

50376
1986
227

50376
1986
227

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

no d'ordre 64

THESE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES

par

Jean François GUERINEAU



ESSAIS DE TRANSFORMATION GENETIQUE DE PROTOPLASTES DE
TABAC PAR DES PLASMIDES ENCAPSULES DANS DES LIPOSOMES

Exemplaire corrigé après avis du jury

Soutenue le 31 octobre 1986 devant la commission d'examen

Président	:	M. GUILLAUME	Professeur
Rapporteurs	:	Mme COUSTAUT	Professeur
		M. TAILLIEZ	Professeur
Examineurs	:	M. RUYSSCHAERT	Professeur
		M. DUBOIS	Maître de Conférences

N° d'ordre :

AVANT-PROPOS

Je remercie Monsieur le Professeur GUILLAUME et Monsieur le Professeur TAILLIEZ de m'avoir accueilli au laboratoire de Microbiologie dont ils assurent la direction, ainsi que Madame le Professeur COUSTAUT qui a accepté avec bienveillance d'être rapporteur de cette thèse. Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur RUYSSCHAERT et à Monsieur DUBOIS de bien vouloir examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude et ma sympathie à Monsieur BECHET qui m'a beaucoup aidé par d'enrichissantes discussions et par les nombreuses techniques qu'il m'a enseignées, à Monsieur EB et à Madame BERTOUT qui m'ont transmis une importante bibliographie et communiqué la méthode d'obtention des protoplastes, à Madame MARY, Madame THINT, Madame BECHET, Monsieur DECQ, qui m'ont apporté une aide quotidienne précieuse.

Je sais gré à Monsieur le Professeur RUYSSCHAERT et Monsieur VANDENBRANDEN, Monsieur le Professeur DHAINAUT et Madame BONET, Monsieur DUBOIS, Monsieur NIEL, Monsieur DEBRAY, Monsieur COLL, Monsieur DEREMAUX, Monsieur PLANCK et Monsieur DEVOISSELLE, de m'avoir fait bénéficier de leurs compétences à différentes étapes de ce travail.

Je remercie également les personnes qui m'ont aidé à la réalisation du mémoire: Monsieur le Professeur TAILLIEZ qui m'a prodigué de nombreux conseils pour la présentation du manuscrit, Monsieur EB et Monsieur BECHET qui y ont apporté des corrections, Madame DELECOURT qui en a effectué une frappe préliminaire, Mademoiselle CLAREBOUT et Mademoiselle DROUJIJINSKY qui ont lu et corrigé la version dactylographiée.

Une part importante de ce travail n'aurait pu être réalisée sans le concours de Monsieur le Professeur VAN MONTAGU et de Monsieur HERRERA-ESTRELLA qui m'ont gracieusement donné les plasmides pLGVneo.

ABREVIATIONS

ANA : acide naphtalène-acétique
Ap : ampicilline
BAP : benzyl amino purine
bp : paires de bases
CaMV : virus de la mosaïque du chou-fleur
CHO : cholestérol
Cm : chloramphénicol
dCTP : désoxyribocytidine tri-phosphate
DCP : di-cétyl-phosphate
DNA : acide désoxyribonucléique
DPM : désintégrations par minute
kbp : kilo paires de bases
Km : kanamycine
L : lécithine
MLV : vésicule multi-lamellaire
neo : néomycine phospho-transférerase
npt : " " "
PC : phosphatidyl-choline
PEG : polyéthylèneglycol
PS : phosphatidyl-sérine
PVP : polyvinylpyrrolidone
REV : vésicule obtenue par évaporation de phase inverse
RNA : acide ribonucléique
SAB : sérum albumine bovine
SEM : microscopie électronique à balayage
SS : sitostérol
St : stéarylamine
T-DNA: DNA transféré
Tc : tétracycline
TCA : acide trichloracétique
TEM : microscopie électronique en transmission

introduction

Il y a environ 10000 ans, en Inde et en Afrique, les premiers pas dans l'agriculture s'accompagnaient aussitôt d'une amélioration des espèces de plantes utilisées alors pour l'alimentation, c'est à dire les céréales, principalement le riz. En effet, les grains ne pouvaient être récoltés pour les semis que s'ils se maintenaient sur les épis après maturation, caractère peu fréquent chez les graminées sauvages. Le maintien des graines sur l'épi fut donc le premier critère de sélection appliqué inconsciemment par les femmes du néolithique (22). Pendant des siècles, le choix des graines pour perpétuer les cultures ne cesse d'accroître la distance génétique entre les plantes cultivées et les espèces sauvages dont elles sont issues. C'est probablement à partir de 4000 av.JC que l'on commença à pratiquer la sélection individuelle, par des croisements empiriques dans le seul but d'améliorer les espèces cultivées. Le critère de sélection était l'abondance de la récolte. Les découvertes de Gregor MENDEL, dans les années 1860, posent les fondements de la transmission des caractères au fil des générations. Ce n'est qu'au début du XX^e siècle que l'exploitation de ces résultats marque le point de départ du développement de la génétique des populations dont HARDY et WEINBERG établissent les lois. La généralisation des techniques de croisement et l'application des concepts de la génétique des populations entraînent un développement considérable des productions végétales au cours du siècle. Un examen attentif de cette progression montre qu'elle est en relation étroite avec l'évolution des pratiques culturelles et de l'incursion de la chimie dans l'agriculture.

L'augmentation de la productivité a malheureusement trop souvent conduit à une dépréciation de la valeur nutritive et de la qualité gustative des produits agricoles qui s'ajoutait à une sensibilité accrue des plantes aux parasites. Ces critères, négligés d'abord devant la nécessité d'adapter les cultures aux techniques agricoles, se sont révélés d'une importance capitale à long terme. Il s'ensuivit, dans les années 70 seulement, une prise de conscience générale des dangers possibles d'une "amélioration" aux objectifs incertains. On se mit alors à rechercher des caractères dans les espèces rustiques de productivité faible, en vue de restaurer dans les variétés cultivées, une diversité génétique qu'une sélection exhaustive avait fait disparaître. Simultanément, la mise en évidence du support biochimique de l'hérédité, le développement rapide des techniques de manipulations génétiques apportaient de nouvelles perspectives qu'encouragèrent bientôt les premiers succès dans l'amélioration des micro-

organismes et leurs applications. En 1983, on parvenait à intégrer des gènes bactériens dans le génome d'une plante. Il s'agit là, non plus d'un brassage génétique intra-spécifique comme dans les croisements classiques, mais d'un apport à la plante de caractères dont certains, comme la fixation de l'azote atmosphérique, pourraient présenter un grand intérêt.

L'importance du choix des objectifs avant l'application des méthodes de sélection variétale vient d'être évoquée. Les conséquences néfastes des impératifs assignés par la société industrielle aux sélectionneurs ont amené ceux-ci à reconsidérer leurs priorités. Les travaux réalisés à ce jour pour l'amélioration génétique des plantes cultivées dans les pays en voie de développement sont peu nombreux. On peut donc envisager autrement la stratégie. Des améliorations pourraient être réalisées dans ces pays où il s'agit non pas de produire des excédents mais d'accéder à l'auto-suffisance alimentaire. L'adaptation des plantes à la sécheresse, à des milieux salins, leur valeur nutritive sont des caractères là-bas plus importants que la couleur ou la forme des fruits. Ils mettent en jeu de nombreux gènes; la sélection variétale par les moyens habituels est pour cela la seule utilisable. Par contre, l'enrichissement d'une espèce de plante en certains acides aminés indispensables, par le transfert d'un gène codant pour une protéine riche en ces acides aminés, ne peut être obtenu que par la mise en œuvre des techniques récentes de manipulations génétiques; de même l'obtention de variétés résistantes à des parasites. Une poursuite de l'amélioration des plantes par les moyens éprouvés peut maintenant être menée de pair avec le développement, au niveau fondamental, de méthodes que nous qualifierons de "non conventionnelles". La revue de ces méthodes fera l'objet de notre étude bibliographique, ainsi que quelques aspects de la biologie moléculaire des plantes. Nous exposerons ensuite nos travaux concernant le transfert d'un gène dans des protoplastes et la régénération de plantes entières.

BUT DU TRAVAIL

Au moment où commence cette étude, aucune méthode ne permet la transformation de protoplastes par des petits plasmides vecteurs. Des gènes hybrides constitués du promoteur du gène nos d'Agrobacterium tumefaciens et des gènes nptII et cat viennent d'être construits (113). Une étude réalisée au laboratoire par L. CASSIER (38) a montré qu'une dégradation importante du DNA s'opère au contact de protoplastes. Par ailleurs, les travaux de LURQUIN réalisés depuis 1979 démontrent l'effet protecteur des liposomes sur le DNA lors de l'incubation avec les protoplastes. Notre travail va consister à définir les conditions d'utilisation des liposomes pour le transfert de gènes dans des protoplastes de mésophylle de tabac.

étude bibliographique

Une méthode de transformation génétique des plantes a été mise au point par l'utilisation d'une bactérie phytopathogène, Agrobacterium tumefaciens. Une autre voie pourrait faire intervenir le virus de la mosaïque du choux-fleur (CaMV).

Ces deux approches seront d'abord présentées, puis suivra une revue des réalisations et perspectives offertes par les fusions de protoplastes de cellules végétales, dans l'optique de l'amélioration et de la génétique des plantes. Après une revue des méthodes de transformation génétique des protoplastes, quelques aspects de la biologie moléculaire des plantes seront évoqués.

I. - LES MICRO-ORGANISMES VECTEURS DE GENES DANS LES PLANTES

A. - Agrobacterium tumefaciens

1. - Mise en évidence d'un plasmide de virulence

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie phytopathogène provoquant l'apparition sur les tiges de dicotylédones d'excroissances tumorales appelées "crown galls" (254). En 1974, SCHELL et al. mettent en relation l'activité tumorigène de la bactérie et la présence d'un plasmide de grande taille qu'ils appellent "Ti-plasmid" (tumor inducing) (300). L'implication de cet élément génétique est confirmée peu après (280, 289). MOREL et al. avaient remarqué que le développement des crown-galls sur la plante était concomitante avec l'apparition dans les tumeurs de composés particuliers, voisins des acides aminés, les opines. Ils mirent en évidence deux principaux types d'opines : octopine et nopaline. Les bactéries du genre Agrobacterium sont capables d'utiliser l'un ou l'autre de ces composés comme seule source de carbone et se classent ainsi en deux groupes taxonomiques (224). Une relation était donc déjà démontrée entre des manifestations biochimiques dans les tumeurs et les capacités cataboliques des bactéries. Une poursuite de l'étude des plasmides Ti prouve leur implication dans le catabolisme et la synthèse des opines (23). Dès lors, un modèle se dessine, celui du transfert et de l'expression dans la plante du plasmide de virulence (Ti) ou de certains de ses gènes. Des études génétiques intensives de ce plasmide réalisées

grâce à l'évolution rapide des méthodes d'investigation, aboutirent à la démonstration de l'intégration dans le génome nucléaire végétal d'un fragment du plasmide Ti, le T-DNA (transferred DNA) (40, 239, 271). On perçoit alors la possibilité d'utiliser la bactérie comme vecteur de gènes dans la plante (111).

2. - Organisation génétique du plasmide Ti et transfert du T-DNA

Les différents types de plasmides Ti, d'une taille de 160 à 240 kb (kilo-paires de bases) possèdent tous deux régions essentielles à l'infectivité des bactéries. Une région responsable de la virulence appelée "vir" et le T-DNA qui s'intègre et s'exprime dans les cellules végétales. Des études ont été conduites pour localiser et identifier les gènes de ces deux zones. D'autres régions des plasmides Ti codent pour les enzymes nécessaires au catabolisme des opines (238).

La région vir, d'une taille de 30 kb est essentielle au déclenchement de la tumorigénisation. Des mutations par insertion de transposons dans cette zone entraînent le plus souvent la perte de l'infectivité (208). Toutefois, certaines d'entre elles ne font que la restreindre à quelques espèces de plantes (168). La même technique a permis d'abord de distinguer dans le pTi A6, cinq loci désignés par vir-A à vir-E (147), puis un sixième, vir-O (116). D'autres ont été ensuite localisés (122). Des mutations dans les régions vir-A et vir-C entraînent une modification du spectre d'hôte des bactéries (298). Le gène vir-E, qui n'est pas nécessaire au transfert du T-DNA (87), serait impliqué dans le processus d'intégration du T-DNA dans le génome de la plante. A l'exception d'un gène impliqué dans la synthèse de l'acide indol-3-acétique (166), aucun rôle biologique précis n'a été attribué aux gènes de la région vir bien que quatre protéines aient été mises en évidence (103). Une région de 5 kb provenant d'une souche synthétisant l'octopine est capable d'induire dans des tissus de Kalanchoe, la synthèse de nopaline par une souche en produisant habituellement très peu (220). Cette région serait l'homologue de la région vir-F décrite par d'autres auteurs (122). Une mutation dans un locus chromosomique, appelée ros a été démontrée être responsable de l'activation de deux gènes de la région vir du plasmide Ti (44). Ce gène chromosomique agirait en levant une répression exercée sur les gènes vir.

On ne sait si certains gènes de la région *vir* s'expriment dans la plante. OKKER et al. (214) ont mis en évidence l'effet inducteur d'une substance végétale, probablement une protéine, sur le gène *vir-C*. L'effet se manifeste au niveau du promoteur du gène. Récemment, des molécules produites par des plantes au niveau de blessures ont été identifiées comme activant l'expression de gènes de la région *vir* (258, 22). Il s'agit de composés phénoliques comme l'acétosyringone ou l' α -hydroxy-syringone intervenant dans la reconstruction des parois des cellules végétales endommagées. Ces molécules présentes dans les exsudats racinaires seraient les signaux reconnus par les bactéries tumorigènes capables de déclencher le processus de virulence. Le fait que l'acétosyringone active l'ensemble des gènes de la région *vir* et que l'activation n'a pas lieu sur les bactéries possédant des mutations dans la région *vir-G* suggère que ce composé active la protéine codée par le gène *vir-G* qui inhiberait ensuite la transcription de l'ensemble des gènes de virulence (258). Ce modèle est confirmé par l'homologie de la protéine codée par le gène *vir-G* avec plusieurs protéines de régulation d'Escherichia coli. La poursuite de ces études devrait apporter des précisions sur les mécanismes de l'infection, la spécificité d'hôte.

La structure du T-DNA est mieux connue. Cette région, que l'on retrouve intégralement dans les tissus végétaux infectés est impliquée dans les manifestations et le maintien de l'état tumoral. Sa taille est d'environ 23 kb. On la subdivise en trois zones : le TL-DNA (gauche), TC-DNA (centrale) et TR-DNA (droite).

Les gènes situés au niveau du TL-DNA des plasmides à octopine peuvent être classés en deux groupes principaux (88, 162). Les premiers sont impliqués dans la suppression de la formation de bourgeons ou de racines dans les tissus tumoraux (*tms* ou *shi*; *tmr* ou *roi*) et les seconds sont responsables de la synthèse de l'octopine (*ocs*). L'étude des plasmides à nopaline montre que la majorité des transcripts sont communs aux deux types de plasmides (291, 136). Le gène nopaline synthase *y* remplace le gène *ocs* dans la partie droite du TL-DNA; il est responsable de la synthèse de la nopaline à partir de l'arginine. Un gène nommé *ons* situé à proximité des gènes *nos* ou *ocs*, serait responsable de la sécrétion des opines (193). Certaines régions du T-DNA interviendraient aussi dans la spécificité d'hôte (299).

Des mutations au niveau des loci tms et tmr entraînent respectivement l'émission de bourgeons et de racines par les tumeurs induites par les bactéries mutantes. L'apparition de ce phénotype est en corrélation avec des modifications de la balance hormonale cytokinine/auxine dans les tissus tumoraux (1) et peut être supprimée par l'addition au milieu de culture, d'hormones (216). Le caractère tumoral des tissus transformés provient donc d'une modification du métabolisme des hormones de croissance. Ceci est confirmé par l'analyse de la structure primaire des protéines codées par les transcripts 1 et 2 du locus tms, après détermination des séquences nucléotidiques des deux régions. L'analogie de la première protéine avec la p-hydroxybenzoate hydroxylase de Pseudomonas fluorescens suggère qu'elle serait capable d'augmenter l'effet de l'AIA en bloquant sa décarboxylation (148). Une autre hypothèse est son rôle dans la synthèse de l'indole-3-acétamine (132,273) alors que la deuxième protéine transformerait ce produit en AIA (242). Cette deuxième hypothèse est confirmée par l'observation de l'accumulation d'indole-3-acétamine dans des plants de tabac transformés par le gène 1 (283) et par l'identité fonctionnelle du gène 1 avec le gène codant pour la tryptophane 2-mono-oxygénase de Pseudomonas savastanoi (71) ainsi que par l'identité du gène 2 avec le gène codant pour l'indole-3-acétamine oxydase de Pseudomonas savastanoi (242,272). D'autres gènes impliqués dans la synthèse de l'AIA sont présents dans la région vir (166).

La détermination de la séquence nucléotidique du TL-DNA a montré que les gènes présents dans cette région possédaient tous les signaux nécessaires à leur transcription par la RNA polymérase II des eucaryotes (149, 91). Les signaux sont, en position 5', une séquence "TATA box" ou "Goldness-Hogness box" localisée entre 25 et 30 bp en amont du codon de départ de la traduction, d'une séquence "CCAAT" précédant la première de 40 à 50 bp. En 3', on trouve des séquences polyadénylées parfois précédées, comme dans les gènes nos et ocs, de l'hexanucléotide "AATAAA" que l'on retrouve en terminaison de la plupart des gènes eucaryotes (30). C'est la structure particulière de ces gènes bactériens qui rend possible leur expression dans la cellule végétale. Ceci pose la question de leur origine. L'homologie constatée entre certaines régions du T-DNA et le DNA d'espèces végétales (290, 84), l'implication de certains gènes dans les voies métaboliques des plantes témoignent en faveur de leur origine eucaryote, à l'image de celle des virus oncogènes.

La séquence complète des 22874 bp du T-DNA d'un plasmide à octopine a été réalisée (8). Elle fait apparaître deux zones de nature eucaryote, le TL-DNA et le TR-DNA et une, le TC-DNA, de nature procaryote. Chacune de ces zones est limitée par des séquences particulières de 24 bp orientées différemment. Les bordures gauche et droite du T-DNA de différents plasmides Ti possèdent des séquences homologues de 10 à 12 bp (295). La bordure droite paraît indispensable au transfert du T-DNA dans la cellule végétale (217). Le mécanisme de ce transfert est encore inconnu. Une analyse des structures du T-DNA observées dans des clones transformés laisse à penser qu'une étape de répllication du T-DNA précéderait son intégration dans le génome de la plante (281). Des séquences situées à l'extérieur du T-DNA pouvant être introduites dans la plante (135), la question du passage du seul T-DNA ou de la totalité du plasmide Ti reste posée.

3. - Transfert d'un gène par le T-DNA

Une première étape pour le transfert d'un gène dans la plante consiste à l'intégrer entre les bordures du T-DNA du plasmide Ti, dans la bactérie Agrobacterium tumefaciens. Le protocole doit contourner les difficultés suivantes : la grande taille du plasmide Ti qui empêche une manipulation directe et l'absence de sa répllication dans E. coli. La méthode suivante peut être utilisée (10) : un fragment du T-DNA possédant un site unique de restriction pour une certaine enzyme est cloné dans un plasmide vecteur courant d'E.coli. Le gène à transférer est lié à un marqueur sélectionnable dans la plante. L'association gène-marqueur est ensuite intégrée dans un plasmide vecteur à large spectre d'hôte, tel le pRK290, capable de transformer A. tumefaciens. La recombinaison entre le T-DNA du plasmide Ti de l'hôte et le fragment homologue du plasmide introduit par transformation s'opère à une basse fréquence. La transformation par un plasmide incompatible avec le pRK290 permet de sélectionner les recombinants, dont le T-DNA possède le gène à intégrer. Une autre méthode évite la nécessité de la recombinaison et joue sur la complémentation "in trans" de la région vir d'un plasmide Ti délété de son T-DNA et du T-DNA véhiculé sur un vecteur par conjugaison d'E.coli à Agrobacterium (117). Une autre méthode est d'utiliser le plasmide Ti pGV3850 qui est délété de ces fonctions oncogènes et qui possède une région homologue au pBR322 entre les bordures du T-DNA (301).

L'étape suivante est le passage à la plante. Il peut s'effectuer sur des organes tissulaires comme des fragments de tige ou dans des cellules isolées. Dans le premier cas, l'infection de petits disques de tige entraîne l'apparition d'une tumeur que l'on peut cultiver. Les manifestations tumorales empêchent la régénération de plantes entières, à moins d'utiliser des bactéries rendues non tumorigènes par des mutations dans le T-DNA. L'insertion du gène à transférer dans le locus tmr a permis ainsi de régénérer des plantes normales à partir de tissus transformés (9, 35).

La transformation de cellules végétales isolées est aussi possible par "co-culture" avec les bactéries Agrobacterium tumefaciens (182, 75). Les cellules transformées prolifèrent, forment des cals qui sont sélectionnés pour leur capacité à se développer sur milieu dépourvu d'hormones de croissance, conséquence de l'expression des gènes bactériens (152). La régénération de plantes à partir de ces tumeurs est corrélatrice de l'utilisation d'un T-DNA délété de ses fonctions oncogènes (301). Toutefois, la greffe des bourgeons d'une tumeur sur une plante normale permet d'obtenir des graines transmettant le T-DNA à la génération suivante (189, 292). Celui-ci est transmis comme un caractère mendélien dominant (219). Toutes ces études, établissant la stabilité du T-DNA dans la plante et même son maintien au cours de la reproduction sexuée, ont été réalisées avec des gènes constitutifs du T-DNA. Parallèlement, des expériences de transfert d'autres gènes intégrés dans le T-DNA n'aboutissaient pas à leur expression dans la plante (33, 9).

HERRERA-ESTRELLA et al. parvinrent, en 1983, à faire s'exprimer dans des tissus de Nicotiana tabacum, les gènes *ocs* et *cat* (chloramphénicol acetyl transférase du pBR325), placés sous le contrôle du promoteur du gène *nos* du T-DNA (113). L'activité des enzymes codées par ces gènes est détectée dans les tissus en culture. L'expression des gènes apportés par le T-DNA n'est donc possible que s'ils sont placés à proximité de signaux transcriptionnels efficaces dans la cellule végétale. Toujours placés sous le contrôle du *pnos*, le gène *aph(3')II* (adénosyl phosphoryl transférase) du transposon 5 conférant la résistance à la kanamycine, le gène *dhfr* (dihydroxyfolate réductase) du Tn7 conférant la résistance au méthotrexate, s'expriment dans les cellules végétales (112, 19, 74). L'utilisation, dans ces expériences, d'un T-DNA

non tumorigène a permis de régénérer des plantes à partir des tissus ou des cellules transformés (54,124). Dans tous les cas cités, le gène introduit est transmis à la descendance comme un caractère dominant. L'intégration du gène de la phaséoline du haricot placé sous le contrôle du promoteur du gène *ocs* aboutit à son expression dans des tissus tumoraux de tournesol (202); par contre, les gènes de l'ovalbumine et de l' α -actine ne s'expriment pas, bien que le premier soit transcrit (150). On voit donc l'importance des signaux de transcription pour l'expression des gènes apportés à la plante et l'intérêt de l'utilisation de la bactérie Agrobacterium tumefaciens pour étudier ce phénomène. Des promoteurs de gènes du T-DNA ont été aussi utilisés pour la construction de petits plasmides vecteurs destinés au transfert de gènes dans les plantes par des méthodes directes ne faisant pas intervenir Agrobacterium (89, 53, 285).

Les premières tentatives d'application pratique sont signalées par VAN MONTAGU (282) et consistent en l'enrichissement du flageolet du Brésil en acides aminés soufrés par l'intégration à son génome, du gène codant pour une protéine de la noix du Brésil. D'autres travaux auraient abouti à l'obtention de plantes résistantes à des herbicides tels que le glyphosate ou l'atrazine (183) mais aucun résultat n'a été publié à ce jour.

Des méthodes simples de transfert de gènes hybrides dans les plantes par Agrobacterium tumefaciens ont été mises au point. Elles s'appliquent à des cellules en culture (2,3) ou à des disques de feuilles (125) à partir desquels la régénération de plantes entières est possible. L'extension des applications de ces méthodes est limitée par les possibilités de régénérer des plantes à partir des cellules ou des tissus en culture et par le spectre d'hôte des bactéries du genre Agrobacterium qui ne s'étend pas au delà des dicotylédones. On signale toutefois les premières réussites de l'expression de gènes du T-DNA dans des monocotylédones (123). La transformation de protoplastes de riz a même été obtenue par co-culture avec Agrobacterium tumefaciens (6).

La figure 1 illustre la possibilité d'utiliser Agrobacterium pour le transfert de gènes dans des cellules ou des tissus végétaux.

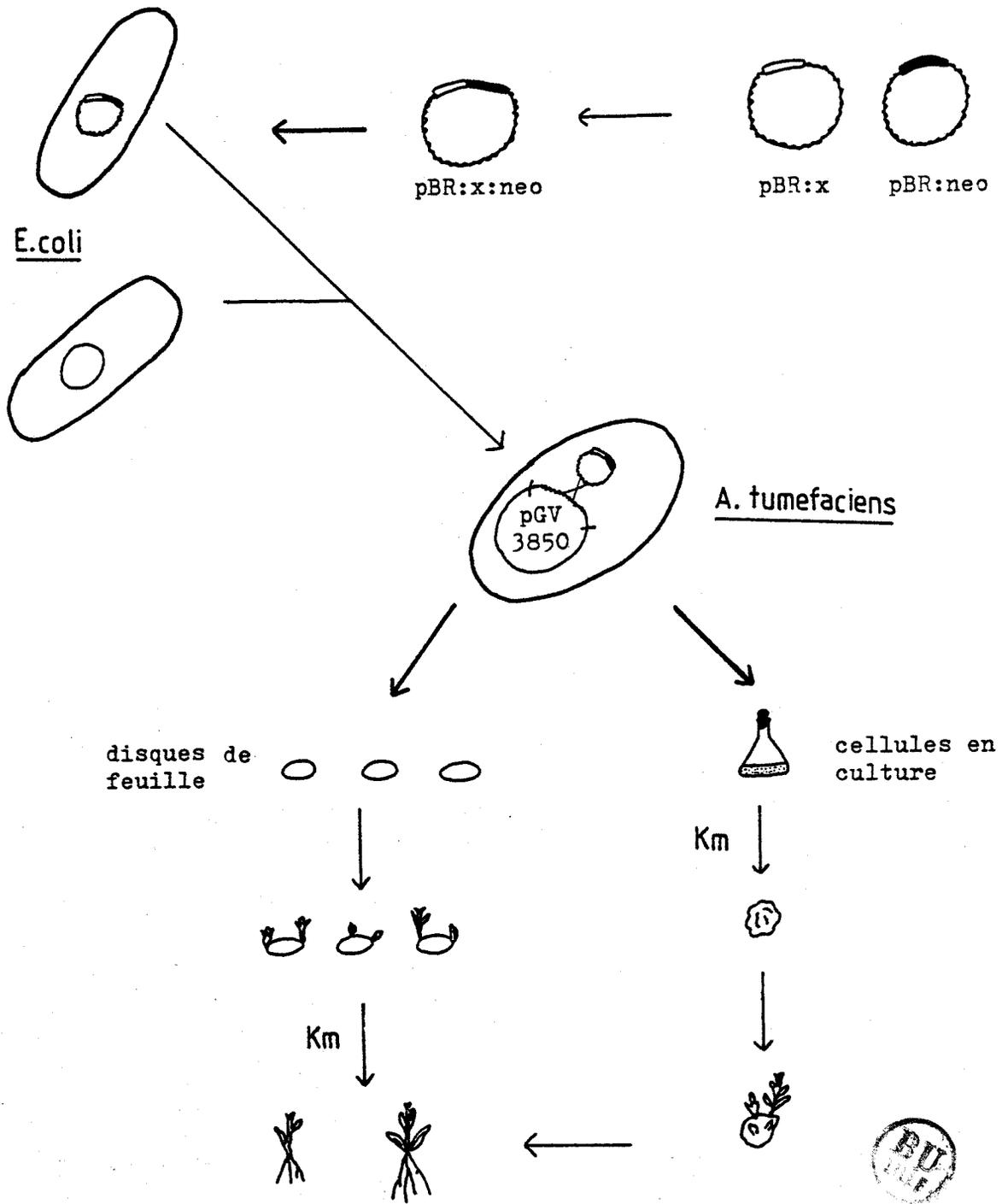
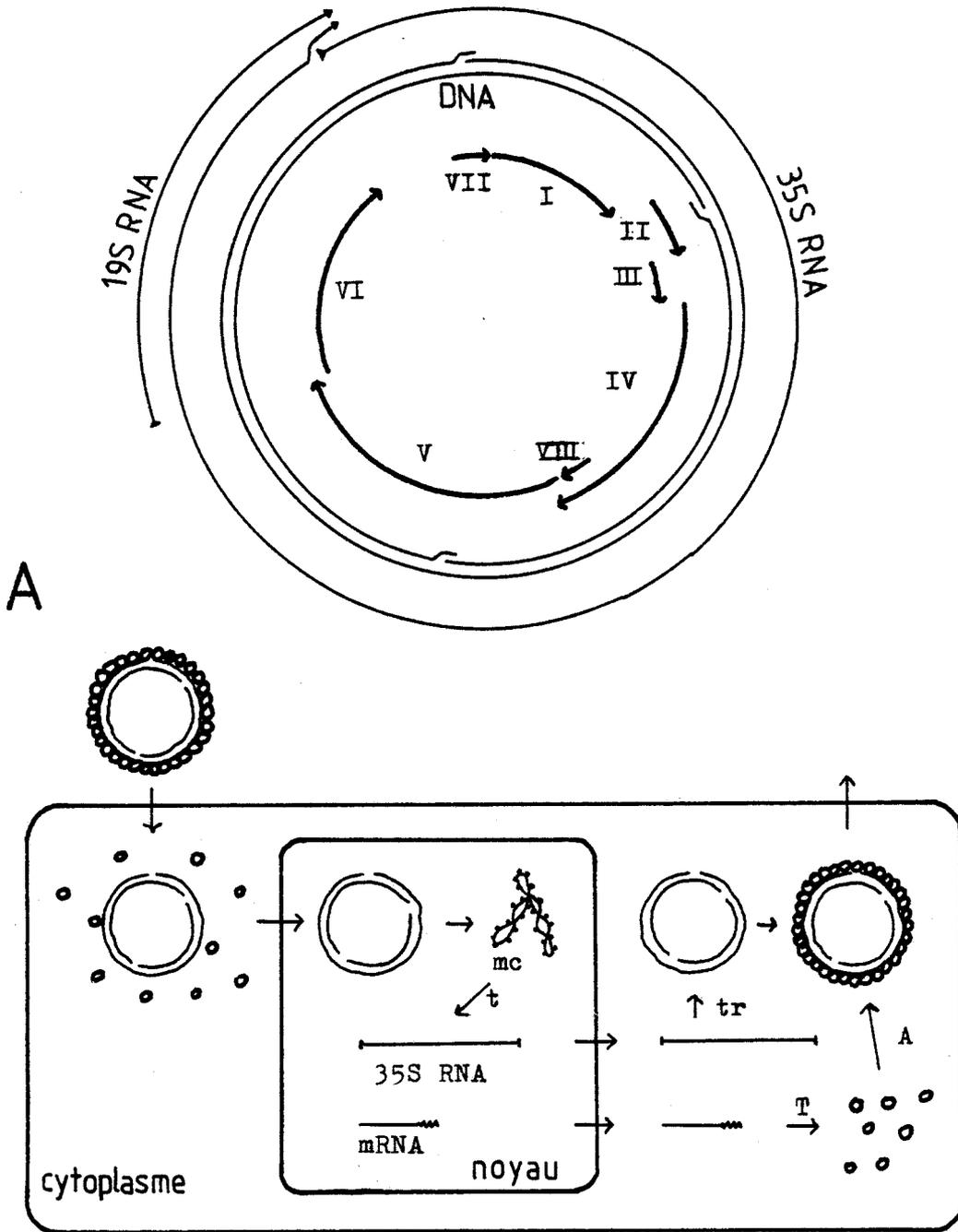


Fig. 1 - Méthodes pour le transfert d'un gène x à une plante par *Agrobacterium tumefaciens*. D'après ZAMBRYSKI et al. (301), FRALEY et al. (75), HORSCH et al. (125).

B. - Le virus de la mosaïque du chou - fleur

Le virus de la mosaïque du chou - fleur (CaMV) est l'un des rares virus des plantes à DNA, c'est pourquoi il a été pressenti comme possible vecteur de gènes. Le génome circulaire, à double brin, a une taille de 8 kb et possède trois discontinuités de quelques bases (286, 231). Il a été cloné dans Escherichia coli (266) et sa séquence nucléotidique déterminée (77, 86). Celle-ci fait apparaître la présence de six régions codantes principales et de deux plus petites. Le génome peut s'organiser sous la forme de "mini-chromosomes" dans la cellule végétale (215, 191). Sa structure est alors proche de celle de la chromatine. L'analyse des RNAs révèle l'existence de deux types principaux : l'un de la taille du génome entier, l'autre de 1,9 kb (47). On trouve également plusieurs autres types, plus petits, polyadénylés (45). L'infection des plantes en culture se fait par incision des feuilles. Les virus se propagent ensuite dans toute la plante. L'infection de protoplastes a été aussi réalisée (126, 297, 186). Le DNA isolé est infectieux ainsi que le DNA cloné, à condition qu'il soit coupé du vecteur (160). Les virus dans la cellule végétale sont inclus dans une matrice, constituée principalement de la protéine P₆₆ codée par le gène VI du virus (293). Celle-ci interviendrait aussi dans les premiers stades de la multiplication du virus (80). Le gène II code pour une protéine nécessaire à la transmission du virus par les aphides (167). La principale protéine de l'enveloppe est codée par une partie du gène IV (77). Des mutations dans toutes les régions codantes, à l'exception de la région II, entraînent la perte de l'infectivité des virus (127). La mise en évidence d'une transcriptase réverse codée par le gène V (287, 155, 268) dans les feuilles infectées, a conduit à envisager le modèle de cycle suivant (225, 131) : après pénétration du virus dans la cellule végétale, le DNA viral parvient au noyau. Il y est transcrit en un grand RNA par la polymérase II. Le RNA passe dans le cytoplasme où la transcriptase réverse catalyse la synthèse d'un brin de DNA. La construction du deuxième brin est suivie de l'encapsidation ou du retour du DNA dans le noyau (figure 2).

L'ensemble des caractéristiques énoncées font que l'on a envisagé d'utiliser le CaMV comme vecteur de gènes dans la plante (128, 119). Un inconvénient par rapport au système utilisant Agrobacterium tumefaciens est la taille limite du fragment inséré qui doit tenir compte de la capacité d'encapsidation du virus. Les premiers essais fixèrent cette



B



Fig. 2 - Le virus de la mosaïque du chou-fleur. D'après HULL et COVEY (131). A. - Organisation génétique. Les régions codantes sont numérotées de I à VIII. B. - Cycle de multiplication dans la cellule. A : assemblage; mc : mini-chromosome; T : traduction; t : transcription; tr : transcriptase réverse.

limite à environ 250 bp (99). D'autre part, le DNA viral ne s'intègre pas dans le noyau, empêchant ainsi la transmission d'un gène au delà de la méiose, donc son maintien dans la descendance. La spécificité d'hôte est limitée à certaines espèces de crucifères. L'expression du gène *dhfr* du plasmide R67 d'E. coli a été néanmoins obtenue après transmission à la plante par le CaMV (31). Ce gène a été inséré après déletion totale de la région codante II du virus. La synthèse de l'enzyme est détectée dans les feuilles mais l'expression du gène s'efface après plusieurs cycles d'infections sans doute à cause de réarrangements dans le DNA viral.

Le promoteur du gène VI (227, 7) et le promoteur 35S (209) du CaMV ont été utilisés pour la construction de gènes hybrides capables de s'exprimer dans la cellule végétale. L'intérêt des virus pour le transfert de gènes dans les plantes apparaît limité à certains auteurs à cause des fréquences d'erreur élevées mesurées lors de la réplication du RNA viral (284). Cependant, le gène bactérien *cat* s'exprime fortement dans des cellules de céréales après son transfert par des RNAs messagers synthétisés dans E. coli à partir des cDNA des RNA du "brome mosaic virus" (BMV) (79). Ceci montre que des virus à RNA peuvent être aussi utilisés pour le transfert de gènes.

II. - LES PROTOPLASTES COMME OUTIL GENETIQUE

A. - Intérêts et limites de l'utilisation des protoplastes

Les protoplastes obtenus à partir de tissus végétaux sont des cellules isolées et dépourvues de paroi. De ce fait, leur relation avec le milieu extérieur devient plus étroite et la seule barrière subsistant est la membrane cytoplasmique. Les méthodes de transfection utilisées pour les cellules animales deviennent donc envisageables. Des fusions cellulaires sont aussi possibles. La capacité de cultiver simultanément un nombre élevé de cellules permet d'appliquer des techniques microbiologiques comme la sélection de mutants. Outre les possibilités nouvelles pour l'étude de la physiologie de la cellule végétale, par exemple la formation de la paroi, l'isolement de composants cellulaires (85), l'intérêt majeur des protoplastes en culture est leur

propriété de former des colonies tissulaires, des cals puis des plantes entières, manifestations de la totipotence cellulaire. La régénération de plantes entières ne concerne encore que peu d'espèces localisées surtout dans la famille des Solanacées. Dans d'autres familles, la carotte, le tournesol, l'endive, le chou, etc..., ont aussi été régénérés. Les plantes de grande culture comme les céréales et beaucoup de plantes utilisées dans l'alimentation humaine ne sont pas actuellement régénérables. L'obtention de protoplastes est parfois même impossible. Aucune importante variété de plante née de la culture de protoplastes n'a encore été produite. Ceci n'en incombe pas seulement aux difficultés d'étendre les techniques de culture in vitro à de multiples espèces, mais aussi au manque de perspectives pratiques encore offertes par l'application des méthodes de transformation génétique aux protoplastes. Ces méthodes, que l'on commence à développer, comprennent l'isolement de mutants, les fusions somatiques et toutes les techniques de transfection, que nous évoquerons dans la quatrième partie et auxquelles on peut ajouter l'utilisation des microorganismes traitée précédemment.

B. - Isolement de mutants

La possibilité de maintenir en culture un grand nombre de cellules permet d'appliquer une sélection massale de mutants apparaissant à des fréquences faibles (180). Le taux de mutations spontanées pour un caractère monogénique ne dépasse jamais 10^{-5} (178). On peut toutefois augmenter ce taux jusqu'à 10^{-3} par des traitements aux agents mutagènes (27). L'état diploïde de la cellule végétale ne permet pas de sélectionner directement les mutants récessifs. Ce handicap peut être levé par l'emploi de lignées haploïdes obtenues à partir de cultures d'anthers. Le terme de mutant ne doit être retenu que pour les variants transmettant le caractère muté à leur descendance. On peut alors déterminer si le caractère apparu est dominant, récessif, ou intermédiaire, ou s'il est transmis par voie maternelle. Dans le cas où la variation n'est pas héréditaire, il s'agit de phénomènes épigéniques. Un autre problème réside dans le maintien du caractère muté, au cours de la régénération. L'expression au niveau cellulaire s'efface parfois au cours du passage à la plante entière.

Les premiers mutants ont été des lignées auxotrophes de Nicotiana tabacum (36). Par la suite, ont été isolées des cellules résistantes à certains acides aminés comme la valine (26), la lysine et la thréonine (115), ou à des antibiotiques comme la streptomycine (50), la lincomycine (179). L'étendue des applications agronomiques est limitée par la possibilité de sélectionner les mutants. De plus, la plupart des caractères intéressants mettent en jeu de nombreux gènes; leur modification ne peut être obtenue simultanément. Toutefois, des lignées résistantes à un agent pathogène peuvent être sélectionnées par mise en contact avec la toxine responsable. C'est à partir de cultures de tissus que furent obtenus des plants de maïs résistants à Helminthosporium maydis, champignon pathogène (90). Des plantes résistantes à des herbicides tels que le picloram ont été aussi obtenues (39) mais le principal intérêt de l'obtention de lignées mutantes réside dans la possibilité de les utiliser dans des expériences de fusion de protoplastes. On possède alors des caractères marqueurs qui permettent de sélectionner plus facilement les produits de fusion (28).

C. - Les fusions de protoplastes

La reproduction sexuée des plantes assure l'hétérogénéité à l'intérieur des espèces. Il existe entre deux plantes d'espèces différentes des barrières d'incompatibilité qui empêchent leur reproduction par la voie sexuée. La fusion somatique de cellules de plantes d'espèces différentes permet de lever certaines de ces barrières et par là même ouvre la voie à la transmission de caractères d'une espèce à une autre.

Selon le type de fusion, on désigne par hybride ou cybride le produit obtenu. Un hybride résulte du maintien des chromosomes des deux espèces au cours des divisions de la cellule issue de la fusion. Cet état est très instable et on assiste à des translocations ou des éliminations de chromosomes au cours de la régénération des plantes. De plus, l'obtention d'hybrides possédant les génomes complets des deux plantes est très rare. Les cybrides proviennent d'une combinaison nouvelle noyau-organites cytoplasmiques. On y trouve le génome nucléaire de l'une des espèces associé aux chloroplastes et aux mitochondries de l'autre ou à l'un des deux types de ses organites seulement. L'intérêt de ces cybrides est le transfert d'une espèce à l'autre de l'infor-

mation génétique des organites.

La mise au point d'une technique de fusion utilisant le polyéthylène-glycol (PEG) pour établir le contact entre les protoplastes en suspension et la dilution par une solution au pH élevé et riche en ions calcium entraînant la fusion des membranes s'est avérée applicable à de nombreuses espèces (138). Ainsi, des hybrides interspécifiques ont été obtenus dans les genres Datura (241), Nicotiana (65, 278), Petunia (229), Solanum (20), Daucus (62), Brassica (240). On remarque que les genres cités sont ceux dans lesquels la régénération de plantes entières est possible; en effet, la régénération d'un hybride n'est réalisable que si l'est celle de l'une au moins des deux espèces dont il est issu. Dans la plupart des cas, la morphologie des plantes hybrides régénérées est intermédiaire et bien qu'elles soient le plus souvent stériles, leur croisement avec l'une ou l'autre des espèces est parfois possible. Cette possibilité dépend de la distance taxonomique entre les groupes. Ainsi, les hybrides intergénériques sont plus difficilement régénérables et sont toujours stériles. Des plantes issues d'hybridations somatiques entre les genres Arabidopsis et Brassica (95), Lycopersicon et Solanum (188), Nicotiana et Petunia (164), Daucus et Aegopodium (63) ont été obtenues.

La stabilité des hybrides issus de fusions de protoplastes étant très aléatoire, les applications en sont limitées. Toutefois, une technique récente consistant en l'irradiation aux rayons ultra-violets des cellules de l'une des espèces assure le transfert d'une quantité faible d'information génétique, qui provoque de ce fait moins de perturbations chez le receveur. Ainsi la fusion de cellules albinos de Datura avec des cellules irradiées de Physalis a permis de restaurer de manière stable la synthèse de chlorophylle dans les hybrides régénérés. Moins de 10% de l'information génétique de Physalis ont été ainsi transférés dans les cellules de Datura (102). Cette méthode, en évitant les incompatibilités somatiques apparaissant lors d'un trop grand mélange des génomes, revêt un plus grand intérêt.

L'obtention de cybrides, en respectant l'intégrité du génome nucléaire, résulte en le transfert de caractères d'origine cytoplasmique intéressants (246). La méthode consiste à irradier les cellules de l'une des espèces aux rayons X (302). L'intégralité du génome nucléaire de l'autre

espèce est ainsi conservée dans les produits de fusion. Seuls les organites cytoplasmiques lui sont transmis durablement. Des recombinaisons entre les DNAs mitochondriaux peuvent intervenir (14) alors qu'un tel évènement n'a jamais été signalé dans le DNA chloroplastique (69). Le caractère "mâle stérile" intéressant pour la sélection variétale est porté par le DNA mitochondrial dans de nombreuses espèces (66). La résistance à certains parasites, antibiotiques, herbicides est plutôt d'origine chloroplastique (259,190). Tous ces caractères peuvent donc être transférés par fusion de protoplastes à condition qu'il n'y ait pas d'incompatibilité entre le génome nucléaire du receveur et les organites qui lui sont transmis. De tels phénomènes sont d'autant plus fréquents que la distance taxonomique entre les deux espèces est grande.

III. - LES LIPOSOMES POUR LA TRANSFECTION DES PROTOPLASTES

A. - Qu'est-ce qu'un liposome?

Un liposome est une entité vésiculaire lipidique élaborée par l'expérimentateur, remarquable par sa capacité à piéger des organites ou des molécules, par son atoxicité et par sa bio-dégradabilité. De sa composition en lipides dépend sa charge. Chaque lipide est caractérisé par une température de transition de phase à laquelle il passe de l'état de gel à l'état cristallin liquide. La fabrication des liposomes doit être effectuée à une température supérieure aux températures de transition de phase des lipides utilisés.

La taille et la structure des liposomes dépendent de leur mode de fabrication. Les liposomes de type MLV (multilamellaires) et de type LUV (unilamellaires) ont été utilisés pour l'encapsulation d'acides nucléiques (118, 174). La méthode de préparation des liposomes de type MLV consiste à déposer au fond d'un tube une mince couche de lipides, par évaporation du solvant dans lequel ils sont dissous. Après addition de la solution d'acides nucléiques, une agitation entraîne la formation de vésicules multilamellaires. La taille des MLV obtenus par cette méthode simple est de 1 à 5 μm de diamètre. La phase aqueuse est emprisonnée entre les feuilletts de lipides. Les liposomes de type LUV peuvent être obtenus par diverses méthodes comme celles de la chélation calcium-

EDTA, l'injection d'éther, la dialyse de détergent, mais la méthode la plus utilisée pour l'encapsulation de DNA est celle dite "de phase inverse" mise au point par SZOKA et PAPAHAJDOPOULOS (267) qui forme des liposomes appelés REV. Aux lipides dissous dans un solvant organique, le plus souvent l'éther, est ajoutée la solution de DNA. L'ensemble est soumis aux ultrasons pendant une courte période, ce qui produit une phase de dispersion homogène dans laquelle de petites gouttes de phase aqueuse sont stabilisées par une couche de phospholipides, formant ainsi des "micelles inversées". Le solvant est ensuite évaporé sous vide. Il se forme un gel par le rapprochement des micelles inversées. La poursuite de l'évaporation du solvant entraîne la destruction d'une partie des micelles dont les phospholipides se disposent autour des micelles inversées intactes, générant ainsi des vésicules constituées d'une bi-couche de phospholipides. La taille moyenne des liposomes de type REV est de 0,4 μm et le pourcentage de phase aqueuse encapsulé est de 20 à 40%.

Les molécules encapsulées dans un liposome vont être véhiculées par lui jusqu'à sa dislocation. Jusque là, les molécules auront été isolées du milieu extérieur et protégées par la couche lipidique.

B. - Intérêt pratique des liposomes pour la transfection

L'apport de DNA exogène à des plantes a d'abord été tenté par incubation des graines dans des solutions de DNA (161). Les auteurs concluaient à l'intégration de fragments de DNA bactériens dans les plantules issues des graines traitées. Ces conclusions furent réfutées par d'autres (16) qui démontrèrent l'implication possible de contaminants bactériens dans le déroulement de l'expérience. Par la suite, le développement des cultures de protoplastes a conduit à rechercher des techniques de transfection.

Les premiers essais se heurtèrent à la mise en évidence de la pénétration du DNA dans les cellules (213). La différence de densité entre le DNA de la plante et le DNA bactérien permet de repérer celui-ci. On peut aussi utiliser du DNA marqué par un isotope radioactif mais ces méthodes ne distinguent pas le DNA pénétré dans la cellule de celui simplement adsorbé sur la membrane cytoplasmique. L'isolement de noyaux pour mettre en évidence la pénétration (165) n'est pas non plus fiable

car on ne peut exclure une redistribution du DNA au cours de la procédure d'extraction. On signale aussi la forte contribution des protoplastes endommagés dans l'évaluation de la quantité de DNA délivré (129).

Un autre problème est la présence de nucléases environnant les protoplastes qui peuvent dégrader fortement le DNA exogène (120). L'utilisation des polycations comme la poly-L-ornithine (PLO) assure une protection contre les DNases extracellulaires en même temps qu'elle augmente l'adsorption du DNA sur la membrane (38, 13). La substitution de plasmides au DNA linéaire permet de mieux évaluer l'étendue des dégradations causées par les nucléases et de leur offrir une plus grande résistance (171). On constate que des coupures sont opérées dans les plasmides mis au contact de protoplastes (68). On doit donc avoir recours à un autre moyen de protection. L'encapsulation du DNA dans des vésicules lipidiques ou liposomes est apparue comme une bonne solution à ce problème (172). Il fallait alors étudier les conditions optimales d'utilisation des liposomes pour le transfert de gènes dans les protoplastes. La transformation de protoplastes de Petunia par le plasmide Ti a néanmoins été obtenue sans l'aide de liposomes par DAVEY et al. (52) et KRENS et al. (152).

C. - Les interactions liposomes-protoplastes

La méthode la plus utilisée pour l'optimisation de l'interaction protoplastes-liposomes a été l'encapsulation de plasmide marqué par un isotope radioactif et la mesure de la radioactivité liée aux protoplastes après incubation avec les liposomes. Ainsi, on a mis en évidence l'influence de la composition en lipides des liposomes (159), du milieu d'incubation (277), de la présence de PEG (176) etc... Cependant, la validité de la méthode est limitée par le fait qu'elle ne différencie pas les liposomes qui pénètrent dans le cytoplasme de ceux seulement adsorbés sur la membrane plasmique. L'intérêt de la mesure de la radioactivité liée aux noyaux après leur extraction est aussi discutable (173).

Un progrès consiste en l'encapsulation de substances fluorescentes dans les liposomes et le comptage des protoplastes fluorescents après incubation (276, 175, 51). Une méthode plus sûre encore est l'autoradio-

graphie qui permet de situer exactement les liposomes contenant un plasmide marqué, après incubation avec les protoplastes. On a pu ainsi soupçonner deux modes d'interaction différents **aux** MLV et **aux** REV; les premiers libérant leur contenu dans la cellule par diffusion à partir de l'extérieur, les seconds pénétrant dans le cytoplasme (177). L'entrée de MLV dans le cytoplasme a néanmoins été observée (234). Une étude ultrastructurale a mis en évidence l'entrée de liposomes de type REV dans les cellule par endocytose (83). La protection des acides nucléiques par les liposomes durant l'incubation a été confirmée (277,185,210) ainsi que l'effet toxique de ceux-ci (174). Toutes ces études ont abouti à l'établissement des conditions générales assurant la libération de DNA dans le cytoplasme des protoplastes. Cependant, leur adaptation à différentes espèces et leur affinage ne pouvaient être réalisés que grâce à la mise en évidence de l'expression d'acides nucléiques dans des cellules en culture.

L'utilisation de RNA de virus de plantes dont les produits de la traduction pouvaient être détectés par immunofluorescence, a été d'un grand intérêt pour préciser les conditions d'incubation assurant la libération optimale d'acides nucléiques dans les cellules. Ainsi, NAGATA et al. (206) et FUKUNAGA et al. (82) parvinrent à obtenir 60 et 80% de protoplastes infectés par du RNA de virus de la mosaïque du tabac. La même technique fut utilisée avec le virus de la rosette du navet (235). La détection peut se faire aussi par dosage radioimmunologique du virus produit après quelques jours de culture (73). Une telle méthodologie est **intéressante** pour définir les meilleures conditions d'incubation avant les essais en vue de l'expression de DNA (76). C'est aussi ce qui fut réalisé par ROUZE et al. (237) et peu après, cette équipe obtenait l'expression dans des protoplastes de mésophylle de tabac, d'un gène hybride constitué du promoteur du gène nos d'Agrobacterium et de la région codante du gène de résistance à la kanamycine issue du transposon Tn5. La fréquence de transformation est approximativement de 4.10^{-5} et les microcals sont sélectionnés directement sur milieu contenant de la kanamycine (34, 59).

IV. - AUTRES METHODES DE TRANSFECTION DES PROTOPLASTES

La transfection des cellules animales est couramment réalisée par deux méthodes. La première utilise un coprécipité DNA-phosphate de calcium (98), l'autre un traitement au DEAE dextran/DMSO (265). La microinjection de DNA dans des oocytes fécondés est également très utilisée (144). Récemment, une méthode comportant un traitement au PEG initialement mise au point pour la transformation des bactéries et des levures (145) a été adaptée à la transfection de cellules animales (146). Le transfert de gènes par impulsions électriques (260) et par laser (154) a été depuis peu réussi. Les fréquences de transformation varient selon les méthodes et le type de cellules utilisé; elles peuvent atteindre 10^{-2} (97).

Les premières méthodes de transformation de protoplastes ont été mises au point avec le plasmide Ti (152, 52) à une époque où il n'existait pas de gènes marqueurs utilisables dans les cellules végétales. La méthode de KRENS et al. (152) a été adaptée quelques années plus tard pour la transformation de protoplastes de tabac (222, 227) et de céréales (228, 169) par des petits plasmides vecteurs. Les fréquences de transformation sont de 10^{-6} à 10^{-5} . Des modifications apportées à cette méthode ont permis d'augmenter la fréquence de transformation jusqu'à 10^{-3} (288). La méthode du coprécipité DNA-phosphate de calcium appliquée à des protoplastes de mésophylle de tabac donne une fréquence supérieure à 10^{-5} (105).

Une comparaison des méthodes de transformation de protoplastes par un plasmide isolé, encapsulé dans des liposomes ou véhiculé par des sphéroplastes bactériens a été réalisée en mesurant l'intensité des signaux d'hybridation du plasmide avec le DNA extrait des protoplastes après les traitements (78). Les protocoles d'incubation ont été adaptés pour qu'au moins 50% des protoplastes survivent aux traitements. Les résultats présentés montrent que plus de 500 copies du plasmide sont liées à chaque protoplaste quand ceux-ci sont incubés avec le plasmide libre ou encapsulé dans des liposomes et 300 copies après incubation avec des sphéroplastes d'E. coli portant le plasmide non amplifié. Cette valeur passe à 6500 quand le plasmide est amplifié. Les interactions protoplastes-sphéroplastes bactériens ont été étudiées (184, 106) et la transformation de protoplastes a été réussie en

utilisant des sphéroplastés d'E. coli possédant un dimère du génome du CaMV (269) et des sphéroplastés d'A. tumefaciens (104). Dans le premier cas, la fréquence de transformation de 8% a été déduite d'expériences d'immunofluorescence mettant en évidence la synthèse de protéines virales après trois jours de culture des protoplastes traités. Dans le second cas, la fréquence de 10^{-4} indique le taux de colonies tissulaires capables de se développer sur milieu dépourvu d'hormones de croissance, conséquence de la transformation par le T-DNA.

Récemment, l'électroporation, qui consiste à soumettre les protoplastes en présence de DNA à une impulsion électrique, a conduit à la transformation de protoplastes de diverses espèces dont le maïs (80, 81). La fréquence de transformation obtenue par cette méthode semble être plus élevée que par les méthodes citées précédemment (15). L'électroporation a été aussi utilisée pour transformer des sphéroplastés de levures (140), des cellules entières de levures (108) et des cellules végétales entières (200). Des microinjections de DNA peuvent aussi aboutir à l'intégration de gènes étrangers dans le génome de protoplastes (49).

Une augmentation de la fréquence de recombinaison homologue dans les cellules animales est observée quand le plasmide introduit est coupé par une enzyme de restriction au niveau de la région homologue qu'il porte (153,256). Cependant, l'insertion d'un gène dans un locus précis du génome n'est obtenu que dans un transformant sur mille après transformation par un plasmide possédant le gène homologue (255). Dans le domaine végétal, la transformation de protoplastes synchronisés au stade cellulaire M par de l'aphidicoline est obtenue à une fréquence mille fois supérieure à celle de protoplastes non synchronisés (194).

Les résultats mentionnés ci-dessus montrent que la transformation directe de protoplastes peut maintenant être réalisée par différentes méthodes qui en font un outil utilisable pour l'étude des régulations génétiques des plantes. Des améliorations peuvent probablement encore être apportées pour augmenter les fréquences de transformation.

V. - STRUCTURES ET REGULATIONS GENETIQUES DES PLANTES

Les plantes ont comme tous les eucaryotes une fraction de leur génome située dans les organites cytoplasmiques. Le génome mitochondrial des plantes est très mal connu. Les premières études montrent que des réarrangements fréquents lui donnent une structure très polymorphe et qu'il est souvent constitué d'une population de molécules circulaires qui sont parfois des polymères de plasmides de 1 à 2 kb (167). Le génome chloroplastique est mieux connu. Il est impliqué dans le processus fondamental de l'utilisation de l'énergie lumineuse par les plantes. La structure et les fonctions du DNA chloroplastique seront d'abord présentées puis suivra une revue des récentes études de la régulation de la transcription par la lumière.

A. - Le DNA chloroplastique

Le DNA chloroplastique a chez la plupart des espèces de plantes une taille comprise entre 120 et 160 kb et une conformation circulaire (221). Le DNA chloroplastique des plantes supérieures possède le plus souvent deux séquences répétitives inversées séparées par une région de petite taille et une région de grande taille présentes en une seule copie.

L'organisation génétique du DNA chloroplastique semble avoir été hautement conservée au cours de l'évolution (221). La carte génétique du génome chloroplastique d'épinard est portée sur la figure 3. Il est à noter que des gènes sont situés sur les jonctions entre les séquences répétitives et les séquences uniques (303). C'est aussi le cas des gènes du tRNA^{His} et du rRNA 16S chez le tabac (263). En plus des gènes mentionnés sur la figure 3, la plupart des gènes codant pour les tRNAs des chloroplastes ont été localisés (211, 17). La séquence d'un grand nombre de ces gènes a été établie (245). Il apparaît que la majorité des gènes codant pour des tRNAs ne possèdent pas d'intron(212). Cependant, les gènes du tRNA^{Lys}(UUU) et du tRNA^{Leu} du tabac possèdent respectivement des introns de 2,5 kb et 0,5 kb (264, 296).

Trois régions capables de promouvoir la réplication autonome chez la levure ont été localisées dans le DNA chloroplastique de Petunia (56). L'une de ces régions présente une homologie avec la séquence présumée être l'origine de réplication du DNA chloroplastique de l'euglène et du tabac. Ces régions sont constituées d'une séquence d'environ 100 bp très riche en bases A-T qui peut former grâce à des séquences inversées des structures en "épingle à cheveux", juxtaposée à une zone riche en bases C-G.

Une particularité dans la structure du gène codant pour la protéine ribosomale S12 a été observée chez le tabac. La partie 3' du gène se trouve dans les séquences inversées du génome chloroplastique et possède un intron de 540 bp alors que la partie 5' se trouve dans la grande région unique, à 30 kb en aval de la partie 3' (275).

L'analyse des introns présents dans différents gènes du DNA chloroplastique a permis d'ajouter un troisième groupe d'introns (250) aux deux groupes déjà décrits (196). Les séquences proximales et terminales des introns appartenant à ce troisième groupe sont proches de celles des gènes chloroplastiques de l'euglène et des gènes codant pour les protéines nucléaires.

Le gène codant pour le rRNA 16S chez le tabac possède deux promoteurs (163). Alors qu'un seul semble utilisé in vivo, les deux sont reconnus par la RNA polymérase d' E.coli au cours d'essais in vitro.

La position des gènes codant pour les différentes sous-unités de l'ATPase des chloroplastes des plantes supérieures est intéressante à comparer avec celle observée chez E.coli. Chez les plantes, cinq sous-unités sur les huit constituant les deux parties de l'ATPase sont codées par le DNA chloroplastique. Leur ordre dans le génome du tabac est le même que celui des sous-unités correspondantes chez E.coli avec un espace de 120 kb intercalé entre les gènes codant pour les sous-unités α et β (58). La séquence des acides aminés de la sous-unité I de l'ATPase de tabac possède 78% d'homologie avec celle du blé et environ 18% avec la sous-unité b d'E.coli (249). Les structures secondaires de ces protéines semblent identiques chez le blé et chez E.coli.

Les promoteurs des gènes du DNA chloroplastique fonctionnent chez E.coli (151). Des mutations ponctuelles dans les zones en position -35 et -10 du gène codant pour la sous-unité β de l'ATPase entraînent des modifications de la transcription in vitro identiques selon que la RNA polymérase chloroplastique ou d'E.coli est utilisée (29). La séquence d'autres gènes chez d'autres espèces a aussi abouti à la conclusion que les signaux régulant la transcription des gènes chloroplastiques sont très voisins de ceux des organismes procaryotes (248, 101). Ceci est un indice en faveur de la théorie endosymbiotique.

Les gènes codant pour la plupart des protéines fonctionnelles dans les chloroplastes sont situés dans le noyau. Il a été montré que ces protéines sont synthétisées dans le cytoplasme sous la forme de précurseurs constitués de la protéine liée à un peptide appelé "peptide de transit" qui est capable de transférer la protéine fonctionnelle dans les chloroplastes. Le peptide de transit de la petite sous-unité de la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (rbc S), de la protéine de liaison aux chlorophylles a et b et de la ferredoxine analysées chez plusieurs espèces ont une longueur de 44 à 57 acides aminés et possèdent trois séquences communes (139). La fusion in vitro du gène npt II au gène codant pour le peptide de transit de la rbc S du pois et le transfert du gène hybride à des plants de tabac par Agrobacterium a eu pour résultat le transfert de l'enzyme npt dans les chloroplastes (279) ce qui suggère qu'un gène codant pour un peptide de transit peut être utilisé pour transporter diverses protéines dans les chloroplastes.

La recombinaison dans le génome chloroplastique a été obtenue à la suite de fusions de protoplastes (187). Les marqueurs utilisés ont été la résistance à la lyncomycine et à la streptomycine. Bien que le transfert d'un gène dans le génome chloroplastique ait été obtenu avec Agrobacterium tumefaciens (55), une méthode reproductible de transfert de gènes dans les chloroplastes serait d'un grand intérêt pour approfondir les connaissances dans ce domaine. Une telle technique ouvrirait aussi la voie à l'apport aux plantes de caractères comme la capacité de fixer l'azote atmosphérique. On pense en effet que les chloroplastes seraient les sites privilégiés pour l'expression des gènes nif de Klebsiella (192).

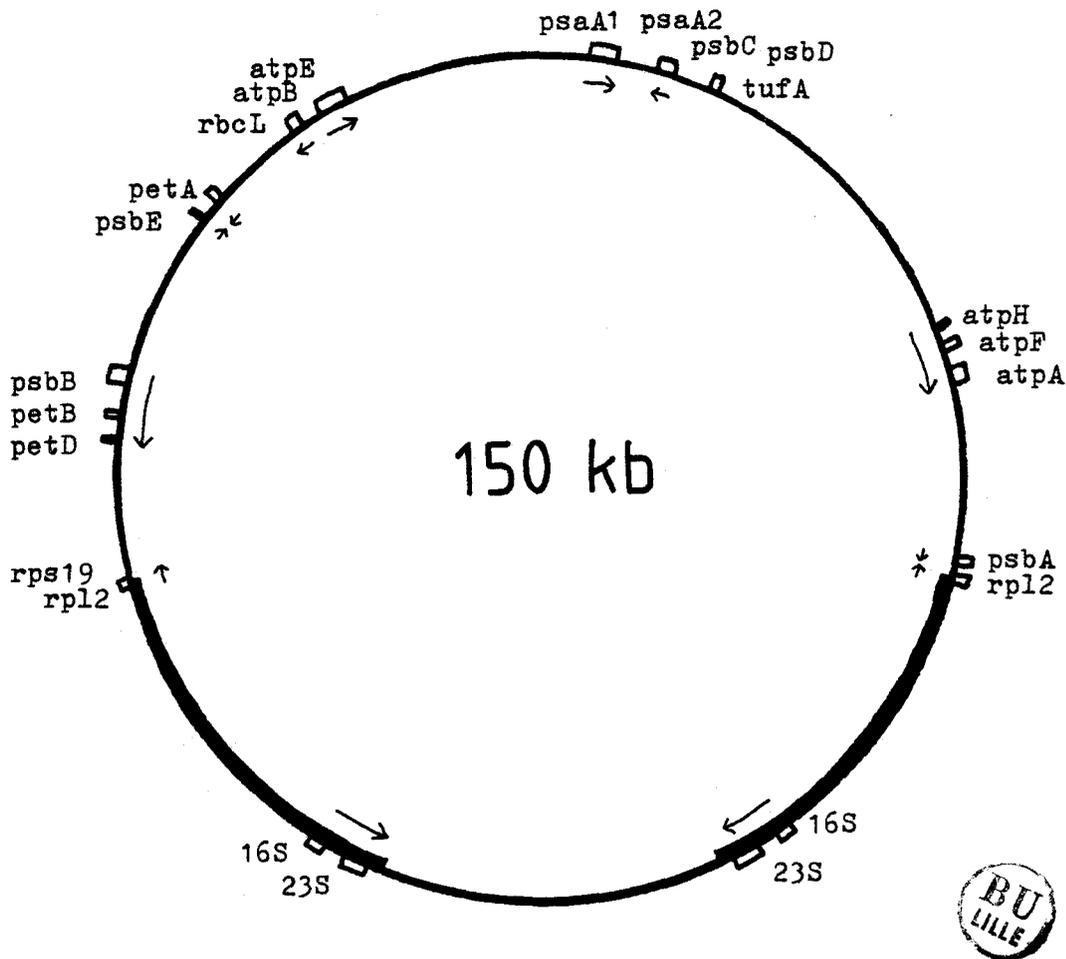


Fig. 3 - Carte génétique du DNA chloroplastique d'épinard. D'après PALMER (221). atpB, atpE, atpF, atpH : sous-unités de l'ATPase; petA : cytochrome f; petB : cytochrome b6; petD : sous-unité 4 du complexe cytochrome b6-f; psaA1, psaA2 : protéines P700 du PSII; psbA : Q-beta du PSII ; psbB, psbC : protéines de liaison à la chlorophylle a; psbD : protéine D2 du PSII; psbE : cytochrome b-559; rbcL : grande sous-unité de la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase; rpl2, rps19 : protéines ribosomales homologues respectivement aux protéines L2 et S19 d'E.coli; tufA : facteur d'élongation EF-Tu. Les gènes codant pour les tRNAs ne sont pas représentés. Les flèches indiquent le sens de la transcription. Les zones épaissies du cercle marquent la position des deux séquences homologues inversées.

B. - La régulation de la transcription par la lumière

La ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase est la protéine soluble la plus abondante dans les tissus photosynthétiques. Elle a une fonction importante car elle initie à la fois le cycle de Calvin et la photorespiration. Elle est constituée de 8 grandes sous-unités de 53000 D et de 8 petites sous-unités de 14000 D. La protéine constituant chaque grande sous-unité est synthétisée dans les chloroplastes alors que la protéine formant les petites sous-unités est synthétisée sur les ribosomes cytoplasmiques à l'état de précurseur de masse molaire 20000. La protéine des petites sous-unités est codée par un petit groupe de gènes nucléaires appelés *rbcS*. L'expression de ces gènes est régulée par la lumière et se limite à certains tissus de la plante (107).

Afin de préciser les connaissances de ce mécanisme, des gènes hybrides constitués de la région 5' d'un gène *rbcS* associée au gène de résistance au chloramphénicol (*cat*) ont été construits et transférés à des plantes par Agrobacterium. Dans tous les cas, la résistance au chloramphénicol s'exprime seulement dans les plantes exposées à la lumière (114,199). Des délétions dans la région 5' du gène ont permis de situer les séquences importantes pour cette régulation : une séquence de 33 bp à proximité de la séquence TATA est suffisante pour que la transcription du gène hybride soit régulée par la lumière (207). Cette séquence peut fonctionner indépendamment de son orientation (274). La lumière exercerait également une régulation post-transcriptionnelle sur l'expression des gènes *rbcS* et *rbcL* (18).

Les gènes *cab* codent pour des protéines se liant aux chlorophylles a et b. Elles forment une partie de l'appareil photosynthétique. Les protéines *cab* sont codées par un groupe de gènes nucléaires chez plusieurs espèces (226). L'expression de ces gènes varie selon les tissus et est régulée par la lumière (156). Un gène *cab* du blé a été transféré chez le tabac et le Petunia par Agrobacterium tumefaciens (157). Dans les deux espèces de plantes, la régulation de l'expression du gène *cab* s'effectue comme dans le blé ce qui montre que le gène possède en position 5' tous les signaux reconnus par les plantes hôtes pour moduler la transcription en réponse à la lumière et spécifiquement selon les tissus. Une autre expérience a consisté à fusion-

ner les signaux de régulation en 5' du gène *cab* du pois à la séquence codante du gène *nptII*. La synthèse de l'enzyme *nptII* s'effectue alors dans les plants de tabac transformés comme celle de la protéine *cab* chez le pois, c'est à dire qu'elle est plus abondante dans les feuilles et dans les plantes exposées à la lumière (252). Ces deux expériences montrent l'intérêt des techniques de transformation pour l'étude de l'expression des gènes chez les plantes.

Un autre gène dont l'expression est régulée par la lumière est le gène codant pour la chalcone synthase. Cette enzyme participe à la synthèse d'un produit intermédiaire important dans la synthèse des flavonoïdes qui peuvent être des pigments floraux. La construction d'un gène hybride 5'-chalcone synthase-*npt II* a permis de situer en position 5' du gène des séquences intervenant dans la régulation de la transcription (141). Certaines de ces séquences ressemblent aux séquences stimulant la transcription de gènes d'animaux.

La lumière peut aussi exercer une régulation négative sur l'expression de certains gènes. C'est le cas du gène codant pour la NADPH-protochlorophyllide oxydoréductase (11). Le phytochrome serait responsable de l'arrêt de la synthèse du mRNA de ce gène alors qu'il stimulerait la synthèse du mRNA des gènes *cab* (11). Cependant, on ignore encore les mécanismes intimes de la régulation par la lumière. Des facteurs des chloroplastes interviendraient aussi dans la régulation de l'expression de gènes nucléaires (12).

matériel et méthodes

I. - MATERIEL

A. - Les bactéries

Nous utilisons Escherichia coli souche HB101 qui présente les caractères F^- , hsd-20 ($r_B^- m_B^-$), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK12, rpsL20 (Sm^R), xyl-5, mtl-1, supE44, λ^- . Elle est conservée en présence de glycérol à $-20^\circ C$.

B. - Les plasmides

pBR325	Ap^R, Cm^R, Tc^R	5,4 kb	(21)
pLGV232neo	Ap^R, Km^R	8,5 kb	(112)
pLGV1103neo	Ap^R, Km^R	7,16 kb	(105)

Le pLGV232neo possède le gène de résistance à la kanamycine du Tn5 placé sous contrôle du promoteur du gène nos d'Agrobacterium tumefaciens. Il confère aux bactéries la résistance à une concentration en kanamycine de 15 $\mu g/ml$. S'y joint la bordure droite du T-DNA et une région de fin de transcription du gène ocs.

Le pLGV1103neo, qui possède aussi l'association pnos-neo est dépourvu de bordure du T-DNA et la séquence de fin de transcription du gène ocs contient une petite délétion. Le gène Km^R du Tn903 leur est ajouté.

C. - Les plantes

Les plants de Nicotiana tabacum variété Wisconsin 38 sont cultivés en serre sous éclairage continu à une température approximative de $25^\circ C$.

D. - Milieu de culture des bactéries

Le milieu de LURIA et BURROUS (LB) (170) de composition suivante est utilisé :

- Extrait de levure	5 g
- Tryptone	10 g
- NaCl	5 g
- Eau distillée	QSP 1 l
- pH	7,0 à 7,2 par addition d'une pastille de soude par litre de milieu

Ce milieu peut être gélifié par de l'agar à 12 g/l. Il est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

Des solutions d'antibiotiques sont préparées aux concentrations suivantes : tétracycline 2 mg/ml d'eau distillée, kanamycine 5 mg/ml. Elles sont stérilisées sur filtre de porosité 0,22 µm et stockées à -20°C jusqu'à utilisation. Les concentrations finales dans le milieu de culture sont de 50 µg/ml.

Le chloramphénicol est solubilisé à la concentration de 34 mg/ml d'éthanol au moment de l'emploi.

E. - Milieus de culture des protoplastes

Le milieu T₀ a été utilisé dans la première phase de la culture (42). Il contient les macroéléments du milieu de MURASHIGE et SKOOG (203) à des concentrations réduites de moitié, les microéléments du milieu de HELLER (110), les vitamines du milieu de MOREL et WETMORE (198), de l'acide 1-naphtalène-acétique, de la 6-benzylaminopurine, du mannitol et du saccharose. Le pH est ajusté à 5,5 par addition de soude 0,1 N. Le milieu peut être gélifié par de l'agar à la concentration de 6 g/l. Les modifications de la composition du milieu apportées au cours de la régénération des plantes seront mentionnées dans le chapitre des résultats. La composition au début de la culture est la suivante :

	concentration finale dans le milieu (mg/l)	concentration dans les solu- tions-mères (g/l)	volume des solutions- mères dans le milieu (ml/l)	
NH ₄ NO ₃	825	8,25		
KNO ₃	950	9,5		
CaCl ₂ , 2H ₂ O	220	2,2	1	100
MgSO ₄ , 7H ₂ O	185	1,85		
KH ₂ PO ₄	85	0,85		
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,85	0,2785	2	100
EDTA(Na ₂)	37,25	0,3725		
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1	1		
H ₃ BO ₃	1	1		
MnSO ₄ • H ₂ O	0,1	0,1		
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,03	0,03	3	1
AlCl ₃	0,03	0,03		
NiCl ₂ , 6H ₂ O	0,03	0,03		
KI	0,01	0,01		
Inositol	100	10		
Panthoténate de calcium	1	0,1		
Biotine	0,01	0,001	4	10
Niacine	1	0,1		
Pyridoxine (HCl)	1	0,1		
Thiamine	1	0,1		
1-NAA	3	0,3	5	10
6-BAP	1	0,1	6	10
Mannitol	80000			
Saccharose	20000		eau distillée QSP 1 l	

Les solutions 4, 5 et 6 sont ajoutées au moment de l'emploi; elles sont stérilisées par filtration sur filtre de porosité 0,45 µm. Le mélange des solutions 1, 2 et 3, additionné du mannitol et du saccharose, est autoclavé à 105 ou 110°C pendant 30 min. Le pH du milieu est réajusté avant utilisation, avec une solution de soude 0,1 N.

Le milieu C (201) de composition suivante a été utilisé dans la deuxième phase des cultures. Il est préparé et stérilisé de la même manière que le milieu T₀.

	Concentration finale dans le milieu (mg/l)
NH ₄ NO ₃	400
KNO ₃	1516
CaCl ₂ , 2H ₂ O	441
MgSO ₄ , 7H ₂ O	739
KH ₂ PO ₄	68
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,85
EDTA(Na ₂)	37,25
H ₃ BO ₃	6,18
MnSO ₄ , H ₂ O	0,151
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,287
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,0238
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
Na ₂ Mo ₄ , 2H ₂ O	0,0242
Inositol	90,1
Pyridoxine (HCl)	0,509
Glutamine	146,1
MES (pH 5,7)	585,6
Pourpre de bromocrésol	5,6
1-ANA	0,1
6-BAP	0,2
Mannitol	80000
Saccharose	20000
Eau distillée	QSP 1 l

F. - Obtention et culture des protoplastes

La méthode enzymatique adaptée pour les protoplastes de mésophylle de tabac par CHUPEAU et al. (43) a été utilisée.

On choisit des feuilles jeunes ayant cessé de croître. Après lavage à l'eau distillée, elles sont stérilisées par agitation pendant 15 secondes dans de l'éthanol à 70° puis par immersion totale pendant 5 min dans de l'hypochlorite de calcium à 50 g/l. Elles sont ensuite lavées quatre fois à l'eau distillée préalablement stérilisée par passage à l'autoclave à 120°C pendant 20 min. Toutes les manipulations pour l'obtention et la culture des protoplastes sont effectuées dans un flux horizontal d'air aseptisé. La feuille stérilisée est placée entre deux feuilles de papier aseptisé et l'épiderme inférieur retiré à partir des nervures à l'aide de pinces fines. Les zones dépourvues d'épiderme sont découpées et placées dans des boîtes de Petri en verre, à la surface d'une solution enzymatique de composition suivante : cellulase et macerozyme "Onozuka R-10, Yahult pharmaceutical industry", driselase "Sigma D-9515" aux concentrations respectives de 100, 20 et 50 mg/ml de milieu T₀ dépourvu de saccharose et de fer/EDTA. La solution enzymatique est stérilisée par filtration sur filtre de porosité 0,45 µm. La macération des fragments de feuille dure de 17 à 18 h à l'obscurité et à 25°C.

Après digestion des parois cellulaires par le mélange enzymatique, les protoplastes sont récupérés par agitation de la boîte de Petri et filtration sur grille de porosité 100 µm, centrifugés à 50 g 5 min dans des tubes à hémolyse de contenance 5 ml. Les protoplastes sont ensuite purifiés par une technique adaptée qui sera présentée dans la partie des résultats. Trois lavages dans du milieu T₀ sans saccharose ni fer/EDTA doivent être effectués avant la mise en culture. Quand les protoplastes sont soumis ensuite aux liposomes, le dernier lavage est réalisé dans du tampon d'incubation.

Les cultures sont faites dans des boîtes de Petri en verre de 55 mm de diamètre. La densité est comprise entre 60000 et 80000 protoplastes par ml de milieu T₀. Les protoplastes sont numérés préalablement sur une cellule de Nageotte (Preciss). Les boîtes sont mises à l'obscurité pendant 7 j à 27-28°C.

Après une semaine en culture dans le milieu T₀, les microcals, les cellules divisées ou semblant évoluer vers une division sont numé-
rées, lavées une fois dans du milieu C puis remises en culture sous
éclairage continu d'intensité 500 lux environ à une température com-
prise entre 27 et 28°C, dans des boîtes de Petri en matière plastique
de 55 mm de diamètre entourées d'une feuille de parafine, à une densité
inférieure à 3000 cellules par ml de milieu. Les cals développés après
un mois sont placés sur milieu gélosé à 0,6%. La composition en éléments
minéraux et en vitamines des milieux gélosés utilisés pour les repiquages
successifs est celle du milieu T₀. Les concentrations des autres éléments
seront données dans la partie des résultats. Quand la taille des cals
atteint 2 à 5 mm de diamètre, ils sont placés dans des flacons de con-
tenance 150 ml contenant environ 30 ml de milieu gélosé favorisant le
bourgeonnement. Après développement de rosettes de feuilles sur les cals,
celles-ci sont excisées et placées sur milieu favorisant l'enracinement.
Les plantules ainsi obtenues peuvent être mises en terre. Elles sont
maintenues en atmosphère humide dans les premiers jours de culture et
arrosées avec une solution de benlate à 200 mg/l.

II. - PREPARATION DES LIPOSOMES ET INCUBATION AVEC LES PROTOPLASTES

A. - Préparation de liposomes contenant de la 6-carboxy-fluores- céine et ciblage sur les protoplastes

La méthode de SZOKA et PAPAHDJOPOULOS (267) décrite dans le
paragraphe C a été utilisée. A 20 mg de lipides dissous dans 3 ml
d'éther, est ajouté 1 ml d'une solution de 6-carboxy-fluorescéine
50mM dans du tampon tris 10mM, EDTA 0,1mM, mannitol 8%, pH8 et préa-
labement purifiée par chromatographie. Les deux phases sont soumises
aux ultrasons et la phase homogène ainsi obtenue est placée en rotation,
sous vide, à 25°C. L'évaporation est poursuivie jusqu'à la formation des
liposomes et l'élimination totale du solvant.

Pour la formation de liposomes chargés positivement le mélange PC/
 β -sitostérol/stéarylamine (10/2/1) (M/M) a été utilisé. Le mélange
PC/ β -sitostérol/PS (10/2/1) (M/M) a permis d'obtenir des liposomes
chargés négativement.

Pour pouvoir être utilisés dans des expériences de ciblage, les liposomes doivent être séparés de la 6-carboxy-fluorescéine non encapsulée. A cette fin, après formation des liposomes, une fraction aliquote de 300 μ l est déposée au sommet d'une colonne de Sephadex G-75 de dimension 11x100 mm équilibrée dans du tampon tris-HCl 10mM pH8, EDTA 0,1mM, mannitol 0,45 M. Les liposomes exclus sont recueillis alors que la 6-carboxy-fluorescéine est retenue dans la colonne. Les liposomes sont immédiatement utilisés pour les expériences de ciblage.

A un culot contenant environ $5 \cdot 10^5$ protoplastes, sont ajoutés 200 μ l de liposomes correspondant à 1 mg de lipides. L'incubation dure 1 h à 25°C. Deux lavages dans du milieu T₀ sont opérés sur les protoplastes par centrifugation pendant 2 min à 100g et remise en suspension dans du milieu de culture.

L'observation est réalisée sous un microscope de type Nikon F1 monté en épi-fluorescence. Un filtre permet d'ajuster la longueur d'onde émise à celle de l'émission de la 6-carboxy-fluorescéine.

B. - Préparation des liposomes contenant le DNA

1. - De type MLV

Nous avons utilisé la méthode décrite par LURQUIN (172). 2 mg de lipides sont déposés au fond d'un tube de verre par évaporation sous courant d'azote, du chloroforme dans lequel ils sont dissous. Une répartition régulière est obtenue par rotation du tube en position inclinée pendant l'évaporation. 4 μ g de plasmide dissous dans 0,6 ml d'un tampon de composition à étudier sont ajoutés. Une suspension de vésicules multilamellaires est obtenue après agitation au vortex durant une minute environ. Les liposomes peuvent être lavés par centrifugation à 15000 g 10 min en vue de la détermination de la quantité de plasmide lié.

2. - De type REV

Nous reproduisons la méthode de SZOKA et PAPAHDJOPOULOS (267). 3 mg de lipides dissous dans du chloroforme sont déposés au fond d'un

tube comme pour la fabrication de MLV. Ils sont repris dans 0,6 ml d' éther préalablement lavé de ses peroxydes à l'eau distillée. Dans un tube de verre, leur sont ajoutés 175 µl de tampon tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, mannitol 8%, pH 7,5 contenant de 150 à 200 µg de plasmide purifié. Le mélange est soumis aux ultrasons puis transféré dans un évaporateur rotatif, sous vide. L'évaporation du solvant se fait à température ambiante d'abord sous vide progressif, ce qui entraîne la formation d'un gel se déposant sur la paroi du tube. Après éclatement spontané du gel, on laisse 5 min sous un vide plus poussé. La suspension des liposomes ainsi formés est diluée jusqu'à 1,5 ml dans le même tampon, homogénéisée au vortex et stockée sous atmosphère d'azote.

On peut séparer les liposomes formés du plasmide non encapsulé de la manière suivante (76). 0,5 ml de la suspension de liposomes est ajouté à 1 ml d'une solution de Ficoll à 25% (P/V) dans le tampon de fabrication des liposomes. Le mélange est placé dans un tube de centrifugation. 2,5 ml d'une solution de Ficoll à 10% dans le même tampon sont déposés sans turbulence au dessus de la suspension. 1,5 ml de tampon est ajouté de la même manière. On centrifuge 30 min à 35000 RPM et 20°C dans un rotor de type Beckmann SW50.1. Les liposomes se disposent alors à l'interface de la solution de Ficoll à 10% et du tampon. Cette méthode est utilisée pour déterminer le pourcentage de plasmide encapsulé dans les liposomes. On encapsule pour cela un plasmide marqué au ³⁵S et on compte la radioactivité d'une fraction aliquote de liposomes repris après passage sur gradient de Ficoll. Les liposomes sont lysés par addition d'un volume de SDS à 2% dans l'eau. 1 ml de DNA de sperme de hareng est ajouté et la préparation continue jusqu'au comptage comme pour l'évaluation du marquage d'un plasmide (§ IV, C).

C. - Incubation des protoplastes avec les liposomes

L'optimisation des paramètres intervenant dans la liaison protoplastes-liposomes sera présentée dans la partie des résultats. Nous mentionnerons ici la méthode finalement retenue.

Après macération, les protoplastes récupérés et purifiés sont lavés dans du tampon citrate (Na) 10 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 mM, mannitol 11%, pH 6,0 et repris dans ce même tampon à la concentration de 10^6 ml^{-1} . Ils sont répartis par fractions de 0,5 ml dans des tubes à hémolyse de contenance 5 ml et placés au bain-marie à 30°C. 50 μl d'une suspension de liposomes correspondant à 0,1 mg de lipides sont ajoutés. Après 5 min, y est joint 0,55 ml d'une solution de polyéthylèneglycol (PEG 6000) à 30% (P/V) dans de l'eau distillée contenant du $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 mM et du KH_2PO_4 0,7 mM. Après homogénéisation, une incubation au bain-marie est réalisée pendant 15 à 20 min. Une dilution en 3 étapes par du tampon glycocolle 25 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, pH 10 est ensuite pratiquée. Successivement 0,5, 1 et 1,5 ml sont ajoutés à quelques minutes d'intervalle. Les protoplastes sont centrifugés 5 min à 70 g et lavés deux fois dans du milieu T_0 avant mise en culture dans ce même milieu additionné de carbénicilline à la concentration de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Toute la procédure est effectuée dans des conditions d'aseptie, dans un flux horizontal d'air aseptisé.

Quand on veut mesurer la liaison aux protoplastes de liposomes contenant un plasmide marqué, les protoplastes recueillis après le dernier lavage sont lysés par 0,2 ml de SDS à 2% (P/V) dans l'eau. La suite de la préparation jusqu'au comptage de la radioactivité est réalisée comme mentionné dans le paragraphe IV, D : précipitation au TCA, filtration ...

III. - METHODES D'OBSERVATION CYTOLOGIQUE

A. - Cyto-autoradiographie

Les techniques de fixation et d'inclusion ont été adaptées d'après celles de SEEDS (243).

Après incubation avec les liposomes contenant un plasmide marqué au ^{35}S , les protoplastes sont lavés une fois dans du milieu T_0 , une fois dans du tampon cacodylate 0,1 M, mannitol 10% pH 7,2 et sont repris après centrifugation 5 min à 70 g dans 0,5 ml du même tampon. Pour la fixation, 0,5 ml de glutaraldéhyde à 2,5% dans le tampon est ajouté.

Les protoplastes sont laissés sédimenter 30 min à température ambiante. La solution surnageante est remplacée par 1 ml de la solution de glutaraldéhyde à 2,5% et la suspension placée à 4°C pendant 2 h. Après un lavage dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2, les protoplastes sont laissés dans le tampon 15 h à 4°C. Après un nouveau lavage, ils sont repris dans 0,5 ml de tampon. 0,1 ml d'acide osmique à 8% dans l'eau est ajouté. La post fixation dure 1h30 à 4°C. L'acide osmique est éliminé. Après un lavage dans du tampon cacodylate, les protoplastes sont inclus dans de l'agarose avant d'être déshydratés et inclus dans l'araldite. Deux gouttes d'agarose à 0,5% dans l'eau sont déposées sur le culot des protoplastes fixés. L'ensemble est aussitôt homogénéisé avant que l'agarose ne prenne en masse. Des petits cubes de 1 mm d'arête sont découpés dans l'agarose ayant emprisonné les protoplastes.

La déshydratation est faite à 4°C successivement dans les bains suivants :

alcool	à	30°	pendant	15 min
"	à	50°	"	15 min
"	à	70°	"	15 min
"	à	90°	"	20 min
"	à	95°	"	30 min
"	à	100°	"	30 min
"	à	100° bidistillé	"	3 x 20 min

Les petits cubes sont ensuite passés dans les solutions suivantes :

oxyde de propylène/alcool	V/V	pendant	5 h à 4°C
oxyde de propylène		"	15 h à 4°C
oxyde de propylène		"	2x 30 min à température ambiante
oxyde de propylène/araldite (MF)	V/V	"	2 h
araldite (MF)		"	3 h

Les échantillons sont ensuite placés dans des cupules de matière plastique remplies d'araldite (MF), mis sous vide pendant 20 à 30 min, portés à 37°C pendant 3 h et 60°C pendant 48 h pour le durcissement de l'araldite. Le mélange final (MF) est constitué de quatre produits de marque Polaron Equipment Ltd (Watford, England) : l'araldite et le durcisseur (V/V) auxquels on ajoute un plastifieur (0,75% V) et un accélé-

rateur (3% V).

Après taille des blocs d'araldite de façon à obtenir une section trapézoïdale, des coupes "semi-fines" d'environ 1 μ m d'épaisseur sont réalisées sur un ultramicrotome à avance mécanique de type Porter-Blum en utilisant des couteaux de verre. Les coupes sont recueillies sur une solution d'éthanol à 10%, dépliées par des vapeurs de chloroforme et déposées sur une lame de verre à l'aide d'un anneau de matière plastique.

L'émulsion nucléaire liquide Ilford K5 est utilisée. Les lames portant les coupes sont trempées dans l'émulsion préalablement liquéfiée dans un bain-marie à 45°C pendant 30 min et diluée au demi dans de l'eau distillée. Les lames sont laissées égoutter et sécher pendant 15 h puis placées dans une boîte hermétique à la lumière renfermant de l'anhydride phosphorique. Après 3 à 4 semaines d'exposition, l'émulsion est révélée en plaçant les lames dans du révélateur Kodack D19b pendant 2 min 30 s à 20°C. Suivent deux bains d'eau distillée puis une fixation pendant 5 min dans du thiosulfate de sodium à 30% dans l'eau et trois rinçages à l'eau distillée. Toutes ces opérations doivent être effectuées à l'obscurité presque totale (devant une ampoule électrique rouge recouverte de cinq épaisseurs de papier). Les lames sont ensuite séchées à la flamme d'un bec bunsen, recouvertes pendant 30 s d'une solution de bleu azur à 0,5% dans l'eau distillée à laquelle est ajoutée une goutte de soude 0,01 M par lame. Après coloration, les lames sont rincées à l'eau, séchées et observées au microscope optique sous un objectif à immersion de grossissement 100.

B. - Microscopie électronique

1. - En transmission (TEM)

Nous avons utilisé la méthode de fixation en une seule étape de FUKUNAGA et al. (83). Après incubation avec les liposomes et lavage dans du milieu T₀, le culot de protoplastes est repris dans 2 ml de tampon cacodylate 50 mM pH 7,2, saccharose 3%, glutaraldéhyde 2%, acide osmique 2%. On effectue de 3 à 5 lavages dans ce milieu jusqu'à obtention d'un surnageant peu coloré. Les protoplastes sont sédimentés par centrifugation 2 min à 50 g et laissés dans 1 ml du mélange fixateur pendant

4 h à 0°C. Après un lavage dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2, les protoplastes sont inclus dans de l'agarose. La déshydratation et l'inclusion dans l'araldite sont poursuivies comme pour l'autoradiographie.

Les coupes, d'une épaisseur de 0,1 µm environ sont aussi réalisées à l'ultramicrotome sur des couteaux de verre. Elles sont reprises sur le coté mat de petites grilles de cuivre. La double coloration acétate d'uranyl/citrate de plomb est effectuée selon REYNOLDS (230). Sous un éclairage faible, les grilles sont placées pendant 4 min, le coté mat en contact avec une solution d'acétate d'uranyl à 4% dans l'eau diluée au demi par de l'éthanol à 95%, filtrée sur filtre de porosité 0,22 µm au moment de l'emploi. Les grilles sont rincées dans un bain puis sous un courant d'éthanol à 50%. Elles sont ensuite posées de la même manière sur le réactif de Reynolds contenant 26,6 g/l de nitrate de plomb et 35,2 g/l de citrate tri-sodique à pH 12 (Na OH), dans une enceinte contenant de la potasse. Cette coloration dure 8 min et les grilles sont lavées comme précédemment dans de l'eau distillée. L'observation est faite au microscope électronique de type Jeol JEM-100 CX.

Pour l'observation de liposomes, une coloration négative est réalisée. Une goutte de suspension de liposomes est déposée et maintenue 10 s sur une grille de nickel recouverte d'une membrane de Parlodion. La grille est ensuite recouverte pendant 10 s d'une goutte d'acide phosphotungstique à 2% dans l'eau. L'observation est faite au microscope électronique à transmission. Les grilles recouvertes d'une membrane de Parlodion sont préparées de la façon suivante : une lame de verre très propre est trempée dans une solution de Parlodion à 2% dans l'acétate d'isoamyle. Après séchage, la membrane de Parlodion est décollée sur une surface d'eau froide. Les grilles sont posées côté mat sur la membrane qui flotte sur l'eau. L'ensemble est repris sur un papier filtre et séché à température ambiante. La membrane est découpée autour de chaque grille au moment de l'emploi.

2. - A balayage (SEM)

Les préparations pour l'observation au microscope à balayage sont réalisées sur des protoplastes fixés par la méthode en une seule étape présentée ci-dessus. Les protoplastes ne sont pas inclus dans de

l'agarose mais deshydratés dans des bains d'alcool et d'acétone de concentration croissante. Successivement, on utilise des bains d'alcool titrant 30%, 50%, 70%, 90%, 100% (2 fois), puis d'acétone à 30, 50, 70, 90% dans l'éthanol absolu, puis d'acétone pur (2 fois). Chaque bain dure 15 min à 4°C. La suspension est conservée dans l'acétone à 4°C. Elle est déposée sur un filtre de cellulose de porosité 0,45 µm. Le filtre est passé dans un appareil à point critique du CO₂ pour éliminer toute trace de solvant. Il est ensuite collé sur un portoir rectangulaire à l'aide d'un ruban comportant deux faces adhésives. Les échantillons sont ensuite métallisés par vaporisation d'un mélange or/palladium sous faible pression d'argon. Ils sont observés au microscope Jeol JEM 100 CX muni d'un système d'observation en "scanning".

IV. - TECHNIQUES DE MANIPULATION DU DNA

A. - Extraction de plasmides

1 - Méthode d'extraction rapide selon GROSVELD et al. (100)

Cinq ml d'une culture d'E. coli parvenue en phase stationnaire de croissance (15 h en agitation à 30°C) sont centrifugés à 5000 g pendant 10 min. le culot est repris dans 200 µl de tampon tris 25 mM, glucose 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8. La lyse est effectuée en tube Eppendorf par addition de 400 µl d'une solution de soude 0,2 M, SDS 1% (P/V) et homogénéisation pendant 5 min à température ambiante. L'addition de 200 µl d'acétate de potassium 3 M pH 4,8 précipite le complexe chromosome-membrane. Après homogénéisation, le mélange est placé 5 min dans la glace et centrifugé 10 puis 5 min à 10000 g. Un volume d'un mélange V/V de chloroforme et de phénol saturé en tris 50 mM, EDTA 5 mM, saccharose 20 mM, pH 8, est ajouté au surnageant. Après plusieurs inversions du tube, les deux phases sont séparées par centrifugation à 10000 g, 30 s. La phase supérieure est reprise et l'opération est répétée deux fois avec un mélange chloroforme/alcool isoamylique 24V/V. Après cette déprotéinisation, le DNA est précipité à l'éthanol/NaCl. 3/7 de volume d'une solution molaire de NaCl sont ajoutés à la solution de plasmide et deux volumes d'éthanol à 95%. Après 25 min à -80°C, on récupère le plasmide par centrifugation 10 min à 10000 g. Le culot est lavé à l'éthanol à 70%

pour éliminer le sel. Après une nouvelle centrifugation durant 5 min, le culot est séché sous vide et repris dans un tampon. La solution obtenue est ensuite traitée à la RNase A. 10 µg de RNase A dissoute à la concentration de 10 mg/ml sont ajoutés à la solution qui est mise en incubation 10 min à 37°C. La RNase est dissoute dans du tampon acétate (Na) 40 mM, pH 4 et est préalablement portée dans un bain-marie bouillant pendant 10 min. La solution plasmidique peut être ensuite purifiée par déprotéïnisation au phénol/chloroforme et chloroforme/alcool isoamylique et précipitation à l'éthanol/NaCl comme mentionné ci-dessus.

2 - Méthode de lyse par ébullition selon HOLMES (121)

Cette méthode a été utilisée pour la préparation de plasmides amplifiables au chloramphénicol. Une culture d'E.coli est réalisée dans les conditions suivantes. 200 ml de milieu LB additionné d'antibiotiques choisis selon les résistances conférées par le plasmide à extraire, sontensemencés par 5 ml d'une préculture. Quand la densité optique à 600 nm devient comprise entre 0,6 et 0,8, on ajoute 1 ml d'une solution de chloramphénicol à 34 mg/ml d'éthanol à 95°. On laisse la culture en agitation à 30°C pendant 18 à 24 h.

Le culot des bactéries est recueilli dans 1,6 ml du surnageant après centrifugation à 5000 g 10 min. On lui ajoute 14 ml de tampon STET (tris 50 mM, saccharose 8%, triton X-100 5% (V), pH 8) puis 1 ml d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml d'eau distillée, préparée au moment de l'emploi. Le mélange est porté immédiatement à ébullition à la flamme d'un bec bunsen et maintenu 75 s dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement, on centrifuge à 12000 g 10 min à 4°C. Le plasmide dans le surnageant est précipité à 0°C 15 min après addition d'un volume d'isopropanol stocké à -20°C. Après centrifugation à 5000 g durant 5 min, le culot est dissous doucement dans 8 ml de tampon tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0. 9,5 g de chlorure de césium (CsCl) sont alors dissous dans la solution. Une centrifugation 10 min à 12000 g permet d'éliminer à la surface de la solution une pellicule blanchâtre de protéines.

La solution enrichie en plasmide est ensuite purifiée en gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium.

3 - Purification des plasmides en gradient de chlorure de césium

A la solution de plasmide contenant le chlorure de césium, 0,3 ml d'une solution à 10 mg/ml de bromure d'éthidium est ajouté et le volume complété avec le tampon à 11,5 ml dans des tubes de centrifugation. Après équilibrage des tubes dans un écart maximum de 10 mg, on centrifuge 48 h à 40000 RPM dans un rotor Beckmann de type 50Ti, à 18°C. La décélération se fait sans frein. Sous un éclairage ultra-violet de longueur d'onde 366 nm, on recueille à l'aide d'une micropipette la bande fluorescente inférieure.

Le bromure d'éthidium est dissocié du plasmide de la façon suivante. A 1 g de chlorure de césium dissous dans 1 ml de tampon tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2, on ajoute 5 ml d'isopropanol conservé à -20°C. Après une brève agitation, on utilise la fraction supérieure constituée d'isopropanol dans lequel le chlorure de césium a précipité. Dans un tube Eppendorf contenant la bande plasmidique reprise du gradient, on ajoute 400 µl de l'isopropanol préparé. Après plusieurs inversions du tube et décantation, la fraction supérieure dans laquelle le bromure d'éthidium s'est dissous est éliminée. L'opération est répétée entre 5 et 10 fois jusqu'à ce que n'apparaisse plus aucune trace de fluorescence sous éclairage ultra-violet, en référence avec du tampon.

L'élimination du chlorure de césium se fait par dialyse pendant 48 h contre 1 l de tampon tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5, renouvelé après 24 h. Les boudins à dialyse sont maintenus dans de l'eau distillée en ébullition pendant 10 min avant emploi. La solution plasmidique recueillie après dialyse est précipitée à l'éthanol/NaCl et reprise dans un tampon approprié à l'utilisation ultérieure du plasmide.

La quantité obtenue est évaluée par mesure de la densité optique à 255 nm. 2 unités de DO correspondent à une concentration en DNA de 100 µg/ml. La pureté de la solution peut être contrôlée par l'examen du spectre d'absorbance en ultra-violet entre 190 et 350 nm.

4 - Méthode de préparation de plasmides selon
ISH-HOROWICZ (133)

Après 15 h en agitation à 30°C, les bactéries en culture dans un litre de milieu LB sont centrifugées à 5000 g 10 min. Les culots sont repris dans 36 ml de tampon tris 25 mM, glucose 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8. 4 ml d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml du même tampon sont ajoutés et la suspension mise à incuber 10 min à température ambiante. La lyse s'effectue par addition de 80 ml d'une solution de soude 0,2 M, SDS 1%. Le lysat est agité et placé dans la glace pendant 5 min. Pour précipiter le complexe DNA-membrane, 40 ml d'une solution d'acétate de potassium 5 M à pH 4,8 froid (4°C) sont ajoutés. Après homogénéisation, le mélange est laissé 15 min dans la glace et centrifugé après addition de 10 ml d'eau, 5 min à 10000 g. Si nécessaire, le surnageant est filtré sur une mince couche de laine de verre. Le DNA plasmidique, restant dans le surnageant est précipité par 0,6 volume d'isopropanol froid (-20°C) 15 min à 0°C. Après centrifugation 5 min à 10000 g, le culot est séché sous vide et repris dans 8 ml de tampon tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7. On purifie ensuite le plasmide en gradient de chlorure de césium comme indiqué dans le paragraphe précédent.

B. - Extraction de DNA bactérien

La méthode utilisée est issue de DHAESE et al. (60). 10 ml d'une culture bactérienne sur milieu LB parvenue en phase exponentielle tardive sont centrifugés à 5000 g pendant 10 min. Le culot bactérien est repris dans 3 ml de tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8 auxquels on ajoute 1 ml de sarkosyl à 5% dans le même tampon et 1 ml de pronase à 2,5 mg/ml de tampon. Le mélange est laissé 1 h à 37°C. Deux extractions au phénol saturé en tris 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8 suivies de quatre extractions à l'éther sont réalisées. Les acides nucléiques recueillis dans la phase aqueuse sont précipités par addition de 2 volumes d'éthanol. Le précipité est repris après centrifugation dans 200 µl de tris 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8. Un traitement par la RNase peut être ajouté au protocole.

C. - Extraction du DNA de plante

1 - A partir de protoplastes

Les protoplastes récupérés après macération dans une boîte de Petri de 9 mm de diamètre, sont repris dans 2 ml de tampon SSC (citrate tri-sodique 0,015 M, NaCl 0,15 M, pH 7) et lysés par addition de 1 ml de SDS à 10% dans l'eau. Le lysat est incubé au bain-marie à 55°C pendant 30 min. Deux volumes de phénol saturé en eau sont ajoutés. La phase supérieure est reprise après agitation du mélange et centrifugation 10 min à 8000 g à 4°C. Le DNA est ensuite précipité deux fois à l'éthanol conservé à -20°C. A chaque opération, le culot de centrifugation (8000 g, 10 min, 4°C) est repris dans 2 ml de tampon SSC. Un traitement à la RNase est ensuite effectué par addition de 20 µl d'une solution à 10 mg/ml de tampon acétate 40 mM, pH 4, préalablement maintenue dans un bain-marie bouillant pendant 10 min. L'incubation dure 30 min à 37°C. Une précipitation à l'éthanol et un nouveau traitement à la RNase sont effectués. Après une extraction au phénol, la phase supérieure est placée en dialyse contre 1 l de tampon SSC pendant 15 h à 4°C. L'examen du spectre UV de la solution recueillie détermine la pureté du DNA.

La solution de phénol saturée en eau est préparée de la manière suivante. Du phénol cristallisé est solubilisé au bain-marie à 55°C sous hotte extractrice. 10 ml sont ajoutés au même volume d'eau distillée dans une ampoule à décanter. Après agitation pendant 10 min et repos quelques heures, la phase inférieure est reprise. Elle est stockée à 4°C recouverte d'une couche d'eau pour l'isoler de l'oxygène atmosphérique.

2 - A partir de feuilles

Cette méthode utilise la propriété du cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) de précipiter les acides nucléiques. Elle a été mise au point pour les tissus végétaux par MURRAY et THOMPSON (204) et modifiée par HEINHORST et al. (109).

Une feuille est broyée au mortier dans 5 ml de tampon tris 20 mM, EDTA 50 mM, pH 8 auxquels on ajoute du SDS à 0,5%. Une extraction au phénol/chloroforme est réalisée. Elle est suivie de deux extractions au chloroforme/alcool isoamylique et d'une précipitation à l'éthanol/NaCl. Le culot de centrifugation est repris dans 2 ml de CTAB à 1% dans du tris 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,7 M, β -mercaptoéthanol 1 mM, pH 8. Un volume de la même solution dépourvue de NaCl est ajouté et le mélange est laissé à température ambiante pendant 30 min pour la précipitation des acides nucléiques. Le précipité est sédimenté par centrifugation à 3500 g pendant 10 min et repris dans 1 ml d'un tampon de force ionique élevée : tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 7,4. Un traitement par 250 μ g de RNase est effectué pendant 30 min à 37°C, suivi d'une extraction au phénol/chloroforme et de deux extractions au chloroforme/alcool isoamylique. Le DNA est précipité par addition de 2 volumes d'éthanol et centrifugé. Il est repris dans un tampon approprié. Notons que le CTAB précipite aux températures inférieures à 15°C. Il est donc nécessaire de réaliser toutes les étapes en présence de CTAB à température ambiante.

3 - A partir de cals

La méthode utilisée est celle de ROGERS et BENDICH (233). Le broyage des tissus est effectué en présence de CTAB. Cette méthode a été utilisée par les auteurs pour l'extraction de DNA de tissus végétaux momifiés. Le rendement de l'extraction est très élevé et la solution de DNA obtenue est dépourvue de polysaccharides. Un tel résultat n'a pas pu être obtenu à partir de cals avec la méthode de HEINHORST et al. Une autre qualité de la méthode est qu'elle est réalisable avec peu de matériel.

Entre 1 et 4 g de cal sont broyés au mortier pendant quelques minutes dans un volume équivalent à 1 μ l/mg de tissu de la solution suivante chauffée à 65°C : CTAB 2%, tris 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, PVP(40000) 1%, pH 8. Le lysat est versé dans un tube de centrifugation de contenance 12 ml et porté à 65°C pendant 2 min. Un volume de chloroforme/alcool isoamylique 24v/v est ajouté et l'ensemble agité pour l'extraction des protéines. Après centrifugation pendant 30 s à 11000 g, la phase supérieure est recueillie et additionnée d' 1/5 de volume d'une

solution de CTAB à 5% dans du NaCl 0,7 M, chauffée à 65°C. Une autre extraction au chloroforme/alcool isoamylique est réalisée. Un volume d'une solution de CTAB à 1% dans du tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8 est ajouté à la phase supérieure. Le précipité est recueilli après centrifugation à 11000 g pendant 5 min dans 2 ml de tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 7,4. Le chauffage à 65°C peut aider la redissolution. Les acides nucléiques sont précipités par addition de deux volumes d'éthanol et repris après centrifugation dans 200 µl de tris 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8. Jusqu'à 25 µg de DNA ont pu être obtenus par cette méthode à partir d'un gramme de cal.

D. - Marquage in vitro de plasmide

La technique de marquage par "nick-translation" a été adoptée (232). Du dCTP marqué au ^{32}P et un kit de marque BRL contenant les autres réactifs ont été utilisés. A 1 µg de plasmide à marquer repris dans 4 µl de tampon tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, NaCl 120 mM, pH 7,5, sont ajoutés successivement : 6 µl de la solution de dCTP marqué, 5 µl de la solution B du kit qui contient les nucléotides froids (dATP, dGTP, dTTP), 30 µl de la solution E (eau distillée), 5 µl de la solution C constituée d'un mélange de DNaseI et de DNA polymérase. Après homogénéisation, le mélange est incubé 2 h à 15°C. La réaction est arrêtée par 5 µl de la solution D (EDTA). L'élimination des nucléotides non incorporés au plasmide de fait par précipitation de celui-ci à l'éthanol/NaCl comme indiqué dans le paragraphe IV-A-1, puis par passage de la solution dans une micro-colonne de Séphadex G-50 comme suit. Les micro-colonnes sont préparées en déposant 0,4 ml de gel préalablement lavé à l'eau distillée, dans un tube de même contenance percé à son extrémité par une aiguille de taille 19G et dans lequel on a placé de la laine de verre. Les petits tubes sont placés dans des tubes Eppendorf et l'ensemble est centrifugé à 3000 RPM pendant 75 s, ce qui provoque le tassement du gel. Le liquide est éliminé du tube Eppendorf et la sonde radioactive est déposée au sommet du gel. Après une centrifugation à 12000 RPM pendant 45 s, la sonde purifiée est récupérée dans le tube Eppendorf. Elle est alors en solution dans le tampon de préparation du gel, c'est à dire du tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, NaCl 50 mM, pH 8. Une fraction aliquote est prélevée avant et après passage sur la micro-colonne pour évaluation du marquage.

Sont ajoutés à la fraction prélevée, 1 ml d'une solution de DNA de sperme de hareng à 100 µg/ml de tampon tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8, NaN₃ 0,02%, puis 1,1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20% (P/V). Le mélange est laissé 1 h à 0°C. Le DNA est recueilli par filtration du précipité sur un petit disque de papier Whatman GF/C placé sur une rampe de filtration sous vide. Le filtre est rincé par 10 ml de TCA à 5% froid (4°C) puis par 5 ml d'éthanol à 95°. Il est séché sous lampe à infrarouge, déposé dans un pot à scintillation et imbibé par 0,4 ml de potasse 0,01 M pour détacher le DNA du filtre. Après 30 min, 4,5 ml de liquide à scintillation de type Beckmann HP sont ajoutés et le pot est agité fortement. La radioactivité est mesurée après quelques heures dans un appareil de comptage à scintillation liquide de type Beckmann LS2800 muni d'un système d'évaluation du quenching et de correction automatique. La chimioluminescence est aussi mesurée. La valeur en nombre de désintégrations par minute (DPM) est rapportée au µg de plasmide marqué.

E. - Utilisation des enzymes pour le clonage moléculaire

1 - Les enzymes de restriction

0,5 à 1 µg de plasmide préparé par l'une des méthodes décrites est précipité à l'éthanol/NaCl comme déjà indiqué. Le culot de centrifugation est lavé à l'éthanol à 70° et repris dans 10 µl d'eau bidistillée stérile. 2,5 µl du tampon d'incubation concentré 10 fois sont ajoutés puis 2 µl contenant 5 à 10 unités de l'enzyme. Le volume est complété à 25 µl par de l'eau et mis en incubation pendant 2 h à 37°C. Quand la digestion doit être suivie d'une électrophorèse, la réaction est arrêtée par 10 µl de "tampon d'arrêt" de composition suivante : saccharose 50%, EDTA 50 mM, urée 4 M, bleu de bromophénol 0,1%, pH 7.

Dans la cas d'une double digestion, l'incubation est d'abord réalisée pendant 1 h 30 min avec l'enzyme agissant dans le tampon de plus faible force ionique puis l'autre enzyme est ajoutée et l'incubation continue pendant 1 h 30 min après correction de la force ionique.

La composition des tampons d'incubation des différentes enzymes utilisées est la suivante :

- EcoRI tris 100 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7,5.

- BclI

- HindIII tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, pH 8.

- Pst I

- BamHI tris 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, β-mercaptoéthanol 1 mM, pH 8.

2 - La phosphatase alcaline

0,5 unité de phosphatase alcaline est utilisée dans un volume de 25 µl contenant 1 µg de fragment plasmidique à déphosphoryler. Le tampon d'incubation est constitué de tris 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8. L'incubation est faite à 37°C pendant 30 min. Le traitement à la phosphatase peut être effectué en fin de digestion par une enzyme de restriction.

3 - La ligase du bactériophage T₄

Pour 0,5 µg du fragment vecteur et 5 µg du fragment à cloner, une unité de ligase est utilisée dans un volume réactionnel de 50 µl constitué de tris 20 mM, MgCl₂ 10 mM, dithioérytritol (dte) 10 mM, ATP 0,6 mM, pH 7,6. L'incubation dure 2 h à 22°C ou 15 h à 15°C. Les fragments ligaturés sont utilisés ensuite pour transformer des bactéries.

Les tampons réactionnels et tout le matériel destiné à contenir du DNA sont stérilisés à l'autoclave à 105°C pendant 30 min. Ce traitement, outre l'aseptie, doit assurer l'élimination de toute trace de nucléases susceptibles de dégrader le DNA.

F. - Transformation bactérienne

9 ml d'une culture d'Escherichia coli réalisée sur milieu LB sont centrifugés à 5000 g, 10 min à 0°C. Les cellules sont remises en suspension dans 4,5 ml d'une solution glacée de CaCl₂ 100 mM et centrifugées de la même manière. Elles sont reprises pareillement et laissées 30 min dans la glace, puis centrifugées, remises en suspension dans 0,45 ml de CaCl₂ 100 mM avant d'être transférées dans un tube de verre. Les bactéries sont laissées ainsi 15 h à 0°C.

La transformation se fait en ajoutant 50 µl contenant le plasmide à transférer à 100 µl des cellules traitées par le CaCl₂. Le mélange est laissé 15 min dans la glace puis soumis à 5 chocs thermiques successifs de 0 à 37°C, chaque passage durant 30 s. La suspension est diluée au dixième dans du milieu LB, incubée à 30°C en agitation pendant 2 h. Des dilutions et étalements sur milieu sélectif sont ensuite effectués.

G. - Electrophorèses en gel d'agarose

1 - Gel horizontal

La concentration en agarose varie de 0,6 à 1,2%. Le tampon d'électrophorèse (TBE) est constitué de tris 89 mM, acide orthoborique 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,2-8,3. Dans chaque alvéole formée par un peigne à 10 dents, sont déposés 35 µl obtenus par addition de 10 µl de "tampon d'arrêt", dont la composition est donnée dans le paragraphe E-1, à 25 µl d'une solution contenant de 0,2 à 1 µg de plasmide ou de fragments issus d'une digestion par une enzyme de restriction. La différence de potentiel est de 130 V. La migration dure de 2 à 4 h. Le gel est ensuite coloré pendant 20 min dans un bain contenant quelques gouttes d'une solution de bromure d'éthidium à 1 mg/ml d'eau, puis décoloré pendant 20 min dans de l'eau distillée. La visualisation des bandes est réalisée sous éclairage ultra-violet de longueur d'onde 322 nm.

2 - Gel vertical

Elle permet la lyse des bactéries dans les alvéoles du gel par la méthode d'ECKAERT (64) modifiée par SIMON et al. (251). Un dépôt dans une alvéole formée par un peigne à 15 dents nécessite la préparation suivante.

A 625 μ l d'une culture bactérienne parvenue à une densité optique à 600 nm d'environ 0,3, le même volume de tampon tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8 est ajouté. Les cellules sont sédimentées par centrifugation 5 min à 10000 g. Le culot est placé dans de la glace après élimination du surnageant et remis en suspension dans 45 μ l de tampon de lyse constitué de TBE contenant 25% de saccharose, 12% de Ficoll, 5 u/ml de RNase et 1 mg/ml de lysozyme, les deux enzymes étant ajoutées juste avant emploi. Après homogénéisation, la suspension est aussitôt déposée dans l'alvéole puis recouverte de 60 μ l de tampon TBE contenant 1% de SDS, 0,05% de bleu de bromophénol et 0,4% d'agarose. Après solidification de cette solution, l'alvéole est remplie avec de l'agarose maintenue liquide. La concentration en agarose du gel est de 0,8%. La migration est d'une heure à 30 V puis de deux heures à 130 V. La coloration et l'observation du gel sont faites de la même manière qu'indiqué précédemment.

H. - Electroélution

L'électroélution est utilisée pour isoler un fragment de plasmide après coupure par une enzyme de restriction. Les fragments sont séparés sur gel horizontal d'agarose à 0,6% et le gel est coloré au bromure d'éthidium. Sous éclairage ultra-violet, un petit cube d'agarose contenant la bande de DNA à éluer est découpé et placé dans la cupule d'un concentrateur de protéines. La cupule est remplie de tampon TBE dilué au demi. La quantité de tampon est ajustée pour que l'intensité du courant soit comprise entre 4 et 7 mA. La puissance est de 3W et l'électroélution dure 1 h. Le fragment de DNA sort du gel et est plaqué contre la membrane de la cupule, du côté de l'électrode chargée positivement. Il est recueilli dans 200 μ l de tampon. Cette méthode est utilisée pour préparer des fragments de plasmide ou des gènes isolés en vue du clonage ou de la fabrication de sondes.

I. - Hybridation moléculaire DNA/DNA

La méthode d'hybridation moléculaire utilisée a été initialement mise au point par SOUTHERN (257). Elle permet de repérer dans un génome une séquence nucléotidique déterminée. Le DNA génomique fixé sur une membrane de nitro-cellulose est mis en contact avec une sonde constituée par la séquence nucléotidique à rechercher marquée par "nick-translation", le plus souvent par du ^{32}P . La sonde se fixe alors au niveau des séquences qui lui sont homologues sur la membrane. On peut ensuite repérer la position de la sonde fixée, donc de la séquence homologue, par autoradiographie. Le protocole présenté ci-dessous pour le transfert du DNA est celui décrit par MANIATIS et al. (181) et les conditions d'hybridation sont celles de CROSSWAY et HOUCK (48).

Le DNA dans lequel une séquence doit être recherchée est coupé par une enzyme de restriction et les fragments sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8%. Le gel est coloré au bromure d'éthidium et photographié. Il est ensuite maintenu en agitation successivement dans les bains suivants :

- | | |
|----------------------------------|---------------|
| - HCl 0,2 M | 2 fois 15 min |
| - NaOH 0,4 M, NaCl 0,6 M | " |
| - tris 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,4 | " |

Un lavage rapide à l'eau distillée est effectué entre les bains. Une membrane de nylon de type Gene Screen (New England Nuclear) est découpée aux dimensions exactes du gel et placée pendant 10 min dans de l'eau distillée puis pendant 15 min dans du tampon SSCx20 (SSCx1 : citrate tri-sodique 0,015 M, NaCl 0,15 M) en agitation intermittente.

Le gel est déposé sur trois feuilles de papier Whatman 3MM imbibées de tampon SSCx20 et placées sur une plaque de verre. Les deux couches supérieures sont à la dimension du gel; la feuille inférieure est de même largeur mais est suffisamment longue pour pouvoir tremper de chaque côté de la plaque de verre dans un bac contenant du tampon SSCx20. Le gel est recouvert de la membrane de nylon, puis de trois couches de papier Whatman découpées à la dimension du gel et imbibées de tampon SSCx20. On évite la présence de bulles entre les couches

superposées, surtout entre le gel et la membrane. L'ensemble est surmonté d'une couche de papier absorbant de plus de 5 cm d'épaisseur et d'un poids de 600 à 700 g. Le transfert du DNA du gel sur la membrane va ainsi s'effectuer pendant 12 à 16 h par le flux du tampon entraîné par le papier absorbant. La membrane est ensuite lavée brièvement dans du tampon SSCx5, mise à sécher à température ambiante et placée à l'étuve à 80°C pendant 2 h. Elle peut être stockée à 4°C jusqu'au moment de l'hybridation.

La membrane est mouillée pendant 2 min dans du tampon SSCx5 et placée dans un sac de plastique dans lequel on ajoute un volume de tampon de pré-hybridation équivalent à 120 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de membrane. Le sac est scellé et placé dans un bain-marie à 42°C en agitation faible (moins de 25 min^{-1}) pendant 3 à 5 h. Le tampon de pré-hybridation a la composition suivante :

- SSC x5
- SDS 0,1%
- EDTA 5 mM
- tampon de DENHARDT X5
- tampon phosphate(Na) 25 mM pH 6,5
- formamide 50%
- DNA dénaturé de sperme de hareng 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Le tampon de DENHARDT(57) contient 0,02% de sérum albumine bovine, de PVP et de Ficoll 400. Il est porté à 80°C pendant 15 min puis filtré sur filtre de porosité 0,45 μm . Il est ajouté au moment de l'emploi, de même que le DNA de sperme de hareng dénaturé par la chaleur. Le mélange des autres constituants est stérilisé à l'autoclave à 105°C pendant 30 min. Le tampon d'hybridation a la même composition mais on y ajoute 10% de sulfate de dextran.

Après la pré-hybridation, le tampon est retiré du sac contenant la membrane et rapidement remplacé par le même volume de tampon d'hybridation contenant la sonde radioactive dénaturée comme suit. Une quantité du fragment de DNA marqué correspondant à 1-2.10⁶ DPM est portée dans un bain-marie bouillant pendant 5 min et rapidement refroidie dans de la glace. Le sac de plastique est de nouveau scellé et placé au bain-marie dans les mêmes conditions que précédemment.

La présence de bulles dans le sac doit être évitée. L'hybridation dure de 16 à 24 h. La membrane est retirée du sac et rapidement placée dans du tampon SSCx2, SDS 0,1% à température ambiante pendant 15 min. Elle est ensuite mise en agitation pendant 30 min à 60°C dans du tampon SSCx2, SDS 0,1% puis de la même manière trois fois 30 min dans du tampon SSCx0,1, SDS 0,1%. La membrane est séchée 1 h à température ambiante, et mise en contact avec un film Kodak XAR-5 entre deux plaques de verre portant des écrans de type Dupont Cronex "Hi-plus". L'ensemble est emballé dans des feuilles de papier et d'aluminium et placé à -80°C jusqu'à la révélation du film. Le temps d'exposition doit être déterminé par essais successifs.

En vue d'une nouvelle hybridation, la sonde peut être retirée de la membrane par lavage en agitation pendant 1 h à 65°C dans du tampon phosphate(Na) 10 mM, pH 6,5, formamide 50%, puis pendant 15 min dans du tampon SSCx2, SDS 0,1%, à température ambiante.

résultats et discussion

I. - OBTENTION ET CULTURE DES PROTOPLASTES DE TABAC

A. - Adaptation d'un procédé de purification des protoplastes

HUGHES décrit une méthode de purification des protoplastes en deux étapes (130). La première comprend une centrifugation sur une solution concentrée de saccharose, la deuxième une flottation des protoplastes sur une solution de saccharose. Le protocole est présenté dans la figure 4. Les protoplastes purifiés sont récupérés dans la bande située à l'interface des deux solutions alors que les débris cellulaires restent dans le culot de centrifugation. Il recueille ainsi une suspension dans laquelle subsistent 50% des protoplastes traités comprenant seulement 2% de cellules endommagées.

Un essai préliminaire ne faisant intervenir que la première étape de la méthode, sur les protoplastes de tabac repris dans du milieu T₀ dépourvu de saccharose, nous a permis d'obtenir avec un rendement de 75% une suspension de protoplastes comprenant 86% de cellules sphériques alors que la suspension avant purification en comprenait 69%. Comme un certain nombre de protoplastes sont endommagés, une mise au point de la technique est nécessaire. Dans un premier temps, nous avons réduit la vitesse de centrifugation puis modifié quelques paramètres en vue d'intégrer au mieux cette technique de purification au protocole de récupération des protoplastes décrit par CHUPEAU (42).

Dans chaque essai, le nombre de protoplastes est évalué avant et après purification. Les protoplastes récupérés dans la bande située à l'interface des deux solutions sont comptés sur une cellule de Nageotte. Deux valeurs sont prises en compte : le nombre de protoplastes parfaitement sphériques et le nombre total incluant aussi les protoplastes endommagés et les débris cellulaires d'une taille supérieure au quart de celle d'un protoplaste. Les chloroplastes isolés ne sont donc pas comptés. Ces comptages permettent de calculer la pureté de la suspension, qui représente le pourcentage de protoplastes sphériques dans la suspension après purification. Le rendement de la purification indique le pourcentage des protoplastes recueillis par rapport à leur nombre avant purification.

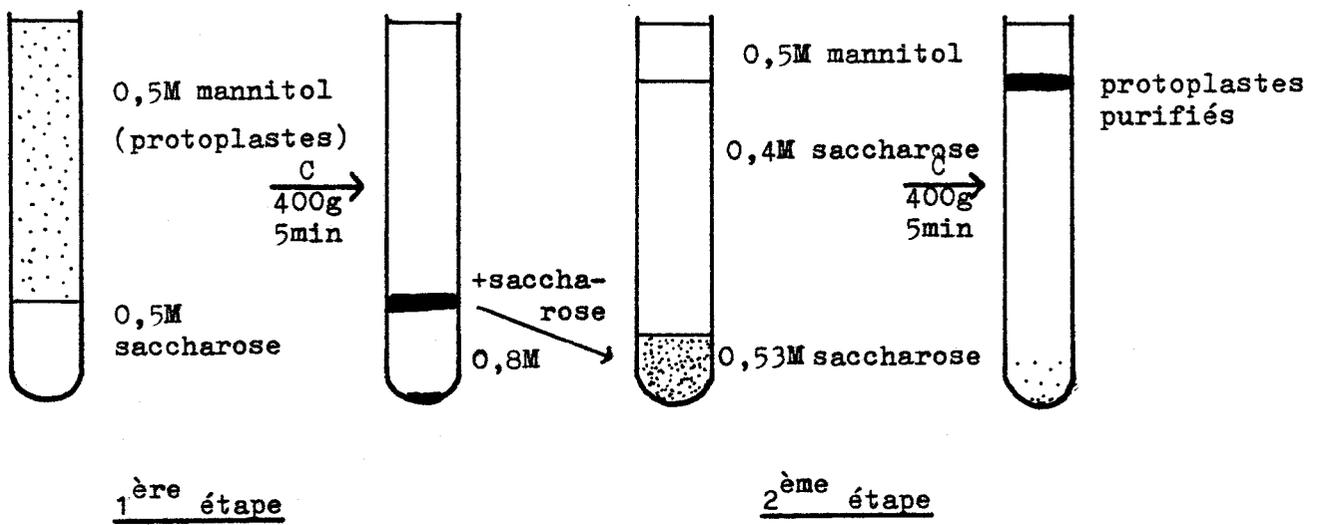


Fig. 4 - Méthode de purification des protoplastes d'après HUGHES et al. (130). C, centrifugation.



1 - Adaptation des paramètres de centrifugation

La réduction de la vitesse de centrifugation à environ 200 g empêche l'éclatement des protoplastes et donne une pureté de 90% (tab. I). Le passage du temps de centrifugation de 5 à 10 min n'apporte aucune amélioration. De même, deux centrifugations sur saccharose n'améliorent pas la pureté. Un point important est d'assurer une montée en vitesse aussi lente que possible. La reprise du protocole de HUGHES (130) avec les deux centrifugations à 200 g a permis d'obtenir une pureté légèrement supérieure avec un rendement inférieur à 40%. Il semble préférable d'utiliser seule la première étape pour obtenir un rendement supérieur.

2 - Composition de la solution inférieure

Deux solutions de densité égale à 1,355 ont d'abord été testées pour reproduire les conditions de HUGHES (130) (tab. II). Les deux solutions donnent des résultats de même grandeur quant à la pureté. Toutefois, la présence de mannitol dans la solution inférieure est à éviter à cause du plus faible rendement obtenu. Une solution de saccharose dans du milieu T₀ dépourvu de mannitol sera utilisée. Différentes concentrations ont été testées (tab. III). Une variation entre 15,4 et 17% est de peu d'influence sur la pureté obtenue.

3 - Composition de la solution supérieure

HUGHES (130) signale de meilleurs résultats quand les protoplastes sont mis en macération dans un milieu légèrement hypertonique.

Nous avons testé une concentration en mannitol de 12,75% au lieu de 8% préconisé dans la méthode de CHUPEAU (42). Les résultats de la purification sont identiques aux précédents mais beaucoup de protoplastes présentent un renflement indiquant leur éclatement. Cette modification a été abandonnée et ont été maintenues les conditions habituelles d'obtention des protoplastes. De plus, un tel traitement aurait pu influencer sur le comportement des protoplastes ultérieurement mis en culture.

	Pureté (%)
avant centrifugation	62
centrifugation à 230g	91
à 180g	89

Tab. I - Effet de la vitesse de centrifugation utilisée lors de la purification des protoplastes sur la pureté obtenue.

	Pureté (%)	Rendement (%)
avant purification	58	100
mannitol 8% + saccharose 6,5%	80	37
saccharose 15,4%	83	59

Tab. II - Etude de la composition en mannitol et saccharose de la solution inférieure utilisée lors de la purification des protoplastes par centrifugation.

	Pureté (%)
avant purification	62
saccharose 15,4%	89
16%	86
17%	90

Tab. III - Effet de la concentration en saccharose de la solution inférieure au cours de la centrifugation des protoplastes.

4 - Effet du temps de macération sur le rendement

En reproduisant les essais de purification avec des protoplastes issus de macérations de durées différentes, les puretés obtenues sont similaires mais les rendements sont très fluctuants. Ces différences pourraient provenir de l'état des protoplastes avant la purification, et plus particulièrement du degré de digestion de la paroi cellulaire. Pour confirmer cette hypothèse, ont été mesurés la pureté et le rendement de la purification de protoplastes recueillis à différents temps de macération. Les résultats sont mentionnés dans le tableau IV.

La pureté varie peu mais le rendement obtenu est proportionnel au degré de digestion des parois cellulaires. La séparation au cours de la purification est fonction de la densité des protoplastes. La présence de paroi résiduelle sur les protoplastes leur donne une densité supérieure qui les fait sédimenter dans le culot de centrifugation alors que des protoplastes totalement dépourvus de paroi ont une densité moindre et restent ainsi à l'interface de la solution de saccharose et du milieu T_0 , lors de la centrifugation. Ceci montre qu'après 18 h de macération, les protoplastes sont totalement dépourvus de paroi. Cette méthode pourrait donc être aussi utilisée pour attester de la digestion complète de la paroi cellulaire, condition essentielle à l'utilisation ultérieure des protoplastes dans des expériences de transformation génétique.

5 - Conclusion : méthode adoptée

La technique de purification s'intègre au protocole de préparation des protoplastes de la façon suivante : les protoplastes récupérés après macération dans une boîte de Petri de 9 cm de diamètre sont centrifugés à 50 g pendant 5 min puis repris dans 10 ml de milieu T_0 dépourvu de saccharose. Dans quatre tubes à hémolyse de contenance 5 ml, sont déposés 1,5 ml d'une solution de saccharose à 16% dans du milieu T_0 sans saccharose ni mannitol. A l'aide d'une pipette à extrémité effilée, 2,5 ml de la suspension de protoplastes sont déposés sans turbulence au-dessus de la solution contenue dans chacun des tubes. Après centrifugation pendant 5 min à 200 g, la bande située à l'inter-

Temps de macération	Pureté (%)	Rendement (%)
15h45	92	29
16h30	91	46
17h15	86	60
18h	96	97

Tab. IV - Rendement de la purification et pureté des protoplastes obtenus après différents temps de macération.



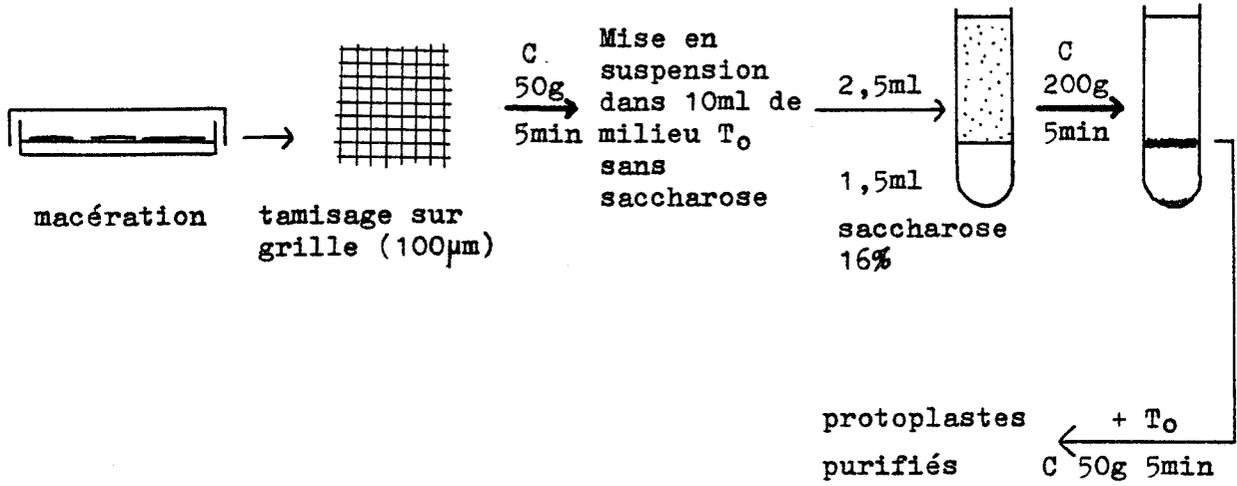


Fig. 5 - Protocole adopté pour l'obtention et la récupération des protoplastes. C, centrifugation.



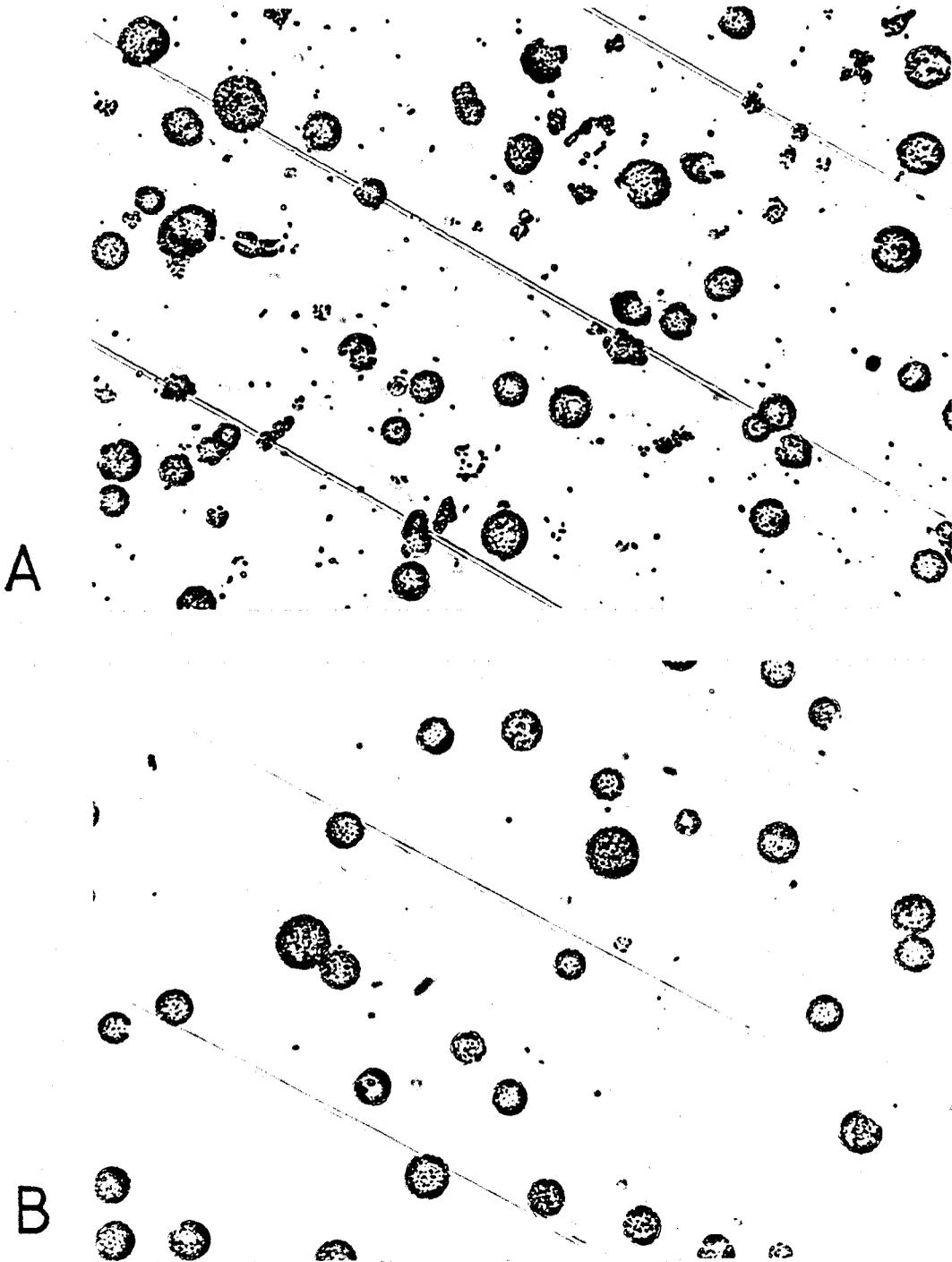


Fig. 6 - Protoplastes au microscope photonique. X330. A. - Avant purification. B. - Après purification sur une solution de saccharose à 16%.



face est recueillie. Elle contient les protoplastes sphériques. Le culot de centrifugation qui contient les débris et les protoplastes endommagés est éliminé. Les protoplastes sont ensuite lavés une fois dans du milieu T₀ dépourvu de saccharose puis mis en culture ou incubés avec des liposomes. Dans ce cas, un autre lavage dans du tampon d'incubation est pratiqué. L'optimisation de cette méthode a permis d'obtenir une suspension contenant 90% \pm 5 de protoplastes parfaitement sphériques alors que ce pourcentage n'est que de 55 \pm 5 avant purification. Le rendement atteint 90% quand la dégradation de la paroi est complète. Le protocole d'obtention des protoplastes est résumé dans la figure 5. La figure 6 établit la comparaison entre la suspension des protoplastes avant et après purification par la méthode adoptée.

B. - Evolution des protoplastes en culture

Les changements de milieu et l'évolution des protoplastes sont résumés dans le tableau V.

En 1974, CHUPEAU et al. (43) reportent la fréquence de 50 à 60% de divisions dans des cultures de protoplastes de Nicotiana tabacum var. Wisconsin 38. MEYER et COOKE (195) observent dans des cultures de protoplastes de mésophylle de tabac que 75% des cellules se divisent avant 120 h de culture et évoluent ensuite vers le stade microcal. Nous avons obtenu dans nos cultures 30 à 50% de cellules divisées après 7 j de culture, soit plus de 10⁵ à partir de 3x10⁵ protoplastes mis en culture dans chaque boîte de Petri. Les premières divisions apparaissent après 3 j de culture. Ces résultats ont pu être obtenus après une révision des conditions de culture des plantes et de préparation du milieu T₀, par l'utilisation de produits plus purs, d'eau déminéralisée et par un contrôle plus strict du pH. En effet, les pourcentages de divisions obtenus avant cette mise au point étaient toujours inférieurs à 1%.



t (jours)	Eléments minéraux et vitamines	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)	Mannitol (%)	Saccharose (%)	Agarose (%)	Observations
0	milieu T ₀	3	1	8	2	0	30 à 50% des protoplastes se divisent
7	milieu C	0,1	0,2	8	2	0	les microcals atteignent 1 à 3 mm de diamètre
40	milieu T ₀	0,1	1	6	2	0,6	les cals grossissent des bourgeons apparaissent
60	milieu T ₀	0,1	1	0	1	0,6	les bourgeons se développent en rosettes
80	milieu T ₀	0,1	0	0	1	0,6	des racines poussent à la base des rosettes

Tab. V - Evolution des protoplastes en culture. Les changements de milieux sont réalisés aux périodes indiquées.

II. - PREPARATION DES PLASMIDES, DES LIPOSOMES ET ESSAIS DE CIBLAGE

A. - Préparation des plasmides

La préparation des plasmides pLGV232neo et pLGV1103neo, non amplifiables au chloramphénicol, a été réalisée par la méthode d'ISH-HOROVICZ (133). Cette méthode prévoit la lyse alcaline des cellules à la soude en présence de SDS. A partir d'un litre de milieu d'une culture parvenue en phase stationnaire de croissance, il a été possible de récupérer en moyenne 300 µg de plasmide après purification sur gradient de chlorure de césium. La même quantité est obtenue à partir de 200 ml de milieu de culture de bactéries possédant un plasmide amplifiable au chloramphénicol. Dans ce cas, la méthode d'HOLMES (121) dans laquelle les cellules sont lysées par ébullition a été utilisée. Il faut noter que la culture des bactéries à 37°C au lieu de 30°C et avec une plus forte agitation aurait probablement donné un rendement meilleur.

La méthode de GROSVELD (100) est utilisée pour préparer rapidement un plasmide à partir de petits volumes de cultures. La solution obtenue contient une plus grande quantité de RNA qui doit être éliminée par un traitement à la RNase. Il subsiste aussi une grande quantité de protéines comme le montre le spectre d'absorption en ultra-violet. C'est pourquoi ont été ajoutées à la fin du protocole, deux extractions au phénol/chloroforme et deux extractions au chloroforme/alcool isoamylique. La quantité de plasmide extrait de 5 ml de culture est de l'ordre de 2 à 5 µg. Cette valeur est déduite de l'observation de l'intensité de la bande obtenue après passage d'une fraction aliquote en électrophorèse en gel d'agarose, en comparaison avec celles montrées par une gamme étalon de DNA du bactériophage λ . Les estimations d'après la mesure de la DO à 255 nm donnent des valeurs plus fortes, ce qui témoigne de la présence de fragments de DNA chromosomiques dans la solution plasmidique. Ceci explique en partie l'excès d'enzyme de restriction généralement requis pour la digestion complète de plasmide préparé par cette méthode.

B. - Préparation des liposomes

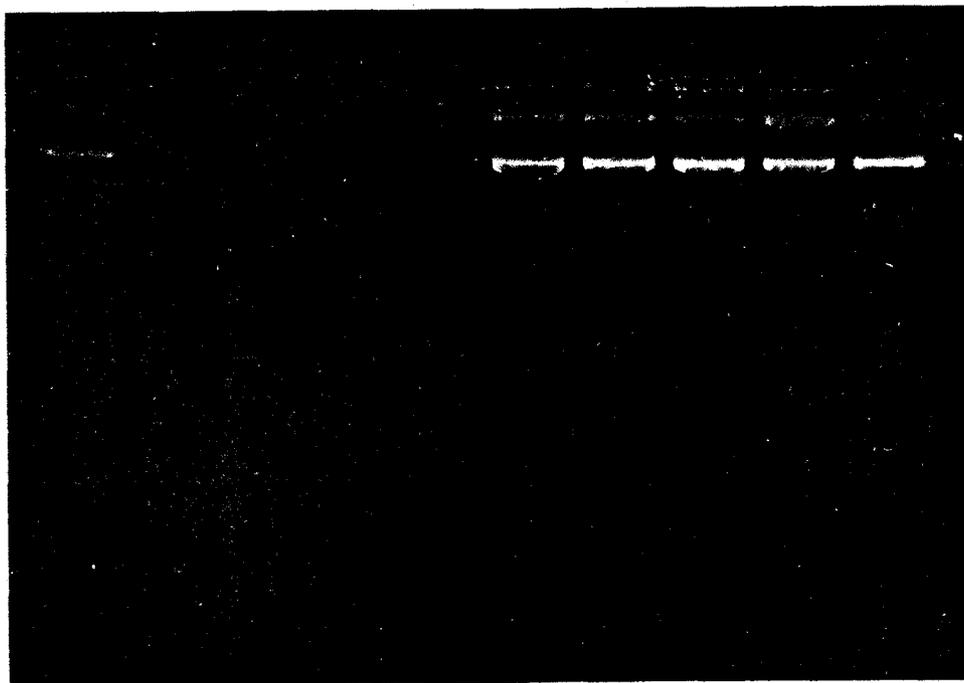
1 - De type MLV

Le mélange lécithine/stéarylamine décrit par LURQUIN (172) a été utilisé. Après leur formation, les liposomes de type MLV peuvent être facilement sédimentés par centrifugation à 15000 g. Une mesure de la radioactivité effectuée sur une fraction des liposomes repris après centrifugation donne une évaluation du pourcentage de plasmide lié aux liposomes. Ce pourcentage est de $55\% \pm 10$. Il ne peut s'expliquer que par l'association du plasmide à l'extérieur des liposomes. En effet, une telle valeur ne s'accorde pas avec le volume interne théorique calculé (262). Le plasmide serait donc lié aux liposomes par des forces électrostatiques; une partie seulement serait encapsulée. Après un traitement à la DNase (100 µg/ml) durant 15 min à température ambiante, en présence de $MgSO_4$ 5 mM, la fraction de plasmide restant précipitable au TCA n'est que de 1%, en référence à une mesure avant le traitement. 99% du plasmide est donc totalement dégradé. Une expérience réalisée dans les mêmes conditions a montré que 40% du plasmide lié à des liposomes de type MLV restait précipitable au TCA. 60% est donc accessible à la DNase. Il s'agit du plasmide lié aux couches externes de lipides. 40% du DNA se trouve protégé du fait de sa situation entre les couches lipidiques des liposomes ou de sa liaison plus étroite avec les couches externes. Le remplacement dans les liposomes de la stéarylamine par du dicétylphosphate ou du sitostérol fait diminuer le pourcentage de liaison du plasmide aux liposomes, ce qui suggère l'implication de ce composé dans la liaison avec le plasmide.

2 - De type REV

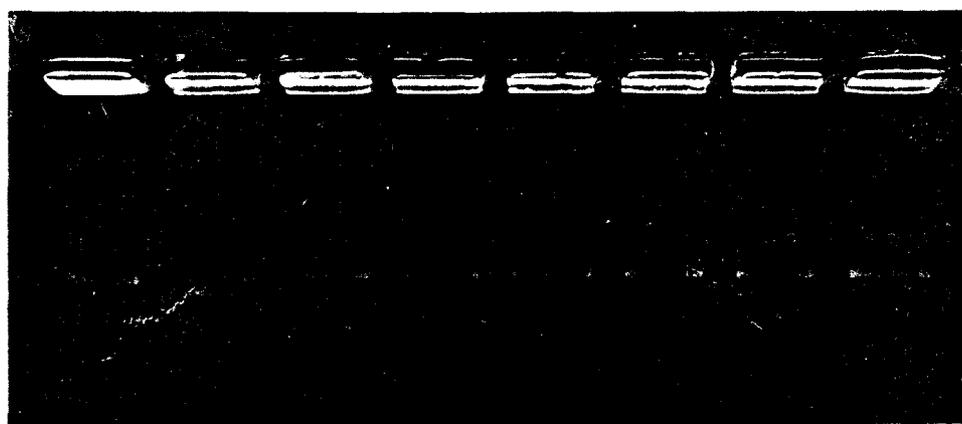
La préparation de liposomes de type REV inclut une étape de passage aux ultrasons des lipides dissous dans de l'éther surmontant une phase aqueuse contenant le plasmide à encapsuler. Le traitement doit aboutir à une émulsion stable résultant de la dispersion des deux phases par les ultrasons (262). Le plasmide, sensible aux ultrasons, peut être dégradé quand une puissance trop élevée est appliquée. Nous avons dans un premier temps utilisé un appareil de type MSE150

t(s)	1	2	5	2	5	0	1	2	5	10
Amplitude	1	1	1	3	3	-	6	6	6	6



A

t(s)	0	5	10	20	30	40	60	90
------	---	---	----	----	----	----	----	----



B

BU
LLE

Fig. 7 - Electrophorèses en gel d'agarose d'un plasmide soumis aux ultrasons. A. - Appareil de type MSE150, puissance "high". La durée des traitements et l'amplitude des ultrasons sont indiqués en haut de chaque colonne. B. - Appareil à bain de type Bransonic 5. Les temps de traitement sont indiqués.

muni d'un réglage de l'amplitude de 1 à 6 et de la puissance : position "low", "medium" et "high". Un traitement durant 5 secondes, d'amplitude 1 et de puissance "high" entraîne une bonne dispersion des deux phases mais un contrôle par électrophorèse en gel d'agarose montre que le plasmide est totalement dégradé : on ne retrouve aucune bande mais une trainée diffuse. La figure 7 montre le profil électrophorétique d'un plasmide soumis aux ultrasons, l'amplitude, la puissance et le temps de traitement étant modifiés.

Seuls les ultrasons d'amplitude 6 conservent l'intégralité du plasmide. Cette amplitude utilisée avec la puissance "high" pendant 10 secondes, n'entraîne pas la dispersion des phases aqueuse et organique. Il n'est donc pas possible avec cet appareil, d'obtenir simultanément le maintien de l'état du plasmide et la dispersion des phases. C'est pourquoi nous avons utilisé par la suite un appareil à ultrasons à bain de type Bransonic 5 de puissance 14W et de fréquence 55KHz. L'état du plasmide après différents temps de traitement est montré sur la figure 7. Des temps supérieurs à 1 min n'entraînent aucune dégradation du plasmide. Une dispersion complète des phases étant obtenue à la suite d'un traitement de 2x15 s, cette durée a été retenue pour la préparation des liposomes.

Au cours de la suite de la préparation, le mélange est placé dans un évaporateur rotatif relié à une pompe à vide. L'évaporation de l'éther entraîne la formation des liposomes. Au début de l'évaporation, la baisse de pression doit être régulée. Il se forme alors un gel qui se dépose sur la paroi du tube. A ce stade, le vide doit encore être limité pour éviter un éclatement trop brutal du gel. Après l'éclatement, la pression est diminuée pour éviter toute trace d'éther dans la suspension de liposomes. On laisse 5 à 10 min sous vide pour obtenir une suspension hétérogène qui, homogénéisée après addition de tampon, donne une suspension de liposomes bilamellaires. Ces liposomes peuvent être séparés du plasmide non encapsulé par centrifugation sur gradient de Ficoll comme indiqué dans le paragraphe II-B-2 de la deuxième partie. Un comptage de la radioactivité d'une fraction aliquote donne le pourcentage d'encapsulation d'un plasmide marqué dans des liposomes. Une mesure par cette méthode a donné la valeur de 18% de plasmide encapsulé dans les liposomes, en utilisant l'appareil à ultrasons à bain.

Le pourcentage d'encapsulation paraît faible en comparaison avec ceux obtenus par FRALEY et al. (76), LURQUIN et SHEEHY (176) qui sont respectivement de 40 et 20%. Ceci pourrait en partie provenir de la méthode de mesure. En effet, deux bandes se sont disposées dans le gradient de Ficoll alors que les liposomes doivent se disposer dans une seule après centrifugation. Une autre hypothèse pourrait être l'insuffisance de la puissance et de la fréquence des ultrasons délivrés par l'appareil utilisé : 14W et 55KHz au lieu de 80W et 80KHz préconisés (262). La dispersion des phases aqueuse et organique, bien qu'apparemment complète, serait peut-être insuffisante.

C. - Observation des liposomes

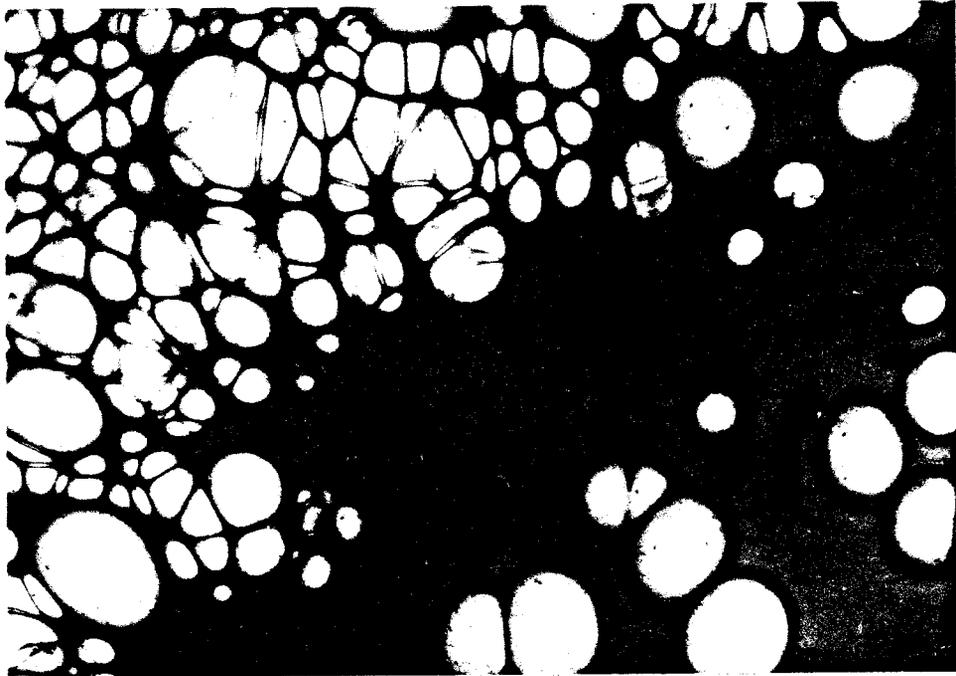
Après coloration négative à l'acide phosphotungstique, les liposomes de type REV apparaissent au microscope électronique comme des sphères isolées ou accolées (fig. 8). Le rapport d'agrandissement donne une évaluation de leur taille. Celle-ci varie entre 0,1 et 1,1 μm avec une grande répartition autour de 0,4 μm .

Au moment de la fixation, les liposomes sont en suspension dans une solution contenant du mannitol. Lors de la fixation à l'acide phosphotungstique, ils tendent à éclater du fait de l'hypotonie du fixateur ajouté mais ils sont fixés au début de l'éclatement. On peut voir sur la photographie B de la figure 8 que les zones de fracture des deux couches de lipides constituant le liposome ne sont pas superposées. Cette observation confirme la structure oligolamellaire des liposomes de type REV.

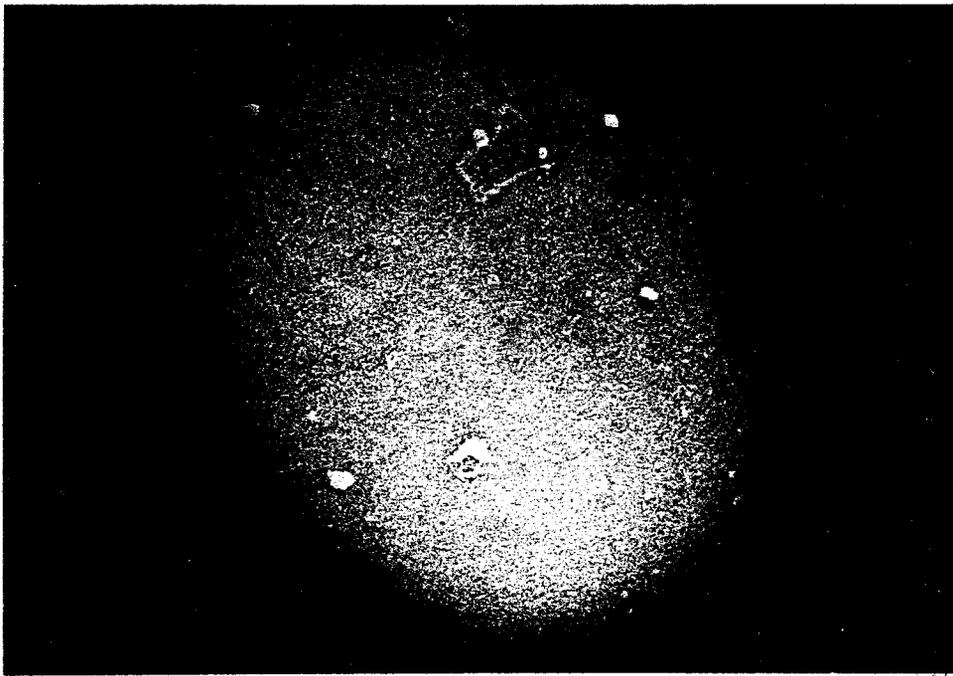
D. - Essais de ciblage des liposomes sur les protoplastes

L'objectif d'un ciblage est de définir la formulation de liposomes assurant leur liaison aux cellules utilisées, afin qu'ils puissent y délivrer leur contenu. Cette expérimentation est le plus souvent conduite avec des liposomes contenant une substance fluorescente qu'il est facile de détecter au microscope photonique.

Des protoplastes ont été incubés avec des liposomes de type REV(-) de composition PC/ β -sitostérol/PS (7/2/1) (M/M) et des liposomes de type



A



B



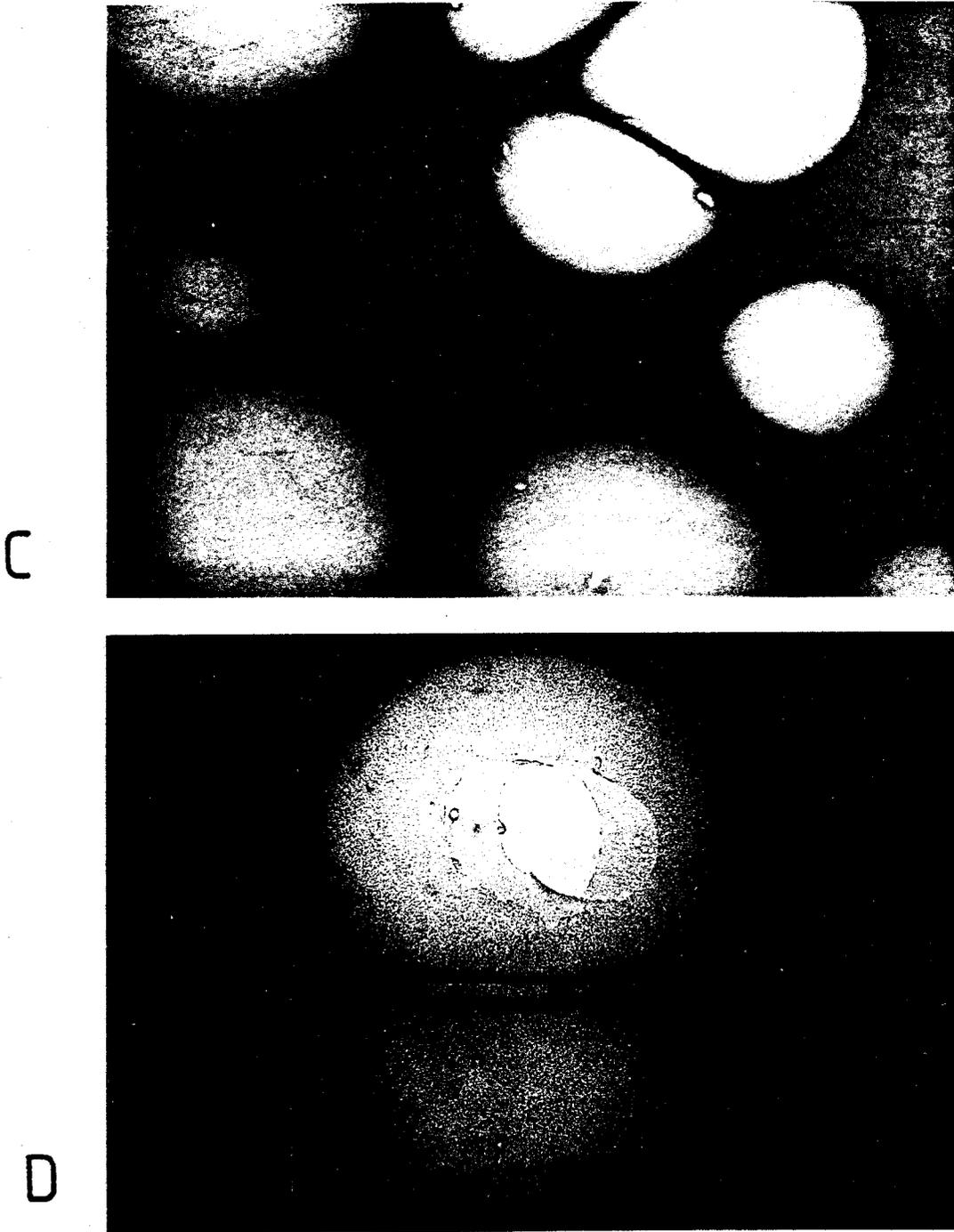
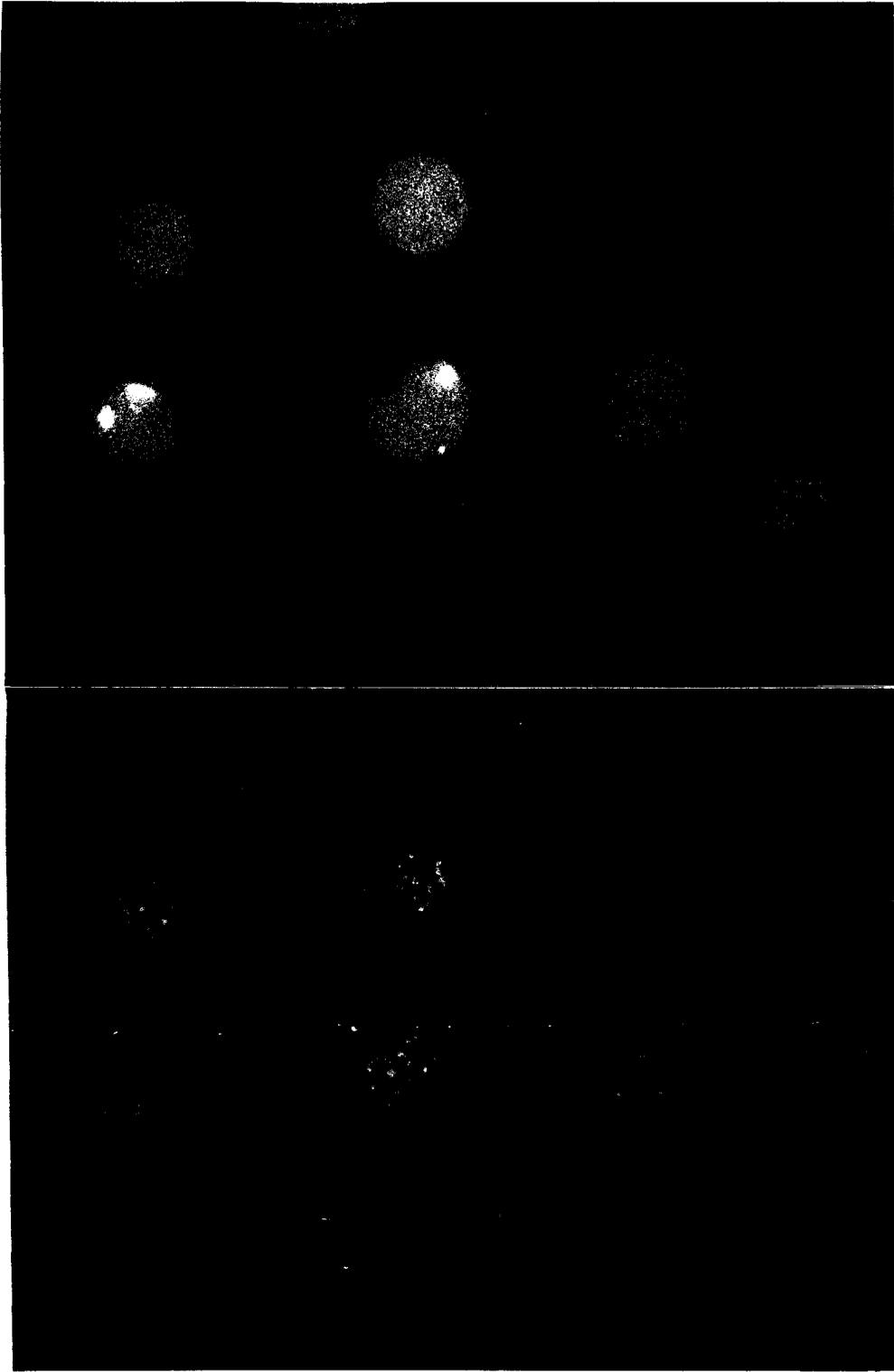


Fig. 8 - Liposomes de type REV, de composition PS/CHO. Microscopie électronique en transmission, coloration négative. A. - X17000. B. - X120000. C. - X170000. D. - X60000. Une fracture met en évidence les deux couches de lipides dont le liposome est constitué.



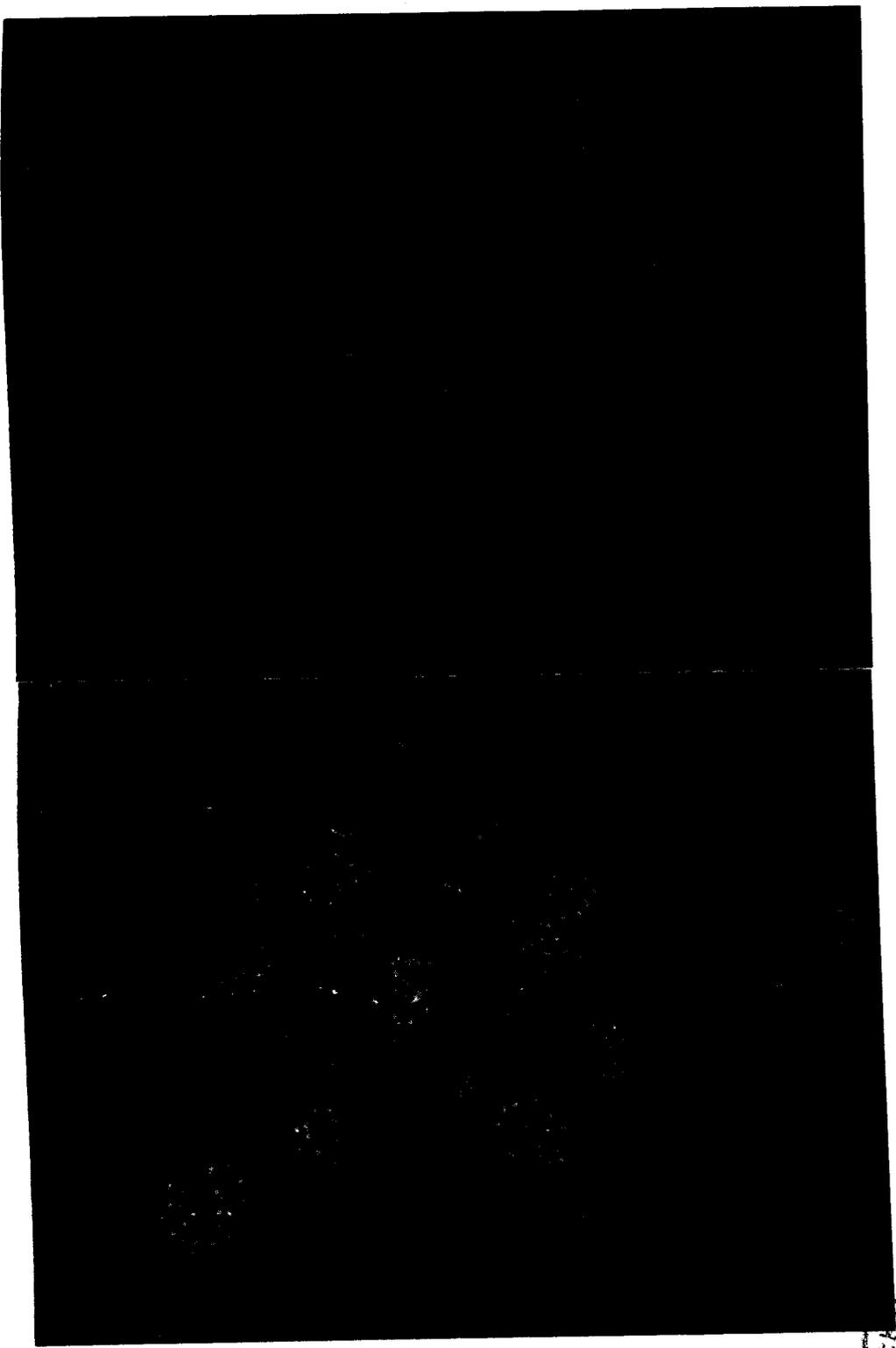
Liposomes	Quantité de lipides (mg)	Incubation	Fluorescence
REV(+)	1	-	+
REV(+)	0,1	PEG-CaCl ₂	+
REV(-)	1	-	ε
REV(-)	0,1	PEG-CaCl ₂	+++

Tab. VI - Appréciation visuelle de la fluorescence liée aux proto-
plastes observés au microscope après incubation avec des liposomes con-
tenant de la 6-carboxy-fluorescéine.



A





B



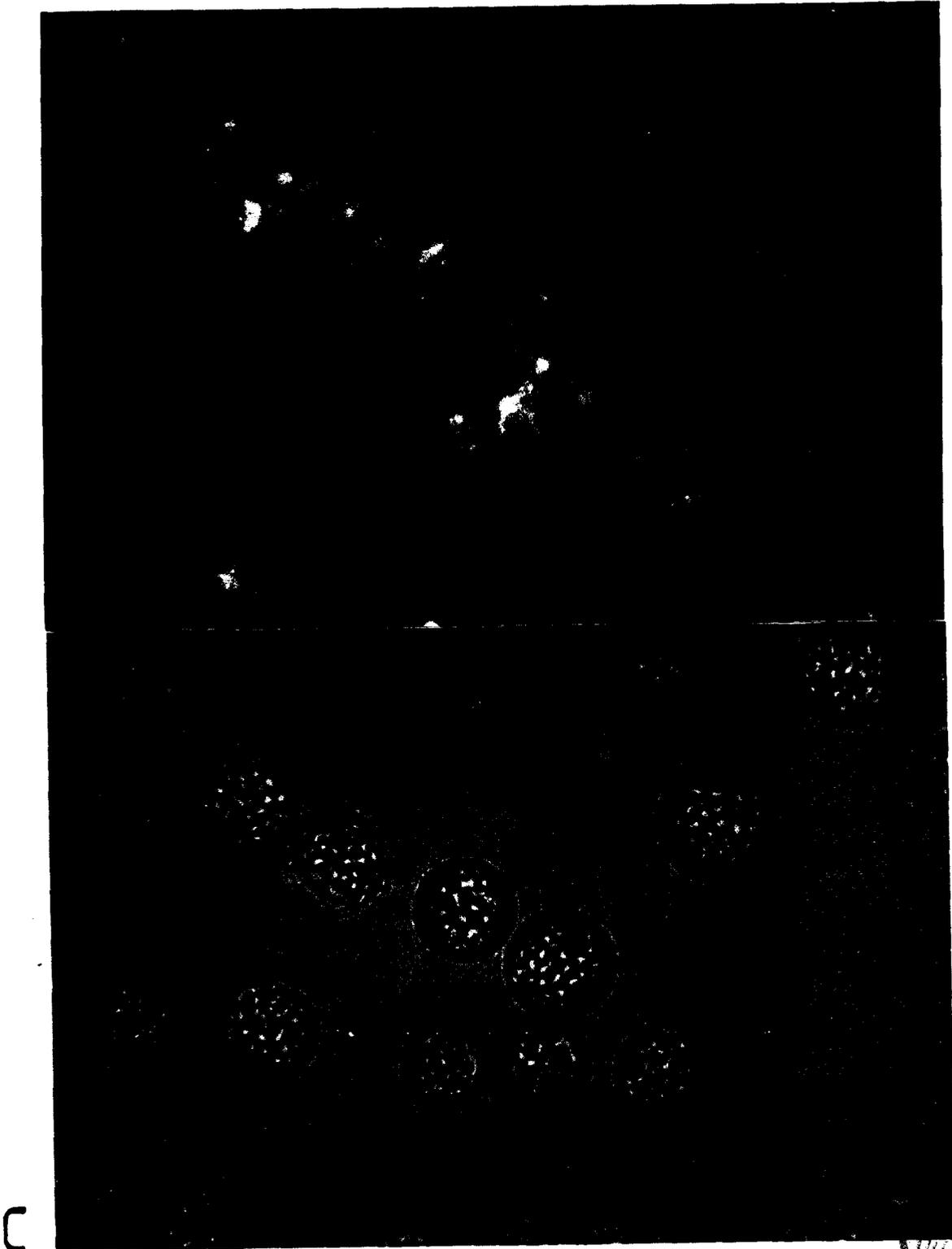


Fig. 9 - Observations au microscope photonique en fluorescence (haut) et en lumière blanche (bas) de protoplastes ayant été incubés avec des liposomes contenant de la 6-carboxy-fluorescéine. X1600.

A. - Liposomes de type REV(+). B. - Liposomes de type REV(-).

C. - Liposomes de type REV(-); incubation en présence de PEG et de CaCl_2 . REV(+): PC/SS/SE (10/2/1); REV(-): PC/SS/PS (10-2/1).

REV(+) de composition PC/ β -sitostérol/stéarylamine (7/2/1) (M/M). Les conditions d'incubation sont décrites dans le paragraphe IIA de la deuxième partie. De plus, des protoplastes ont été incubés en présence de PEG et de CaCl_2 selon la méthode mise au point et décrite à la page 44. Les protoplastes sont lavés et observés en fluorescence. Les résultats des observations sont mentionnés dans le tableau VI.

Les photographies de la figure 9 montrent la présence de liposomes autour de protoplastes observés en fluorescence. La présence de pigments naturels fait apparaître les protoplastes rouges alors que la 6-carboxy-fluorescéine contenue dans les liposomes leur donne une coloration jaune. Pour chaque observation, le même cliché a été réalisé en lumière blanche afin de témoigner de l'état des protoplastes observés. La diffusion de 6-carboxy-fluorescéine dans un protoplaste est visible sur la photographie A. De nombreux liposomes sont visibles autour des protoplastes sur la photographie C. Les liposomes sont localement agrégés.

Les résultats de ces expériences indiquent que les liposomes chargés positivement semblent avoir pour la membrane des protoplastes une affinité plus marquée que les liposomes chargés négativement, en l'absence de tout agent fusogène. Toutefois le nombre de liposomes autour de chaque protoplaste est beaucoup moins important qu'après incubation avec des liposomes chargés négativement, en présence de PEG et de CaCl_2 . Ceci confirme le choix des REV(-) (174,175) et des conditions d'incubation utilisées avec les protoplastes (237,73,176,206).

III. - ETUDE DES FACTEURS INFLUENCANT LA LIAISON DES LIPOSOMES AUX PROTOPLASTES

Cette étude a été réalisée principalement avec des liposomes de type MLV contenant un plasmide marqué au ^{35}S . Chaque essai est réalisé sur 5×10^5 protoplastes repris dans 0,5 ml de tampon d'incubation. Les lavages des protoplastes après incubation éliminent les liposomes qui ne leur sont pas liés. La radioactivité associée aux protoplastes est ensuite comptée. Est aussi mesuré le marquage des liposomes. Le rapport des deux valeurs en DPM donne le pourcentage des liposomes liés aux protoplastes. Avant d'entreprendre cette étude, nous avons déterminé

la quantité de liposomes pouvant être utilisée sans dommage pour les protoplastes car l'effet toxique des liposomes a été démontré (237).

A. - Effet de la concentration en liposomes sur la viabilité des protoplastes après incubation

La viabilité a été évaluée par le comptage des protoplastes ne retenant pas le bleu EVANS, colorant spécifique des cellules mortes. L'aspect des protoplastes est aussi pris en considération ainsi que leur agrégation. Les résultats sont présentés dans le tableau VII.

Une trop forte concentration en liposomes entraîne la formation d'agrégats de protoplastes. Un grand nombre de protoplastes sont endommagés dans les agrégats. Pour éviter leur formation, nous avons choisi d'utiliser 0,1 mg de lipides pour 5×10^5 protoplastes. 100 nmoles sont généralement utilisées (76, 237) ce qui est proche de la valeur retenue.

B. - Effet de la température d'incubation

Le pourcentage de liaison des liposomes aux protoplastes est évalué en fonction de la température d'incubation (tab. VIII).

L'importance de la température d'incubation des liposomes avec des cellules animales (72) et des protoplastes de cellules végétales (276) a été démontrée. Nos résultats suggèrent que des températures supérieures à la température ambiante augmentent la liaison. Nous utiliserons donc une température de 30°C au lieu de la température ambiante plus généralement admise. L'effet inducteur de la température sur la liaison des liposomes aux protoplastes pourrait se faire par l'augmentation de la fluidité des lipides liposomaux et membranaires (244).



Lipides pour 5.105 protoplastes (mg)	Nombre total de protoplastes isolés	Nombre de protoplastes non sphériques	Nombre d'agrégats	Protoplastes sphériques (%)	Protoplastes morts isolés (%)
0	260	26	0	90	13
0,1	224	34	0	85	9
0,3	146	22	12	85	14
0,5	129	24	18	81	9,5
0,7	89	15	17	83	19

Tab. VII - Effet de la concentration en liposomes sur la viabilité des protoplastes après incubation.
Conditions d'incubation : MLV PC/St (10/1), tris-maléate 10 mM pH 5,2, mannitol 11%, PEG 10%, 30°C,
dilution au CaCl₂ 50 mM dans le tampon d'incubation.

Température (°C)	% de liaison
17	8,8
25	12,8
30	16,2
37	12,2
45	14,4

Tab. VIII - Pourcentage de liaison liposomes-protoplastes en fonction de la température. Conditions d'incubation : MLV PC/St (10/1), citrate 25 mM pH 5,6, mannitol 11%, PEG 5%, dilution au CaCl_2 100 mM dans le tampon d'incubation.

Composition des liposomes (P/P)	% de liaison
PC/St	22
PC/St/DCP	12
PC/St/SS	5

Tab. IX - Pourcentage de liaison aux protoplastes de liposomes de type MLV de différentes compositions. Conditions d'incubation : citrate 10 mM pH 5,6, mannitol 11%, PEG 10%, 30°C, dilution au CaCl_2 50 mM dans le tampon d'incubation.

C. - Effet de la composition des liposomes de type MLV

Le mélange lécithine-stéarylamine a été reconnu favorable à la liaison des liposomes aux protoplastes (176, 37). Nous y avons ajouté différents lipides et mesuré les pourcentages de liaison (tab. IX).

Quels que soient les lipides ajoutés à la composition PC/St, le pourcentage de liaison aux protoplastes est diminué. La stéarylamine donne aux liposomes des charges positives. L'addition d'autres lipides comme le dicétylphosphate diminue leur capacité de liaison aux protoplastes par l'apport de charges négatives.

D. - Influence du pH

Des pH acides ont été jugés favorables à la liaison aux protoplastes des liposomes de type MLV(+) (176). Nous avons voulu préciser cette prééminence et localiser la zone des pH optimaux. Deux expériences indépendantes sont rapportées dans le tableau X et les résultats regroupés dans la figure 10. Les résultats obtenus avec des tampons d'incubation différents montrent que le pH optimal se situe au voisinage de 5,3-5,5.

E. - Effet du chlorure de calcium

Les ions bivalents, en particulier l'ion calcium, ont une importance capitale dans les interactions membranaires. Leur effet se manifeste seul ou en association avec les polymères utilisés dans le milieu d'incubation (24). Ils provoquent des modifications de charges à la surface des membranes (205) pouvant aboutir à des fusions cellulaires (25). Les pourcentages de liaison obtenus en présence de différentes concentrations en CaCl_2 sont indiqués dans le tableau XI.

Le CaCl_2 est inhibiteur aux concentrations supérieures à 5 mM et ne semble pas nécessaire. Cependant, une étude a montré que la présence de 5 mM de CaCl_2 était indispensable pour obtenir l'infection de protoplastes par du RNA viral contenu dans des liposomes (237), c'est pourquoi nous avons retenu cette valeur dans notre protocole.

pH	% de liaison
3,8	2,9
4,2	9,4
4,8	20,4
5,3	22,8
5,8	20,3

Conditions d'incubation : MLV PC/St (10/1), citrate-phosphate 10 mM, mannitol 11%, PEG 10%, 30°C, dilution au CaCl_2 50 mM dans du tampon d'incubation.

pH	% de liaison
4,95	34,8
5,25	45,9
5,6	48,3
6,25	37,4

Conditions d'incubation : MLV PC/St (10/1), tris-maléate 10 mM, CaCl_2 5 mM, mannitol 11%, PEG 15%, 30°C, dilution par du tampon d'incubation.

Tab. X - Effet du pH du tampon d'incubation sur la liaison liposomes-protoplastes. Les deux essais ont été réalisés dans des milieux d'incubation différents.

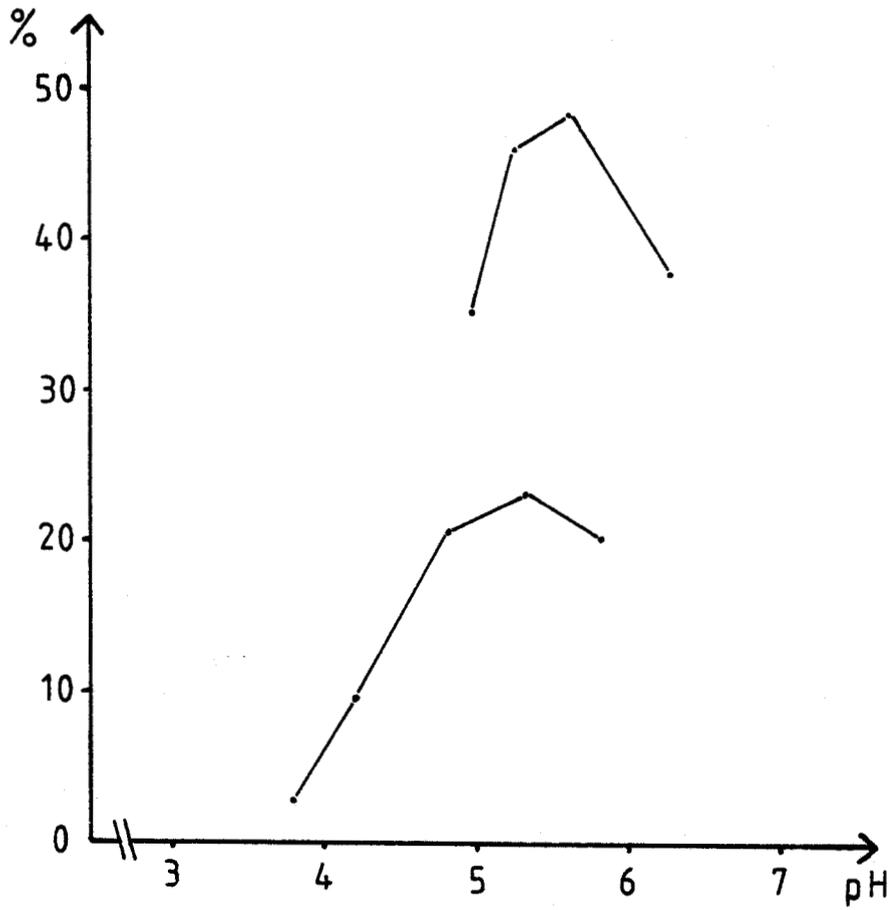


Fig. 10 - Pourcentage de liaison liposomes-protoplastes en fonction du pH du tampon d'incubation (données du tableau X).

CaCl ₂ (mM)	% de liaison
0	24
5	24,7
10	19,4
20	17,6
50	11,1
100	7,4

Tab. XI - Effet de la concentration en chlorure de calcium dans le tampon d'incubation sur la liaison des liposomes aux protoplastes. Conditions d'incubation : MLV PC/St (10/1), tris-maléate 10 mM pH 5,2, mannitol 11%, PEG 15%, 30°C, dilution au CaCl₂ 50 mM dans le tampon d'incubation.

PEG (%)	% de liaison	PEG (%)	% de liaison
10	23,7	0	3,5
20	25,7	5	6,8
25	24,9	10	12,5

Conditions d'incubation :
MLV PC/St (10/1), tris-maléate
10 mM pH 5,2, CaCl₂ 10 mM,
mannitol 11%, 30°C, dilution
au CaCl₂ 50 mM dans le tampon
d'incubation.

Conditions d'incubation :
MLV PC/St (10/1), citrate 10 mM
pH 5,6, mannitol 11%, 30°C, dilu-
tion au CaCl₂ 100 mM dans le
tampon d'incubation.

Tab. XIII - Effet de la composition en PEG sur la liaison des liposomes aux protoplastes. Les deux essais ont été réalisés dans des milieux d'incubation.

F. - Effet du PEG

Le PEG a été utilisé dans des expériences de fusion de protoplastes (137, 46). Les concentrations utilisées sont de 25 à 35%. Nous avons déterminé l'influence de la concentration en PEG sur la liaison des liposomes aux protoplastes (tab. XII).

Une augmentation de la liaison se manifeste jusqu'à 10%. Une augmentation linéaire jusqu'à 12% a été constatée par LURQUIN (176). Ceci explique le choix de la valeur de 10% par différents auteurs (206, 73). Toutefois, l'entrée de liposomes dans les protoplastes semble s'effectuer seulement en présence de concentrations en PEG supérieures à 15% (237). L'effet toxique du PEG ne se manifestant que pour les valeurs supérieures à 20%, celle-ci a été retenue par les auteurs. D'autres travaux montrent que l'infection de protoplastes par du RNA viral encapsulé dans des liposomes a bien lieu en présence de 10% de PEG (82, 73). Ces divergences démontrent l'interdépendance des paramètres d'incubation. Par exemple, la concentration en CaCl_2 ou le type de liposomes utilisé doit modifier la concentration optimale en PEG. Ceci s'accorde avec les hypothèses formulées par KAO et al. (137, 138) sur le mode d'action du PEG sur les membranes : les liaisons éther du PEG donnent une polarité très négative à la molécule qui peut former des liaisons hydrogène avec les groupements de charge positive de diverses substances. Les longues molécules de PEG peuvent agir comme des ponts moléculaires entre les surfaces de deux protoplastes voisins et entraîner l'adhérence des membranes. Le PEG peut se lier aux ions Ca^{2+} ou à d'autres cations qui forment alors des ponts entre les groupements négatifs du PEG et ceux des membranes. Ceci expliquerait la possibilité de contact entre des surfaces membranaires chargées négativement.

G. - Effet de la solution de dilution du PEG

La dilution de la suspension de protoplastes par un tampon de pH élevé contenant des ions calcium est importante pour obtenir la fusion des protoplastes après traitement par le PEG. Selon KAO et al., cette dilution provoquerait une perturbation et une redistribution des charges électriques qui aboutiraient à la fusion des membranes accolées

pH	CaCl ₂ (mM)	% de liaison
5,3	5	33,6
5,3	50	36,6
10	5	34,2
10	50	46,9
milieu T ₀		41,3

Conditions d'incubation : MLV PC/St (10/1), tris-maléate pH 5,3, CaCl₂ 5 mM, mannitol 11%, PEG 10%, 30°C, dilution par du tampon tris-maléate, mannitol 11%.

CaCl ₂ (mM)	% de liaison
0	2,3
20	15,1
50	29,3
100	24,3

Conditions d'incubation : MLV PC/St (10/1), citrate 10 mM pH 5,3, CaCl₂ 5mM, mannitol 11%, PEG 15%, 30°C, dilution par du tampon glyco-colle /NaOH pH10, CaCl₂, mannitol 13%.

Tab. XIII - Effet du pH et de la concentration en chlorure de calcium de la solution de dilution du PEG sur la liaison liposomes-protoplastes. Les deux essais ont été réalisés dans des milieux d'incubation différents.



Tampon	Molarité (mM)	pH	Pourcentage de liaison	
			Essai 1	Essai 2
Citrate	10	5,4	25,1	35,5
Citrate	25	5,4	20,3	29,9
Citrate	50	5,4	13,3	17,5
Citrate	25	6,5	28,4	31,5
Tris-HCl	25	8,0	18,5	22
Tris- maléate	25	5,4	21,8	
-	0	6,0	20,7	

Tab. XIV - Influence de la nature, de la molarité et du pH du tampon d'incubation sur la liaison aux protoplastes de liposomes de type REV. Conditions d'incubation : REV PS/CHO (1/1), PEG 15%, 30°C, dilution par du tampon glyco-colle 25 mM pH10, CaCl₂ 50 mM, mannitol 13%.



(137,138). L'effet du pH du tampon de dilution et de la concentration en CaCl_2 sur la liaison des liposomes aux protoplastes est montré dans le tableau XIII.

Les résultats montrent un effet synergique du CaCl_2 et du pH élevé sur la liaison des liposomes aux protoplastes. Ceci va dans le sens des observations réalisées au cours d'expériences de fusion de protoplastes (143). Dans le cas d'incubation avec des liposomes, la dilution avec du tampon glycine/NaOH contenant du CaCl_2 est pratiquée par certains auteurs (83,206) alors que d'autres diluent simplement par du milieu d'incubation (76,237).

H. - Choix du tampon d'incubation avec les liposomes de type REV

La nature du tampon, sa molarité, son pH ont été modifiés. Les concentrations en mannitol et en CaCl_2 sont constantes, respectivement 11% et 5 mM. L'ensemble des résultats est porté dans le tableau XIV.

Il ressort de cette étude que le tampon citrate doit être utilisé à la molarité 0,01. Les valeurs supérieures entraînent une diminution de la liaison liposomes-protoplastes. Cependant, le tampon citrate n'est pas inhibiteur en comparaison avec le tampon tris-maléate. Le pH optimal n'est plus acide comme dans le cas des liposomes de type MLV(+) mais il n'est pas non plus alcalin. Un pH entre 6 et 7 semble souhaitable dans nos conditions expérimentales alors que des pH alcalins sont généralement utilisés avec les liposomes de type REV(-) (176, 237). Le tampon tris-HCl est le plus souvent retenu (76,176). Certains auteurs utilisent le milieu de culture pour l'incubation (206,82). Dans ce cas, le pH est inférieur à 6. Il nous semble que l'utilisation du tampon citrate 10 mM pH 6,5 donne les meilleurs résultats.

I. - Essais d'agglutination des protoplastes par différentes lectines

L'incorporation de lectines à des liposomes s'est avérée augmenter leur liaison aux protoplastes (176).

Pour étudier la possibilité d'utiliser des lectines, la première étape consiste à identifier des lectines capables d'agglutiner les protoplastes. Les protoplastes sont observés au microscope après incubation avec les lectines durant une heure dans des alvéoles de plaques de microtitration. La plus forte concentration en lectine utilisée est de 500 µg/ml. Des dilutions au dixième sont ensuite réalisées jusqu'à 10^{-6} . La densité des protoplastes est de 3 à $5 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$. Le milieu d'incubation est constitué de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,437 g, Na_2HPO_4 , 1 g, mannitol, 80 g, QSP 1 l d'eau distillée. Les lectines suivantes ont été testées : concanavaline A, lectines VF, PHA, LTA, PHA, WGA, VV, BSI et HD101.

Aucune agglutination des protoplastes n'a été observée dans les conditions expérimentales décrites.

La liaison de la concanavaline A a été observée sur le plasmalemme de protoplastes de Nicotiana tabacum et Vitis vinifera (32). L'effet agglutinant des lectines PHA et WGA a été constaté à des concentrations de $200 \text{ µg} \cdot \text{ml}^{-1}$ et $10^6 \text{ protoplastes} \cdot \text{ml}^{-1}$ chez l'orge, le blé et le tabac (41). La concanavaline A agglutine des protoplastes de carotte, à la concentration de $50 \text{ µg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (96). L'agglutination de protoplastes de 11 espèces de plantes a été obtenue par 4 types de lectines sur 11 testées (158). L'auteur n'observe aucune différence entre les espèces étudiées. Les concentrations minimales efficaces sont de 50 µg de lectine par ml. La densité des protoplastes doit être élevée (10^6 à $10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$). Cette dernière remarque de LARKIN peut peut-être expliquer l'absence d'agglutination des protoplastes dans nos conditions. Des lectines capables d'agglutiner les protoplastes auraient ensuite été testées sur des liposomes préparés avec des lipides extraits de plants de tabac (70) et purifiés sur gel de silice (236). La méthode décrite par KAYSER et al. avait été envisagée pour détecter l'agglutination des liposomes (142).

J. - Conclusion

L'optimisation des paramètres de l'incubation des protoplastes avec les liposomes fait apparaître l'interdépendance de nombreux facteurs. Ce travail est aussi rendu difficile par l'existence de paramètres noncontrôlés, par exemple l'état physiologique des plantes

utilisées pour l'obtention des protoplastes. Pour cette raison, seules ont été comparées dans toute cette étude, des valeurs obtenues avec des protoplastes récoltés simultanément, donc dans le même état physiologique. On observe en effet des écarts entre les essais successifs. Ces écarts concernent seulement les valeurs des pourcentages de liaison obtenues cependant que les variations consécutives aux changements des paramètres testés demeurent dans le même sens. Ceci rend difficile l'expression statistique de chaque résultat mais permet tout de même d'évaluer l'importance de chaque facteur et d'optimiser la méthode.

Les modifications apportées aux différents paramètres de l'incubation ont permis d'obtenir une liaison aux protoplastes d'environ 45% des liposomes de type MLV(+) et de 30% de ceux du type REV(-). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles rapportées par divers auteurs (176,234).

Une telle étude ne permet pas d'évaluer la quantité de DNA incorporé dans chaque protoplaste. En effet, les mesures de radioactivité ne font pas la différence entre les liposomes entrés dans les protoplastes et ceux adsorbés sur la membrane plasmique ou même seulement liés à des débris cellulaires. Une liaison optimale est la condition première de l'entrée du DNA dans les protoplastes mais elle n'en donne pas l'assurance. Celle-ci doit être recherchée par d'autres moyens comme des observations cytologiques ou la mise en évidence de l'expression des acides nucléiques transférés.

IV. - OBSERVATIONS AUTORADIOGRAPHIQUES ET ETUDE ULTRASTRUCTURALE

A. - Cyto-autoradiographie

L'autoradiographie permet de repérer la position d'une substance radioactive dans des organismes, des organes ou des cellules dont on observe les coupes au microscope. Après mise en contact avec le produit marqué, les cellules sont incluses dans une résine. Des coupes d'une épaisseur de 1 µm environ sont réalisées et mises en contact avec une émulsion photographique sensible aux particules émises par la source radioactive. Après révélation, la position des grains

d'argent sur la coupe indique l'emplacement dans la cellule, de la substance marquée qui les a impressionnés. Nous avons observé des coupes de protoplastes préalablement mis en incubation avec des liposomes contenant un plasmide marqué au ^{35}S : l'emplacement des grains d'argent indique la position des liposomes par rapport aux protoplastes.

Des observations ont d'abord été réalisées après incubation de protoplastes avec des liposomes de type MLV de composition PC/St (10/1). Plusieurs situations se présentent. Des amas de grains sont visibles à la périphérie de certaines cellules. D'autres cellules ne comportent que des grains isolés à leur surface ou dans leur cytoplasme. Dans certains cas, des amas de grains ont été localisés à l'intérieur des cellules. Enfin, des coupes ne sont pas marquées. Des comptages ont été réalisés pour déterminer les pourcentages de chacune des situations. Seuls ne sont comptés que les protoplastes intacts. 1633 coupes de protoplastes ont été observées. Les résultats sont portés dans le tableau XV.

Plus de la moitié des coupes observées sont marquées. L'existence de grains d'argent isolés dans le cytoplasme des protoplastes pourrait indiquer que du plasmide s'y trouve. De même, la présence d'amas de grains dans le cytoplasme semblerait indiquer que les liposomes pénètrent dans le cytoplasme.

La photographie A de la figure 11 montre deux amas de grains en périphérie d'un protoplaste dont le noyau est visible. La présence de deux amas a été rarement observée autour d'un même protoplaste. On en trouve le plus souvent un seul. Les amas de grains observés ne peuvent provenir de plasmide isolé; seule la concentration de nombreuses molécules de plasmide dans un liposome peut expliquer le grand nombre de grains les composant. Chaque amas indique donc la position d'un liposome. On observe une dispersion importante des grains autour de chaque amas. Ces grains périphériques ont été impressionnés par des rayonnements obliques partant de la source. Leur emplacement ne coïncide donc pas exactement avec celui de plasmide marqué dans la coupe. La figure 12A illustre ce phénomène. Seul le

Protoplastes	%
non marqués	42,7
ayant des amas de grains en périphérie	14
ayant des grains isolés dans le cytoplasme	31
ayant des grains isolés en périphérie	11
ayant des amas de grains dans le cytoplasme	1,3



Tab. XV - Pourcentage des différentes situations observées en autoradiographie après incubation des protoplastes avec des liposomes de type MLV et de composition phosphatidylcholine/Stéarylamine (10/1).

A



B

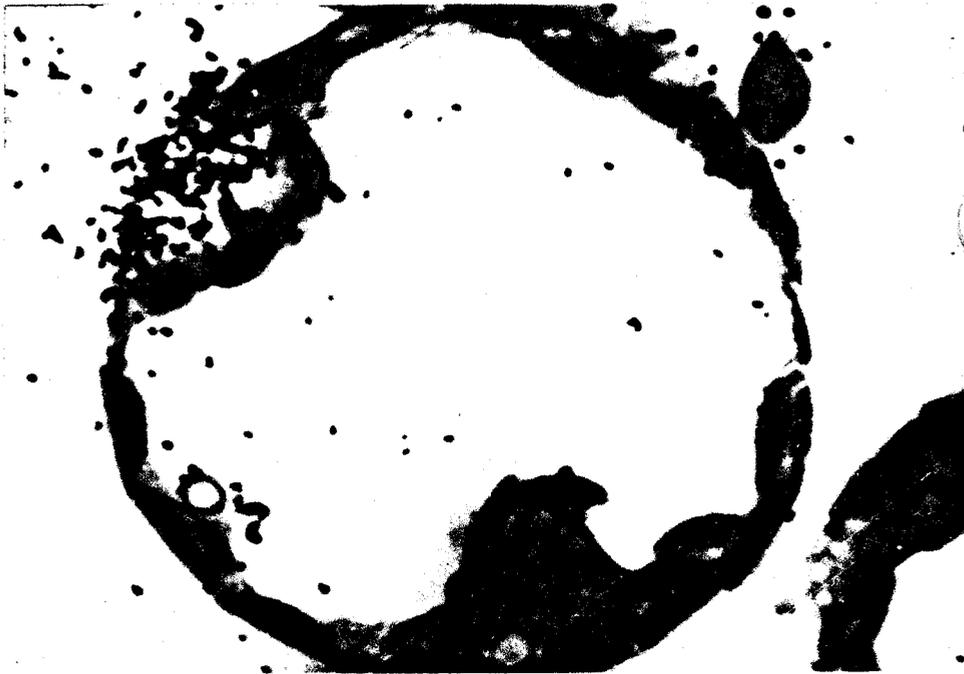
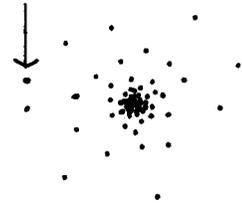
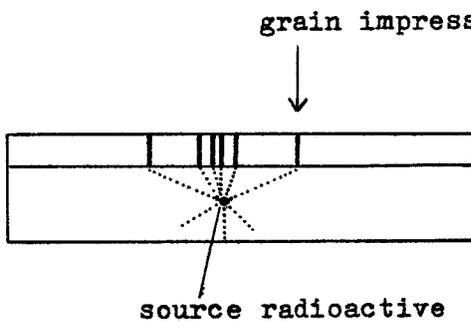




Fig. 11 - Protoplastes vus en coupe au microscope photonique. Cyto-autoradiographie: les grains d'argent impressionnés en périphérie des protoplastes indiquent la position des liposomes de type MLV contenant un plasmide marqué au ^{35}S . A. - Deux amas de grains d'argent sont visibles. X5900. B. - Protoplaste déformé par un liposome. X5300. C. - Amas de grains visible dans le cytoplasme. X6000.

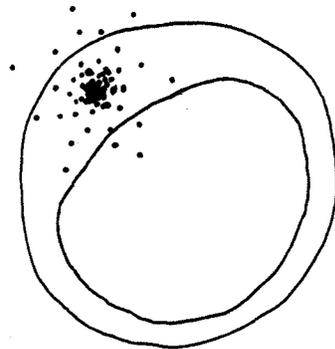
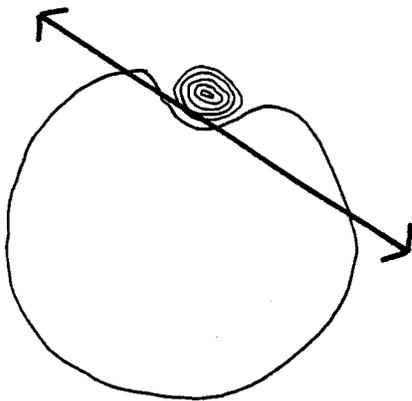




Trajet des rayonnements dans la coupe (vue de profil)

Figure vue au microscope. La tache centrale représente l'emplacement exacte de la source émettrice.

A



Protoplaste déformé par un liposome et plan d'une coupe

Figure observée d'une coupe passant par le plan indiqué

B

Fig. 12 - L'autoradiographie. A.- Le phénomène de dispersion. B.- Hypothèse expliquant l'observation d'amas de grains dans le cytoplasme.

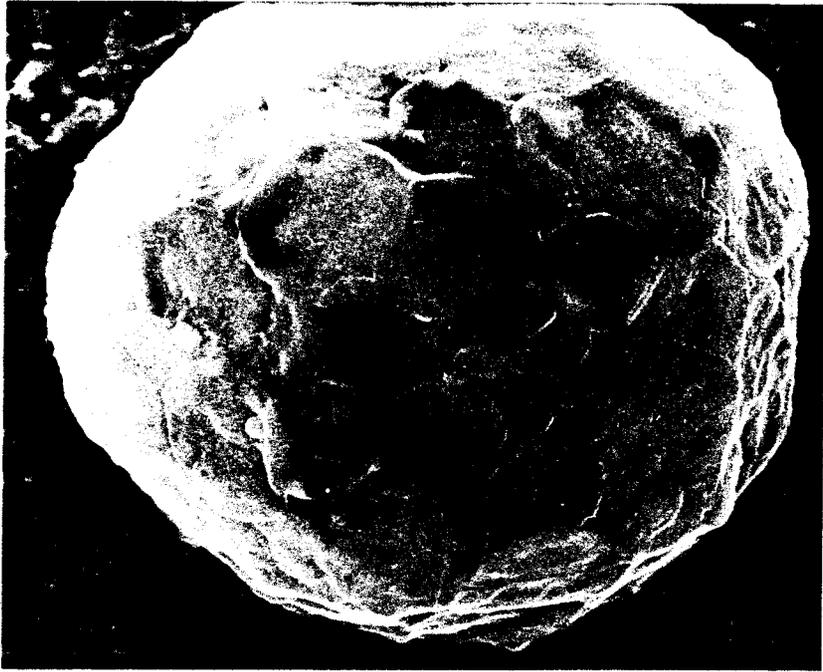
centre des taches observées au microscope correspond à l'emplacement des sources rayonnantes, c'est à dire des liposomes. Par exemple sur la photographie A (fig. 11), la présence de deux grains au dessus du noyau ne signifie pas que du plasmide s'y trouve. Ces grains ont été impressionnés par des rayons ayant cheminé obliquement à partir de l'un ou l'autre des liposomes situés en périphérie du protoplaste. L'interprétation des photographies doit donc être menée avec circonspection. Néanmoins, elle permet une localisation approximative des liposomes par rapport aux protoplastes. Sur la photographie A, les liposomes se situent sur la membrane du protoplaste.

La photographie B (fig. 11) fait apparaître la déformation de la membrane plasmique sous l'effet d'un liposome. L'observation d'une coupe passant par le point de déformation pourrait donner l'impression de la présence d'un liposome dans le cytoplasme, comme l'indique la figure 12 B. La photographie C (fig. 11), où l'on voit un amas de grains dans le cytoplasme ne sera donc pas considérée comme preuve irréfutable de l'entrée d'un liposome dans le cytoplasme du protoplaste.

Les mêmes préparations ont été réalisées sur des protoplastes incubés avec des liposomes de type REV contenant un plasmide marqué au ^{35}S . On n'observe pas dans ce cas, de gros amas de grains comme avec les liposomes de type MLV, mais des grains isolés ou accolés en petit nombre, situés en périphérie des protoplastes. Ceci est une conséquence de leur taille, beaucoup plus petite que celle des MLV. Il est difficile de les localiser de part et d'autre de la membrane plasmique. A cette fin, une étude ultrastructurale a été engagée.

B. - Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage met en évidence le volume des structures observées. Les protoplastes de cellules végétales ont approximativement un aspect sphérique : à leur surface, on peut observer l'emplacement des chloroplastes qui provoquent de petits soulèvements (fig. 13 A). Le protoplaste représenté sur la photographie B a été incubé avec des liposomes avant sa fixation. A sa surface,



A



B

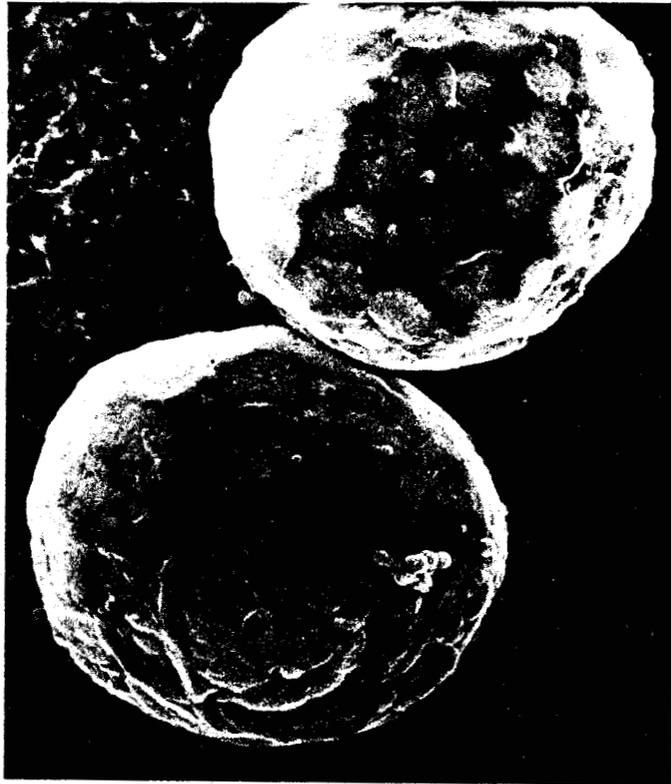


Fig. 13 - Protoplastes vus au microscope électronique à balayage.
A. - Protoplaste n'ayant pas été incubé avec des liposomes. X5500.
B. - Trois sphérules visibles à la surface d'un protoplaste ayant
été incubé avec des liposomes de type REV. X14400. C. - Protoplastes
n'ayant pas été incubés avec des liposomes. Des structures sont
visibles en périphérie. X3300.

A



B



Fig. 14 - Protubérances visibles au microscope électronique en transmission à la surface de protoplastes ayant été incubés avec des liposomes. A. - X120000. B. - X80000.

trois sphérules qui pourraient être des liposomes sont nettement visibles. Cependant, la photographie C (fig. 13) montre deux protoplastes n'ayant pas été mis au contact de liposomes. Des structures identiques sont visibles à leur surface. Elles pourraient être des vésicules périplasmiques ou des organites cytoplasmiques provenant de cellules endommagées. Il apparaît donc difficile d'identifier avec certitude les liposomes à la surface des protoplastes observés au microscope électronique à balayage.

Les photographies A et B de la figure 14 montrent des protubérances de la membrane cytoplasmique de protoplastes observés en coupe en TEM. De telles déformations apparaîtraient en SEM comme des structures analogues à des liposomes fixés sur la membrane plasmique. L'association à la membrane d'organites cytoplasmiques provenant de protoplastes cassés apparaîtrait pareillement. C'est pourquoi l'étude ultrastructurale a été poursuivie en microscopie électronique en transmission.

C. - Microscopie électronique en transmission

L'observation au microscope électronique de coupes de protoplastes ayant été incubés avec des liposomes permet de localiser ceux-ci de part et d'autre du plasmalemme. On peut aussi constater que les liposomes subissent des réarrangements au cours de l'incubation avec les protoplastes. La figure 15 montre que plusieurs liposomes peuvent fusionner ou se juxtaposer, vraisemblablement sous l'effet des ions calcium et du PEG. Les ions calcium pourraient aussi provoquer la lyse de certains liposomes, éventuellement suivie d'une réassociation des lipides dissociés aux liposomes résiduels (93). Dans ce cas, une partie du contenu des liposomes serait perdue. Les réarrangements observés s'accompagneraient donc d'un relargage de plasmide dans le milieu d'incubation. Notons qu'il est facile de repérer les liposomes en coupe en raison de leur propriété osmiophile qui en fait apparaître les contours plus épais que les membranes cellulaires.



Fig. 15 - Liposomes après incubation avec des protoplastes. Microscopie électronique en transmission. Des fusions et des réarrangements des membranes liposomales donnent une configuration en agrégat. X60000.





A



B

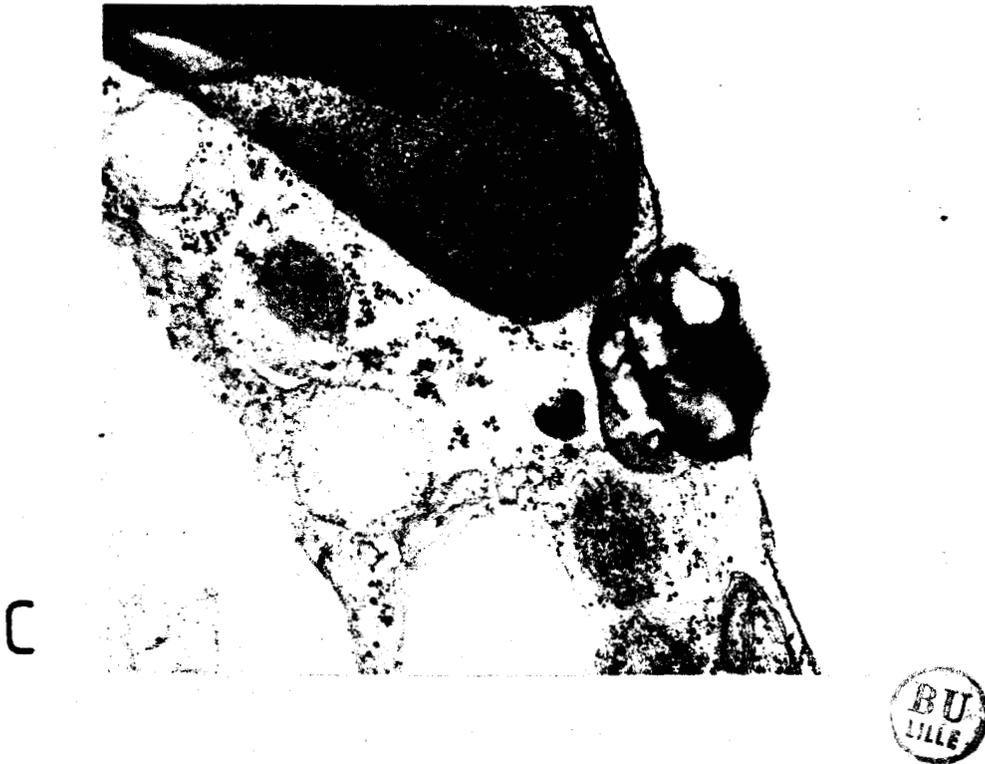


Fig. 16 - Liposomes à la surface de protoplastes observés au microscope électronique en transmission. A.- Liposomes proche du plasmalemme. X60000. B. - Contact étroit entre les liposomes et la membrane cytoplasmique. X120000. C. - Déformation de la membrane cytoplasmique au contact de liposomes, X48000.

en agrégat

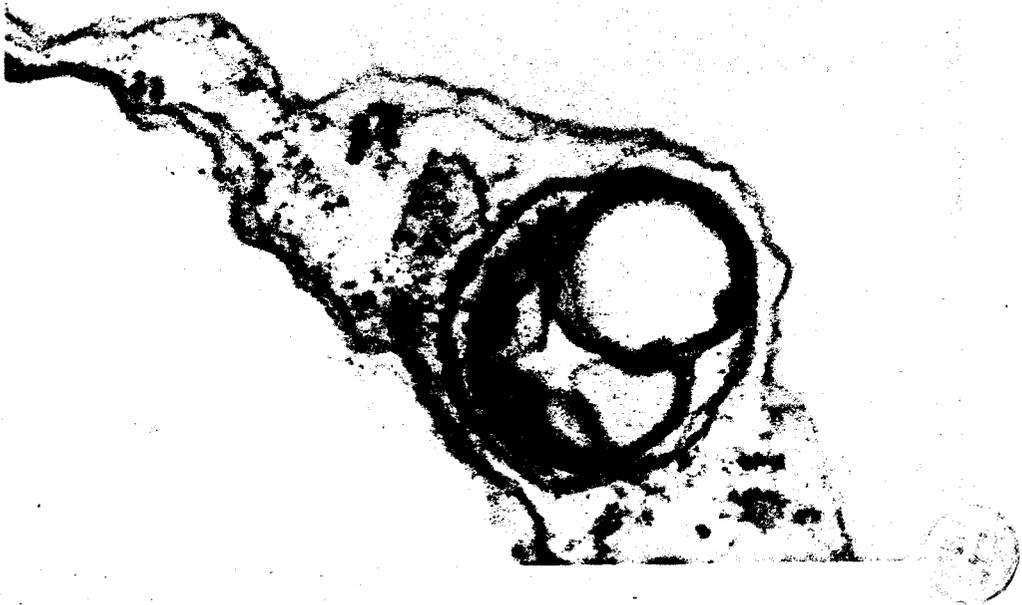


Fig. 17 - Liposomes dans le cytoplasme de protoplastes. Microscopie électronique en transmission. A. - X32000. B. - La membrane entourant le liposome est nettement visible. X120000.

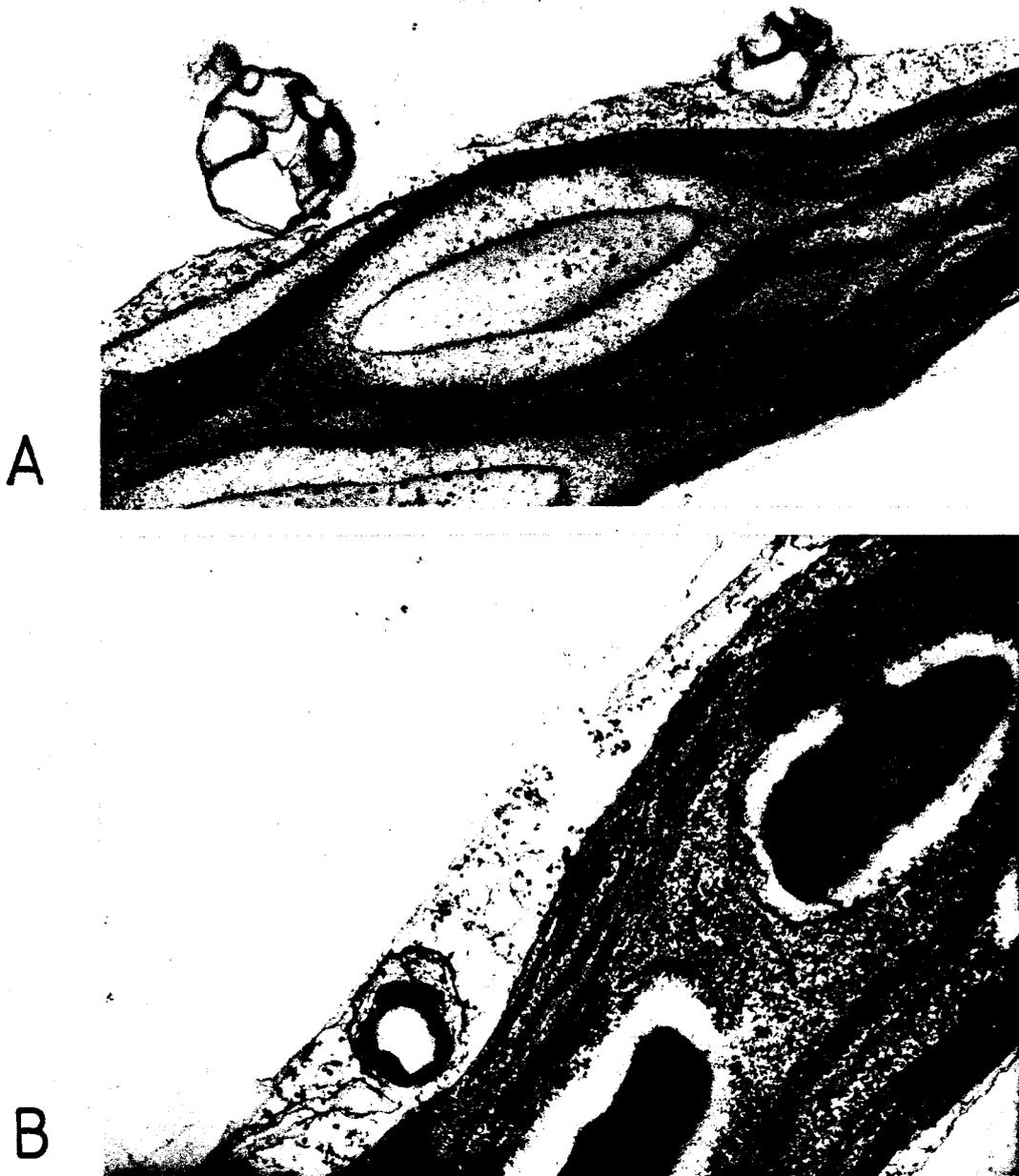


Fig. 18 - Cassures induites par des liposomes dans la membrane cytoplasmique de protoplastes. Microscopie électronique en transmission. A. - Deux *agrégats de liposomes*, X32000. B. - Le liposome est entré dans le cytoplasme. X48000.



Fig. 19 - Liposomes dans une vacuole périphérique d'un protoplasme.
Microscopie électronique en transmission. X32000.



En périphérie de chaque protoplaste observé en coupe, on peut observer plusieurs liposomes. Leur position est variable et différents cas se présentent. La photographie A de la figure 16 montre un liposome à l'extérieur du protoplaste. Le liposome est parfois accolé à la face externe de la membrane (fig. 16 B). Il y a juxtaposition des membranes mais pas de fusion. Une autre configuration est l'invagination de la membrane cytoplasmique sous l'effet d'un liposome (fig. 16 C). Cette étape semble pouvoir aboutir à l'entrée du liposome dans le protoplaste.

Les photographies A et B de la fig. 17 montrent la présence de liposomes dans le cytoplasme. Dans certains cas, une rupture de la membrane cytoplasmique au voisinage du liposome a été observée (fig. 18 A). Cette rupture semble parfois aboutir à l'entrée du liposome dans le cytoplasme (fig. 18 B). Il est alors le plus souvent entouré d'une membrane (fig. 17 B). Des liposomes ont aussi été trouvés dans de petites vacuoles périphériques (fig. 19). L'ensemble de ces observations permet de suggérer le mécanisme de pénétration des liposomes dans les protoplastes.

D. - Discussion

Les observations autoradiographiques ont permis de visualiser les liposomes autour des protoplastes. Des amas de grains correspondant à des liposomes sont visibles sur environ 15% des coupes de protoplastes. Sachant que le diamètre moyen des protoplastes est compris entre 50 et 100 μm et celui des liposomes entre 1 et 5 μm , on peut penser que chaque protoplaste est entouré d'un nombre de liposomes variant entre 1 et 15.

Des études autoradiographiques ont été réalisées sur des protoplastes issus de cultures cellulaires de carotte (234,177,175). ROLLO et al. rapportent que 4% des coupes observées sont marquées, le plus souvent par des grains isolés (234). Cette valeur faible en comparaison avec nos résultats peut provenir du fait que le DNA utilisé dans cette expérience était marqué "in vivo" à une faible activité spécifique (115000 CPM/ μg). Cependant, des amas de grains ont été observés à l'intérieur des protoplastes sans que les auteurs

concluent à l'entrée des liposomes dans le cytoplasme. LURQUIN et ROLLO (177) obtiennent un marquage sur 10% des coupes observées. La source radioactive est le plasmide pBR322 marqué "in vitro". Aucun amas de grains n'est observé à l'intérieur du cytoplasme. Les auteurs, pour expliquer la présence de grains isolés dans le cytoplasme, concluent à l'entrée du plasmide par diffusion à partir des liposomes fixés sur la membrane cytoplasmique. Une large diffusion de plasmide à partir des MLV est observée grâce à l'utilisation de ^{32}P comme source radioactive, par LURQUIN et SHEEHY (175). La présence de grains isolés dans le cytoplasme sur plus de 30% des coupes observées nous amène aux mêmes conclusions. Les quelques figures montrant la présence d'amas de grains dans le cytoplasme pourraient attester de l'entrée des liposomes de type MLV dans les protoplastes; elles pourraient aussi être issues de coupes tangentielles au niveau de la déformation provoquée par un liposome, de la membrane d'un protoplaste. L'entrée des liposomes de type MLV dans les protoplastes ne peut donc être établie avec certitude.

L'interprétation des observations au microscope électronique à balayage est délicate du fait de l'existence de sphérules à la surface de protoplastes n'ayant pas été mis en contact avec des liposomes. ATTREE et SHEFIELD (4, 5) signalent l'existence possible d'artefacts pouvant aboutir à l'apparition de proéminences à la surface de protoplastes de fougère observés en SEM. Cette remarque nous incite à analyser avec prudence les conclusions établies par certains auteurs (175, 177) à la suite d'observations en SEM de protoplastes ayant été mis en contact avec des liposomes, d'autant qu'il n'est mentionné aucune observation de protoplastes sans liposomes. Tout comme FUKUNAGA et al. (83) nous concluerons que les observations en SEM n'apportent que peu de renseignements sur les interactions liposomes-protoplastes.

La libération du contenu d'un liposome de type REV dans une cellule peut théoriquement se faire par deux mécanismes : la fusion de la membrane liposomale et de la membrane cytoplasmique aboutissant à la dispersion du contenu du liposome dans le cytoplasme, ou l'endocytose de la vésicule lipidique pénétrant ainsi dans la cellule. L'endocytose a été souvent observée chez les cellules animales (261). L'entrée de grains de ferritine par endocytose dans des

protoplastes issus de feuilles (134) ou de cultures cellulaires (270) a été reportée. Une étude ultrastructurale des interactions liposomes-plasmalemma a été effectuée par FUKUNAGA et al. sur des protoplastes issus de cultures cellulaires de Vinca rosea (83). Une séquence d'observations a permis aux auteurs de conclure que les liposomes pénétraient dans les cellules par endocytose et qu'ils y étaient le plus souvent inclus dans des vésicules issues de la membrane plasmique.

Nos observations établissent que des fractures de la membrane peuvent s'effectuer au contact des liposomes (fig. 18A) et que ces fractures peuvent conduire à l'entrée des liposomes dans le cytoplasme (fig. 18B). Les observations de FUKUNAGA et al. font apparaître de profondes invaginations de la membrane cytoplasmique, aboutissant à l'endocytose des liposomes par rétablissement de la continuité de la membrane. Nous n'avons jamais observé de telles figures. On peut s'interroger sur les raisons de l'apparition des fractures dans les membranes. Il est peu probable qu'elles proviennent exclusivement de nos conditions expérimentales qui sont peu différentes de celles utilisées par FUKUNAGA et al. Par contre, la topographie particulière des protoplastes isolés de mésophylle pourrait en être responsable. En effet, contrairement aux protoplastes issus de cultures cellulaires, ceux-là sont occupés par une grande vacuole centrale qui repousse à la périphérie les organites cytoplasmiques. Les déformations de la membrane pourraient être limitées par la continuité des organites sous-jacents. L'apparition des ruptures de la membrane pourrait en grande partie expliquer l'effet toxique des liposomes sur les protoplastes. Cette disposition particulière des organites dans la cellule, établissant localement la contiguïté du noyau et de la membrane cytoplasmique implique que les possibilités pour un liposome pénétrant dans la cellule à proximité du noyau d'y déverser son contenu, sont plus élevées que dans une cellule où le noyau est en position centrale. Les photographies de la figure 20 montrent la distance à parcourir pour un liposome ne pénétrant pas à proximité du noyau. L'épaisseur des coupes de l'ordre de 0,1 μm et le fait que plusieurs liposomes sont observés sur toutes les coupes de protoplastes font que l'on peut évaluer à plusieurs centaines le nombre de liposomes de type REV présents autour de chaque protoplaste.

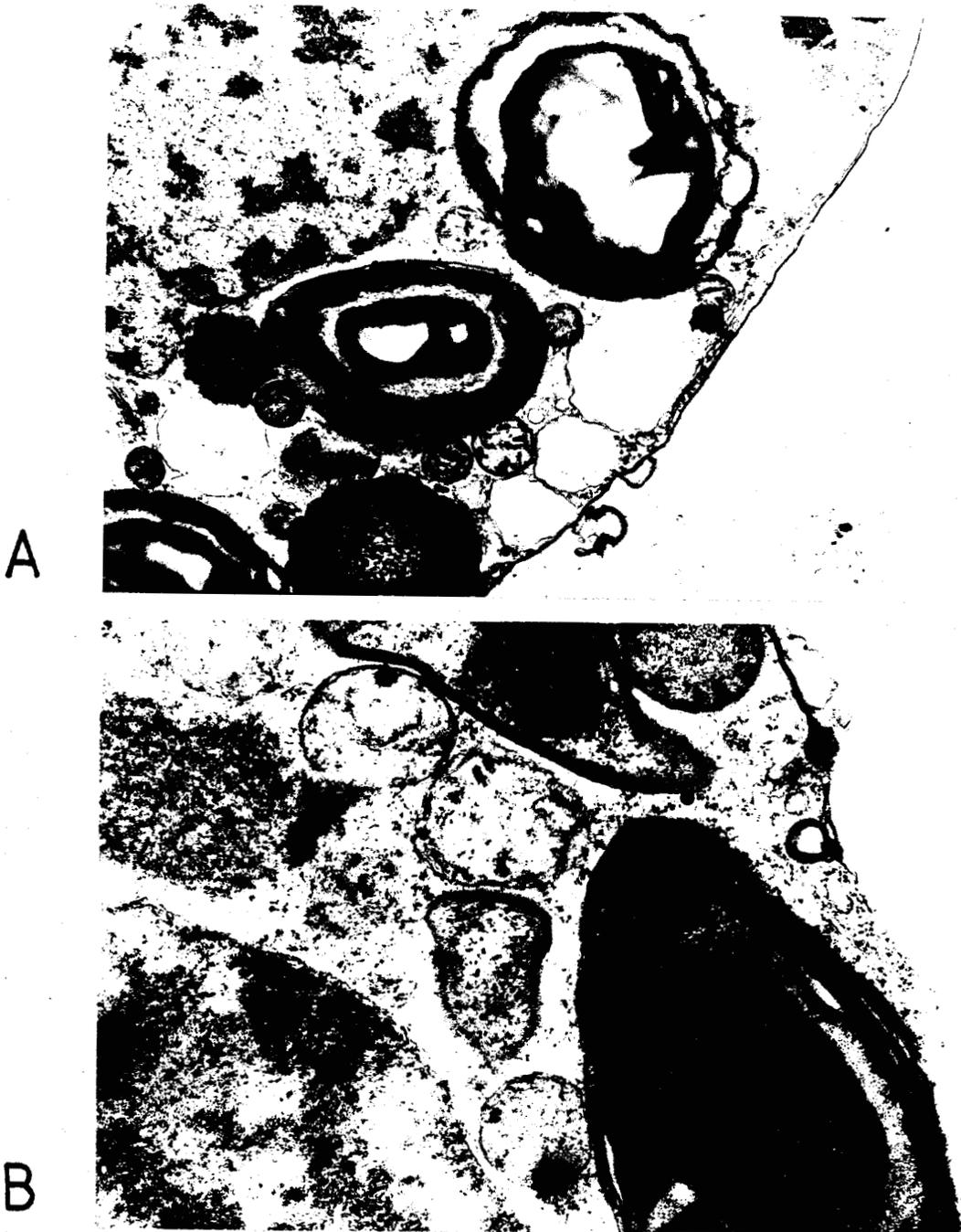


Fig. 20 - Liposomes à la périphérie de protoplastes. Microscopie électronique en transmission. A. - X12000. B. - X32000.

Une étude ultrastructurale en TEM apparaît donc être une bonne méthode pour certifier de l'entrée des liposomes de type REV dans les protoplastes. Nous pouvons affirmer que celle-ci a bien lieu dans nos conditions d'incubation et proposer un modèle établissant leur mode de pénétration et rendant compte de leur interaction avec la membrane cytoplasmique. L'endocytose pourrait être le principal mode d'entrée des liposomes dans les protoplastes de mésophylle et les cassures du plasmaleme en résultant tendraient à montrer que la fusion des membranes liposomale et cytoplasmique doit être un phénomène rare voire inexistant,

V. - CONSTRUCTION DE PLASMIDES CONTENANT UN FRAGMENT DE DNA DE TABAC

L'objectif de ces essais est d'insérer dans des plasmides contenant le gène marqueur *nos-neo*, une séquence de DNA de tabac pour créer une zone d'homologie entre les plasmides utilisés pour la transformation des protoplastes et le DNA des cellules hôtes. Cette zone homologue pourrait en effet favoriser la recombinaison et augmenter de ce fait la fréquence de transformation.

A. - Clonage d'un fragment de DNA de tabac

La première étape de la construction consiste à intégrer une séquence de DNA de tabac dans un vecteur d'E.coli. Le plasmide pBR325 a été choisi à cet effet car il possède un site unique pour l'enzyme de restriction *EcoRI* au niveau du gène conférant la résistance au chloramphénicol. Il est ainsi facile de sélectionner les plasmides hybrides car ils ne confèrent plus la résistance au chloramphénicol aux bactéries dans lesquelles ils se trouvent. De plus, le pBR325 confère la résistance à la tétracycline, contrairement aux pLGV232neo et pLGV1103neo.

Le pBR325 a été digéré par l'enzyme *EcoRI* ainsi que le DNA extrait de tissus de tabac. Le mélange des fragments a été traité par la ligase puis utilisé pour la transformation des bactéries. Celles-ci ont été étalées sur un milieu contenant de l'ampicilline et de la

tétracycline, et les clones qui se sont développés ont été repiqués sur un milieu contenant les mêmes antibiotiques ainsi que du chloramphénicol. Les contenus plasmidiques de 100 clones Ap^r Tc^r Cm^s ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose par la méthode de lyse directe dans les alvéoles du gel. La photographie A de la figure 21 montre que le clone 56 possède un plasmide de taille bien supérieure à celle du pBR325; d'autres plasmides légèrement plus gros que le pBR325 sont aussi détectés. Le plasmide du clone 56, désigné p56, a été extrait et découpé par les enzymes de restriction EcoRI et HindIII. La photographie B (fig. 21) montre que le fragment cloné a une taille de 4 à 5 kb et qu'il s'y trouve 3 sites de restriction pour l'enzyme HindIII. La présence de tels sites a été recherchée en vue de la réalisation de la deuxième étape de la construction.

Afin de confirmer l'origine du DNA cloné, le fragment a été purifié par électroélution après sa séparation du plasmide vecteur par traitement avec EcoRI, puis hybridé avec du DNA extrait d'E.coli, d'endive et de tabac digéré par l'enzyme EcoRI. La figure 22 montre que la séquence clonée est bien retrouvée dans le génome du tabac, à la même position que celle du témoin. Aucune réponse n'est détectée dans la colonne du DNA d'E.coli. Par contre, dans la colonne du DNA d'endive, une tache de même intensité que celle produite par le DNA de tabac est située à une position différente. La séquence clonée n'est donc pas spécifique du tabac. De ce fait, elle pourra être utilisée dans des expériences pour la transformation de plantes appartenant à d'autres espèces. De plus, l'intensité des deux réponses est telle qu'elle laisse penser que la séquence clonée se trouve en de multiples copies dans le génome des plantes. Cette observation confirmerait que son utilisation pour promouvoir la recombinaison dans différentes cellules végétales est à retenir.

B. - Insertion du gène nos-neo dans la séquence de DNA de tabac

La deuxième étape de la construction consiste à insérer le gène nos-neo du pLGV232neo dans la séquence de DNA de tabac clonée dans le pBR325

La présence de plusieurs sites de restriction pour l'enzyme *Hind*III dans le p56 impose de réaliser sa digestion partielle par cette enzyme pour obtenir des coupures en un point dans certaines molécules. Un traitement par la ligase a été effectué sur le mélange des fragments obtenus avec ceux provenant de la digestion complète par *Hind*III du pLGV232neo. Les bactéries transformées par les fragments ligaturés ont été étalées sur un milieu contenant de l'ampicilline, de la tétracycline et de la kanamycine. Seuls les plasmides p56 ayant intégré le fragment du pLGV232neo contenant le gène *nos-neo* dans l'un des sites *Hind*III du DNA de plante peuvent permettre à des bactéries de se développer sur un tel milieu. En effet, l'insertion dans le site *Hind*III du pBR325 ferait perdre la résistance à la tétracycline. Le plasmide d'un clone développé sur ce milieu a été extrait et coupé par les enzymes *Eco*RI et *Hind*III, en parallèle avec le pBR325 et le p56. La photographie du gel est montrée dans la figure 23. On retrouve bien dans le plasmide hybride extrait : le pBR325, un des deux fragments *Hind*III du pLGV232neo et le DNA de tabac. Le fragment *Hind*III de 1 kb du DNA de tabac a été éliminé au cours de la digestion partielle du p56. Il reste néanmoins le fragment de 2,1 kb et celui de 0,8 kb.

Afin de vérifier que le fragment du pLGV232neo inséré est bien celui possédant le gène *nos-neo*, une digestion par les enzymes *Hind*III et *Bcl*I de ce plasmide a été effectuée parallèlement à celle du plasmide hybride construit. En effet, le fragment *Hind*III du pLGV232neo portant le gène hybride possède un site *Bcl*I alors que l'autre fragment n'en possède pas. Les résultats sont visibles sur la photographie B de la figure 23. On retrouve les mêmes fragments *Hind*III-*Bcl*I dans le pLGV232neo et dans le plasmide hybride construit. Le plasmide hybride, que nous appellerons pLGV232neoNt3 possède donc un fragment du pLGV232neo contenant le gène *nos-neo*, inséré dans un fragment de DNA de tabac de 3 kb cloné dans le pBR325. Le plasmide, d'une taille de 13 kb, est amplifiable au chloramphénicol.

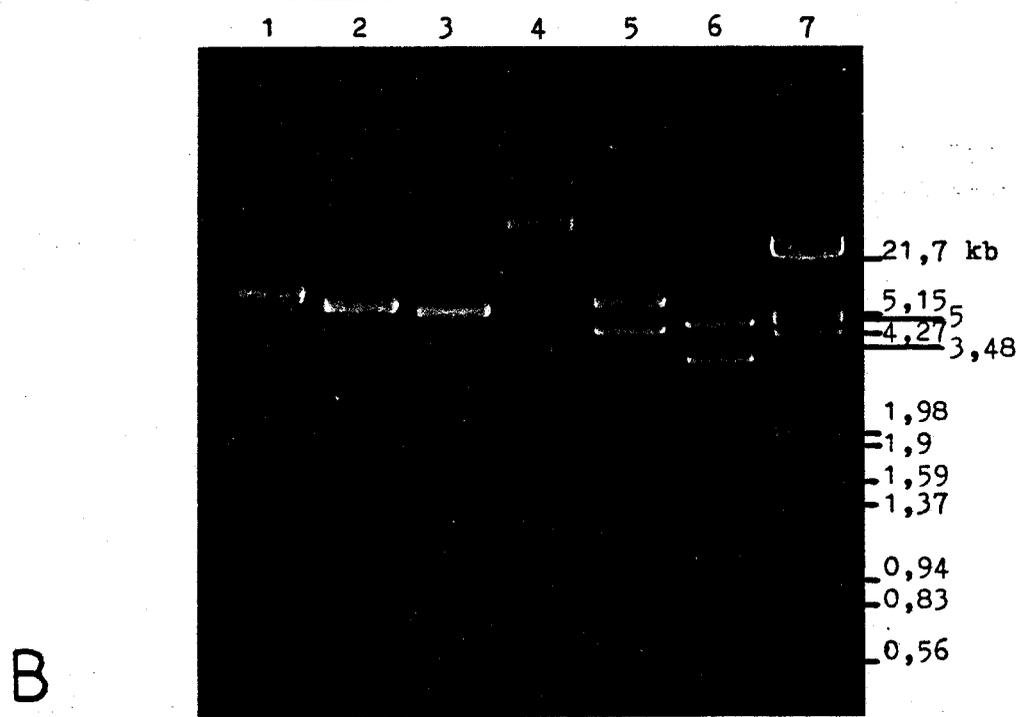
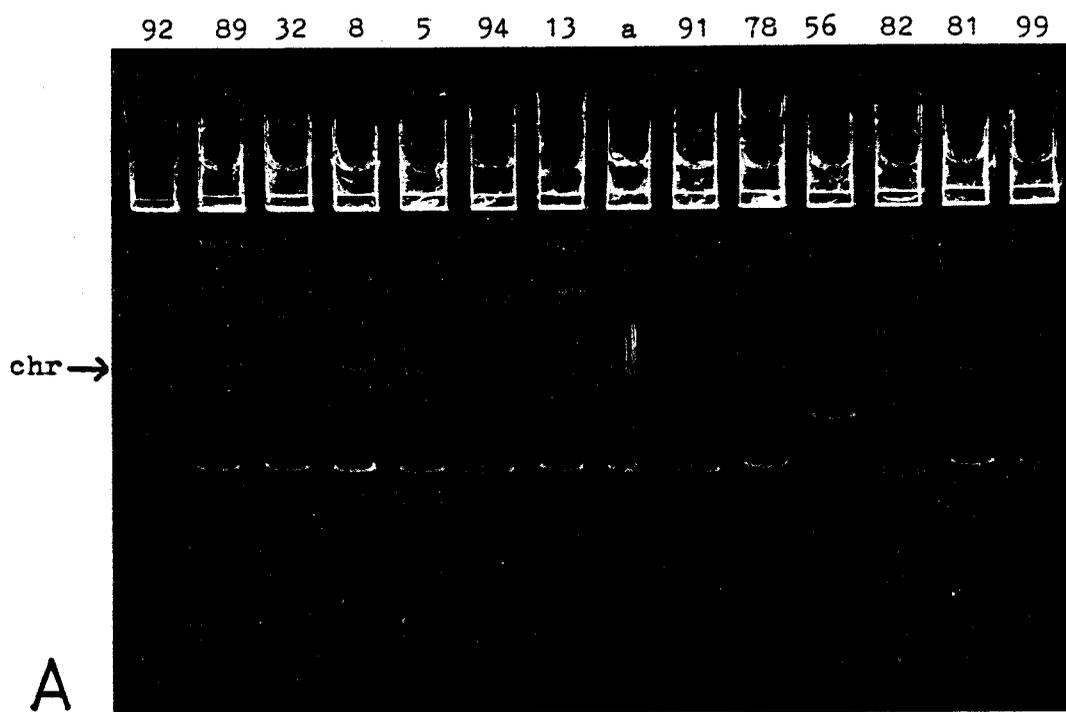


Fig. 21 - Repérage et analyse du p56 par électrophorèse en gel d'agarose. A.- Lyse directe; agarose à 0,8%, migration pendant 1 h à 30 V puis 2 h à 130 V; les numéros des clones sont mentionnés en haut des colonnes; a: pBR325; chr: bande de DNA chromosomique. B.- Gel horizontal; agarose à 1,2%, migration pendant 2h30min à 130 V; 1: pBR325; 2: pBR325 (EcoRI); 3: pBR325 (HindIII); 4: p56; 5: p56 (EcoRI); 6: p56 (HindIII); 7: λ (EcoRI, HindIII), la taille des fragments est indiquée.

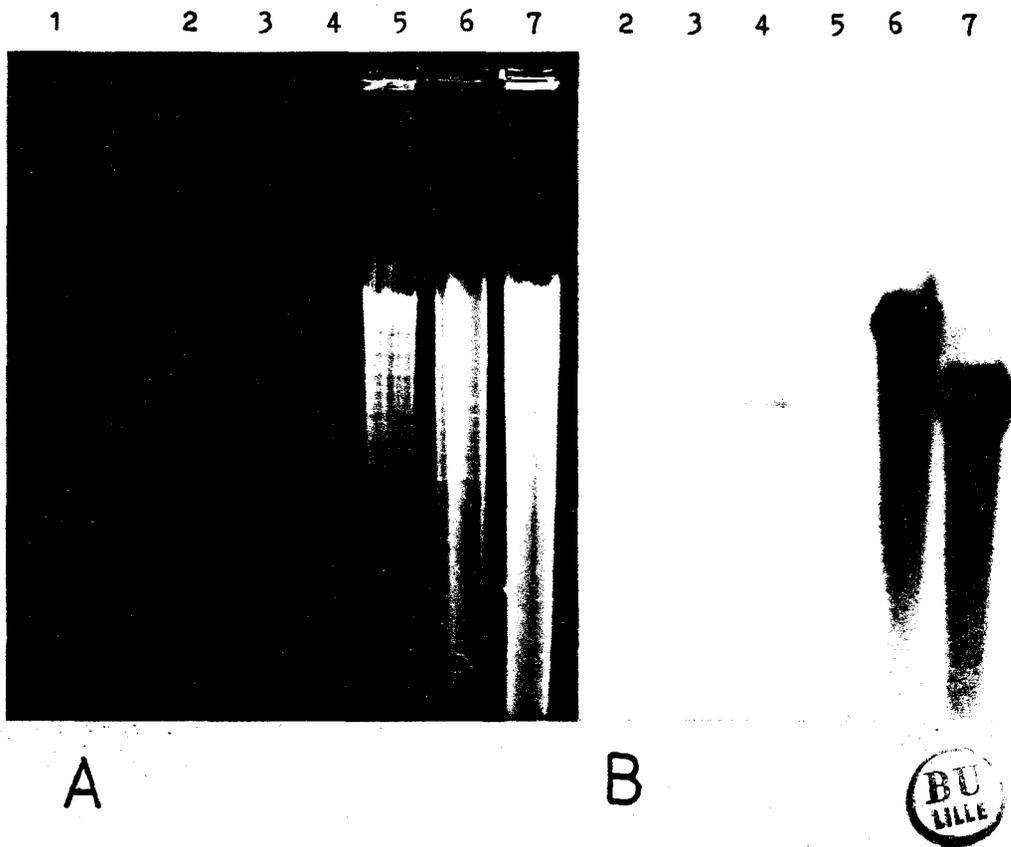
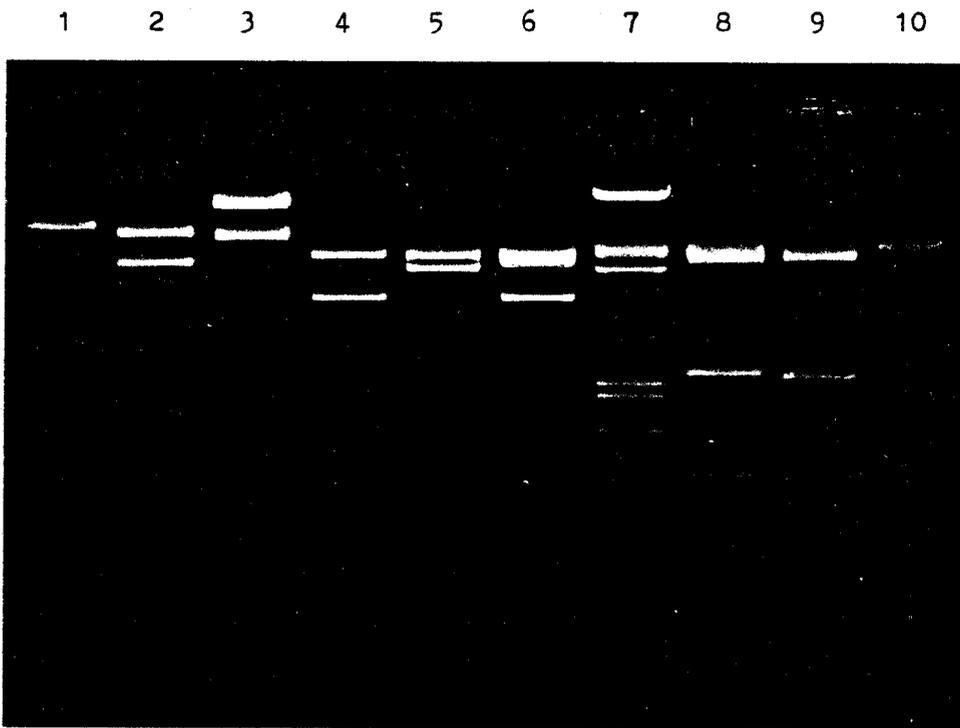
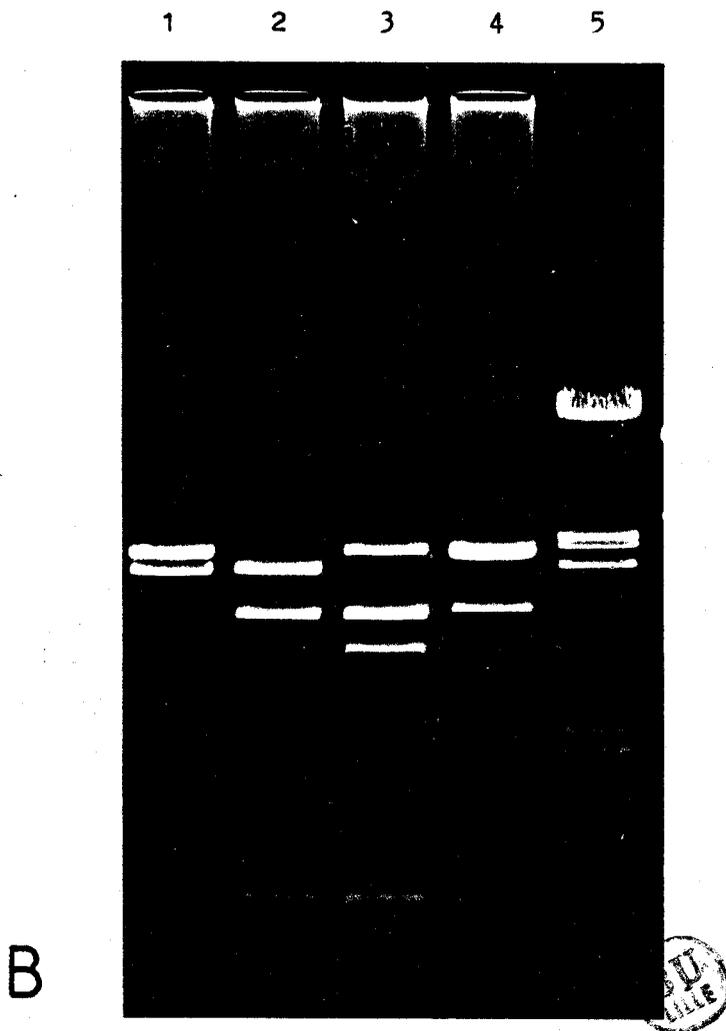


Fig. 22 - Hybridation moléculaire de la séquence clonée du p56 avec: colonne 2: 0,02 ng de p56 (EcoRI); 3: 0,2 ng de p56 (EcoRI); 4: 2 ng de p56 (EcoRI); 5: DNA d'E.coli (EcoRI); 6: DNA d'endive (EcoRI); 7: DNA de tabac (EcoRI). A.- Gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium; agarose à 0,8%, tension 130 V, temps 3h45min; colonne 1: 0,2 µg de p56 (EcoRI). B.- Autoradiographie de la membrane; les conditions d'hybridation sont décrites dans le paragraphe IV-I de la 2^{ème} partie; temps d'exposition 24 h.



A

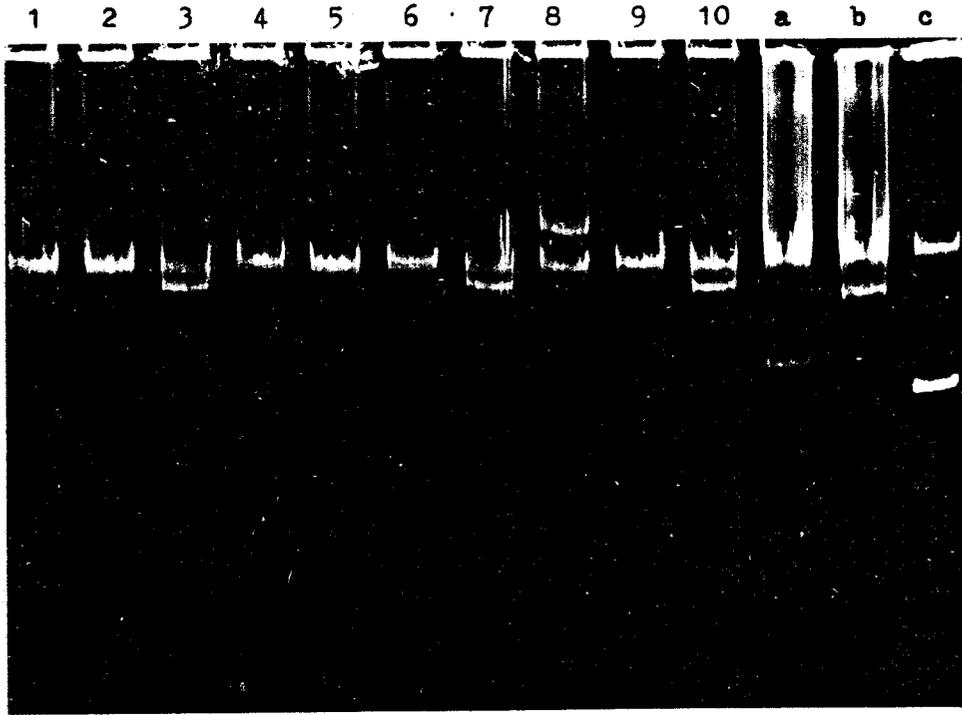




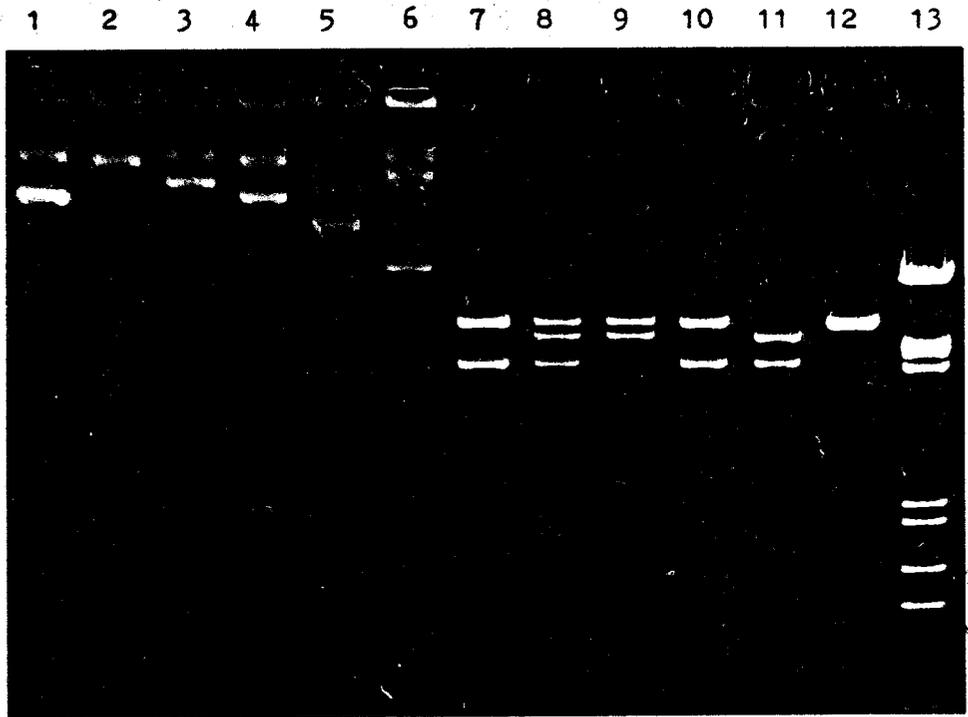
B

Fig. 23 - Analyse du pLGV232neoNt3 en gel d'agarose horizontal.

A.- Agarose à 1,2%, migration pendant 2h30min à 130 V; 1: pBR325 (EcoRI); 2: p56 (EcoRI); 3: pLGV232neoNt3 (EcoRI); 4: p56 (HindIII); 5: pLGV232neo (HindIII); 6: pLGV232neoNt3 (HindIII); 7: λ (EcoRI, HindIII); 8: pLGV232neoNt3 (EcoRI, HindIII); 9: p56 (EcoRI, HindIII); 10: pBR325 (EcoRI, HindIII). B. - Agarose à 1%, migration pendant 3 h à 130 V; 1: pLGV232neo (HindIII); 2: pLGV232neo (HindIII, BclI); 3: pLGV232neoNt3 (HindIII, BclI); 4: pLGV232neoNt3 (HindIII); 5: λ (EcoRI, HindIII).



A



B

BU
LILLE

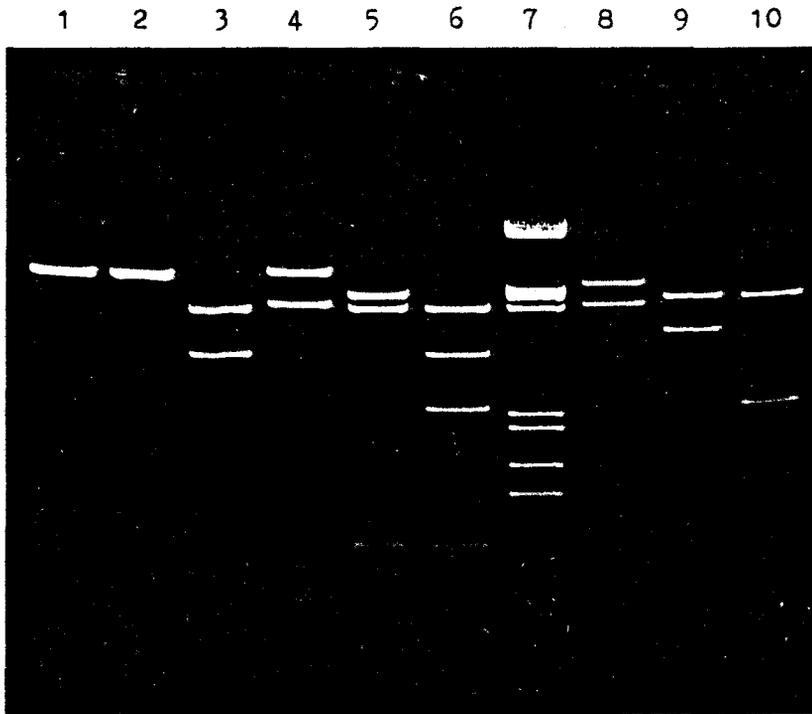


Fig. 24 - Repérage et analyse du pLGV1103neoNt4 en gel d'agarose. A.- Lyse directe; les numéros des clones sont indiqués en haut des colonnes; a: pLGV1103neo; b: p56; c: pBR325; gel à 0,8%, migration pendant 1h à 30 V puis 2h30min à 130 V. B.- Gel horizontal; agarose à 1%, migration pendant 3h à 130 V; 1: p3; 2: p8; 3: p9; 4: p10; 5: p56; 6: pLGV1103neo; 7: p3 (EcoRI); 8: p8 (EcoRI); 9: p9 (EcoRI); 10: p10 (EcoRI); 11: p56 (EcoRI); 12: pLGV1103neo (EcoRI); 13: λ (EcoRI, HindIII). C.- Gel horizontal; agarose à 1%, migration pendant 3h à 130 V; 1: pLGV1103neo (EcoRI); 2: pLGV1103neo (HindIII); 3: pLGV1103neo (EcoRI, HindIII); 4: pLGV1103neoNt4 (EcoRI); 5: pLGV1103neoNt4 (HindIII); 6: pLGV1103neoNt4 (EcoRI, HindIII); 7: λ (EcoRI, HindIII); 8: p56 (EcoRI); 9: p56 (HindIII); 10: p56 (EcoRI, HindIII).

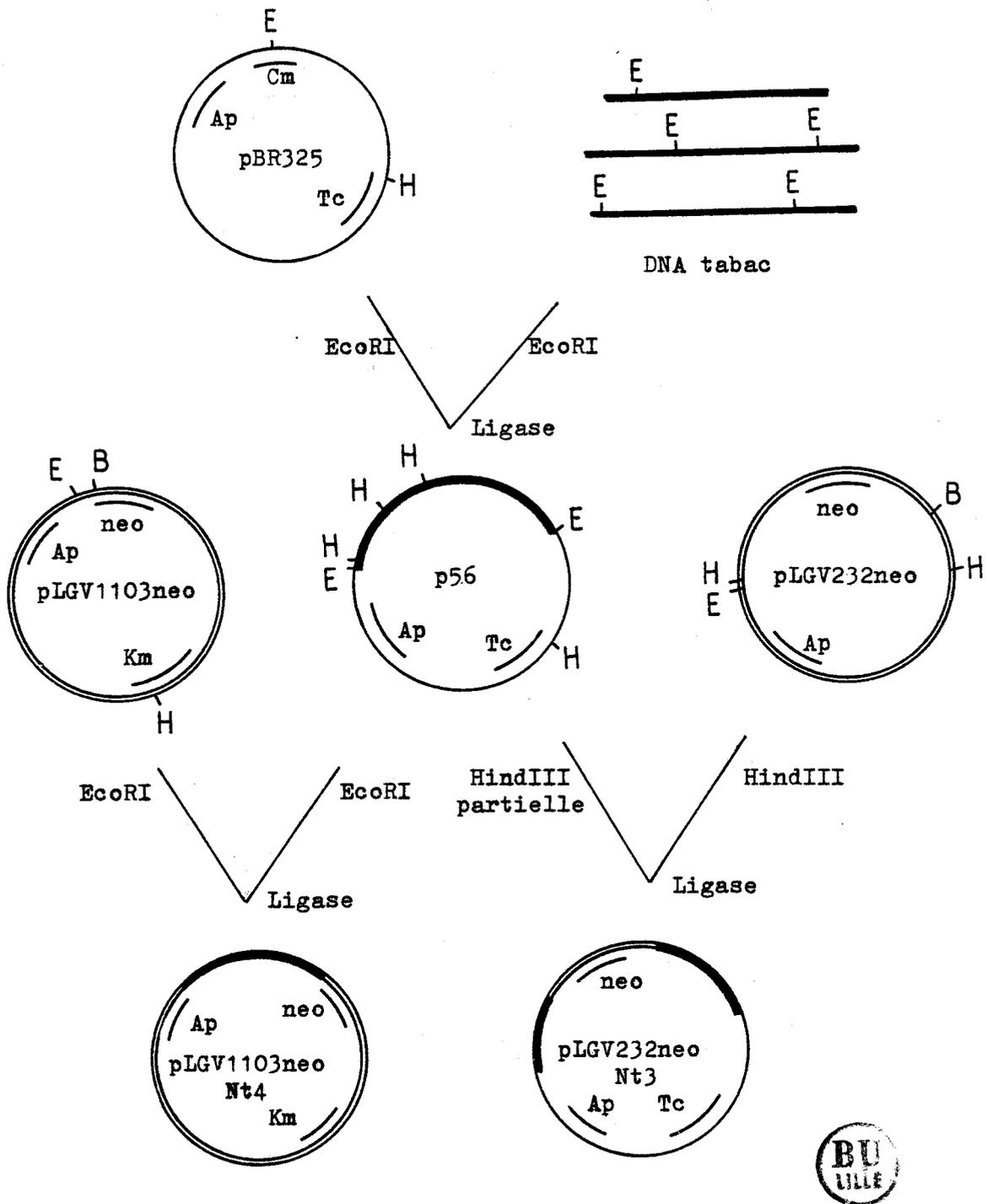


Fig. 25 - Construction des plasmides pLGV1103neoNt4 et pLGV232neoNt3; E, EcoRI; H, HindIII; B, BclI.

C. - Insertion d'une séquence de DNA de tabac dans le pLGV1103neo

Le pLGV1103neo possède un site de restriction pour l'enzyme *EcoRI* à proximité du gène *nos-neo*. Ce plasmide et le p56 ont été digérés par l'enzyme *EcoRI* et le mélange des fragments traité par la ligase. Après transformation des bactéries par les fragments ligaturés, les contenus plasmidiques des clones isolés sur milieu contenant de l'ampicilline et de la kanamycine ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose par la méthode de lyse directe. La photographie A de la figure 24 montre que les clones testés possèdent des plasmides de différentes tailles. Les plasmides ont été extraits des clones 3, 8, 9 et 10 et digérés par l'enzyme *EcoRI* (photographie B). Le plasmide du clone 3 semble être la somme du pLGV1103neo et du fragment de DNA de plante du p56, c'est à dire le plasmide souhaité. Le plasmide du clone 8 semble être la somme du pLGV1103neo et du p56. Le plasmide du clone 9 semble être la somme du pLGV1103neo et du pBR325. Le plasmide du clone 10 semble être le même que celui du clone 3. Ce dernier plasmide, que nous appellerons provisoirement p10 a été coupé par les enzymes *HindIII* et *EcoRI* en parallèle avec les p56 et pLGV1103neo. La photographie C de la figure 24 montre les résultats obtenus. On retrouve à la fois dans le p10, les fragments *EcoRI-HindIII* des pLGV1103neo et du DNA de plante du p56. Ce plasmide, qui possède une zone homologue au DNA de plante de 4 kb, sera appelé pLGV1103neoNt4. La construction des pLGV232neoNt3 et pLGV1103neoNt4 est résumée dans la figure 25.

VI. - ISOLEMENT DE CALS RESISTANTS A LA KANAMYCINE ET REGENERATION DE PLANTES

Le plasmide pLGV1103neo possédant le gène hybride *nos-neo* conférant la résistance à la kanamycine et capable de s'exprimer dans les cellules végétales et le plasmide pLGV1103neoNt4 ont été utilisés pour la transformation des protoplastes. Les liposomes sont de type REV et de composition PS/CHO 2/1 (P/P). Le protocole d'incubation est décrit dans le paragraphe IIC de la deuxième partie.

A. - Sélection des cals résistants

La sélection s'opère à la deuxième étape de la culture des protoplastes, lors de la mise en culture dans le milieu C. Les cellules divisées ou en cours de division sont comptées pour l'évaluation ultérieure de la fréquence d'apparition des cals résistants. Les cals développés après 30 j dans le milieu contenant de la kanamycine sont comptés. La fréquence est alors déterminée.

La photographie (figure 26) montre que des cals de tabac ne se développent pas et brunissent en présence de kanamycine à 30 mg/l. La concentration en kanamycine de 60 mg/l a été retenue pour la sélection des cals résistants sur milieu C. Les cals développés sur ce milieu sont ensuite repiqués sur milieu gélosé contenant la même concentration en kanamycine, pour confirmation de l'acquisition du caractère de résistance.

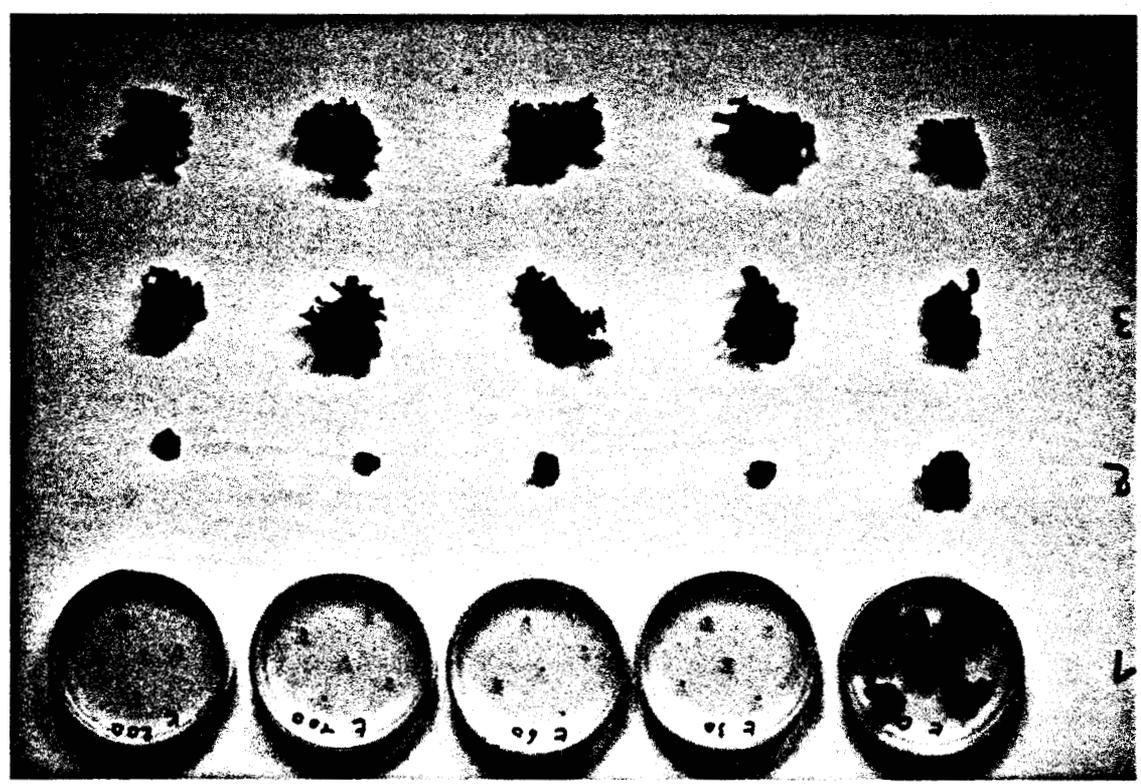
Aucun cal n'est apparu dans les cultures de protoplastes de tabac non transformés sur milieu contenant de la kanamycine à 60 mg/l. Par contre, après transformation par des plasmides portant le gène *nos-neo*, des cals se développent sur milieu contenant la même concentration en kanamycine. La figure 26 montre que des fragments de cals résistants à la kanamycine continuent de se développer sur milieu contenant cet antibiotique à la concentration de 200 mg/l alors qu'un fragment de cal non résistant ne se développe pas sur milieu contenant de la kanamycine à 30 mg/l.

La kanamycine a été reconnue comme un bon agent sélectif pour le tabac et aucune apparition de résistance spontanée n'a été décrite (59,105,194), c'est pourquoi l'existence de cals se développant sur milieu contenant de la kanamycine ne peut être imputable qu'à l'expression du gène *neo* dans les cellules transformées.

B. - Etude de la fréquence d'apparition des cals résistants

Le tableau XVI indique le nombre de cals résistants à la kanamycine à 60 mg/l isolés au cours de 5 expériences indépendantes. La fréquence est calculée par rapport au nombre de cellules sélectionnées.

Fig. 26 - Croissance de cals de tabac sur milieu contenant de la kanamycine; les concentrations en mg/l indiquées sur les boîtes de Petri concernent aussi les cals des lignes 2, 3 et 4. Lignes 1 et 2 : cals non transformés. Lignes 3 et 4 : cals résistants isolés après des expériences de transformation. Les cals des lignes 2, 3 et 4 ont été cultivés dans les mêmes conditions.



Plasmide	Cellules sélectionnées	Cals résistants	Fréquence
pLGV1103neo			
exp 1	100000	3	$3 \cdot 10^{-5}$
exp 2	70000	38	$5,4 \cdot 10^{-4}$
exp 3	120000	2	$1,7 \cdot 10^{-5}$
exp 4	85000	7	$8,2 \cdot 10^{-5}$
pLGV1103neoNt4	135000	150	$1,1 \cdot 10^{-3}$

Tab. XVI - Fréquences d'apparition des cals résistants à la kanamycine après des expériences de transformation de protoplastes.

Expérience	Feuille	Cellules sélectionnées	Cals résistants	Fréquence
1	a	64000	3	$4,7 \cdot 10^{-5}$
	b	87000	4	$4,6 \cdot 10^{-5}$
2	a	92000	6	$6,5 \cdot 10^{-5}$
	b	85000	6	$7,3 \cdot 10^{-5}$
3	a	110000	3	$2,7 \cdot 10^{-5}$
	b	96000	2	$2,1 \cdot 10^{-5}$

Tab. XVII - Influence de la position sur la plante de la feuille utilisée pour l'obtention des protoplastes, sur la fréquence d'apparition des cals résistants à la kanamycine après transformation par le pLGV1103 (exp. 1) et le pLGV1103neoNt4 (exp. 2 et 3). a: position apicale; b: position basale.

Les fréquences d'apparition des cals résistants sont comprises entre $1,7 \cdot 10^{-5}$ et $1,1 \cdot 10^{-3}$, ce qui indique une grande variabilité. La haute fréquence obtenue avec le pLGV1103neoNt4 pourrait être due à la présence de la séquence de DNA de tabac présente dans le plasmide. Ce résultat est à confirmer car une seule expérience a été réalisée avec ce plasmide et la variabilité observée entre les différents essais avec le pLGV1103neo pourrait à elle seule l'expliquer.

La variabilité provient probablement de différences d'état des protoplastes utilisés. Certains paramètres comme l'âge de la feuille prélevée pour préparer les protoplastes pourraient avoir une grande influence sur la fréquence de transformation. En effet, MEYER et al. (194) ont montré que des protoplastes de tabac synchronisés au stade M du cycle cellulaire peuvent être transformés à une fréquence 1000 fois supérieure à celle de protoplastes non synchronisés. Le nombre de protoplastes se trouvant au stade M au moment de l'expérience de transformation est donc primordial. Le pourcentage de cellules en cours de mitose, donc au stade M, est plus élevé dans les feuilles jeunes. C'est pourquoi nous avons réalisé une série d'expériences pour comparer les fréquences d'apparition des cals résistants obtenus avec des protoplastes isolés de feuilles jeunes et de feuilles adultes.

1 - Influence de l'âge de la feuille

Chaque expérience a été réalisée avec des protoplastes issus de feuilles occupant des positions contiguës sur la plante, la feuille en position apicale étant encore en cours de croissance. Les résultats des 3 essais réalisés sont présentés dans le tableau XVII: la fréquence d'apparition des cals résistants est du même ordre de grandeur avec les protoplastes issus de feuilles jeunes ou plus âgées. La position de la feuille prélevée pour préparer les protoplastes n'explique donc pas les variations observées au cours des premières expériences. L'origine de celles-ci est peut-être à rechercher dans des différences d'état physiologique de la plante.

Les résultats infirment aussi l'hypothèse selon laquelle la séquence de DNA de plante présente dans le pLGV1103neoNt4 provoquerait une augmentation de la fréquence de transformation. Afin

d'élucider cette question, une nouvelle série d'expériences a été réalisée.

2 - Influence de la séquence de DNA de tabac

Afin d'éviter l'interférence des variations enregistrées lors des premières expériences, chaque essai en vue de la comparaison des fréquences d'apparition des cals résistants obtenues avec les pLGV1103neo et pLGV1103neoNt4 a été réalisé avec des protoplastes issus d'une même feuille, donc dans le même état physiologique. Les résultats sont rapportés dans le tableau XVIII.

Les fréquences obtenues sont identiques après transformation par le plasmide pLGV1103neo ou le plasmide pLGV1103neoNt4. La présence de la séquence de DNA de tabac dans le pLGV1103neoNt4 ne semble pas entraîner d'augmentation de la fréquence d'apparition des cals résistants.

Les fréquences d'apparition des cals résistants décrites ci-dessus sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par DESHAYES et al. (59) qui obtiennent des valeurs comprises entre $4,1 \cdot 10^{-6}$ et $2,2 \cdot 10^{-4}$ au cours de 11 expériences de transformation de protoplastes de mésophylle de tabac par le plasmide pLGV23neo encapsulé dans des liposomes.

Des plantes ont été régénérées à partir des cals résistants à la kanamycine. A la suite de ce travail, différentes expériences pourraient être réalisées pour mettre en évidence la présence et l'expression du gène nptII dans les plantes régénérées et dans des protoplastes issus de ces plantes. Le maintien du caractère dans la descendance des plantes pourra aussi être recherché.

Expérience	plasmide	Cellules sélectionnées	Cals résistants	Fréquence
1	11	64000	3	$4,7 \cdot 10^{-5}$
	Nt	110000	3	$2,7 \cdot 10^{-5}$
2	11	87000	4	$4,6 \cdot 10^{-5}$
	Nt	96000	2	$2,1 \cdot 10^{-5}$
3	11	61000	8	$1,3 \cdot 10^{-4}$
	Nt	52000	2	$3,8 \cdot 10^{-5}$
4	11	71000	3	$4,2 \cdot 10^{-5}$
	Nt	95000	4	$4,2 \cdot 10^{-5}$

Tab. XVIII - Fréquences d'apparition des cals résistants à la kanamycine après transformation de protoplastes par les plasmides pLGV1103neo (11) et pLGV1103neoNt4 (Nt).



conclusion

Les conditions d'incubation assurant la liaison optimale de liposomes de type MLV aux protoplastes ont été définies grâce à l'utilisation d'un plasmide marqué par "nick-translation". Cette étude fait apparaître l'importance de certains paramètres comme la température, le pH, la concentration en PEG, CaCl_2 dans le milieu d'incubation. Il semble que l'importance des constituants du milieu d'incubation soit d'autant plus grande qu'ils influent sur les charges membranaires. Dans les conditions retenues (citrate 25 mM, pH 5,4, CaCl_2 5 mM, mannitol 11%, PEG 10%, 30°C), 45% des liposomes de type MLV se lient aux protoplastes. Des conditions d'incubation légèrement modifiées (citrate 10 mM, pH 6,5, PEG 15%) assurent la liaison de 30% des liposomes de type REV aux protoplastes.

Les expériences de cyto-autoradiographie montrent que les liposomes de type MLV ne pénètrent pas dans les protoplastes. La taille des amas de grains d'argent impressionnés autour des protoplastes vus en coupe prouve que la quantité de plasmide véhiculée par chaque liposome de type MLV est importante. De tels amas sont visibles sur 15% des coupes de protoplaste observées.

Les observations ultrastructurales montrent que les liposomes de type REV pénètrent dans le cytoplasme des protoplastes. Les liposomes induisent des cassures de la membrane cytoplasmique, ce qui semble indiquer que leur pénétration par endocytose dans les protoplastes s'effectue avec difficulté. La configuration particulière des protoplastes de mésophylle pourrait en être responsable (GUERINEAU et TAILLIEZ, *Cytobios*, 48, 39-44 (1986)). La taille des liposomes de type MLV, plus grande que celle des REV pourrait expliquer l'impossibilité de leur pénétration dans les protoplastes. Les dommages causés à la membrane cytoplasmique seraient alors plus difficilement réparables.

Le fait que les liposomes induisent des cassures dans le plasmalemma explique en partie leur effet toxique sur les protoplastes et la destruction de ceux-ci quand des concentrations en liposomes plus importantes sont utilisées. Ce mode d'interaction avec le plasmalemma constitue une limite à l'utilisation des liposomes pour le transfert de DNA; une autre est la capacité d'encapsulation des liposomes qui limite à quelques μg la quantité de DNA utilisable dans chaque expérience de transformation de protoplastes.

L'utilisation d'un plasmide portant le gène hybride nos-neo a permis de sélectionner des cals résistants à la kanamycine après les expériences de transformation de protoplastes. Les fréquences d'apparition des cals résistants sont le plus souvent comprises entre 10^{-5} et 10^{-4} ; toutefois, les valeurs $5,4 \cdot 10^{-4}$ et $1,1 \cdot 10^{-3}$ ont été obtenues au cours de deux expériences. Bien que la quantité de plasmide utilisée dans les expériences utilisant les liposomes soit dix fois plus faible que dans la méthode du coprécipité DNA-phosphate de calcium (105), les fréquences obtenues par les deux méthodes sont du même ordre de grandeur. La faible quantité de plasmide requise pour l'obtention de cals résistants à la kanamycine donne un intérêt à la méthode de transformation utilisant les liposomes. Récemment, la mise au point d'un protocole d'incubation de protoplastes avec du DNA a abouti à des fréquences de transformation de l'ordre de 10^{-3} (288). L'électroporation pourrait aussi donner des résultats similaires (15).

Une séquence répétitive de DNA de tabac a été insérée dans le plasmide pLGV1103neo. La présence de la séquence homologue destinée à favoriser la recombinaison dans le génome hôte ne modifie pas la fréquence d'apparition des cals résistants à la kanamycine. Ce résultat tend à prouver que le facteur limitant le nombre de cals résistants ne se situe pas au niveau de la recombinaison.

La variabilité importante observée au cours des expériences de transformation par diverses méthodes semble indiquer que des facteurs importants sont inconnus. Pour étudier ce phénomène, le protocole mis au point pour l'incubation de liposomes de type REV avec les protoplastes, qui permet l'obtention de cals résistants à la kanamycine à la suite de chaque expérience, constitue une méthode avantageuse.

références

- 1 AKIYOCHI D.E., MORRIS R.O., HINZ R., MISCHKE B.S., KOKUGE T., GARFINKEL D.J., GORDON M.P. & NESTER E.W. - Cytokinin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 407-411 (1983)
- 2 AN G. - High efficiency transformation of cultured tobacco cells. Plant Physiol. 79, 568-570 (1985)
- 3 AN G., WATSON B.D. & CHIANG C.C. - Transformation of tobacco, tomato, potato and Arabidopsis thaliana using a binary Ti vector system. Plant Physiol. 81, 301-305 (1986)
- 4 ATTREE S.M. & SHEFFIELD E. - Scanning electron microscopy of protoplasts isolated from gametophytes of the fern Pteridium - I. Preparative methods. Micron. Microsc. Acta 15, 181-186 (1984)
- 5 ATTREE S.M. & SHEFFIELD E. - Plasmolysis of Pteridium protoplasts : A study using light and scanning-electron microscopy. Planta 165, 151-157 (1985)
- 6 BABA A., HASEZAWA S. & SYONO K. - Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by Agrobacterium spheroplasts. Plant Cell Physiol. 27, 463-471 (1986)
- 7 BALAZS E., BOUZOUBAA S., GUILLEY H., JONARD G., PASZKOWSKI J. & RICHARD K. - Chimeric vector construction for higher-plant transformation. Gene 40, 343-348 (1985)
- 8 BARKER R.F., IDLER K.B., THOMPSON D.V. & KEMP J.D. - Nucleotide sequence of the T-DNA region from Agrobacterium tumefaciens octopine Ti-plasmid pTi15955. Plant Mol. Biol. 2, 335-350 (1983)

- 9 BARTON K.A., BINNS A., MATZKE A. & CHILTON M.D. - Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA and transmission of T-DNA to R₁ progeny. Cell 32, 1033-1043 (1983)
- 10 BARTON K.A. & CHILTON M.D. - Agrobacterium Ti-plasmid as vector for plant genetic engineering. Meth. in Enzymol. 101, 527-539 (1983)
- 11 BATSCHAUER A. & APEL K. - An inverse control by phytochrome of the expression of two nuclear genes in barley (Hordeum vulgare L.). Eur. J. Biochem. 143, 593-597 (1984)
- 12 BATSCHAUER A., MOSINGER E., KREUZ K., DORR I. & APEL K. - The implication of a plastid-derived factor in the transcriptional control of nuclear genes encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein. Eur. J. Biochem. 154, 625-634 (1986)
- 13 BEHKI R.M. & LESLEY S.M. - Uptake of exogenous DNA in carrot protoplasts. In Vitro 15, 851-856 (1979)
- 14 BELLIARD G., VEDEL F. & PELLETIER G. - Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of Nicotiana tabacum by protoplast fusion. Nature 281, 401-403 (1979)
- 15 BELLINI C., LEMOULLEC J.M. & GUERCHE P. - Optimization of gene transfer into tobacco mesophyll protoplasts by electroporation. Int. Symp. Plant Mol. Biol. Strasbourg, France (1986)
- 16 BENDICH A.J. & FILNER P. - Uptake of exogenous DNA by pea seedlings and tobacco cells. Mutat. Res. 13, 199-214 (1971)
- 17 BERGMANN P., SEYER P., BURKARD G. & WEIL J.H. - Mapping of transfer RNA genes on tobacco chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 3, 29-36 (1984)

- 18 BERRY J.O., NIKOLAU B.J., CARR J.P. & KLESSIG D.F. - Transcriptional and post-transcriptional regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in light- and dark-grown amaranth cotyledons.
Mol. Cell. Biol. 5, 2238-2246 (1985)
- 19 BEVAN M.W., FLAVELL R.B. & CHILTON M.D. - A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation.
Nature 304, 184-187 (1983)
- 20 BINDING H., JAIN S.M., FINGER J., MORDHORST G., NEHLS R. & GRESSEL J. - Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of Solanum nigrum with Solanum tuberosum.
Theor. Appl. Genet. 63, 273-277 (1982)
- 21 BOLIVAR F. - Construction and characterization of new cloning vehicles III. Derivatives of pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules.
Gene 4, 121-126 (1978)
- 22 BOLTON G.W., NESTER E.W. & GORDON M.P. - Plant phenolic compounds induce expression of the Agrobacterium tumefaciens loci needed for virulence.
Science 232, 983-985 (1986)
- 23 BOMHOFF G., KLAPWIJK P.M., KESTER H.C.M., SCHILPEROORT R.A., NERNALSTEENS J.P. & SCHELL J. - Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of Agrobacterium tumefaciens.
Mol. Gen. Genet. 145, 177-181 (1976)
- 24 BOSS W.F. & MOTT R.L. - Effect of divalent cations and PEG on the membrane fluidity of protoplast.
Plant Physiol. 66, 835-837 (1980)
- 25 BOSS W.F., GRIMES H.D. & BRIGHTMAN A. - Calcium-induced fusion of fusogenic wild carrot protoplasts.
Protoplasma 120, 209-215 (1984)

- 26 BOURGIN J.P. - Valin-resistant plants from in vitro selected tobacco cells.
Mol. Gen. Genet. 161, 225-230 (1978)
- 27 BOURGIN J.P. - Protoplasts and the isolation of plant mutants.
In : Protoplast 1983, ed. by I. POTRYKUS, C.T. HARMS, A. HINNEN, R. HUTTER, P.J. KING & R.D. SHILLITO. Birhauser, Basel. pp 43-50 (1983)
- 28 BOURGIN J.P., MISSONIER C. & GOUJAUD J. - Direct selection of cybrids by streptomycin and valin resistance in tobacco.
Theor. Appl. Genet. 72, 11-14 (1986)
- 29 BRADLEY D. & GATENBY A.A. - Mutational analysis of the maize chloroplast ATPase- β subunit gene promoter : The isolation of promoter mutants in E.coli and their characterization in a chloroplast in vitro transcription system.
EMBO J. 4, 3641-3648 (1985)
- 30 BREATHNACH R. & CHAMBON P. - Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins.
Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383 (1981)
- 31 BRISSON N., PASZKOWSKI J., PENSWICK J.R., GRONENBORN B., POTRYKUS I. & HOHN T. - Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector.
Nature 310, 511-513 (1984)
- 32 BURGESS J. & LINSTEAD P.J. - Ultrastructural studies of the binding of concanavalin A to the plasmalemma of higher plant protoplasts.
Planta 130, 73-79 (1976)
- 33 BYRNE M.C. & CHILTON M.D. - Regeneration of plants from cells transformed by Ti or Ri plasmids of Agrobacterium.
Curr. Top. Plant Biochem. Physiol. 1, 163-169 (1983)

- 34 CABOCHE M. & DESHAYES A. - Utilisation de liposomes pour la transformation de protoplastes de mésophylle de tabac par un plasmide recombinant de E. coli leur conférant la résistance à la kanamycine.
C.R. Acad. Sci. Paris 299(III), 663-666 (1984)
- 35 CAPLAN A., HERRERA-ESTRELLA L., INZE D., VAN HAUTE E., VAN MONTAGU M., SCHELL J. & ZAMBRYSKI P. - Introduction of genetic material into plant cells.
Science 222, 815-821 (1983)
- 36 CARLSON P.S. - Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of Nicotiana tabacum.
Science 168, 1366-1368 (1970)
- 37 CASSELS A.C. - Uptake of charged lipid vesicles by isolated tomato protoplasts.
Nature 275, 760 (1978)
- 38 CASSIER L. - Essais d'incorporation de DNA bactérien dans des protoplastes de tabac.
Thèse de 3^e cycle, Université de Lille I (1982)
- 39 CHALEFF R.S. & PARSONS M.F. - Direct selection in vitro for herbicide resistant mutants of Nicotiana tabacum.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5104-5107 (1978)
- 40 CHILTON M.D., DRUMMOND M.H., MERLO D.J. & SCIAKY D. - Highly conserved DNA of Ti plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors.
Nature 275, 147-149 (1978)
- 41 CHIN J.C. & SCOTT K.J. - Effect of phytolectins on isolated protoplasts from plants.
Ann. Bot. 43, 33-44 (1979)
- 42 CHUPEAU Y. & MOREL G. - Obtention de protoplastes de plantes supérieures à partir de tissus cultivés in vitro.
C.R. Acad. Sci. Paris 270 D, 2659-2662 (1970)

- 43 CHUPEAU Y., BOURGIN J.P., MISSONIER C., DORION N. & MOREL G. -
Préparation et culture de protoplastes de divers Nicotiana.
C.R. Acad. Sci. Paris 278 D, 1565-1568 (1974)
- 44 CLOSE T.J., TAIT R.J. & KADO C.I. - Regulation of Ti plasmid
virulence genes by a chromosomal locus of Agrobacterium
tumefaciens.
J. Bact. 164, 774-781 (1985)
- 45 CONDIT C., HAGEN T.J., McKNIGHT T.D. & MEAGHER R.B. - Characteri-
zation and preliminary mapping of cauliflower mosaic virus
transcripts.
Gene 25, 101-108 (1983)
- 46 CONSTABEL F. & KAO K.N. - Agglutination and fusion of plant
protoplasts by polyethylene glycol.
Can. J. Bot. 52, 1603-1606 (1974)
- 47 COVEY S.N., HOMONOSSOFF G.P. & HULL R. - Characterization of
cauliflower mosaic virus DNA sequences which encode major
polyadenylated transcripts.
Nucl. Acids Res. 9, 6735-6748 (1981)
- 48 CROSSWAY A. & HOUCK C.M. - A microassay for detection of DNA and
RNA in small numbers of plant cells.
Plant Mol. Biol. 5, 183-190 (1985)
- 49 CROSSWAY A., OAKES J.V., IRVINE J.M., WARD B., KNAUF V.C. &
SHEWMAKER C.K. - Integration of foreign DNA following micro-
injection of tobacco mesophyll protoplasts.
Mol. Gen. Genet. 202, 179-185 (1986)
- 50 CSEPLO A. & MALIGA P. - Lincomycine resistance, a new type of
maternally inherited mutation in Nicotiana plumbaginifolia.
Curr. Genet. 6, 105-109 (1982)
- 51 CUTLER A.J., CONSTABEL F., KURE W.G.W. & SHARGOUL P.D. - Quantitation
of the delivery of liposome contents in plant protoplasts.
Anal. Biochem. 139, 482-486 (1984)

- 52 DAVEY M.R., COCKING E.C., FREEMAN J., PEARCE N. & TUDOR I. -
Transformation of Petunia protoplasts by isolated Agrobacterium
plasmids.
Plant Sci. Lett. 18, 307-313 (1980)
- 53 DEBLAERE R., BYTEBIER B., DE GREVE H., DEBOECK F., SCHELL J. &
VAN MONTAGU M. - Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors
for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants.
Nucl. Acids Res. 13, 4777-4788 (1985)
- 54 DE BLOCK M., HERRERA-ESTRELLA L., VAN MONTAGU M., SCHELL J. &
ZAMBRYSKI P. - Expression of foreign genes in regenerated plants
and in their progeny.
EMBO J. 3, 1681-1690 (1984)
- 55 DE BLOCK M., SCHELL J. & VAN MONTAGU M. - Chloroplast transformation
by Agrobacterium tumefaciens.
EMBO J. 4, 1367-1372 (1985)
- 56 DE HAAS J.M., BOOT R.J.M., HARING M.A., KOOL Ad J. & NIJKAMP J.J. -
A Petunia hybrida chloroplast DNA region, close to one of the
inverted repeats, shows sequence homology with the Euglena
gracilis chloroplast DNA region that carries the putative
replication origin.
Mol. Gen. Genet. 202, 48-54 (1986)
- 57 DENHARDT D.T. - A membrane-filter technique for the detection of
complementary DNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 641-646 (1966)
- 58 DENO H., SHINOZAKI K. & SUGIURA M. - Structure and transcription
pattern of a chloroplast gene coding for subunit III of proton-
translocating ATPase.
Gene 32, 195-201 (1984)
- 59 DESHAYES A., HERRERA-ESTRELLA L. & CABOCHE M. - Liposome-mediated
transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an Escherichia
coli plasmid.
EMBO J. 4, 2731-2737 (1985)

- 60 DHAESE P., DE GREVE H., DECKAEMER H., SCHELL J. & VAN MONTAGU M. -
Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations
in the large Ti-plasmid of Agrobacterium tumefaciens.
Nucl. Acids Res. 7, 1837-1849 (1979)
- 61 DIMITRIADIS G.J. - Entrapment of plasmid DNA in liposomes.
Nucl. Acids Res. 6, 2697-2705 (1979)
- 62 DUDITS D., HADLACZKY G., LEVI E., FEJER O., HAYDU Z. & LAZAR G. -
Somatic hybridization of Daucus carotta and D. capillifolius
by protoplast fusion.
Theor. Appl. Genet. 51, 127-132 (1977)
- 63 DUDITS D., HADLACZKY G.Y., BAJSZAR G.Y., KONCZ C.S. & LAZAR G. -
Plant regeneration from intergeneric cell hybrids.
Plant Sci. Lett. 15, 101-112 (1979)
- 64 ECKHARDT T. - A rapid method for the identification of plasmid
deoxyribonucleic acid in bacteria.
Plasmid 1, 584-588 (1978)
- 65 EVANS D.A., WETTER L.R. & GAMBORG O.L. - Somatic hybrid plants
of Nicotiana glauca and Nicotiana tabacum obtained by protoplast
fusion.
Physiol. Plant. 48, 225-230 (1980)
- 66 EVANS D.A. - Agricultural applications of plant protoplast fusion.
Biotechnology may, 253-261 (1983)
- 67 FALLER D.V. & BALTIMORE D. - Liposome encapsulation of retrovirus
allows superinfection of resistant cell lines.
J. Virol. 49, 269-272 (1984)
- 68 FERNANDEZ S.M., LURQUIN P.F. & KADO C.I. - Incorporation and
maintenance of recombinant-DNA plasmid vehicles pBR313 and
pCR1 in plant protoplasts.
FEBS Lett. 87, 277-282 (1978)

- 69 FLUHR R., AVIV D., GALUN E. & EDELMAN M. - Generation of heteroplastidic Nicotiana cybrids by protoplast fusion - Analysis for plastid recombinant types. Theor. Appl. Genet. 67, 491-498 (1984)
- 70 FOLCH J., LEES M. & SLOANE-STANLEY G.H. - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem. 228, 497-509 (1957)
- 71 FOLLIN A., INZE D., BUDAR F., GENETELLO C., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. - Genetic evidence that the tryptophan 2-mono-oxygenase gene of Pseudomonas savastanoi is functionally equivalent to one of the T-DNA genes involved in plant tumor formation by Agrobacterium tumefaciens. Mol. Gen. Genet. 201, 178-185 (1985)
- 72 FRALEY R.T., STRAUBINGER R.M., RULE G., SPINGER L. & PAPAHDJOPOULOS D. - Liposome-mediated delivery of deoxyribonucleic acid to cells : Enhanced efficiency of delivery related to lipid composition and incubation conditions. Biochem. 20, 6978-6997 (1981)
- 73 FRALEY R.T., DELLAPORTA S.L. & PAPAHDJOPOULOS D. - Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into tobacco protoplasts : A sensitive assay for monitoring liposome-protoplast interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1859-1863 (1982)
- 74 FRALEY R.T., ROGERS S.G., HORSCH R.B., SANDERS P.R., FLICK J.S., ADAMS S.P., BITTNER M.L., BRAND L.A., FINCK C.L., FRY J.S., GALLUPI G.R., GORDBERG S.B., HOFFMANN N.L. & WOO S.C. - Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4803-4807 (1983)
- 75 FRALEY R.T., HORSCH R.B., MATZKE A., CHILTON M.D., CHILTON W. & SANDERS P.R. - In vitro transformation of Petunia cells by an improved method of co-cultivation with Agrobacterium tumefaciens strains. Plant Mol. Biol. 3, 371-378 (1984)

- 76 FRALEY R.T. - Liposome preparation and incubation with plant protoplasts.
In : Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol 1 : laboratory procedures and their applications, ed. by I.K. VASIL. Academic Press, Orlando. pp 483-491 (1984)
- 77 FRANCK A., GUILLEY H., JONARD G., RICHARDS K. & HIRTH L. -
Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA.
Cell 21, 285-294 (1980)
- 78 FREEMAN J.P., DRAPER J., DAVEY M.R., COCKING E.C., GARTLAND K.M.A.,
HARDING K. & PENTAL D. - A comparison of methods for plasmid delivery into plant protoplasts.
Plant Cell Physiol. 25, 1353-1365 (1984)
- 79 FRENCH R., JANDA M. & AHLQUIST P. - Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus : Efficient expression in monocotyledonous plant cells.
Science 231, 1294-1297 (1986)
- 80 FROMM M., TAYLOR L.P. & WALBOT V. - Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824-5829 (1985)
- 81 FROMM M., TAYLOR L.P. & WALBOT V. - Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation.
Nature 319, 791-793 (1986)
- 82 FUKUNAGA Y., NAGATA T. & TAKEBE I. - Liposome-mediated infection of plant protoplasts with tobacco mosaic virus RNA.
Virology 113, 752-760 (1981)
- 83 FUKUNAGA Y., NAGATA T., TAKEBE I., KAKEHI T. & MATSUI C. - An ultrastructural study of the interaction of liposomes and plant protoplasts.
Expl. Cell Res. 144, 181-189 (1983)

- 84 FURNER I.J., HUFFMAN G.A., AMASINO R.M., GARFINKEL P.J., GORDON M.P.
& NESTER E.W. - An Agrobacterium transformation in the evolution
of the genus Nicotiana.
Nature 319, 422-427 (1986)
- 85 GALUN E. - Plant protoplasts as physiological tools.
Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 237-266 (1981)
- 86 GARDNER R.G., HOWARTH A.J., HAHN P., BROWN-LUEDI M., SHEPHERD J.F.
& MESSING J. - The complete nucleotide sequence of an infectious
clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing.
Nucl. Acids Res. 9, 2871-2888 (1981)
- 87 GARDNER R.C. & KNAUF V.C. - Transfer of Agrobacterium DNA to plants
requires a T-DNA border but not the virE locus.
Science 231, 725-727 (1986)
- 88 GARFINKEL P.J., SIMPSON R.B., REAM L.W., WHITE F.F., GORDON M.P.
& NESTER E.W. - Genetic analysis of crown gall : Fine structure
map of the T-DNA by site-directed mutagenesis.
Cell 27, 143-153 (1981)
- 89 GELVIN S.B., KARCHER S.J. & GOLDSBROUGH P.B. - Use of TR-T-DNA
promoter to express genes in plants and bacteria.
Mol. Gen. Genet. 199, 240-248 (1985)
- 90 GENGENBACH B.G., GREEN C.E. & DONOVAN C.M. - Inheritance of
selected pathotoxin-resistance in maize plants regenerated
from cell cultures.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5113-5117 (1977)
- 91 GIELEN J., DE BEUCKELEER M., SEURINK J., DEBOECK F., DE GREVE H.,
LEMMERS M., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. - The complete nucleotide
sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid
pTiAch5.
EMBO J. 3, 835-846 (1984)

- 92 GILES K.L., VAUGHAN V., RANCH J.P. & EMERY J. - Liposome-mediated uptake of chloroplasts by plant protoplasts.
In Vitro 16, 581-584 (1980)
- 93 GINSBERG L. - Does Ca^{2+} cause fusion or lysis of unilamellar lipid vesicles ?
Nature 275, 758-760 (1978)
- 94 GIVORD L., XIONG C., GIBAND M., KOENIG I., HOHN T., LEBEURIER G. & HIRTH L. - A second cauliflower mosaic virus gene product influences the second structure of the viral inclusion body.
EMBO J. 3, 1423-1427 (1984)
- 95 GLEBA YU.YU. & HOFFMAN F. - "Arabidobrassica" : Plant-genome engineering by protoplast fusion.
Naturwiss. 66, 547-554 (1979)
- 96 GLIMELIUS K., WALLIN A. & ERIKSSON T. - Agglutinating effects of concanavalin A on isolated protoplasts of Daucus carota.
Physiol. Plant. 31, 225-230 (1974)
- 97 GORMAN C.M., LANE D.P. & RIGBY P.W.J. - High efficiency gene transfer into mammalian cells.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 307, 343-346 (1984)
- 98 GRAHAM F.L. & VAN DER EB A.J. - A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.
Virology 52, 456-467 (1973)
- 99 GRONENBORN B., GARDNER R.C., SCHAEFER S. & SHEPHERD R.J. - Propagation of foreign DNA in plants using cauliflower mosaic virus as vector.
Nature 294, 773-776 (1981)
- 100 GROSVELD F.G., LUND T., MURRAY E.J., MELLOR A.L., DAHL H.H.M. & FLAVELL R.A. - The construction of cosmid libraries which can be used to transform eucaryotic cells.
Nucl. Acids Res. 10, 6715-6728 (1982)

- 101 GRUISSSEN W. & ZURAWSKI G. - Analysis of promoter regions for the spinach chloroplast *rbcl*, *atpB* and *psbA* genes.
EMBO J. 4, 3375-3383 (1985)
- 102 GUPTA P.P., SCHIEDER O. & GUPTA M. - Intergeneric nuclear gene transfer between somatically and sexually incompatible plants through asymmetric protoplast fusion.
Mol. Gen. Genet. 197, 30-35 (1984)
- 103 HAGIYA M., CLOSE T.J., TAIT R.C. & KADO C.I. - Identification of pTiC58 plasmid-encoded proteins for virulence in Agrobacterium tumefaciens.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2669-2673 (1985)
- 104 HAIN R., STEINBISS H.H. & SCHELL J. - Fusion of Agrobacterium and E.coli spheroplasts with Nicotiana tabacum protoplasts - Direct gene transfer from microorganism to higher plant.
Plant Cell Reports 3, 60-64 (1984)
- 105 HAIN R., STABEL P., CZERNILOFSKY A.P., STEINBISS H.H., HERRERA-ESTRELLA L. & SCHELL J. - Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts.
Mol. Gen. Genet. 199, 161-168 (1985)
- 106 HARDING K. & COCKING E.C. - The interaction between E.coli spheroplasts and plant protoplasts : a proposed procedure to deliver foreign genes into plant cells.
Protoplasma 130, 153-161 (1986)
- 107 HARPSTER M. & APEL K. - The light-dependent regulation of gene expression during plastid development in higher plants.
Physiol. Plant. 64, 147-152 (1985)
- 108 HASHIMOTO H., MORIKAWA H., YASUYOKI Y. & KIMURA A. - A novel method for transformation of intact yeast cells by electro-injection of plasmid DNA.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 336-339 (1985)

- 109 HEINHORST S., CANNON G. & WEISSBACH A. - Plastid and nuclear DNA synthesis are not coupled in suspension cells of Nicotiana tabacum.
Plant Mol. Biol. 4, 3-12 (1985)
- 110 HELLER R. - Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro.
Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14, 223 (1953)
- 111 HERNALSTEENS J.P., VAN VLIET F., DE BEUCKELEER M., DEPICKER A., ENGLER G., LEMMERS M., HOLSTERS M., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. - The Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells.
Nature 287, 654-656 (1980)
- 112 HERRERA-ESTRELLA L., DE BLOCK M., MESSENS E., HERNALSTEENS J.P., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. - Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells.
EMBO J. 2, 987-995 (1983)
- 113 HERRERA-ESTRELLA L., DEPICKER A., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. - Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector.
Nature 303, 209-212 (1983)
- 114 HERRERA-ESTRELLA L., VAN DEN BROECK G., MAENHAUT R., VAN MONTAGU M., SCHELL J., TIMKO M. & CASHMORE A. - Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene into Nicotiana tabacum using a Ti-plasmid vector.
Nature 310, 115-120 (1984)
- 115 HIBBERG K.A. & GREEN C.E. - Inheritance and expression of lysine plus threonine resistance selected in maize tissue culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 559-563 (1982)
- 116 HILLE J., VAN KAN J. & SCHILPEROORT R.A. - Trans-acting virulence functions of the octopine Ti-plasmid from Agrobacterium tumefaciens.
J. Bact. 158, 754-756 (1984)

- 117 HOEKEMA A., HIRSCH P.R., HOOYKAAS P.J.J. & SCHILPEROORT R.A. -
A binary plant vector strategy based on separation of vir-
and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid.
Nature 303, 179-180 (1983)
- 118 HOFFMAN R.M., MARGOLIS L.B. & BERGELSON L.P. - Binding and
entrapment of high molecular weight DNA by lecithin liposomes.
FEBS Lett. 93, 365-368 (1978)
- 119 HOHN T., RICHARDS K. & LEBEURIER G. - Cauliflower mosaic virus
on its way to becoming a useful plant vector.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96, 193-236 (1982)
- 120 HOLL F.B. - Cellular environment and the transfer of genetic
information.
In : Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales.
Coll. Int. CNRS 212, 509-512 (1973)
- 121 HOLMES D.S. & QUIGLEY M. - A rapid boiling method for the
preparation of bacterial plasmids.
Anal. Biochem. 114, 193-197 (1981)
- 122 HOOYKAAS P.J.J., HOPKER M., DEN DULK-RAS H. & SCHILPEROORT R.A. -
A comparison of virulence determinants in an octopine Ti
plasmid, a nopaline Ti plasmid and a Ri plasmid by
complementation analysis of Agrobacterium tumefaciens mutants.
Plasmid 11, 195-205 (1984)
- 123 HOOYKAAS-VAN SLOGTENEN G.M.S., HOOYKAAS P.J.J. & SCHILPEROORT R.A.
- Expression of Ti-plasmid genes in monocotyledonous plants
infected with Agrobacterium tumefaciens.
Nature 311, 763-764 (1984)
- 124 HORSCH R.B., FRALEY R.T., ROGERS S.G., SANDERS P.R., LLOYD A. &
HOFFMAN N. - Inheritance of functional foreign genes in plants.
Science 223, 496-498 (1984)

- 125 HORSCH R.B., FRY J.E., HOFFMAN N.L., EICHHOLTZ D., ROGERS S.G. & FRALEY R.T. - A simple and general method for transferring genes into plants.
Science 227, 1229-1231 (1985)
- 126 HOWELL S.H. & HULL R. - Replication of cauliflower mosaic virus and transcription of its genome in turnip leaf protoplasts.
Virology 86, 468-471 (1978)
- 127 HOWELL S.H., WALKER L.L. & WALDEN R.M. - Rescue of in vitro generated mutants of cloned cauliflower mosaic virus genome in infected plants.
Nature 293, 483-485 (1981)
- 128 HOWELL S.H., ODELL J.T., WALDEN R.M., DUDLEY R.K. & WALKER L.L. - Use of cauliflower mosaic virus DNA as a molecular vehicle in plants.
In : Developmental biology using purified genes, ed. by D.D. BROWN. Academic Press. pp 587-594 (1981)
- 129 HUGHES B.G., WHITE F.G. & SMITH M.A. - Contribution of damaged protoplasts to DNA uptake by purified plant protoplasts.
Plant Sci. Lett. 11, 199-206 (1978)
- 130 HUGHES B.G., WHITE F.G. & SMITH M.A. - Purification of plant protoplasts by discontinuous gradient centrifugation.
Biochem. Physiol. Pflanzen. 172, 223-231 (1978)
- 131 HULL R. & COVEY S.N. - Cauliflower mosaic virus : Pathways of infection.
BioEssays 3, 160-163 (1985)
- 132 INZE D., FOLLIN A., VAN LIJSEBETTENS M., SIMOENS C., GENETELLO C., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. - Genetic analysis of the individual T-DNA genes of Agrobacterium tumefaciens. Further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic-acid synthesis.
Mol. Gen. Genet. 194, 265-274 (1984)

- 133 ISH-HOROWITZ D. & BURKE J.F. - Rapid and efficient cosmid cloning.
Nucl. Acids Res. 9, 2989-2998 (1981)
- 134 JOACHIM S. & ROBINSON D.G. - Endocytosis of cationic ferritin by
bean leaf protoplasts.
Eur. J. Cell Biol. 34, 212-216 (1984)
- 135 JOOS H., TIMMERMAN B., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. - Genetic
analysis of transfer and stabilization of Agrobacterium DNA
in plant cells.
EMBO J. 2, 2151-2160 (1983)
- 136 JOOS H., INZE D., CAPLAN A., SORMANN M., VAN MONTAGU M. & SCHELL J.
- Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls.
Cell 32, 1057-1067 (1983)
- 137 KAO K.N., CONSTABEL F., MICHAYLUK M.R. & GAMBORG O.L. - Plant
protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells.
Planta 120, 215-227 (1974)
- 138 KAO K.N. & MICHAYLUK M.R. - A method for high-frequency intergeneric
fusion of plant protoplasts.
Planta 115, 355-367 (1974)
- 139 KARLIN-NEUMAN G. & TOBIN E.M. - Transit peptides of nuclear-
encoded chloroplast proteins share a common amino acid framework.
EMBO J. 5, 9-13 (1986)
- 140 KARUBE I., TAMIYA E. & MATSUOKA H. - Transformation of Saccharomyces
cerevisiae spheroplasts by high electric pulse.
FEBS Lett. 182, 90-94 (1985)
- 141 KAULEN H., SCHELL J. & KREUZALER F. - Light-induced expression
of the chimeric chalcone synthase-NPT II gene in tobacco cells.
EMBO J. 5, 1-8 (1986)

- 142 KAYSER G., DUFRANE S.P. & RUYSSCHAERT J.M. - Interaction between lectin and liposomes containing gangliosides.
Bull. Soc. Belge Biophys. réunion d'Anvers, 1^{er} juin 1979
- 143 KELLER W.A. & MELCHERS G. - The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion.
Z. Naturforsch. 28c, 737-741 (1973)
- 144 KELLY J.H. & DARLINGTON G.J. - Hybrid genes : molecular approaches to tissue-specific gene expression.
Ann. Rev. Genet. 19, 273-296 (1985)
- 145 KLEBE R.J., HARRISS J.V., SHARP Z.D. & DOUGLAS M.G. - A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast.
Gene 25, 333-341 (1983)
- 146 KLEBE R.J., HARRISS J.V., HANSON D.P. & GAUNTT C.J. - High-efficiency polyethylene glycol-mediated transformation of mammalian cells.
Som. Cell Mol. Genet. 10, 495-502 (1984)
- 147 KLEE H.J., WHITE F.F., IYER W.N., GORDON M.P. & NESTER E.W. - Mutational analysis of the virulence region of an Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid.
J. Bact. 153, 878-883 (1983)
- 148 KLEE H., MONTOYA A., HORODYSKI F., LICHTENSTEIN C., GARFINKEL D., FULLER S., FLORES C., PESCHON S., NESTER E. & GORDON M. - Nucleotide sequence of the *tms* genes of the pTiA6NC octopine Ti-plasmid : two gene products involved in plant tumorigenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1728-1732 (1984)
- 149 KONCZ C., DE GREVE H., ANDRE D., DEBOECK F., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. - The opine synthase genes carried by Ti-plasmids contain all signals necessary for expression in plants.
EMBO J. 2, 1597-1603 (1983)

- 150 KONCZ C., KREUZALER F., KALMAN Z.S. & SCHELL J. - A simple method to transfer, integrate, and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and α -actin in plant tumors. EMBO J. 3, 1029-1037 (1984)
- 151 KONG X.F., LOVETT P.S. & KUNG S.D. - The Nicotiana chloroplast genome IX. Identification of regions active as prokariotic promoters in Escherichia coli. Gene 31, 23-30 (1984)
- 152 KRENS F.A., MOLENDIJK L., WULLEMS G.J. & SCHILPEROORT R.A. - In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. Nature 296, 72-74 (1982)
- 153 KUCHERLAPATI R.S., EVES E.M., SONG K.Y., MORSE B.S. & SMITHIES O. - Homologous recombination between plasmids in mammalian cells can be enhanced by treatment of input DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3153-3157 (1984)
- 154 KURATA S.I., TSUKAKOSHI M., KASUYA T. & IKAWA Y. - The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells. Expl. Cell Res. 162, 372-378 (1986)
- 155 LAQUEL P., ZIEGLER V. & HIRTH L. - The 80 K polypeptide associated with the replication complexes of cauliflower mosaic virus is recognized by antibodies to gene V translation product. J. Gen. Virol. 67, 197-201 (1986)
- 156 LAMPPA G.K., MORELLI G. & CHUA N.H. - Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. Mol. Cell. Biol. 5, 1370-1378 (1985)
- 157 LAMPPA G.K., NAGY F. & CHUA N.A. - Light-regulated and organ-specific expression of a wheat Cab gene in transgenic tobacco. Nature 316, 750-752 (1985)

- 158 LARKIN P.J. - Plant protoplast agglutination by lectins.
Plant Physiol. 61, 626-629 (1978)
- 159 LAVELLE D., OSTRO M.J., MATTHEWS B.F., PAXTON W. & DRAY S. -
Parameters affecting the insertion of liposomally-sequestered
high molecular weight RNA into eucaryotic cells in vitro.
Fed. Proc. 37, 1391 (1978)
- 160 LEBEURIER G., HIRTH L., HOHN T. & HOHN B. - Infectivity of native
and cloned DNA of cauliflower mosaic virus.
Gene 12, 139-146 (1980)
- 161 LEDOUX L., HUART R. & JACOBS M. - Fate of exogenous DNA in
Arabidopsis thaliana.
Eur. J. Biochem. 23, 96-108 (1971)
- 162 LEEEMANS J., DEBLAERE R., WILLMITZER L., DE GREVE H., HERNALSTEENS
J.P., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. - Genetic identification of
functions of TL-DNA transcripts in octopine crown gall.
EMBO J. 1, 147-152 (1982)
- 163 LESCURE A.M., BISANZ-SEYER C., PESEY H. & MACHE R. - In vitro
transcription initiation of the spinach chloroplast 16S rRNA
gene at two tandem promoters.
Nucl. Acids Res. 13, 8787-8796 (1985)
- 164 LI X.H., LI W.B. & HUANG M.J. - Somatic hybrid plants from
intergeneric fusion between tobacco tumor B6S3 and Petunia
hybrida W43 and expression of LpDH.
Scient. Sinica 25, 611-619 (1982)
- 165 LIEBKE B. & HESS D. - Uptake of bacterial DNA into mesophyll
protoplasts of Petunia hybrida.
Biochem. Physiol. Pflanzen 171, 493-501 (1977)
- 166 LIU S.T., PERRY K.L., SCHARDL C.L. & KADO C.I. - Agrobacterium
Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall
oncogenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2812-2816 (1982)

- 167 LONSDALE D.M. - A review of the structure and organization of the mitochondrial genome of higher plants.
Plant Mol. Biol. 3, 201-206 (1984)
- 168 LOPER J.E. & KADO C.I. - Host-range conferred by the virulence-specifying plasmid of Agrobacterium tumefaciens.
J. Bact. 139, 591-596 (1979)
- 169 LORZ H., BAKER B. & SCHELL J. - Gene transfer to cereal mediated by protoplast transformation.
Mol. Gen. Genet. 199, 178-186 (1985)
- 170 LURIA S.E. & BURROUS J.W. - Hybridization between Escherichia coli and Shigella.
J. Bact. 74, 461-476 (1957)
- 171 LURQUIN P.F. & KADO C.I. - Escherichia coli plasmid pBR313 insertion into plant protoplasts and into their nuclei.
Mol. Gen. Genet. 154, 113-121 (1977)
- 172 LURQUIN P.F. - Entrapment of plasmid DNA by liposomes and their interactions with plant protoplasts.
Nucl. Acids Res. 6, 3773-3784 (1979)
- 173 LURQUIN P.F. - Binding of plasmid loaded liposomes to plant protoplasts : Validity of biochemical methods to evaluate the transfer of exogenous DNA.
Plant Sci. Lett. 21, 31-40 (1981)
- 174 LURQUIN P.F., SHEEHY R.E. & RAO N.A. - Quantitative aspects of nucleic acids sequestration in large liposomes and their effects on plant protoplasts.
FEBS Lett. 125, 183-187 (1981)
- 175 LURQUIN P.F. & SHEEHY R.E. - Binding of large liposomes to plant protoplasts and delivery of encapsulated DNA.
Plant Sci. Lett. 25, 133-146 (1982)

- 176 LURQUIN P.F. & SHEEHY R.E. - Effects of conditions of incubation on the binding of DNA-loaded liposomes to plant protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 28, 49-61 (1982/83)
- 177 LURQUIN P.F. & ROLLO F. - Intracellular distribution of donor DNA following interaction between plant protoplasts and DNA-loaded liposomes. *Biol. Cell* 47, 117-120 (1983)
- 178 MALIGA P. - Isolation, characterization, and utilisation of mutant cell lines in higher plants. *Int. Rev. Cytol. suppl.* 11A, 225-250 (1980)
- 179 MALIGA P. - Streptomycine resistance is inherited as a recessive nuclear trait in Nicotiana sylvestris line. *Theor. Appl. Genet.* 60, 1-3 (1981)
- 180 MALIGA P. - Isolation and characterization of mutants in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 519-542 (1984)
- 181 MANIATIS T., FRITSCH E.F. & SAMBROOK J. - Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)
- 182 MARTON L., WULLEMS G.J., MOLENDIJK L. & SCHILPEROORT R.A. - In vitro transformation of cultured cells from Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens. *Nature* 277, 129-131 (1979)
- 183 MARX J.L. - Plant gene transfer becomes a fertile field. *Science* 230, 1148-1150 (1985)
- 184 MATSUI C., HASEZAWA S., TANAKA N. & SYONO K. - Introduction of Escherichia coli cells and spheroplasts into Vinca protoplasts. *Plant Cell Reports* 2, 30-32 (1983)

- 185 MATTHEWS B., DRAY S., WIDHOLM J. & OSTRO M. - Liposome-mediated transfer of bacterial RNA into carrot protoplasts. *Planta* 145, 37-44 (1979)
- 186 MAULE A.J. - Infection of protoplasts from several Brassica species with cauliflower mosaic virus following inoculation using polyethylene glycol. *J. Gen. Virol.* 64, 2655-2660 (1983)
- 187 MEDGYESY P., FEJES E. & MALIGA P. - Intergeneric chloroplast recombination in a Nicotiana somatic hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6960-6964 (1985)
- 188 MELCHERS G., SACRISTAN M.D. & HOLDER S.A. - Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Comm.* 43, 202-218 (1978)
- 189 MEMELINK J., WULLEMS G.J. & SCHILPEROORT R.A. - Nopaline T-DNA is maintained during regeneration and generative propagation of transformed tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 190, 516-522 (1983)
- 190 MENCZEL L., NAGY F., KISS Z.R. & MALIGA P. - Streptomycin resistant and sensitive hybrids of Nicotiana tabacum + Nicotiana knightiana : Correlation of resistance with N. tabacum plastids. *Theor. Appl. Genet.* 59, 191-195 (1981)
- 191 MENISSIER J., DE MURCIA G., LEBEURIER G. & HIRTH L. - Electron microscopic studies of the different topological form of the cauliflower mosaic virus DNA : Knotted encapsidated DNA and nuclear minichromosome. *EMBO J.* 2, 1067-1072 (1983)
- 192 MERRICK M. & DIXON R. - Why don't plants fix nitrogen ? *Trends Biotechnol.* 2, 162-166 (1984)
- 193 MESSENS E., LENAERTS A., VAN MONTAGU M. & HEDGES R.W. - Genetic basis for opine secretion from crown gall tumor cells. *Mol. Gen. Genet.* 199, 344-348 (1985)

- 194 MEYER P., WALGENBACH E., BUSSMAN K., HOMBRECHER G. & SAEDLER H.
- Synchronized tobacco protoplasts are efficiently transformed
by DNA.
Mol. Gen. Genet. 201, 513-518 (1985)
- 195 MEYER Y. & COOKE R. - Time course of hormonal control of the first
mitosis in tobacco mesophyll protoplasts cultivated in vitro.
Planta 147, 181-185 (1979)
- 196 MICHEL F. & DUJON B. - Conservation of RNA secondary structure
in two intron families including mitochondrial-, chloroplast-
and nuclear-encoded members.
EMBO J. 2, 33-38 (1983)
- 197 MODJTAHEDI N., VOLOVITCH M., MOZZOLINI L. & YOT P. - Comparison
of the predicted secondary structure of aphid transmission
factor for transmissible and non-transmissible cauliflower
mosaic virus strains.
FEBS Lett. 181, 223-228 (1985)
- 198 MOREL G. & WETMORE R.H. - Fern callus tissue culture.
Am. J. Bot. 38, 141-143 (1951)
- 199 MORELLI G., NAGY F., FRALEY R.T., ROGERS S.G. & CHUA N.H. - A
short conserved sequence is involved in the light-inducibility
of a gene encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small
subunit of pea.
Nature 315, 200-204 (1985)
- 200 MORIKAWA H., LIDA A., MATSUI C., IKEGAMI M. & YAMADA Y. - Gene
transfer into intact plant cells by electroinjection through
cell walls and membranes.
Gene 41, 121-124 (1986)
- 201 MULLER J.F., MISSONIER C. & CABOCHE M. - Low density growth of
cells derived from Nicotiana and Petunia protoplasts : Influence
of the source of protoplasts and comparison of the growth-
promoting activity of various auxins.
Physiol. Plant. 57, 35-41 (1983)

- 202 MURAI N., SUTTON D.W., MURRAY M.G., SLIGHTOM J.L., MERLO D.J., REICHERT N.A., SENGUPTA-GOPALAN C., STOCK C.A., BARKER R.F., KEMP J.D. & HALL T.C. - Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222, 476-482 (1983)
- 203 MURASHIGE T. & SKOOG F. - A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473-497 (1962)
- 204 MURRAY M.G. & THOMPSON W.F. - Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8, 4321-4325 (1980)
- 205 NAGATA T. & MELCHERS G. - Surface charge of protoplasts and their significance in cell-cell interaction. *Planta* 142, 235-238 (1978)
- 206 NAGATA T., OKADA K., TAKEBE I. & MATSUI C. - Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). *Mol. Gen. Genet.* 184, 161-165 (1981)
- 207 NAGY F., MORELLI G., FRALEY R.T., ROGERS S.G. & CHUA N.H. - Photoregulated expression of a pea rbsS gene in leaves of transgenic plants. *EMBO J.* 4, 3063-3068 (1985)
- 208 NESTER E.W., GORDON M.P., AMASINO R.M. & YANOFSKY M.F. - Crown gall : a molecular and physiological analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 387-414 (1984)
- 209 ODELL J.T., NAGY F. & CHUA N.H. - Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810-812 (1985)

- 210 OHGAWARA T., UCHIMIYA H. & HARADA H. - Uptake of liposome-encapsulated plasmid DNA by plant protoplasts and molecular fate of foreign DNA.
Protoplasma 116, 145-148 (1983)
- 211 OHME M., KAMOGASHIRA T., SHINOZAKI K. & SUGIURA M. - Locations and sequences of tobacco chloroplast genes for tRNA^{Pro}(UGG), tRNA^{Trp}, tRNA^{Met} and tRNA^{Gly}(GCC) : the tRNA^{Gly} contains only two base-pairs in the D stem.
Nucl. Acids Res. 12, 6741-6749 (1984)
- 212 OHME M., KAMOGASHIRA T., SHINOZAKI K. & SUGIURA M. - Structure and cotranscription of tobacco chloroplast genes for tRNA^{Glu}(UUC), tRNA^{Tyr}(GUA) and tRNA^{Asp}(GUC).
Nucl. Acids Res. 13, 1045-1056 (1985)
- 213 OHYAMA K., GAMBORG O.L. & MILLER R.A. - Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts.
Can. J. Bot. 50, 2077-2080 (1972)
- 214 OKKER R.J.H., SPAINK H., HILLE J., VAN BRUSSEL T.A.N., LUGTENBERG B. & SCHILPEROORT R.A. - Plant-inducible virulence promoter of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid.
Nature 312, 564-566 (1984)
- 215 OLSZEWSKI N., HAGEN G. & GUILFOYLE T.J. - A transcriptionally active, covalently closed minichromosome of cauliflower mosaic virus DNA isolated from infected turnip leaves.
Cell 29, 395-402 (1982)
- 216 OOMS G., HOOYKAAS P.J.J., MOOLENAAR G. & SCHILPEROORT R.A. - crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by Agrobacterium tumefaciens carrying mutated Ti plasmid; analysis of T-DNA functions.
Gene 14, 33-50 (1981)

- 217 OOMS G., HOOYKAAS P.J.J., VAN VEEN R.J.M., VAN BEELEN P., ROSENSBURG-TUINK T.J.G. & SCHILPEROORT R.A. - Octopine Ti-plasmid deletion mutants of Agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the T-region. Plasmid 7, 15-29 (1982)
- 218 OSTRO M.J., GIACOMONI D. & DRAY S. - Incorporation of high molecular weight RNA into large artificial lipid vesicles. Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 836-842 (1977)
- 219 OTTEN L., DE GREVE H., HERNALSTEENS J.P., VAN MONTAGU M., SCHIEDER O., STRAUB J. & SCHELL J. - Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of Agrobacterium tumefaciens. Mol. Gen. Genet. 183, 209-213 (1981)
- 220 OTTEN L., PIOTROWIAK G., HOOYKAAS P., DUBOIS M., SZEGEDI E. & SCHELL J. - Identification of an Agrobacterium tumefaciens pTiB6S3 vir region fragment that enhances the virulence of pTiC58. Mol. Gen. Genet. 199, 189-193 (1985)
- 221 PALMER J.D. - Comparative organization of chloroplast genomes. Ann. Rev. Genet. 19, 325-354 (1985)
- 222 PASZKOWSKI J., SHILITO R.D., SAUL M., MANDAK V., HOHN D. & POTRYKUS I. - Direct gene transfer to plants. EMBO J. 3, 2717-2722 (1984)
- 223 PERNES J. - La génétique de la domestication des céréales. La Recherche 14, 910-919 (1983)
- 224 PETIT A., DELHAYE S., TEMPE J. & MOREL G. - Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'Agrobacterium et les tumeurs qu'elles induisent. Physiol. Veg. 8, 205-213 (1970)

- 225 PFEIFFER P. & HOHN T. - Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus : a detailed model and test of some aspects.
Cell 33, 781-789 (1983)
- 226 PICHERSKY E., BERNATSKY R., TANKSLEY S.D., BREIDENBACH R.B., KAUSCH A.P. & CASHMORE A.R. - Molecular characterization and genetic mapping of two clusters of genes encoding chlorophyll a/b-binding proteins in Lycopersicon esculentum (tomato).
Gene 40, 247-258 (1985)
- 227 POTRYKUS I., PASZKOWSKI J., SAUL M.W., PETRUSKA J. & SHILITO R.D. - Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer.
Mol. Gen. Genet. 199, 163-177 (1985)
- 228 POTRYKUS I., SAUL M.W., PETRUSKA J., PASZKOWSKI J. & SHILITO R.D. - Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot.
Mol. Gen. Genet. 199, 183-188 (1985)
- 229 POWER J.B., FREASON E.M., HAYWARD C., GEORGE D., EVANS P.K., BERRY S.F. & COCKING E.C. - Somatic hybridization of Petunia hybrida and P. parodii.
Nature 263, 500-502 (1976)
- 230 REYNOLDS E.S. - The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol. 17, 208-212 (1963)
- 231 RICHARDS K.E., GUILLEY H. & JONARD G. - Further characterization of the discontinuities in cauliflower mosaic virus DNA.
FEBS Lett. 134, 67-70 (1981)
- 232 RIGBY P.W., DIECKMANN M., RHODES C. & BERG P. - Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. 133, 237-251 (1977)

- 233 ROGERS S.O. & BENDICH A.J. - Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5, 69-76 (1985)
- 234 ROLLO F., GALLI M.G. & PARISI B. - Liposome-mediated transfer of DNA to carrot protoplasts : a biochemical and autoradiographic analysis. *Plant Sci. Lett.* 20, 347-354 (1981)
- 235 ROLLO F. & HULL R. - Liposome-mediated infection of turnip protoplasts with turnip rosette virus and RNA. *J. Gen. Virol.* 60, 359-363 (1982)
- 236 ROUSER G., KRITCHEVSKY G. & YAMAMOTO A. - Column chromatography and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipides. In : *Lipid chromatographic analysis*, ed. by G.V. MORINETTI, vol. 1, p 99 (1967)
- 237 ROUZE P., DESHAYES A. & CABOCHE M. - Use of liposomes for the transfer of nucleic acids : Optimization of the method for tobacco mesophyll protoplasts with tobacco mosaic virus RNA. *Plant Sci. Lett.* 31, 55-64 (1983)
- 238 SCHARDL C.L. & KADO C.I. - Ti plasmid and chromosomal ornithine catabolism genes of Agrobacterium tumefaciens C58. *J. Bact.* 155, 196-202 (1983)
- 239 SCHELL J., VAN MONTAGU M., DE BEUCKELEER M., DE BLOCK M., DEPICKER A., DE WILDE M., ENGLER G., GENETELLO C., HERNALSTEENS J.P., HOLSTERS M., SEURINCK J., SILVA B., VAN VLIET F. & VILLARROEL R. - Interactions and DNA transfer between Agrobacterium tumefaciens, the Ti-plasmid and the plant host. *Proc. R. Soc. Lond. B* 204, 251-266 (1979)
- 240 SCHENCK H.R. & ROBBELEN G. - Somatic hybrids by fusion of protoplasts from Brassica oleracea and B. campestris. *Z. Pflanzenzuchtg.* 89, 278-288 (1982)

- 241 SCHIEDER O. - Somatic hybrids of Datura innoxia Mill. + Datura discolor Bernh. and of Datura innoxia Mill. + Datura stramonium L. var. tatula L. I. Selection and characterization. Mol. Gen. Genet. 162, 113-119 (1978)
- 242 SCHRODER G., WAFFENSCHMIDT S., WEILER E.W. & SCHRODER J. - The T-region of Ti plasmid codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. Eur. J. Biochem. 138, 387-391 (1984)
- 243 SEED L.J. - The preparation of fragile protoplasts for electron microscopy. J. Microsc. 120, 109-112 (1980)
- 244 SENDA M., MORIKAWA H., KATAGI H., TAKADA T. & YAMADA Y. - Effect of temperature on membrane fluidity and protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 57, 33-35 (1980)
- 245 SHAPIRO D.R. & TEWARI K.K. - Nucleotide sequences of transfer RNA genes in the Pisum sativum chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 6, 1-12 (1986)
- 246 SHEPARD J.F., BIDNEY D., BARSBY T. & KEMBLE R. - Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion. Science 219, 683-688 (1983)
- 247 SHIMIZU-KADOTA M. & KUDO S. - Liposome-mediated transfection of Lactobacillus casei. Agric. Biol. Chem. 48, 1105-1107 (1984)
- 248 SHINOZAKI K., SUN C.R. & SUGIURA M. - Gene organization of chloroplast DNA from the broad bean Vicia faba. Mol. Gen. Genet. 197, 363-367 (1984)
- 249 SHINOZAKI K., DENO H., WAKASUGI T. & SUGIURA M. - Tobacco chloroplast gene coding for subunit I of proton-translocating ATPase : comparison with the wheat subunit I and E.coli subunit b. Curr. Genet. 10, 421-423 (1986)

- 250 SHINOZAKI K., DENO H., SUGITA M., KURAMITSU S. & SUGIURA M. -
Intron in the gene for the ribosomal protein S16 of tobacco
chloroplast and its conserved boundary sequences.
Mol. Gen. Genet. 202, 1-5 (1986)
- 251 SIMON R. - High frequency mobilization of gram-negative bacterial
replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon.
Mol. Gen. Genet. 196, 413-420 (1984)
- 252 SIMPSON J., TIMKO M.P., CASHMORE A.R., SCHELL J., VAN MONTAGU M.
& HERRERA-ESTRELLA L. - Light-inducible and tissue-specific
expression of a chimaeric gene under control of the 5'-flanking
sequence of a pea chlorophyll a/b-binding protein gene.
EMBO J. 4, 2723-2729 (1985)
- 253 SLAVIK N.S. & WIDHOLM J.M. - Inhibition of deoxyribonuclease
activity in the medium surrounding plant protoplasts.
Plant Physiol. 62, 272-275 (1978)
- 254 SMITH E.T. & TOWNSEND C.O. - A plant tumor of bacterial origin.
Science 25, 671-673 (1907)
- 255 SMITHIES O., GREGG R.G., BOGGS S.S., KORALEWSKI M.A. & KUCHERLAPATI
R. - Insertion of DNA sequences into the human chromosome
 β -globin locus by homologous recombination.
Nature 317, 230-234 (1985)
- 256 SONG K.Y., CHEKURI L., RAUTH S., EHRLICH S. & KUCHERLAPATI R. -
Effect of double-strand breaks on homologous recombination
in mammalian cells and extracts.
Mol. Cell. Biol. 5, 3331-3336 (1985)
- 257 SOUTHERN E.M. - Detection of specific sequences among DNA fragments
separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)

- 258 STACHEL S.E., MESSENS E., VAN MONTAGU M. & ZAMBRYSKI P. -
Identification of the signal molecules produced by wounded
plant cells that activate T-DNA transfer in Agrobacterium
tumefaciens.
Nature 318, 624-629 (1985)
- 259 STEINBACK K.E., MC INTOSH L., BOGORAD L. & ARNTZEN C.J. -
Identification of the triazine receptor protein as a
chloroplast gene product.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7463-7467 (1981)
- 260 STOPPER H., ZIMMERMANN U. & WECKER E. - High yields of DNA-
transfer into mouse L-cells by electropermeabilization.
Z. Naturforsch. 40c, 929-932 (1985)
- 261 STRAUBINGER R.M., HONG K., FRIEND D.S. & PAPAHAJIOPOULOS D. -
Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated
molecules : Encounter with a low pH compartment after
internalization in coated vesicles.
Cell 32, 1069-1079 (1983)
- 262 STRAUBINGER R.M. & PAPAHAJIOPOULOS D. - Liposomes as carriers for
intracellular delivery of nucleic acids.
Meth. Enzymol. 101, 512-526 (1983)
- 263 SUGITA M., KATO A., SHIMADA H. & SUGIURA M. - Sequence analysis
of the junctions between a large inverted repeat and single-
copy regions in tobacco chloroplast DNA.
Mol. Gen. Genet. 194, 200-205 (1984)
- 264 SUGITA M., SHINOZAKI K. & SUGIURA M. - Tobacco chloroplast
tRNA^{Lys}(UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron : An
open reading frame and a conserved boundary sequence in the
intron.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3557-3561 (1985)
- 265 SUSSMAN D.J. & MILMAN G. - Short-term, high-efficiency expression
of transfected DNA.
Mol. Cell. Biol. 4, 1641-1643 (1984)

- 266 SZETO W.W., HAMER D.H., CARLSON P.S. & THOMAS C.A. - Cloning of cauliflower mosaic virus (CaMV) DNA in Escherichia coli.
Science 196, 210-212 (1977)
- 267 SZOKA F. & PAPAHDJOPOULOS D. - Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4194-4198 (1978)
- 268 TAKATSUI H., HIROCHIKA H., FUKUCHI T. & IKEBA J.E. - Expression of cauliflower mosaic virus reverse transcriptase in yeast.
Nature 319, 240-243 (1986)
- 269 TANAKA N., IKEGAMI M., HOHN T., MATSUI C. & WATANABE I. - E. coli spheroplast-mediated transfer of cloned cauliflower mosaic virus DNA into plant protoplasts.
Mol. Gen. Genet. 195, 378-380 (1984)
- 270 TANCHAK M.A., GRIFFING L.R., MERSEY B.G. & FOWKE L.C. - Endocytosis of cationized ferritin by coated vesicles of soybean protoplasts.
Planta 162, 481- 486 (1984)
- 271 THOMASHOW M.F.T., NUTTER R., MONTOYA A.L., GORDON M.P. & NESTER E.W. - Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors.
Cell 19, 729-739 (1980)
- 272 THOMASHOW L.S., REEVES S. & THOMASHOW M.F. - Crown gall oncogenesis : Evidence that a T-DNA gene from Agrobacterium Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyses synthesis of indolacetic acid.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5071-5075 (1984)
- 273 THOMASHOW M.F., HUGLY S., BUCHHOLZ W.G. & THOMASHOW L.S. - Molecular basis for the auxin-independent phenotype of crown gall tumor tissues.
Science 231, 616-618 (1986)

- 274 TIMKO M.P., KAUSCH A.P., CASTRESANA C., FASSLER J., HERRERA-ESTRELLA L., VAN DEN BROECK G., VAN MONTAGU M., SCHELL J. & CASHMORE A.R. - Light regulation of plant gene expression by an upstream enhancer-like element.
Nature 318, 579-582 (1985)
- 275 TORAKAWA K., HAYASHIDA N., OBOKATA J., SHINOZAKI K. & SUGIURA M.
- The 5' part of the gene for ribosomal protein S12 is located 30 kbp downstream from its 3' part in tobacco chloroplast genome.
Nucl. Acids Res. 14, 3143 (1986)
- 276 UCHIMIYA H. - Parameters influencing the liposome-mediated insertion of fluorescein diacetate into plant protoplasts.
Plant Physiol. 67, 629-632 (1981)
- 277 UCHIMIYA H. & HARADA H. - Transfer of liposome-sequestering plasmid DNA into Daucus carotta protoplasts.
Plant Physiol. 68, 1027-1030 (1981)
- 278 UCHIMIYA H. - Somatic hybridization between male sterile Nicotiana tabacum and N. glutinosa through protoplast fusion.
Theor. Appl. Genet. 61, 69-72 (1982)
- 279 VAN DEN BROECK G., TIMKO M.P., KAUSCH A.P., CASHMORE A.R., VAN MONTAGU M. & HERRERA-ESTRELLA L. - Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase.
Nature 313, 358-363 (1985)
- 280 VAN LAREBEKE N., ENGLER G., HOLSTERS M., VAN DEN ELSACKER S., ZAENEN I., SCHILPEROORT R.A. & SCHELL J. - Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability.
Nature 252, 169-170 (1974)
- 281 VAN LIJSEBETTENS M., INZE D., SCHELL J. & VAN MONTAGU M. - Transformed cell clones as a tool to study T-DNA integration mediated by Agrobacterium tumefaciens.
J. Mol. Biol. 188, 129-145 (1986)

- 282 VAN MONTAGU M. - Interview in :
Biofutur 29, 21-29 (1984)
- 283 VAN ONCKELEN H., RUDELSHEIM P., INZE D., FOLLIN A., MESSENS E.,
HOREMANS S., SCHELL J., VAN MONTAGU M. & DE GREEF J. - Tobacco
plants transformed with the Agrobacterium T-DNA gene 1 contain
high amounts of indole-3-acetamine.
FEBS Lett. 181, 373-376 (1985)
- 284 VAN VLOTEN-DOTING L., BOL J.F. & CORNELISSEN B. - Plant-virus-
based vectors for gene transfer will be of limited use
because of the high error frequency during viral RNA synthesis.
Plant Mol. Biol. 4, 323-326 (1985)
- 285 VELTEN J. & SCHELL J. - Selection-expression plasmid vectors for
use in genetic transformation of higher plants.
Nucl. Acids Res. 13, 6981-6998 (1985)
- 286 VOLOVITCH M., DRUGEON G. & YOT P. - Studies on simple-stranded
discontinuities of cauliflower mosaic virus genome.
Nucl. Acids Res. 5, 2913-2926 (1978)
- 287 VOLOVITCH M., MODJTAHEDI N., YOT P. & BRUN G. - RNA-dependant
DNA polymerase activity in cauliflower mosaic virus-infected
plant leaves.
EMBO J. 3, 309-314 (1984)
- 288 WALDRON C., MALCOLM S.K., MURPHY E.B. & ROBERTS J.L. - A method
for high-frequency DNA-mediated transformation of plant
protoplasts.
Plant Mol. Biol. Rep. 3, 169-173 (1985)
- 289 WATSON B., CURRIER T.C., GORDON M.P., CHILTON M.D. & NESTER E.W.
- Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens.
J. Bact. 123, 255-264 (1975)

- 290 WILLMITZER L., SANCHEZ- SERRANO J., BUSCHFELD E. & SCHELL J. -
DNA from Agrobacterium rhizogenes is transferred to and
expressed in axenic hairy root plant tissues.
Mol. Gen. Genet. 186, 16-22 (1982)
- 291 WILLMITZER L., DHAESE P., SCHREIER P.H., SCHMALENBACH W., VAN
MONTAGU M. & SCHELL J. - Size, location and polarity of T-DNA-
encoded transcripts in nopaline crown gall tumors; common
transcripts in octopine and nopaline tumors.
Cell 32, 1045-1056 (1983)
- 292 WOSTEMEYER A., OTTEN L.A.B.M. & SCHELL J. - Sexual transmission
of T-DNA in abnormal tobacco regenerants transformed by
octopine and nopaline strains of Agrobacterium tumefaciens.
Mol. Gen. Genet. 194, 500-507 (1984)
- 293 XIONG C., MULLER S., LEBEURIER G. & HIRTH L. - Identification by
immunoprecipitation of cauliflower mosaic virus in vivo
major translation product with a specific serum against
viroplasm proteins.
EMBO J. 1, 971-976 (1982)
- 294 XIONG C., LEBEURIER G. & HIRTH L. - Detection in vivo of a new
gene product (gene III) of cauliflower mosaic virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6608-6612 (1984)
- 295 YADAV N.S., VANDERLEYDEN J., BENNETT D.R., BARNES W.M. & CHILTON
M.D. - Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline
Ti plasmid.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6322-6326 (1982)
- 296 YAMADA K., SHINOZAKI K. & SUGIURA M. - DNA sequences of tobacco
chloroplast genes for tRNA^{Ser}(GGA), tRNA^{Thr}(UGU), tRNA^{Leu}(UAA),
tRNA^{Phe}(GAA) : the tRNA^{Leu} gene contains a 503 bp intron.
Plant Mol. Biol. 6, 193-199 (1986)
- 297 YAMAOKA N., FURUSAWA I. & YAMAMOTO M. - Infection of turnip
protoplasts with cauliflower mosaic virus DNA.
Virology 122, 503-505 (1982)

- 298 YANOFSKY M., LOWE B., MONTOYA A., RUBIN R., KRUL W., GORDON M.P.
& NESTER E.W. - Molecular and genetic analysis of factors
controlling host range in Agrobacterium tumefaciens.
Mol. Gen. Genet. 201, 237-246 (1985)
- 299 YANOFSKY M., MONTOYA A., KNAUF V., LOWE B., GORDON M. &
NESTER E. - Limited-host range plasmid of Agrobacterium
tumefaciens : Molecular and genetic analysis of transferred
DNA.
J. Bact. 163, 341-348 (1985)
- 300 ZAENEN I., VAN LAREBEKE N., TEUCHY H., VAN MONTAGU M. & SCHELL
J. - Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing
Agrobacterium strains.
J. Mol. Biol. 86, 109-127 (1974)
- 301 ZAMBRYSKI P., JOOS H., GENETELLO C., LEEMANS J., VAN MONTAGU M.
& SCHELL J. - Ti plasmid vector for the introduction of DNA
into plant cells without alteration of their normal regeneration
capacity.
EMBO J. 2, 2143-2150 (1983)
- 302 ZELLER A., AVIV D. & GALUN E. - Interspecific transfer of
cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts
of normal Nicotiana sylvestris and X-ray irradiated protoplasts
of male-sterile N. tabacum.
Z. Pflanzenphysiol. 90, 397-407 (1978)
- 303 ZURAWSKI G., BOTTOMLEY W. & WHITFIELD P.R. - Junctions of the
large single copy region and the inverted in Spinacia oleracea
and Nicotiana debneyi chloroplast DNA : Sequence of the genes
for tRNA^{His} and the ribosomal proteins S19 and L2.
Nucl. Acids Res. 12, 6547-6558 (1984)

table des matières

	pages
AVANT-PROPOS	2
ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION - BUT DU TRAVAIL	5
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. - LES MICRO-ORGANISMES VECTEURS DE GENES DANS LES PLANTES	9
A. - <u>Agrobacterium tumefaciens</u>	9
B. - Le virus de la mosaïque du chou-fleur	17
II. - LES PROTOPLASTES COMME OUTIL GENETIQUE	19
A. - Intérêts et limites de l'utilisation des protoplastes	19
B. - Isolement de mutants	20
C. - Les fusions de protoplastes	21
III. - LES LIPOSOMES POUR LA TRANSFECTION DES PROTOPLASTES	23
A. - Qu'est-ce qu'un liposome?	23
B. - Intérêt pratique des liposomes pour la transfection	24
C. - Les interactions liposomes-protoplastes	25
IV. - AUTRES METHODES DE TRANSFECTION DES PROTOPLASTES	27
V. - STRUCTURES ET REGULATIONS GENETIQUES DES PLANTES	29
A. - Le DNA chloroplastique	29
B. - La régulation de la transcription par la lumière	33
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	
I. - MATERIEL	36
A. - Les bactéries	36
B. - Les plasmides	36
C. - Les plantes	36
D. - Milieu de culture des bactéries	37
E. - Milieux de culture des protoplastes	37
F. - Obtention et culture des protoplastes	40

II. - PREPARATION DES LIPOSOMES ET INCUBATION AVEC LES PROTOPLASTES	41
A. - Préparation de liposomes contenant de la 6-carboxy-fluorescéine et ciblage sur les protoplastes	41
B. - Préparation des liposomes contenant le DNA	42
C. - Incubation des protoplastes avec les liposomes	43
III. - METHODES D'OBSERVATION CYTOLOGIQUE	44
A. - Cyto-autoradiographie	44
B. - Microscopie électronique	46
IV. - TECHNIQUES DE MANIPULATION DU DNA	48
A. - Extraction de plasmides	48
B. - Extraction de DNA bactérien	51
C. - Extraction du DNA de plante	52
D. - Marquage in vitro de plasmide	54
E. - Utilisation des enzymes pour le clonage moléculaire	55
F. - Transformation bactérienne	57
G. - Electrophorèse en gel d'agarose	57
H. - Electroélution	58
I. - Hybridation moléculaire DNA/DNA	59
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	
I. - OBTENTION ET CULTURE DES PROTOPLASTES DE TABAC	63
A. - Adaptation d'un procédé de purification des protoplastes	63
B. - Evolution des protoplastes en culture	71
II. - PREPARATION DES PLASMIDES, DES LIPOSOMES ET ESSAIS DE CIBLAGE	73
A. - Préparation des plasmides	73
B. - Préparation des liposomes	74
C. - Observation des liposomes	77
D. - Essais de ciblage des liposomes sur les protoplastes	77

III. - ETUDE DES FACTEURS INFLUENCANT LA LIAISON DES LIPOSOMES	
AUX PROTOPLASTES	84
A. - Effet de la concentration en liposomes sur la viabilité des protoplastes après incubation	85
B. - Effet de la température d'incubation	85
C. - Effet de la composition des liposomes de type MLV	88
D. - Influence du pH	88
E. - Effet du chlorure de calcium	88
F. - Effet du PEG	92
G. - Effet de la solution de dilution du PEG	92
H. - Choix du tampon d'incubation avec les liposomes de type REV	95
I. - Essais d'agglutination des protoplastes par différentes lectines	95
J. - Conclusion	96
IV. - OBSERVATIONS AUTORADIOGRAPHIQUES ET ETUDE ULTRASTRUCTURALE	97
A. - Cyto-autoradiographie	97
B. - Microscopie électronique à balayage	103
C. - Microscopie électronique en transmission	107
D. - Discussion	114
V. - CONSTRUCTION DE PLASMIDES CONTENANT UN FRAGMENT DE DNA DE TABAC	118
A. - Clonage d'un fragment de DNA de tabac	118
B. - Insertion du gène nos-neo dans la séquence de DNA de tabac	119
C. - Insertion d'une séquence de DNA de tabac dans le pLGV1103neo	128
VI. - ISOLEMENT DE CALS RESISTANTS A LA KANAMYCINE ET REGENERATION DE PLANTES	128
A. - Sélection des cals résistants	129
B. - Etude de la fréquence d'apparition des cals résistants	129

	pages
CONCLUSION	136
REFERENCES	139
TABLE DES MATIERES	177

RESUME

Des liposomes de type multilamellaire ont été utilisés pour mettre au point un protocole d'incubation assurant leur liaison optimale aux protoplastes. Des observations autoradiographiques montrent que les liposomes de ce type restent adsorbés sur la membrane cytoplasmique. Des observations au microscope électronique démontrent l'entrée de liposomes de type unilamellaire dans le cytoplasme des protoplastes. Les cassures de la membrane cytoplasmique observées au contact de liposomes tendent à prouver que leur pénétration par endocytose dans les protoplastes de mésophylle est difficile.

Un petit plasmide vecteur possédant un gène hybride conférant la résistance à la kanamycine aux cellules végétales a été encapsulé dans des liposomes unilamellaires. A partir des protoplastes incubés avec les liposomes, des cals se sont développés sur milieu contenant de la kanamycine à des concentrations toxiques pour les cellules non transformées. Les fréquences d'apparition des cals résistants à la kanamycine sont comprises entre $1,7 \cdot 10^{-5}$ et $1,1 \cdot 10^{-3}$.

Une séquence de DNA de tabac a été insérée dans le plasmide vecteur en vue de créer une zone d'homologie capable de promouvoir la recombinaison dans le génome de la plante. La présence de la séquence homologue dans le plasmide vecteur ne modifie pas la fréquence d'apparition des cals résistants à la kanamycine. Des plantes ont été régénérées à partir des cals résistants.

