

Caractérisation de gènes potentiellement impliqués dans le développement de trichomes glandulaires longs chez *Nicotiana tabacum* : création de lignées rapportrices et modulation de l'expression par RNA silencing ou surexpression

Réalisé par Vanderborcht Nicolas

Promoteur : Charles Hachez

Lecteurs : Marc Boutry

Xavier Draye

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de **Bioingénieur : chimie et bio-industries**

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu, le Professeur Charles Hachez, mon promoteur, pour son encadrement et le temps qu'il a consacré au bon déroulement de mon mémoire. Merci pour ses conseils et explications aussi bien théoriques que pratiques. Sans compter son aide précieuse pour la correction de mes présentations orales et de l'écriture de mon mémoire.

Un grand merci à Joseph Nader pour toute l'aide qu'il m'a apportée lors de la réalisation de la partie expérimentale de ce mémoire, ainsi que pour ses explications, ses conseils, sa patience et sa bonne humeur jours après jours au laboratoire.

Je remercie toute l'équipe trichomes, pour leur aide, leurs conseils et leur bonne humeur. Parmi ceux-ci, Maxime Vannieuwenhuyze et Nicola Gossart pour leurs différents conseils et encouragements pour la rédaction de mon mémoire.

Je remercie Aldana Ramirez et Thomas Bouvy de m'avoir généreusement fourni du cDNA de trichomes matures me permettant de procéder à des manipulations complémentaires de dernière minute.

Merci également au mémorant Julien Agneessens pour son soutien, ses encouragements et ses précieux conseils.

Enfin, merci à tous les membres de l'équipe FYMO pour leur aide et les activités organisées. Je souhaite aussi remercier mes lecteurs de consacrer du temps à la lecture de ce mémoire. Finalement, merci à ma famille et à mes amis de m'avoir soutenu et encouragé tout au long de mes études.

Table des matières

Remerciements.....	1
Table des matières	2
Tables des abréviations	5
1. Introduction	6
1.1. Caractérisation du modèle : <i>Nicotiana tabacum</i>	6
1.2. Rôle des trichomes	8
1.3. Développement de l'épiderme du système caulinaire de la plante	10
1.3.1. Mécanismes de développement des trichomes	11
1.3.2. Aspects cytologiques du développement des trichomes chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
1.3.3. Génétique moléculaire du développement des trichomes chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
1.3.4. Aspects cytologiques du développement des trichomes glandulaires chez <i>N. tabacum</i>	16
1.3.5. Génétique moléculaire du développement des trichomes.....	18
1.3.6. Génétique moléculaire du développement des trichomes glandulaires chez <i>N. tabacum</i>	18
2. Objectifs.....	21
3. Matériel et méthodes.....	22
3.1 Technique de biologie moléculaire et cellulaire	22
3.1.1 Extraction d'ADN génomique de plantules de tabac	22
3.1.2 Amplification par polymérase chain reaction (PCR) des séquences d'ADN d'intérêt	23
3.1.3. La méthode de silencing par artificial microRNA (amiRNA)	23
3.1.4 Purification sur minicolonne des produits PCR	24
3.1.5 Quantification au Nanodrop de la concentration d'ADN	24
3.1.6 Réaction de TOPO cloning (Invitrogen)	25
3.1.7 Insertion dans pGEM-T Easy (Promega)	25
3.1.8 La restriction.....	26
3.1.9 La restriction in silico	27
3.1.10 La déphosphorylation	27
3.1.11 La Ligation.....	28
3.1.12 Réaction LR.....	29
3.1.13 Le séquençage des constructions génétiques	30

3.2 Matériel et manipulations relatives aux plantes	30
3.2.1 L'espèce végétale.....	30
3.2.2 Stérilisation des graines.....	30
3.2.3 Les milieux de culture végétal	31
3.2.4 Transformation de plantes (Horsh et al. 1985).....	32
3.3 Méthode de révélation à l'aide de la coloration GUS.....	33
3.4 Microscopie confocale.....	33
4 Résultats.....	34
4.1 Génération de constructions génétiques permettant de créer une lignée transgénique de <i>N. tabacum</i> rapportrice de l'expression de <i>PDF1</i> et de <i>HEC2</i>	34
4.1.1 Amplification de la séquence promotrice de <i>PDF1</i> (PDF1pro) et de <i>HEC2</i> (HEC2pro).....	34
4.1.2 Clonage de PDF1pro et de HEC2pro dans le vecteur pGEM-T easy .	35
4.1.3 Clonage de HEC2pro et PDF1pro dans le vecteur pAUX3131 GUS-Vénus.....	37
4.1.4 Clonage de HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus dans le vecteur binaire pMODUL3408	38
4.1.5 Observation des deux lignées de <i>N. tabacum</i> transgénique HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus par microscopie confocal et par coloration GUS.....	41
4.2 Génération de constructions génétiques en vue de créer une lignée transgénique de <i>N. tabacum</i> surexprimant le gène <i>CNR13</i> et une autre surexprimant le gène <i>PDF1</i> à l'aide d'un promoteur inductible au β -estradiol.	41
4.2.1 Amplification de la séquence de <i>CNR13</i> nommée CNR13seq et de la séquence de <i>PDF1</i> nommée PDF1seq.	41
4.2.2 Clonage de CNR13seq et PDF1seq dans le vecteur pENTR/D-TOPO	42
4.2.3. Clonage de CNR13seq et PDF1seq dans le vecteur binaire pMDC7	44
4.3 Génération de constructions génétiques en vue de créer une lignée transgénique de <i>N. tabacum</i> surexprimant le gène <i>HEC2</i> à l'aide d'un promoteur inductible au β -estradiol.....	47
4.3.1 Amplification de la séquence de <i>HEC2</i> nommée HEC2seq	47
4.3.2 Clonage de HEC2seq dans le vecteur pENTR/D-TOPO.....	47
4.4 Constructions génétiques permettant d'altérer l'expression du gène <i>CNR13</i> par interférence ARN de façon inductible.....	47
4.4.1 Modélisation de l'amiRNA_CNR13 par amplification PCR.....	47
4.4.2 Clonage de amiRNA_CNR13 et amiRNA_CNR13_2 dans le vecteur pENTR/D-TOPO.....	48

4.4.3. Clonage de amiRNA_CNR13 et amiRNA_CNR13_2 dans le vecteur binaire pMDC7	49
4.5 Amplification PCR menée sur base de cDNA de trichomes matures pour les séquences des gènes <i>PDF1</i> , <i>CNR13</i> et <i>HEC2</i>	51
5 Discussion	52
5.1 Plantes transgéniques de <i>Nicotiana tabacum</i> rapportrices de l'expression des gènes <i>HEC2</i> et <i>PDF1</i> à l'aide d'un tag GUS-Vénus.	52
5.2 Constructions génétiques générées comportant un promoteur inductible au β -estradiol permettant de surexprimer les gènes <i>PDF1</i> , <i>CNR13</i> , <i>HEC2</i> et permettant d'induire le silencing d'un gène à l'aide d'un amiRNA pour le gène <i>CNR13</i>	53
6. Perspectives	54
6.1 Intérêt des lignées rapportrices porteuses d'un tag GUS-Vénus	54
6.2 intérêt de la formation de lignées de plantes de <i>N. tabacum</i> transgéniques munie d'un promoteur inductible au β -estradiol permettant d'actionner la surexpression ou l'inhibition de l'expression de gènes clés dans le développement des trichomes.	55
7. Conclusion.....	57
Bibliographie	58
Annexe	61
Annexe n°1 : Tableau des amorces pour les différentes Polymérase Chain Réaction.	61
Annexe n°2 : Cartes des différents vecteurs	65
Annexe n°3 : Les souches bactériennes et milieu de culture bactérien	69
Annexe n°4 : préparation de cellules électrocompétentes et thermocompétentes	70
Annexe n°5 : Réalisation d'une électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	70
Annexe n°6 : Les différentes techniques de transformation.....	72
Annexe n°7 : La minipréparation d'ADN.....	73

Tables des abréviations

35S = Promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur

Am = *Anthriscum majus*

amiRNA = artificial micro RNA

ApE = A plasmid Editor, software

BAP = 6-benzylaminopurine

cDNA = ADN complémentaire

CNR13 = Cell Number Regulator 13

CPC = Caprice

CTAB = bromure d'hexadécyltriméthylammonium

DMAPP = diméthylallyl-pyrophosphate

DMSO = Diméthylsulfoxyde

dsRNA = double stranded RNA

EGL3 = Enhancer de Glabra 3

ETC1/2/3 = Enhancer OF TRY And CPC 1/2/3

GFP, YFP, RFP= Green, Yellow, Red fluorescent protein

GL1/2/3 = Glabra1/2/3

IAA = Indol acetic acid

IPP = isopentényl-pyrophosphate

LB = Lysogenic Broth

MS = Murashige et Skoog

PCR = Polymerase Chain Reaction

PDF1 = Protodermal Factor 1

rpm = rotation par minute

ssRNA = single stranded RNA

TRY = Tryptichon tracrRNA = trans-activating RNA

TTG1 = Transparent Testa Glabra 1

Wo = Woolly

WT = wild-type

1. Introduction

1.1. Caractérisation du modèle : *Nicotiana tabacum*

Les plantes du genre *Nicotiana* sont réparties en 76 espèces naturelles appartenant à la famille des solanacées. Quasi toutes ces espèces sont issues d'Amérique et d'Australie sauf une originaire d'Afrique (en Namibie plus précisément) (Knapp et al., 2004).

Nicotiana tabacum est quant à elle une plante dicotylédone annuelle pubescente glanduleuse allotétraploïde issue du croisement des espèces *Nicotiana sylvestris* et *Nicotiana tomentosiformis* qui s'est effectué il y a plus de 200 000 ans (Sierro et al., 2014).

L'intérêt premier de l'homme pour *Nicotiana tabacum* remonte à plusieurs milliers d'années pour son tabac exploité par les autochtones d'Amérique.

A cette époque, la consommation de tabac se faisait dans le cadre de cérémonies religieuses et spirituelles (tel que le fameux calumet de la paix dont la mention subsiste dans la culture populaire) plutôt qu'à des fins récréatives (Haustein et Groneberg, 2010).

L'exploitation industrielle de cette plante pour la production de tabac (essentiellement sous forme de cigares et cigarettes) représente à l'heure actuelle une production d'environ 7,5 millions de tonnes par an (Von Eichborn et Abshagen, 2015).

Outre son utilisation par l'industrie, *Nicotiana tabacum* de par sa biomasse importante, un cycle de génération relativement court (2,5 mois), la production de nombreuses graines, un métabolisme secondaire très développé occupe une place de choix comme modèle en biologie végétale. Ces caractéristiques en font également un bon candidat dans la production de protéines recombinantes de par son aptitude à être transformable de manière constitutive ou transitoire par *Agrobacterium tumefaciens*.








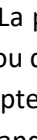
En 2014, la séquence de son génome constitué de 4,5Gb a été déterminée (Sierro et al., 2014).

Sur la surface aérienne de *Nicotiana tabacum*, des excroissances uni ou pluricellulaire dérivant de son protoderme peuvent être observées, ces dernières se nomment trichomes.

Les trichomes ont principalement un rôle de protection de la plante contre les prédateurs (Levin, 1973) et diverses conditions environnementales. Ces rôles sont endossés par différents types de trichomes avec divers attributs. La catégorisation des trichomes est vaste, ces derniers peuvent être glandulaires, non-glandulaires, capitates, peltates, longs, courts, unicellulaires, pluricellulaires, etc. En soi, il existe plus de 300 critères permettant leur différenciation (Wagner, 1991).

La tomate (*Solanum lycopersicum*) par exemple, présente huit sortes de trichomes classées selon la présence ou non d'au moins une cellule glandulaire et d'autres traits morphologiques (**Tableau 1**) montrant bien la diversité possible de ces structures sur une même plante (Glas et al., 2012).

Tableau 1 : Tableau regroupant les différents types de trichomes présents sur l'épiderme caulinaire de la plante de tomate (Glas et al., 2012)

Type	Description
I 	Thin glandular trichomes consisting of 6–10 cells and 2–3 mm long. Globular and multicellular base with a small and round glandular cell in the trichome tip.
II 	Similar to trichome I but non-glandular and shorter (0.2–1.0 mm). Globular and multicellular base.
III 	Thin non-glandular trichome consisting of 4–8 cells and 0.4–1.0 mm long with a unicellular and flat base. External walls lack intercellular sections.
IV 	Similar to trichome I but shorter (0.2–0.4 mm) and with a glandular cell in the tip. Trichome base is unicellular and flat.
V 	Very similar to type IV with respect to height and thickness but non-glandular.
VI 	Thick and short glandular trichomes composed of two stalk cells and a head made up of 4 secretory cells.
VII 	Very small glandular trichomes (0.05 mm) with a head consisting of 4–8 cells.
VIII 	Non-glandular trichome composed of one basal and thick cell with a leaning cell in the tip.

Le premier critère selon lequel les trichomes sont départagés est le fait qu'ils soient glandulaires ou non. Les trichomes glandulaires peuvent être trouvés sur environ 30 % des plantes vasculaires. La particularité d'un trichome glandulaire est la présence de cellules qui ont la capacité de sécréter ou de stocker de grandes quantités de métabolites secondaires permettant à la plante de mieux s'adapter à son environnement. Plusieurs types de métabolites sont identifiés dans les trichomes glandulaires tels que les phénylpropanoïdes, les flavonoïdes, les méthyl cétones, les sucres acylés, les composés phénoliques, les alcaloïdes, les esters de sucres et les terpènes. Mais la classe de métabolites la plus abondante dans les trichomes glandulaires sont les terpénoïdes qui présentent d'importantes propriétés quant à la protection de la plante contre les herbivores. (Huchelmann et al., 2017).

Il est intéressant de citer que le terme "Trichomes" au niveau mondial est de plus en plus utilisé dans le moteur de recherche internet : "Google" montrant bien l'intérêt grandissant pour ces petits poils de plante (**Figure 1**).

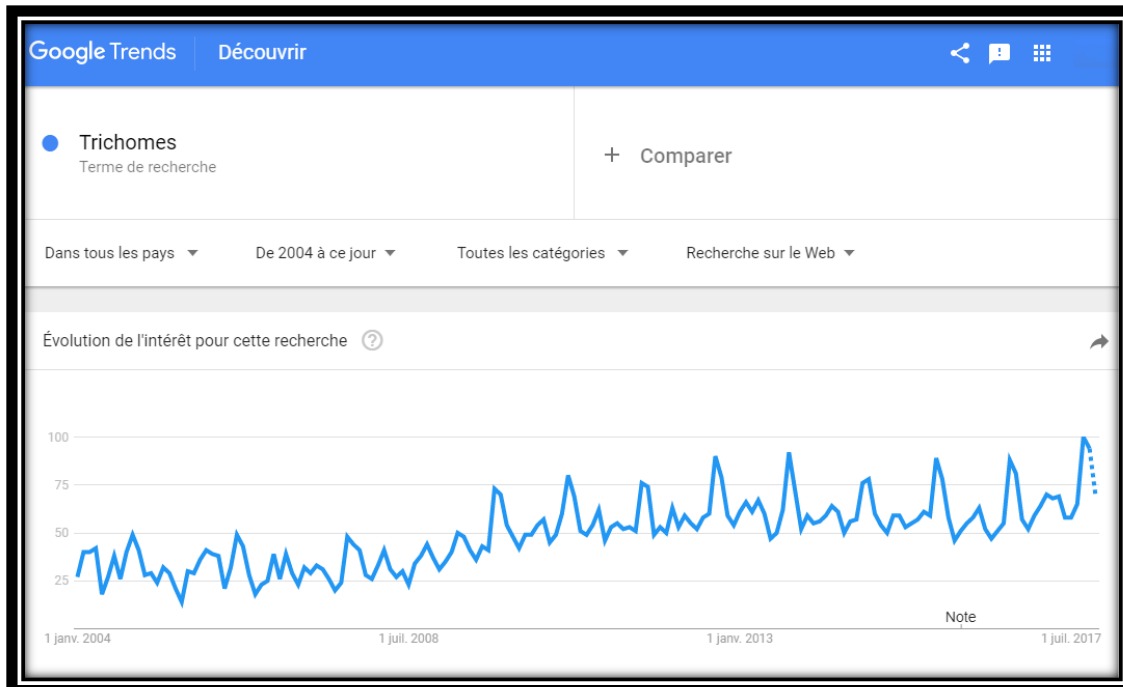


Figure 1 : Graphe illustrant l'intérêt pour la recherche du mot : "Trichomes" sur internet via Google. L'intérêt va de 0 à 100 avec 100 la valeur correspondant au plus grand nombre de recherche menée pour ce terme de recherche à un mois donné dans le temps entre le premier janvier 2004 et novembre 2017 (<https://trends.google.fr/trends/explore?date=all&q=Trichomes>).

1.2. Rôle des trichomes

Les trichomes dont la morphologie et le métabolisme sont fort diversifiés d'une espèce à l'autre endossent de nombreux rôles pour la plantes.

Ils peuvent intervenir dans la pollinisation, la protection contre les herbivores, la compétition avec d'autres plantes (allélopathie) ou encore dans la protection vis-à-vis des stress abiotiques tels que les radiations UV, le froid, le vent ou la sécheresse (**Tableau 2**) (Wagner et al.,2004 ; Werker, 2000).

Tableau 2 : Tableau réunissant les fonctions apparentes de différents trichomes (glandulaires ou non) (Wagner et al., 2004)

Apparent functions	Trichome type*	Reference
Reduced insect movement	ST and GST	Levin, 1973; Johnson, 1975; Kessler, 2002; Kennedy, 2003
Temperature regulation	ST and GST	Johnson, 1975; Dell and McComb, 1978; Ehleringer, 1984
Increased light reflectance (including UV)	ST and GST	Ehleringer, 1984
Decreased water loss through reflection	ST and GST	Ehleringer, 1984
Reduced mechanical abrasion	ST and GST	Uphof, 1962; Johnson, 1975
Protection of phylloplane organisms	ST and GST	Beattie and Lindow, 1999
Reduced leaf wetness	ST and GST	Brewer and Smith, 1997
Reduced photosynthesis thru reflectance	ST and GST	Ehleringer, 1984
Seed dispersal and establishment	ST and GST	Uphof, 1962; Werker, 2000
Epidermal Ca ⁺⁺ homeostasis	ST and GST	DeSilva <i>et al.</i> , 2001
Pollen collection and dispersal	ST and GST	Uphof, 1962; Werker, 2000
Provide insect and herbivore deterrence	GST	Johnson, 1975; Kelsey <i>et al.</i> , 1984; Wollenweber, 1984; Bennett and Wallsgrove, 1994; Berenbaum, 1995
Insect immobilization	GST	Kennedy, 2003
Fungal and bacterial toxicity/nutrition	GST	Johnson, 1975; Behnke, 1984
Pollinator attraction	GST	Werker, 2000
Ion and pollutant metal secretion	GST	Salt <i>et al.</i> , 1995 Choi <i>et al.</i> , 2001; Kupper <i>et al.</i> , 2000
Water retention and decreased desiccation in seeds	GST	Werker, 2000
Allelopathy	GST	Macias <i>et al.</i> , 1999; Werker, 2000
Assist in climbing, and seed establishment	ST	Uphof, 1962; Werker, 2000
Absorb water and nutrients	ST	Uphof, 1962; Sakai <i>et al.</i> , 1980; Werker, 2000
Guide pollinators	ST	Johnson, 1975
Water and ion secretion	HT	Johnson, 1975; Aloni <i>et al.</i> , 2003

* ST, simple trichomes; GST, glandular secreting trichomes; HT, hydathode trichomes.

Plus particulièrement, les trichomes glandulaires qui ont la capacité de synthétiser divers produits dans leurs glandes jouent un rôle clé dans l'adaptation des plantes qui en possèdent.

On peut retrouver parmi les trichomes glandulaires des trichomes avec un système de stockage sous cuticulaire ou un système de sécrétion immédiate permettant d'affiner l'adaptation de la plante à son environnement.

Pour illustrer le stockage sous cuticulaire parlons du cas de l'ortie dont les trichomes stockent de l'acide formique dans une cellule sous cuticulaire à l'extrémité du trichome qui lors d'une altercation physique avec un prédateur, cette cellule se casse en biseau ressemblant à une aiguille de seringue. Un simple contact avec l'aiguille formée provoque le déversement de l'acide formique permettant d'éloigner l'assaillant.

Concernant le système de sécrétion immédiate, parlons du cas de la Droséra, plante insectivore dont les trichomes sécrètent à leurs surface un mucilage constitué de polysaccharides et d'enzymes protéolytiques permettant ensemble d'attirer, piéger et digérer la proie. L'intensité de cette sécrétion continue dépend du niveau de carence alimentaire de la plante qui en cas de jeune prolongé, sécrète plus.

D'un certain point de vue, ces trichomes peuvent être relayés à la plante comme l'ensemble d'un complexe industriel métabolisant des métabolites d'intérêts pour cette dernière (Huchelmann et al.,2017).

Les grandes classes de métabolites que l'on y retrouve sont les terpénoïdes, les méthylcétones, les alcaloïdes, les composés phénoliques et les sucres acylés. Les terpénoïdes présentent d'importantes propriétés en termes de défenses et d'interactions avec les herbivores permettant de protéger la plante. Les méthylcétones et les alcaloïdes sont plutôt impliqués dans la défense des plantes contre les insectes nuisibles à cette dernière. Les composés phénoliques offrent une défense biochimique contre les microbes et les champignons. Les sucres acylés eux interviennent dans la protection de la plante contre les herbivores en rendant les feuilles collantes qui piègent les insectes. Les sucres acylés présentent également une protection de la plante contre les champignons pathogènes.

Pour illustrer, prenons pour exemple, la plante de tabac *Nicotiana tabacum* dont l'exsudat des trichomes glanduleux à la surface d'une feuille présente jusqu'à 17% de la biomasse en poids sec (Wagner et al., 2004).

Les trichomes glandulaires de cette plante sont d'un intérêt tout particulier au vu de son potentiel pour l'ingénierie métabolique. En effet, les trichomes glandulaires de tabac synthétisent un nombre important de précurseurs naturels (IPP/DMAPP) essentiels à la synthèse de métabolites spécialisés (Huchelmann et al.,2017). Parmi ces métabolites, les terpénoïdes représentent la classe la plus large et structurellement la plus diversifiée de métabolites et la plante de tabac est apte à en produire une large quantité (Glas et al., 2012, Huchelmann et al.,2017). Cette classe de métabolites ainsi que ses dérivés et précurseurs présentent plusieurs intérêts au niveau de l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire (additif alimentaire, pesticide naturel) (Schillmiller et al., 2008). Par exemple, il a été essayé de produire par ingénierie métabolique via les trichomes de tabac de l'artémisinine (composé antipaludique) dont la conception naturelle se fait au travers des mêmes précurseurs que pour les terpénoïdes (Laterre et Boutry, 2015).

Un autre exemple est la production de taxadiène dans les trichomes de tabac par ingénierie métabolique qui est le précurseur du paclitaxel, un diterpène potentiellement anticancérigène (Huchelmann et al.,2017).

1.3. Développement de l'épiderme du système caulinaire de la plante

Au stade embryonnaire de la plante, celle-ci est principalement constituée de cellules méristématiques (cellules possédant des fonctions analogues à celles des cellules souches chez les animaux) formant les méristèmes apicaux (tissus embryonnaires de la plante).

Plus particulièrement, le méristème apical de la tige, « shoot apical meristem » (SAM) en anglais est responsable du développement du système caulinaire de la plante. Ce dernier se trouve à l'apex caulinaire de la plante et mesure entre 0,1 et 1 mm de diamètre

Le SAM est histogène et organogène c'est-à-dire qu'il est responsable de la production des tissus pour la croissance primaire de la tige et qu'il produit aussi des organes latéraux, tiges et feuilles. Le SAM comprend deux zones : le corpus et la tunica (**Figure 2**).

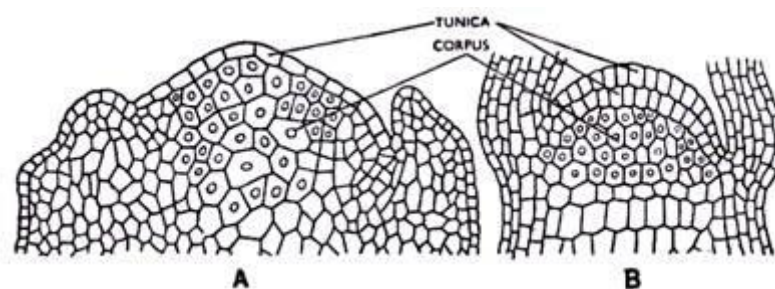


Figure 2 : Représentation schématique d'une coupe longitudinale d'une plante montrant le shoot apical meristem (SAM) avec ses deux zones : la tunica et le corpus. (A) Cas d'une tunica avec une seule assise cellulaire. (B) Cas d'une tunica avec deux assises cellulaires (figure adaptée du site : « <http://www.biologydiscussion.com> »).

Le corpus est la partie la plus interne du SAM et il s'y passe de nombreuses cytokinèses selon différents plans augmentant le volume de l'apex. Au centre du corpus se situe la zone des cellules-mères, aussi appelée méristème d'attente, où les divisions sont moins fréquentes. Cette zone sera à l'origine des structures florales.

La tunica est constituée des assises cellulaires les plus externes, où les cytokinèses sont anticlines et permettent l'augmentation de la surface de l'apex. L'assise cellulaire la plus externe donnera le protoderme qui à son tour donnera l'épiderme.

L'épiderme des plantes supérieures est un tissu multifonctionnel impliqué dans la protection de la plante face aux pathogènes, aux prédateurs et aux facteurs environnementaux (vent, pluie, ...). Il permet aussi de limiter les pertes d'eaux, d'attirer les pollinisateurs et facilite les échanges gazeux avec l'environnement extérieur.

Les cellules de l'épiderme peuvent se différencier en poils absorbants au niveau du système racinaire mais aussi en cellules de pavement, en trichomes et en stomates au niveau du système caulinaire (Serna, 2004).

Chez *Arabidopsis thaliana*, ces structures sont générées par des gènes parfois identiques ou différents. Par exemple, ces gènes se présentent au niveau du développement des trichomes comme des régulateurs positifs mais agissent au niveau du développement des cellules de pavement comme des régulateurs négatifs du développement de ces dernières (Glover, 2000).

De ce fait, la formation des trichomes, des stomates et des poils racinaires chez *Arabidopsis* proviendrait de l'action d'un pool de gènes homologues (Serna, 2004).

1.3.1. Mécanismes de développement des trichomes

Les astéridées et les rosidées sont les deux clades les plus importants des dicotylédones vraies. Elles peuvent être respectivement représentées en biologie moléculaire par les organismes modèles *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana ne possède que des trichomes unicellulaires non glandulaires alors que *Nicotiana tabacum* possède des trichomes unicellulaires ou pluricellulaires glandulaires ou non glandulaires.

Actuellement, le développement des trichomes chez *A. thaliana* a été traité au travers de nombreuses études en génétique moléculaire contrairement à *N. tabacum* où relativement peu d'informations sur les trichomes glandulaire sont disponibles. L'analyse d'un ensemble de recherches menées par Serna & Martin (2006) semble indiquer que les gènes impliqués dans le développement de trichomes unicellulaire seraient propres aux rosidées alors que les gènes liés au développement de trichomes pluricellulaire seraient propres aux Astéridées (Serna & martin 2006).

1.3.2. Aspects cytologiques du développement des trichomes chez *Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis*, la production de trichomes a lieu sur presque toutes les structures caulinaires à l'exception de l'hypocotyle et des cotylédons (Schellmann & Hülskamp, 2005).

Les trichomes d'*Arabidopsis thaliana* se développent dans les zones de l'épiderme foliaire où les divisions cellulaires sont en pleine effervescence. L'initiation du développement des trichomes n'est pas simultanée mais progressive selon le développement de la jeune feuille (Hülskamp et al., 1998). Ceux-ci commencent à se développer à l'extrémité des premières jeunes feuilles sur leur face adaxiale lorsque celles-ci atteignent une taille d'au moins 100 μm de largeur et possèdent une centaine de cellules (Larkin et al, 1996).

A ce stade du développement de la feuille, les trichomes ne sont séparés que par 3 à 4 cellules épidermiques qui continuent à se diviser 3 à 4 fois, marquant un écart plus grand entre les trichomes en maturation (**Figure 3**) (Hülskamp et al., 1994, 1998).

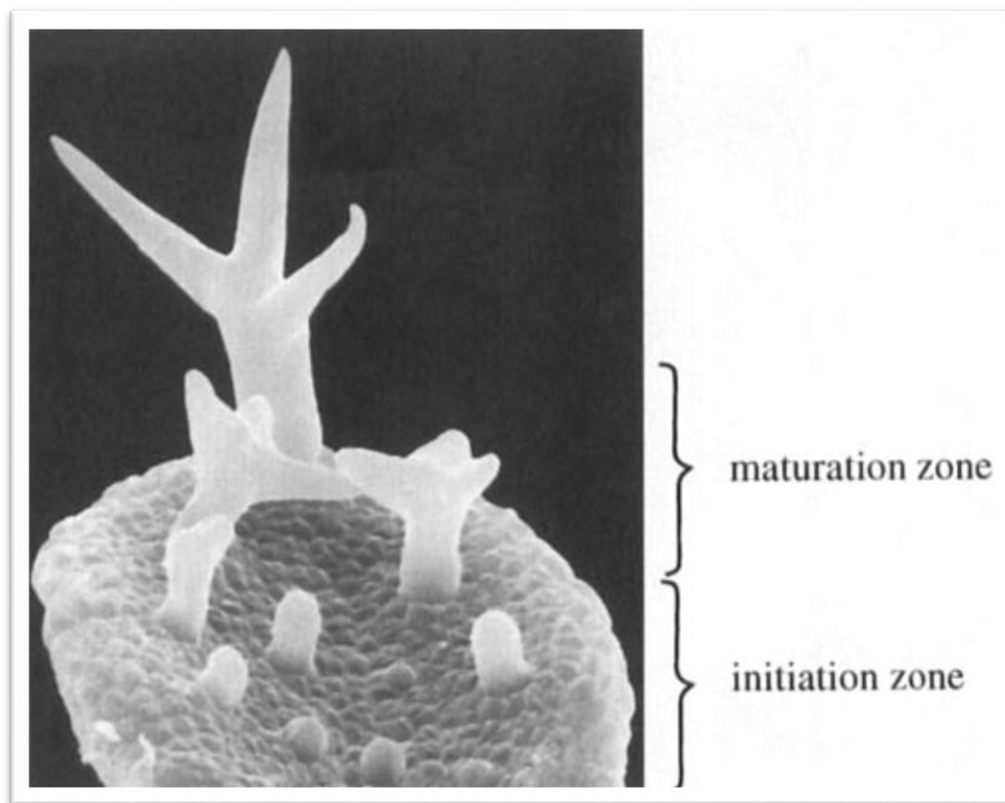


Figure 3 : Photo de trichomes d'*Arabidopsis thaliana* en développement sur une jeune feuille prise à l'aide d'un microscope électronique (Hülskamp et al., 1998).

L'organisation de ces trichomes sur la feuille montre une tendance à être plutôt structurée qu'aléatoire (Larkin et al, 1996).

Les trichomes apparaissent sur la face abaxiale des feuilles en plus de l'adaxiale seulement après que la première rosette foliaire ait développé 4 à 5 feuilles.

(Marks, 1997).

Au niveau cellulaire, le trichome se différencie à partir d'une cellule du protoderme qui subit une augmentation de sa taille et du volume de son noyau. Cette augmentation de taille se poursuit perpendiculairement au plan de la feuille jusqu'au développement de branchement sur le trichome en formation (Hülkamp et al., 1994).

Au sein de la cellule de trichome en différenciation se passe une réaction d'endoréduplication (réaction dupliquant des chromosomes sans cytokinèse) causant l'augmentation du contenu en ADN passant de 2N à 4N puis 8N jusqu'à atteindre 16N (**Figure 4**) (Hülkamp et al., 1994).

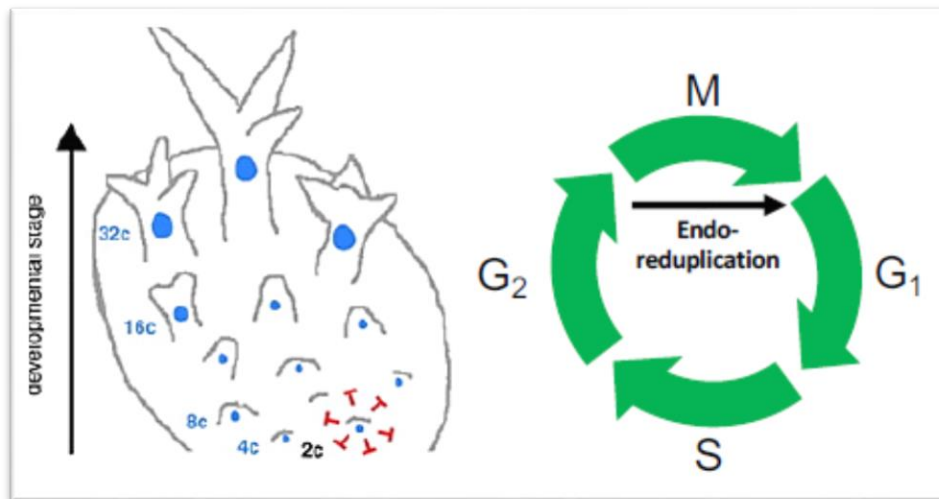


Figure 4 : Image de gauche, illustration de trichomes se développant sur une feuille augmentant leur contenu en ADN de 2N à 16N par l'endoréduplication dont l'illustration de cette réaction d'endoréduplication dans le cycle mitotique est représentée sur l'image de droite (image provenant du cours de physiologie cellulaire, Charles Hachez, 2016)

A terme, le développement du trichome s'achève lorsqu'une taille d'environ 200 à 300 µm et un diamètre d'environ 50 µm sont atteints (Marks, 1997).

1.3.3. Génétique moléculaire du développement des trichomes chez *Arabidopsis thaliana*

A l'échelle moléculaire, le développement des trichomes d'*Arabidopsis* est géré par au moins 30 gènes (Schellmann and Hülkamp, 2005). On y retrouve différents régulateurs positifs et négatifs responsables de l'initiation et du développement des trichomes qui ont été mis en évidence. Dans les régulateurs positifs majeurs, on retrouve : les facteurs de transcription de type basic helix-loop-helix (bHLH) *GLABRA3* (*GL3*) et l'ENHANCER de *GLABRA3* (*EGL3*), les facteurs de transcription Myb de type R2R3 *GLABRA1* (*GL1*) et MYB23, mais aussi la protéine à domaines WD40 répétés *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*) et la protéine à homéodomaine *GLABRA2* (*GL2*).

Pour les régulateurs négatifs, on retrouve : les facteurs de transcription MYB de type R3 *CAPRICE* (*CPC*), *TRYPTICHON* (*TRY*), l'ENHANCER OF *TRY* AND *CPC1* (*ETC1*), l'ENHANCER OF *TRY* AND *CPC2* (*ETC2*) et l'ENHANCER OF *TRY* AND *CPC3* (*ETC3*) (Tominaga-Wada et al., 2011, Pesch et Hülkamp, 2009, Zhao et al., 2008, Hülkamp et al., 1994).

L'ensemble de ces régulateurs sont essentiels quant au bon déroulement du développement des trichomes afin que ceux-ci atteignent une taille mature et se forme avec un espacement cellulaire régulier.

Des mutations appliquées à ces différents régulateurs ont permis de mettre en évidence l'impact de ces derniers dans l'initiation et le développement des trichomes (**Figure 5**) (Tominaga-Wada et al., 2011, Hülskamp et al., 1994).

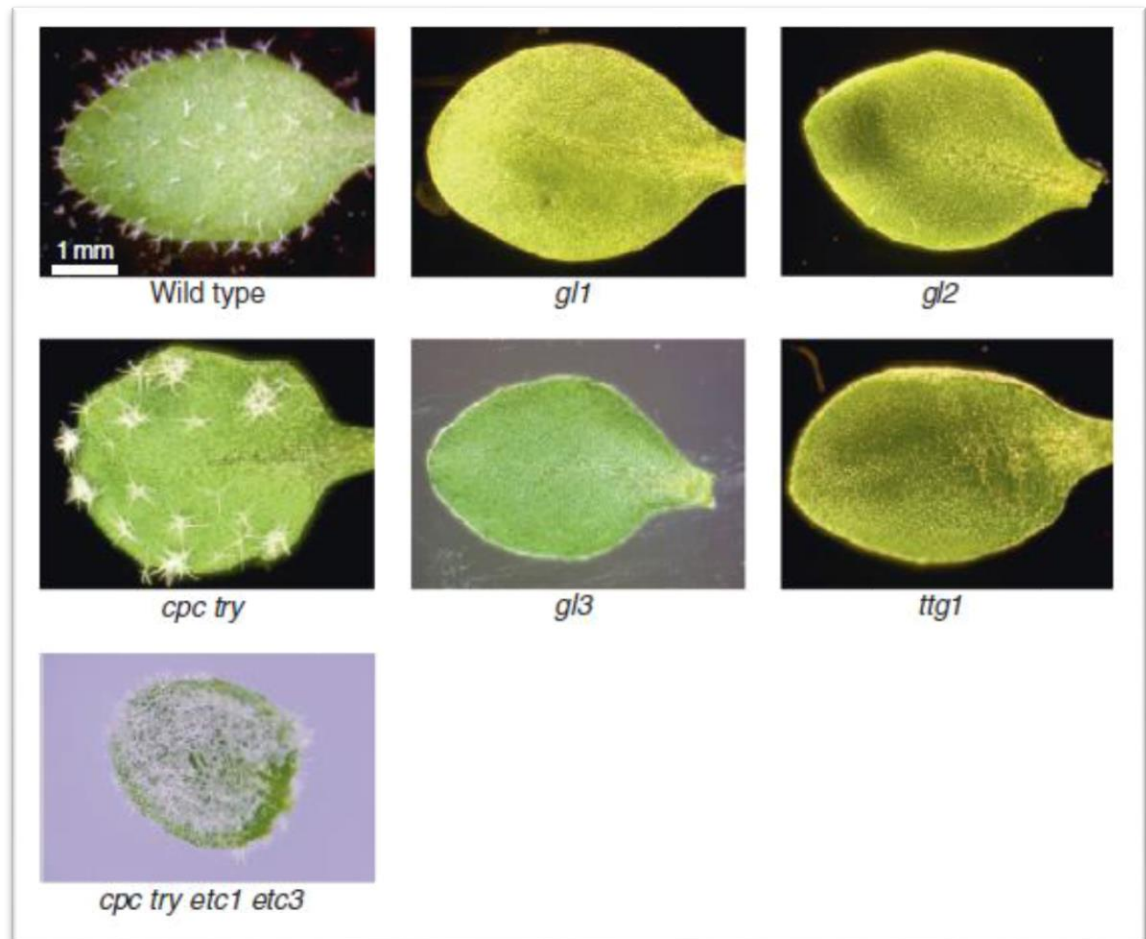


Figure 5 : Comparaison de différents phénotypes de feuilles mutantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 2 semaines avec une feuille wild type (sans mutation). Pour les mutants *gl1*, *gl2*, *gl3* et *ttg1* aucun trichome n'est observable. Chez le double mutant *cpc try*, on observe que la face adaxiale des feuilles du quadruple mutant *cpc try etc1 etc3* est quasi totalement recouverte de trichomes (Tominaga-Wada et al., 2011).

Malgré ces mutations, on remarque que la plante arrive à survivre démontrant bien le rôle non-essentiel des trichomes chez *Arabidopsis thaliana*. On y observe clairement qu'une mutation appliquée à *GL1*, *GL2*, *GL3* ou à *TTG1* qui sont annoncés comme régulateurs positifs du développement des trichomes mène à un phénotype dépourvu de trichomes sur les feuilles de plantes d'*Arabidopsis thaliana* mutée.

Par contre la combinaison d'une mutation ciblant *CPC* et *TRY* qui sont des régulateurs négatifs mène à l'apparition d'agglomérats de trichomes montrant leur importance dans l'organisation et la production des trichomes sur la feuille. Cette démonstration est d'autant plus flagrante pour le quadruple mutant *cpc*, *try*, *etc1* et *etc3* dont la feuille est quasi totalement recouverte de trichomes (Tominaga-Wada et al., 2011).

L'absence de trichomes sur les plantes mutées *gl1*, *gl3* et *ttg1* s'explique par le fait que ces trois régulateurs positifs forment un complexe impliqué dans le contrôle de l'expression de *GL2* permettant aux cellules du protoderme caulinaire de se différencier en trichomes (Zhao et al., 2008). Ce complexe tertiaire, contrôle également l'expression des régulateurs négatifs *TRY*, *CPC* et *ETC1*. L'expression de ces régulateurs négatifs produit les protéines TRY, CPC et ETC1 qui vont traverser la cellule de trichome en devenir vers les cellules avoisinantes afin d'empêcher ces dernières de se différencier en trichomes (**Figure 6**). Ces protéines réalisent cela en entrant en compétition avec GL1 pour la liaison à GL3/EGL3-TTG1 ne permettant pas la formation du complexe tertiaire favorable à l'expression de *GL2* dans les cellules voisines à un trichome mature ou en formation (Ishida et al., 2008).

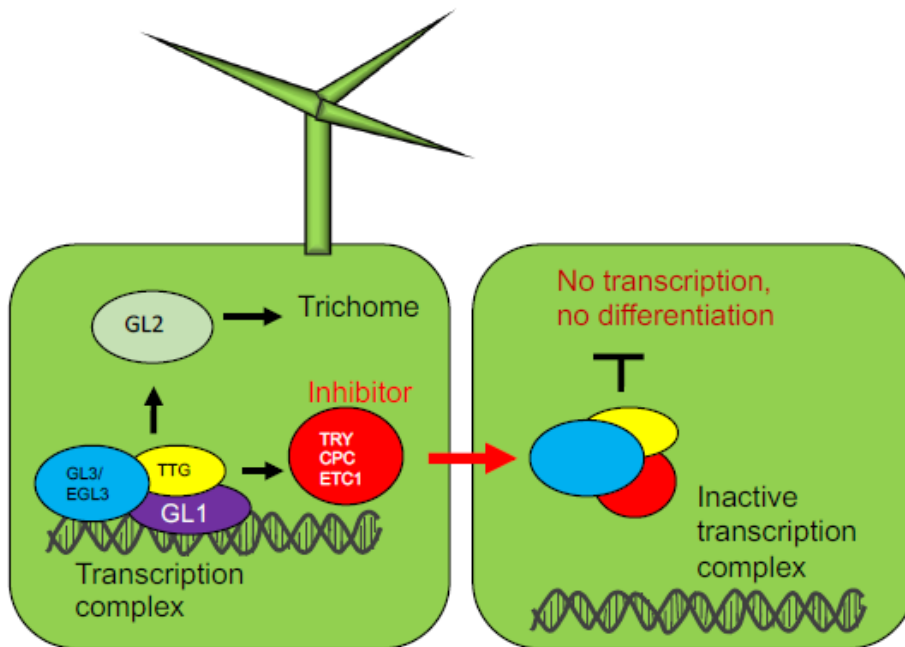


Figure 6 : Modèle d'initiation des trichomes d'*Arabidopsis thaliana* se basant sur un système activateur-inhibition. Le complexe protéique GL3/EGL3, TTG et GL1 contrôle l'expression du gène *GL2* qui permet la différenciation de la cellule du protoderme en en cellule de trichome. Ce même complexe contrôle également l'expression de CPC, TRY et ETC1 des régulateurs négatifs de l'initiation des trichomes permettant d'empêcher les cellules voisines de se différencier en trichomes (image provenant du cours de physiologie cellulaire, Charles Hachez, 2017).

GL2 n'étant pas exprimé dans ces cellules, ces dernières ne se différencient pas en trichomes. De ce fait deux cellules de trichomes ne sont jamais contiguës sur la plante sauvage d'*Arabidopsis thaliana*. Par contre, un autre modèle d'initiation et de différenciation des trichomes a été proposé (**Figure 7**) (Pesch and Hülskamp, 2009). Contrairement au premier modèle présenté comme un modèle activateur-inhibiteur (**Figure 6**), le second est une modèle activateur-déplétion (**Figure 7**).

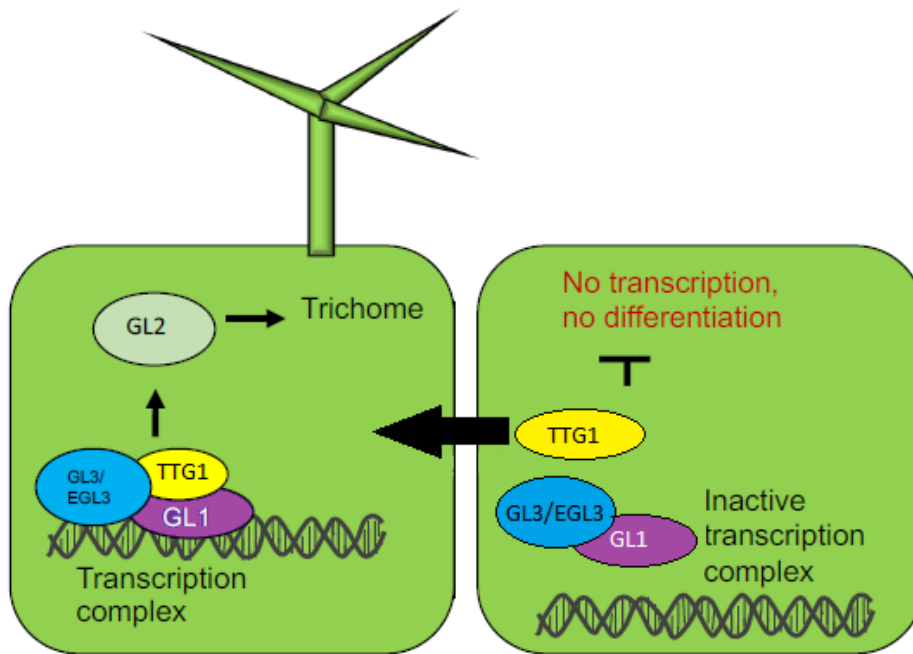


Figure 7 : Modèle d'initiation des trichomes d'*Arabidopsis thaliana* se basant sur un système d'activation-déplétion. Ce dernier est basé sur le déplacement de la protéine TTG1 qui s'oriente de la cellule qui ne se différencie pas en trichome vers la cellule qui va se différencier en trichome. De ce fait, la protéine TTG1 va alors s'associer aux protéines GL1 et GL3 formant le complexe activant la transcription de GL2 provoquant la différenciation de la cellule en trichome (Pesch and Hülskamp, 2009) (image adaptée du cours de physiologie végétale, Charles Hachez, 2017).

Ce dernier est basé sur le déplacement de la protéine TTG1 qui s'oriente de la cellule qui ne se différencie pas en trichome vers la cellule qui va se différencier en trichome.

De ce fait, la protéine TTG1 va alors s'associer aux protéines GL1 et GL3 formant le complexe tertiaire activant la transcription de GL2 provoquant la différenciation de la cellule en trichome (Pesch and Hülskamp, 2009).

1.3.4. Aspects cytologiques du développement des trichomes glandulaires chez *N. tabacum*

Nicotiana tabacum contrairement à *Arabidopsis thaliana* présente des trichomes multicellulaires.

Deux types principaux de trichomes glandulaires sont présents : les peltates et les capitates. Ces derniers diffèrent par la taille de leur tête et leur longueur. Les trichomes capitates sont plus longs avec une tête relativement plus petite possédant une ou plusieurs cellules glandulaires et les peltates sont plus courts avec une tête assez large possédant plusieurs cellules glandulaires (Glas et al., 2012).

Actuellement, la compréhension détaillée de l'initiation et du développement des trichomes glandulaires est encore très parcellaire. La cellule épidermique destinée à se différencier en trichome commence par gagner en volume puis se divise perpendiculairement à la surface épidermique au travers de divisions cellulaires jusqu'à former un trichome glandulaire mature (**Figure 8**) (Huchelmann et al., 2017).

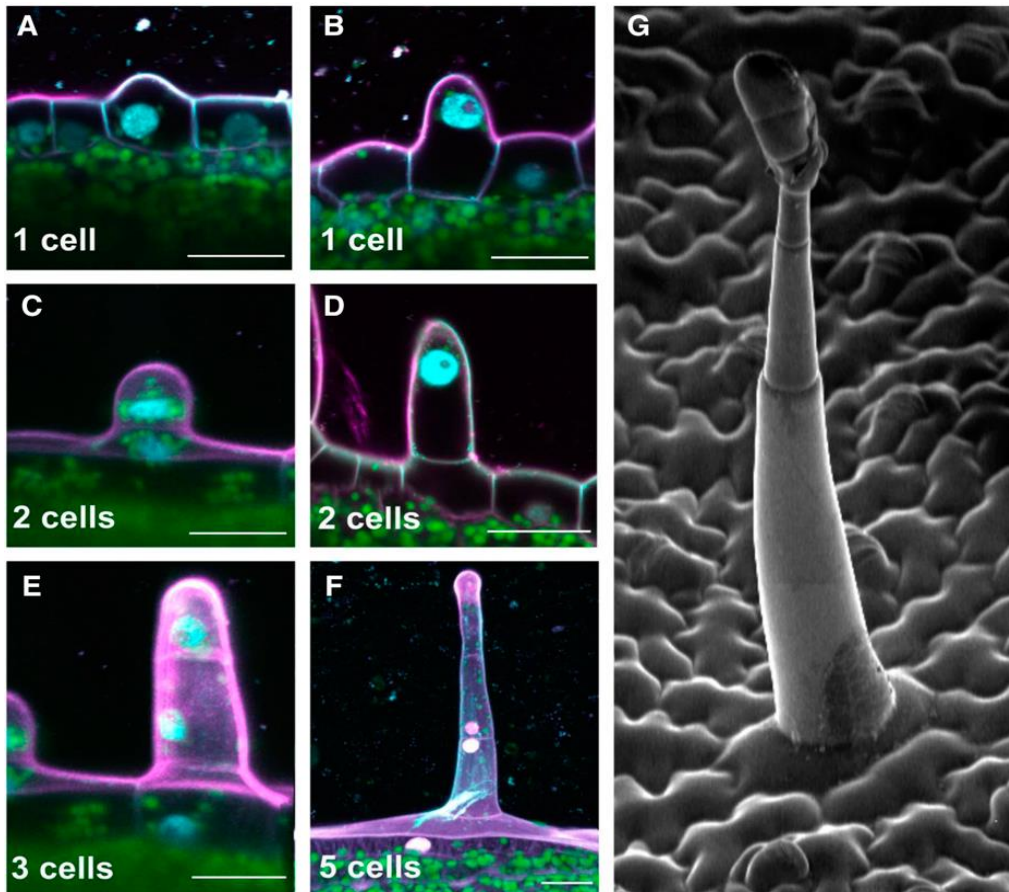


Figure 8 : Initiation et développement des trichomes chez *Nicotiana tabacum*. **(A-F)** images obtenues par microscopie confocale montrant les premières étapes du développement des trichomes glandulaires. Le nombre de cellules intervenant dans le processus est précisé en bas à gauche de chaque image. **(A)** Une cellule du protoderme prend du volume et forme une protubérance à la surface de l'épiderme, **(B)** le noyau de cette cellule se déplace au sein de cette protubérance qui continue à gagner en volume. **(C)** La cellule entre en division cellulaire pour former deux cellules distinctes **(D)**. La cellule située à l'extrémité de la protubérance subit alors une division asymétrique **(E)** donnant une large cellule (qui formera la « tige » du trichome multicellulaire après plusieurs divisions cellulaires contrôlées) et une petite cellule (qui donnera naissance à la tête glandulaire multicellulaire du trichome). **(F)** Un trichome en développement constitué de 5 cellules. (La petite barre blanche en bas à droite des images représente l'échelle, cette dernière mesure en vrai 20 μ m). Le magenta correspond aux parois cellulaires (coloration à l'iodure de propidium), le cyan correspond aux noyaux (coloration au DAPI) et le vert correspond aux chloroplastes (autofluorescence de la chlorophylle). **(G)** Image d'un trichome glandulaire long à la surface de l'épiderme obtenue par microscopie électronique à balayage (Huchelmann et al., 2017).

1.3.5. Génétique moléculaire du développement des trichomes

Le développement des trichomes glandulaires est étudié dans de nombreuses espèces. Trouver une bonne espèce modèle pour parler des trichomes glandulaires n'est pas chose aisée. En effet, selon le type de trichomes, certaines espèces sont plus adéquates que d'autres. Dans le cas des trichomes peltates, les espèces de la classe des *Lamiacées* sont préférées alors que pour les capitates ce sont plutôt les espèces de la classe des *Solanacées* qui sont utilisées comme modèle. Ici plus bas, sont énoncées quelques une des plantes modèles pour l'étude des trichomes dans des cas concrets.

Pour commencer, la plante de tomate (*Solanum Lycopersicum*) dont nous avons parlé précédemment et de son gène *Woolly* agissant dans le contrôle de la formation des trichomes de types I et type VI au niveau des feuilles en développement (Yang et al., 2011).

Une autre plante, le Cotton (*Gossypium spp*) possède un facteur de transcription bHLH GoPGF qui agit comme un régulateur positif de la formation de trichomes glandulaires et que son silencing mène à un phénotype dépourvu de trichomes glandulaires (Ma et al., 2016).

Il y a également l'*Armoise annuelle* (*Artemisia annua*) qui possède un facteur de transcription MYB AaMYB1 dont la surexpression induit la formation d'un plus grand nombre de trichomes (Matias-Hernandez et al., 2017). Cette plante a aussi révélé un facteur de transcription à homéodomaine-leucine zipper *AaHD1* qui est requis pour l'initiation des trichomes glandulaires ou non-glandulaires par le jasmonate. La surexpression de *AaHD1* a permis d'augmenter la densité en trichomes glandulaires sur l'*Armoise annuelle* sans porter préjudice à la croissance de la plante (Yan et al., 2017). Le concombre (*Cucumis sativus L.*) est également une espèce pour laquelle des gènes clés du développement de trichomes multicellulaires ont été identifiés. Le facteur de transcription *CsGL3* (appartenant à la famille des *HD-ZIP*) lorsqu'il est muté, mène à un phénotype glabre c'est à dire démunis de trichomes (Cui et al., 2016)

Tous ces exemples, illustrent la diversité moléculaire influant le développement et l'initiation des trichomes.

1.3.6. Génétique moléculaire du développement des trichomes glandulaires chez *N. tabacum*

Comme cité dans le point précédent, l'initiation et le développement des trichomes chez *Nicotiana tabacum* reste encore un processus mal caractérisé en comparaison à *A. thaliana*.

Jusqu'à présent, les données moléculaires récoltées sur les trichomes glandulaires réunissent quelques facteurs de transcriptions, des régulateurs de cycle cellulaire et des récepteurs impliqués dans la réception des signaux induits par les phytohormones. Ces données continuent sans cesse d'augmenter au travers des nombreuses équipes de recherche abordant le sujet. Entre autres une base de données nommée TrichOME regroupe déjà beaucoup d'informations sur le sujet (Huchelmann et al., 2017).

Pour les trichomes glandulaires de *N. tabacum*, il a été trouvé que la surexpression d'un facteur de transcription MYB de type R2R3 issu d'*Antirrhinum majus* nommé "MIXTA" entraîne chez *N. tabacum* la formation de trichomes glandulaires en surnombre au niveau des cotylédons, de la tige et des feuilles (**Figure 9**).

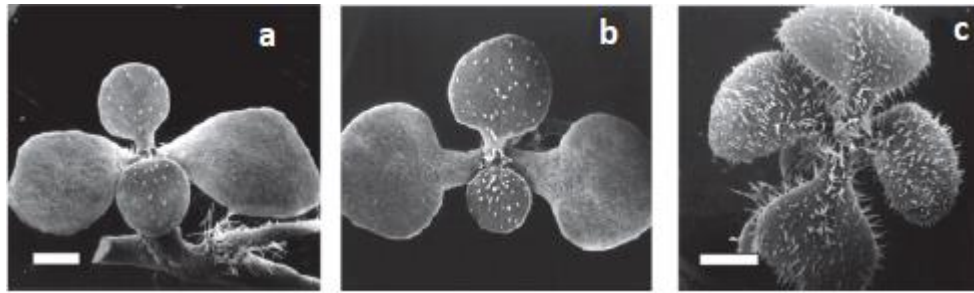


Figure 9 : Photo montrant le phénotype de plantules âgées de deux semaines de *N. tabacum*, (a) WT, (b) 35S:GL1, (c) 35S:AmMIXTA. La barre blanche est l'échelle, celle-ci mesure en vrai 1 mm (Figure adaptée de Payne et al, 1999).

Le gène *MIXTA* d'*A. majus* semble être un régulateur positif de la paroi cellulaire dont l'action confère une forme conique aux cellules épidermiques sur la surface adaxiale des pétales de la plante sauvage. Mais la surexpression de ce dernier à l'aide d'un promoteur fort 35S chez *Nicotiana tabacum* a montré que *MIXTA* pouvait aussi réguler la différenciation des trichomes (Glover et al. 1998). Par contre, l'utilisation de la surexpression de *AmMIXTA* avec la même construction génétique sur *Arabidopsis thaliana*, n'aboutit à aucun changement morphologique concernant ses trichomes. Même la surexpression de *AmMIXTA* sur les mutants *ttg1* et *gl1* dépourvus de trichomes n'arrive pas à restaurer ces derniers sur les feuilles mutées d'*Arabidopsis* (Payne et al., 1999). Puisque la surexpression de *GL1* n'a pas d'effet sur l'initiation et la différenciation des trichomes chez *Nicotiana tabacum*, il est suggéré qu'*A. thaliana* et *N. tabacum* ont un développement de leur trichomes géré par une régulation transcriptionnelle différente (Payne et al., 1999).

Récemment, un facteur de transcription "C2H2 zinc-finger" (*GIS*) agissant en amont du complexe activateur GL3/EGL3-GL1-TTG1 d'initiation et de différenciation des trichomes chez *Arabidopsis thaliana* est reporté comme pouvant agir sur le développement des trichomes glandulaires de *Nicotiana tabacum*. La surexpression de *GIS* chez *Nicotiana tabacum* a démontré une augmentation significative de la production de trichomes glandulaires sur la tige, les branches, les feuilles et les pétales de tabac (Liu et al. 2017).

Une autre étude menée sur l'expression du gène *Wo* de la plante de tomate au sein de *Nicotiana tabacum* mène à un phénotype poilu sur la plante de tabac. En effet, une fois exprimé chez le tabac, on observe l'apparition de groupes de cellules s'apparentant à des trichomes au niveau des feuilles. Par contre, les structures formées sont anormales : celles-ci sont pluricellulaires mais ne présentent pas de structure glandulaire. (**Figure 10**).

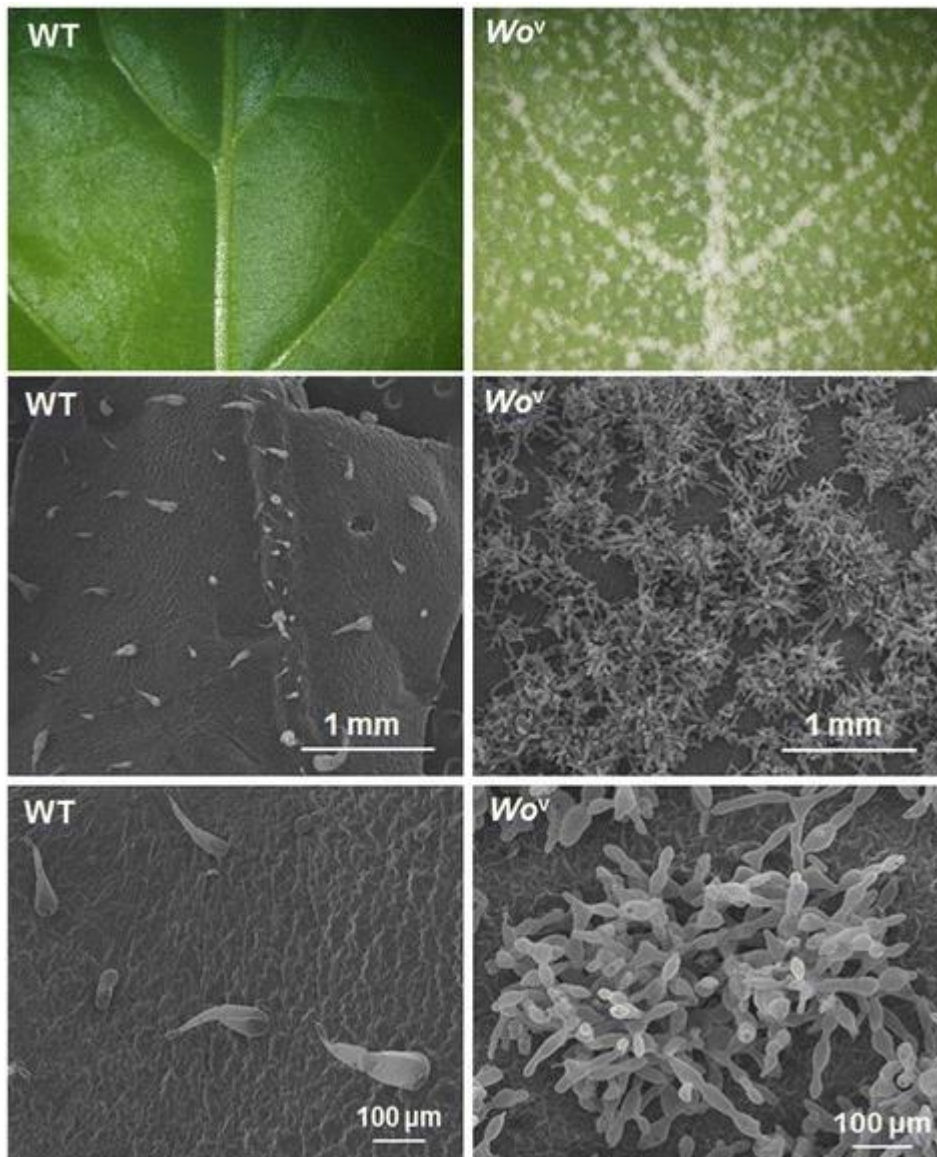


Figure 10 : Images comparant à différentes échelles les trichomes de feuilles de tabac entre la plante Wild Type et la plante exprimant le gène *Wo^v* (les images à plus petite échelle ont été prise par microscopie électronique à balayage) (Yang et al., 2015).

Des analyses RNA-seq ont été menées sur ces plantes afin d'identifier les gènes différemment exprimés par rapport au phénotype sauvage. Au terme de ces analyses, une grande quantité d'information a été extraite. Ces résultats ont été réunis dans les annexes de leur article et un décortiquage de cette information permettrait de mettre la main sur des gènes candidats intervenants dans la formation des trichomes chez *Nicotiana tabacum*.

On peut y retrouver par exemple, *PDF1* (protodermal factor 1), le facteur de transcription *HEC2* codant pour la protéine bHLH37 et un gène appelé *Cell Number Regulator 13 (CNR13)*.

2. Objectifs

Ce mémoire a pour objectif de parvenir à une meilleure connaissance et compréhension quant au développement des trichomes multicellulaires glandulaires de *Nicotiana tabacum* au travers de l'étude de divers gènes supposés intervenir dans l'initiation et le développement des trichomes de cette plante.

Les gènes ciblés ont été sélectionnés suite à une publication faisant état d'une liste de gènes up-régulés et down-régulés dans une plante de tabac surexprimant le gène *Woolly*, présentant suite à cette surexpression un phénotype très riche en trichomes (Yang et al., 2015).

Dans le cadre de mon mémoire, les gènes présentés comme up-régulés suite à la surexpression de *WO*^v sur lesquels j'ai travaillé sont : *HEC2*, *PDF1* et *CNR13*.

La description de ces gènes a été obtenue grâce à la base de données NCBI consultable via le lien suivant : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

HEC2 code pour un facteur de transcription bHLH impliqué dans le développement des papilles stigmatiques chez *Arabidopsis thaliana* (Gremski et al., 2007).

PDF1 (Protodermal Factor 1) encode une protéine putative extracellulaire riche en proline s'exprimant exclusivement dans la couche L1 des méristèmes végétatifs, inflorescents et floraux ainsi que dans le protoderme des primordia chez *Arabidopsis thaliana* (Abe et al., 1999).

CNR13 (Cell number regulator 13) encode une protéine membranaire riche en cystéine portant un domaine PLAC8 et parmi les protéines à domaine PLAC8, les protéines MCAs (MID-COMPLEMENTING ACTIVITY), sont supposées intervenir dans l'absorption du Ca⁺⁺ chez *Zea mays* (Rosa et al., 2017).

De plus une activité kinase peut être supposée de par l'homologie de sa séquence N-terminale avec la région régulatrice des protéines kinases de la plante de riz (*Oryza sativa*) (Rosa et al., 2017).

Un autre facteur influençant l'intérêt de recherche sur *CNR13* est un article mentionnant que le silencing de ce dernier chez *Zea mays* mène à un phénotype présentant une différenciation incomplète des stomates et des trichomes (Rosa et al., 2017).

La mise en évidence de l'implication de ces derniers dans l'initiation et le développement des trichomes chez *N. tabacum* se fera par la réalisation de diverses constructions génétiques qui vont permettre la création de lignées transgéniques stables de tabac.

En premier lieu, la création de lignées rapportrices pour *PDF1* et *HEC2* dont les promoteurs propres ont été flanqués d'un tag GUS-Vénus afin de pouvoir déterminer le profil d'activité du promoteur de ces gènes.

En second lieu, la création de lignées surexprimant les gènes *PDF1*, *HEC2* et *CNR13* avec un promoteur inductible au β -estradiol afin d'observer l'impact de la surexpression de ces gènes sur le phénotype des trichomes de tabac.

Et dernièrement, la création d'une lignée entraînant un silencing du gène *CNR13* par technique amiRNA avec un promoteur inductible au β -estradiol afin d'observer l'impact du silencing de ce gène sur le phénotype des trichomes de tabac.

3. Matériel et méthodes

3.1 Technique de biologie moléculaire et cellulaire

3.1.1 Extraction d'ADN génomique de plantules de tabac

- Récolter \pm 100 mg de tissu foliaire et les introduire dans un tube eppendorf de 1.5 mL ensuite, plonger le tube dans du N₂ liquide
- Ajouter 400 μ L de CTAB 2x (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) chauffé à 60°C au bain marie dans le tube et broyer à l'aide d'un potter les tissus foliaires (à effectuer sous hotte)
- Après broyage, le tube est incubé pendant 30 minutes au bain marie à 60°C
- Ajouter 800 μ L d'un mélange chloroforme/IAA (rapport 25 :1)
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante
- Récupérer la phase supérieure (\pm 400 μ L) et l'insérer dans un nouvel eppendorf
- Ajouter 800 μ L de CHCl₃/IAA (25 :1) et centrifuger à nouveau à 14000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante
- Comme précédemment, récolter la phase supérieure
- Ajouter 600 μ L d'isopropanol
- Incuber pendant 15 minutes sur glace pour favoriser la précipitation d'ADN
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C
- Éliminer le surnageant puis ajouter 1 mL d'EtOH 70%
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C
- Éliminer l'excédent d'EtOH et sécher au speedvac
- Le culot est resuspendu dans 40 μ L d'eau distillée
- Ajouter 2 μ L de Rnase (10 mg/mL) puis laisser le tube incubé 5 minutes à température ambiante
- Plonger le tube dans du N₂ liquide afin de le conserver à -20°C

3.1.2 Amplification par polymerase chain reaction (PCR) des séquences d'ADN d'intérêt

La PCR, est une méthode qui permet de spécifiquement amplifier une séquence d'ADN particulière.

Le mélange PCR se prépare comme suit dans un tube PCR :

- 1 μL de mélange des 4 dNTPs (10mM)
- 5 μL tampon MgCl_2 (18 mM) (10 μL de tampon Phusion (7,5 mM) pour la DNA polymérase Phusion)
- 1 μL d'ADN matrice (≤ 10 ng)
- 3 μL DMSO (0,5 U/ μL)
- 1 μL amorce Forward (10 μM)
- 1 μL amorce Reverse (10 μM)
- 37 μL eau distillée (si Phusion, 32 μL)
- 1 μL FastStart DNA polymérase (5U/ μL) (Phusion DNA polymerase (2U/ μL))

NB : Les amorces créées pour l'amplification des séquences d'ADN voulues se situent dans l'annexe n°1 qui décrit également les conditions de la réactions PCR pour chacun des couples d'amorces.

3.1.3. La méthode de silencing par artificial microRNA (amiRNA)

La technologie artificial microRNA (amiRNA) utilise le mécanisme de formation de miRNA pour arriver au silencing de gènes cibles.

La création d'amiRNAs se fait à l'aide de la séquence d'un miRNA qui est complémentaire à son gène cible qui se voit remplacée par la séquence complémentaire à un autre gène dont on souhaite le silencing.

La formation de cette séquence chimérique s'effectue au travers d'une manipulation triple. Cette séquence artificielle peut alors être majorée par un promoteur inductible ou spécifique d'un type cellulaire particulier afin d'avoir un silencing contrôlé ou ciblé (**Figure 11**) (Ossowski et al., 2008).

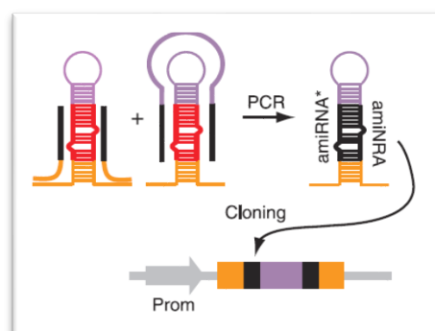


Figure 11 : Représentation schématique de la formation d'amiRNAs via des PCR chevauchantes. La séquence chimérique formée est transférée dans un vecteur de choix par la suite (Ossowski et al., 2008).

L'amiRNA formé passe alors par le même mécanisme que les miRNAs pour parvenir au silencing du gène cible.

3.1.4 Purification sur minicolonne des produits PCR

Les produits PCR sont purifiés via l'utilisation du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up en suivant le protocole du fournisseur Macherey-Nagel.

Il est également possible de purifier de l'ADN sur gel d'agarose en découpant la bande contenant l'ADN d'intérêt. Cette portion de gel est ensuite fondue au bain marie à 60°C avec la quantité appropriée de binding buffer et ensuite traitée selon les instructions du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Les produits purifiés peuvent être stockés à -20°C.

3.1.5 Quantification au Nanodrop de la concentration d'ADN

Certaines manipulations demandent une quantification préalable de la concentration d'ADN présente dans l'échantillon. Une des méthodes utilisées au laboratoire est la quantification à l'aide de l'appareil de mesure : "NanoDrop ND-100 (Thermo Scientific)" permettant de mesurer l'absorbance à 260 et 280 nm. Cette mesure d'absorbance nécessite un blanc qui est réalisé en déposant 1 µL du tampon (sans ADN) sur la lentille de l'appareil. Après le blanc, la concentration en ADN est mesurée en déposant 1 µL de la solution contenant de l'ADN sur cette lentille après nettoyage du blanc. La mesure de la concentration en ADN est alors directement calculée par l'appareil.

3.1.6 Réaction de TOPO cloning (Invitrogen)

Le TOPO cloning est une technique de clonage permettant l'insertion d'une séquence d'ADN produite par PCR dans un plasmide d'entrée (pENTR/D-TOPO) par l'action de la topoisomérase I du virus Vaccinia.

Le mix permettant la réaction de TOPO cloning est le suivant :

- 1 μ L de produit PCR (contenant 5-10 ng d'ADN)
- 1 μ L de solution saline
- 3 μ L d'eau stérile
- 1 μ L du vecteur TOPO

Il est à noter que pour obtenir une réaction de TOPO cloning optimale, il faut avoir un ratio molaire allant de 0,5:1 à 2:1 entre le produit PCR et le vecteur pENTR/D-TOPO comme indiqué par la courbe d'efficacité (**Figure 12**). Après un léger mélange du mix en tapotant dessus, il faut laisser incuber au minimum 30 minutes à température ambiante. Au terme de ces 30 minutes, le vecteur TOPO ayant intégré notre produit PCR d'intérêt est prêt à être transformé par électroporation ou Heat Shock.

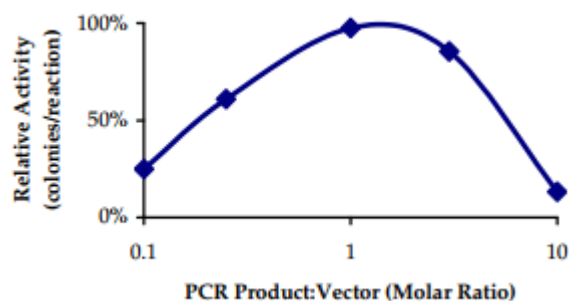


Figure 12 : Courbe d'efficacité de la méthode TOPO cloning avec en ordonnée l'activité relative en pourcentage et en abscisse, le ratio molaire du produit PCR que l'on souhaite intégrer dans le vecteur pENTR/D-TOPO. (Image provenant du protocole de Invitrogen pour le TOPO cloning)

NB : Carte du vecteur pENTR/D-TOPO dans l'annexe n°2

3.1.7 Insertion dans pGEM-T Easy (Promega)

La fonctionnalité du vecteur pGEM-T Easy est basée sur l'activité de la T4 DNA ligase qui permet la liaison entre l'extrémité 3' hydroxyle de nucléotides adjacents et le phosphate en 5'. Le vecteur pGEM-T Easy est un vecteur linéarisé par EcoRV avec de chaque côté une extrémité 3' protubérante constituée de résidus deoxythymidine insérés par l'action d'une terminal transférase. Ce vecteur présente plusieurs avantages. Premièrement, ces extrémités permettent une ligation efficace du produit PCR en empêchant la recyclisation du vecteur et deuxièmement, elles fournissent des sites compatibles pour les produits PCR si la polymérase utilisée rajoute une queue polyadénine à la fin du produit. Entre autres, ce vecteur offre de nombreux sites de restriction de part et d'autre de la zone de clonage permettant ainsi de libérer l'insert par la suite.

La ligation d'un insert dans pGEM T-easy s'effectue comme suit dans un eppendorf stérile :

- 4µL de produit PCR (en veillant à ce que la quantité d'insert en ng soit respectée suivant la formule présentée ci-dessous)
- 1 µL de pGEM®-T Easy Vector (50 ng/µL)
- 6 µL du 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
- 1 µL de T4 DNA Ligase (3U/µL)
- Mélanger et incuber 1H à température ambiante
- Transformer par électroporation et étaler sur boîte LB + Ampicilline à laquelle est ajoutée préalablement 100 µL d'une solution d'IPTG 100 mM et 20 µL d'une solution de X-gal 50 mg/ml qui ont été étalés sur cette dernière
 - Les colonies ayant intégré l'insert devraient présenter une coloration blanche contrairement à celles ne le possédant pas qui seront bleue

$$\text{Quantité de l'insert en ng} = \frac{\text{Quantité de vecteur en ng} * \text{taille en kb de l'insert} * \text{ratio molaire de l'insert sur le vecteur}}{\text{taille en kb du vecteur}}$$

La carte du vecteur pGEM-T Easy est reprise dans l'annexe n°2

3.1.8 La restriction

Le but de la méthode de restriction est de permettre l'ouverture d'un vecteur de destination en vue d'y insérer un plasmide, d'extraire une séquence d'intérêt présente dans un vecteur ou encore de permettre la vérification de constructions génétiques, Les restrictions sont basées sur l'utilisation d'enzymes de restriction spécifiques qui vont couper à des endroits précis dans le vecteur cible et permettre de l'ouvrir ou de le fragmenter en plusieurs morceaux avec pour but de comparer les tailles du ou des fragments générés sur gel d'électrophorèse.

Les restrictions sont réalisées de la manière suivante dans un eppendorf :

- 2 µL d'ADN
- 1 µL de l'enzyme 1 (10U/µL pour le fournisseur Roche et 20U/µL pour le fournisseur New England Biolabs)
- 1 µL de l'enzyme 2 (selon le cas une seconde enzyme est nécessaire)
- 2 µL du tampon adéquat (*cf.* au fournisseur des enzymes : "Roche" ou "New England Biolabs")
- 14 µL d'eau distillée

Placer le tube pendant 2H à 37°C au bain marie et charger ensuite les solutions sur un gel d'agarose pour réaliser l'électrophorèse suivie de la révélation UV.

3.1.9 La restriction in silico

Cette dernière se passe virtuellement au travers du programme informatique : “ApE (A plasmid Editor) “. Ce programme, en libre accès (téléchargeable ici : <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) permet d'observer directement les profils de digestion qui devraient être obtenus suite à l'utilisation d'enzymes de restriction sur la construction génétique ciblée. Il est juste nécessaire de posséder la séquence nucléotidique de la construction afin d'y appliquer virtuellement les enzymes de restriction voulues.

3.1.10 La déphosphorylation

Dans le but d'empêcher la refermeture du plasmide après une linéarisation par restriction, le site d'ouverture du plasmide doit être déphosphorylé. De fait, une fois le travail des enzymes de restriction effectué, le produit linéarisé est purifié sur minicolonne (voir point 3.1.3) mais l'élution se fait avec 87 μ L d'eau distillée chauffée à 60 °C.

Cela, dans le sens de réaliser la déphosphorylation comme suit :

- Les 87 μ L du plasmide linéarisé purifié
- 10 μ L de tampon phosphatase
- 3 μ L de phosphatase alcaline
- Incuber 1H à 37°C

Après cela, le produit est à nouveau purifié sur minicolonne avant de réaliser une ligation.

3.1.11 La Ligation

Avant la réalisation de la ligation, il faut comme pour le système pGEM Teasy quantifier la quantité d'insert à utiliser selon la quantité de vecteur (voir point 3.1.6). La procédure se déroulait avec un contrôle négatif (sans insert) donnant déjà une première indication sur la réussite de la manipulation consistant en l'insertion de HEC2pro et PDF1pro dans le vecteur de destination pAUX3131(GV) :

	HEC2pro		PDF1pro	
Type de contrôle	+	-	+	-
pAUX 3131 (GV)	4µL	4µL	4µL	4µL
Promoteur HEC2	13µL*			
Promoteur PDF1			13µL*	
H ₂ O		13µL		13µL
Ensuite, 5 minutes à 65°C au bain marie puis 5 minutes sur glace				
Ligation buffer	2µL	2µL	2µL	2µL
Ligase (T4)	1µL	1µL	1µL	1µL

Les solutions sont alors placées pendant 16H à 16°C au bain marie.
 Au terme de cela, on effectue une transformation par électroporation.

*en veillant à ce que la quantité d'insert en ng soit respectée suivant la formule présentée au point 3.1.6.

3.1.12 Réaction LR

La création d'un clone d'expression, au travers de la réaction de recombinaison de type LR offre la possibilité de transférer la séquence codante contenue dans un vecteur d'entrée vers un vecteur de destination. Cette réaction est catalysée par la LR Clonase II qui permet à la réaction $attL \times attR \Rightarrow attB \times attP$ d'avoir lieu. Il est à noter que les sites de recombinaison att doivent correspondre entre le vecteur d'entrée et de destination pour que la réaction ait lieu. Le gros atout de cette réaction est la diversité des vecteurs d'expression disponibles. Ces derniers peuvent par exemple permettre les constructions suivantes : aider à former une fusion N ou C-terminale avec un tag histidine, myc ou une protéine fluorescente (GFP, YFP, RFP,...), fusionner en aval d'un promoteur inductible au β -estradiol ou encore offrir l'ajout d'un promoteur 35S.

La réaction LR est réalisée de la manière suivante dans un eppendorf :

- Ajouter :
 - 1-7 μ L du clone d'entrée (\pm 100ng)
 - 1 μ L du vecteur de destination (150 ng/ μ L)
 - TE buffer à pH 8 à ajouter pour atteindre un volume de 8 μ L
- Dégeler sur glace pendant 2 minutes la LR clonase II enzyme mix. Vortexer la brièvement 2 fois pendant 2 secondes
- Ajouter à chaque échantillons 1 μ L de cette dernière puis microcentrifuger brièvement
- Remettre la LR clonase II enzyme mix à -20°C
- Incuber vos solutions pendant 1H à 25°C
- Ajouter 1 μ L de Proteinase K solution à chaque échantillon pour finir la réaction. Vortexer brièvement puis incuber les échantillons à 37°C pendant 10 minutes

Au terme de cela, on effectue une transformation par électroporation.

3.1.13 Le séquençage des constructions génétiques

La vérification des séquences intégrées dans les clones d'intérêt à l'aide du séquençage est d'une importance primordiale, ce afin de vérifier que l'insertion dans le vecteur s'est faite dans le bon sens et de vérifier qu'il n'y ait pas eu d'introduction de mutations suite à l'amplification PCR des séquences. Le séquençage est pris en charge par la société MacroGen.

La préparation des échantillons envoyés au séquençage est réalisée de la manière suivante dans un eppendorf :

- 6,5 µL d'eau distillée
- 1 µL de l'ADN issu de la minipréparation
- 2,5 µL de M13 Forward ou Reverse (10^{-6} M) (une seule amorce par tube).

Ici, les amorces M13 ont été utilisées pour les différents séquençages vu que les séquences Forward et Reverse se retrouvaient bien dans les vecteur pENTR/D-TOPO, pGEM-T Easy et pAUX3131. Lors de la réception des résultats envoyés par MacroGen, le traitement de ceux-ci s'est effectué au travers des programmes "CLC Main Workbench 7" et/ou "DNASTAR".

3.2 Matériel et manipulations relatives aux plantes

3.2.1 L'espèce végétale

La variété de tabac utilisée au travers des expériences est la suivante : *Nicotiana tabacum L. cv. Petit Havana SR1*, communément dénommée SR1.

3.2.2 Stérilisation des graines

Dans le but de faire germer des plantes de *N. tabacum SR1 WT* sur du milieu MS en conditions axéniques, il est important de stériliser les graines. La stérilisation se passe comme suit sous hotte:

- Insérer l'équivalent de 50-100 µL de graines dans un tube eppendorf de 1,5 mL
- Placer le tube ouvert sur un portoir lui-même posé dans un récipient scellé
- Insérer dans la boîte un petit berlin de 25 mL contenant un mélange de 5 mL d'HCl 37% et 1 mL de NaClO 10% (Ceci provoque une réaction rédox entraînant la formation de Cl₂ gazeux qui va remplir la boîte et stériliser les graines)
- Laisser agir 30 minutes
- Les gaines stérilisées obtenues peuvent ensuite être étalées sur milieu MS solide

3.2.3 Les milieux de culture végétal

Le milieu Murashige and Skoog (MS) est le milieu de prédilection concernant la culture de cellules et tissus de plantes (Murashige T and Skoog F, 1962). Selon son utilisation, sa composition (en pourcentage massique, kg/l de solution) diffère :

- Milieu MS
 - 0,44% de sels constituant le milieu Murashige and Skoog (ref produit)
 - 3% Saccharose
 - Mettre à pH 5,6
 - (0,8% Agar si milieu solide désiré)
 - Autoclaver

- Milieu de rinçage MSCC(K-H)
 - 0,44% de sels constituant le milieu Murashige and Skoog medium (ref produit)
 - 3% Saccharose
 - Mettre à pH 5,6 et autoclaver avant d'ajouter les antibiotiques à température ambiante
 - Antibiotiques :
 - 0,05% Cefotaxime
 - 0,04% Carbénicilline
 - 0,01% Kanamycine ou 0,005% Hygromycine selon le marqueur de sélection au niveau du T-DNA du vecteur binaire (voir annexe n°2)

- Milieu de régénération MSCC(K-H) IAA BAP
 - 0,44% de sels constituant le milieu Murashige and Skoog medium
 - 3% Saccharose
 - Mettre à pH 5,6
 - (0,8% Agar si milieu solide désiré)
 - À autoclaver avant d'ajouter les antibiotiques à température ambiante
 - Antibiotiques :
 - 0,05% Cefotaxime
 - 0,04% Carbénicilline
 - 0,01% Kanamycine ou 0,005% Hygromycine selon le marqueur de sélection au niveau du T-DNA du vecteur binaire (voir annexe n°2)
 - Hormones de croissance :
 - $2 \cdot 10^{-5}$ % IAA
 - $2,2 \cdot 10^{-4}$ % BAP

- Milieu d'enracinement MS IAA CC(K-H))
 - Idem que précédemment en omettant l'ajout de BAP

3.2.4 Transformation de plantes (Horsh et al. 1985)

- Inoculer 4 mL de LB liquide contenant 0,002% de rifampicine, 0,004% de gentamycine et 0,005% du marqueur de sélection du vecteur binaire qui est ici la spectinomycine avec une colonie d'*Agrobacterium tumefaciens*
- Incuber 24 à 48H à 28°C sous agitation
- Récolter les cellules en centrifugeant à 5000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante
- Laver deux fois le culot avec 1 mL de MgSO₄ 10 mM
- Resuspendre les cellules dans 300 µL de MgSO₄ 10 mM
- Découper des jeunes feuilles de *N. tabacum* en petits morceaux (1 cm x 1 cm en essayant d'éliminer les nervures) et placer les sur un milieu MS solide
- Piquer chaque feuille 4 fois avec une aiguille trempée dans la culture d'*A. tumefaciens*
- Incuber 5-6 jours sur ce milieu (local plante : température : 25°C, photopériode : 16h-8h, flux de photons : 40-55µmol/m².s)
- Rincer les morceaux de feuilles dans du MSCC(K-H) (selon le marqueur de sélection) liquide
- Transférer ensuite les fragments de feuilles sur un milieu de régénération MSCC(K-H) IAA BAP
- Apparition de cals après 3-4 semaines puis de pousses après 4-6 semaines
- Transférer les pousses sur le milieu d'enracinement MSCC(K-H) IAA
- Apparition de racines après 2-3 semaines
- Transférer les plantules en sol

3.3 Méthode de révélation à l'aide de la coloration GUS

Solutions à préparer

Tampon phosphate pH 7,2 (concentration finale) :

- 34,2 mM Na₂HPO₄
- 15,8 mM NaH₂PO₄
- 0,05% (v/v) Triton X100

Tampon de préfixation :

- Tampon phosphate
- 1,5% (v/v) formaldéhyde

Tampon de coloration GUS (concentration finale) :

- Tampon phosphate
 - 2 mM Potassium Ferrocyanide
 - 2 mM Potassium Ferricyanide
 - 2 mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide cyclohexamine salt) dans du diméthylformamide (DMF ; à manipuler sous hotte)
-
- Transférer les plantules de différentes lignées transgéniques dans une plaque multipuits (12 puits) et mettre dans chaque puits 2 ml de tampon de préfixation.
 - Placer la plaque multipuits dans une cloche à vide et effectuer le vide pendant 30 minutes.
 - Laver 3 fois pendant 5 minutes au tampon phosphate chaque échantillon
 - Après le dernier lavage, ajouter 3 ml de tampon de coloration GUS.
 - Placer la plaque multipuits dans une cloche à vide et effectuer le vide pendant 30 minutes.
 - Incuber dans la solution de coloration pendant 2h dans l'obscurité totale (la plaque doit être recouverte de papier aluminium) à 37°C.
 - Quand la coloration des tissus est bien visible, placer les plantules dans une solution d'éthanol 70%. Le traitement à l'éthanol solubilisera la chlorophylle mais pas le précipité bleu formé. Ceci rendra le tissu translucide.
 - Quand le tissu est bien décoloré, observer à la loupe binoculaire et au microscope en lumière visible.

3.4 Microscopie confocale

Les analyses ont été réalisées via la plateforme IMABIOL utilisant le microscope confocal ZEISS LSM710.

L'observation du tag Vénus s'est faite à une longueur d'onde (λ) d'excitation de 514 nm réémise à une longueur d'onde comprise entre : 519-552 nm.

4 Résultats

4.1 Génération de constructions génétiques permettant de créer une lignée transgénique de *N. tabacum* rapportrice de l'expression de PDF1 et de HEC2.

4.1.1 Amplification de la séquence promotrice de PDF1 (PDF1pro) et de HEC2 (HEC2pro)

La première étape pour l'obtention de nos constructions génétiques a été l'amplification des séquences d'intérêts par PCR (voir point 3.1.2) afin d'y appliquer par la suite les modifications souhaitées.

Ces amplifications PCR sont faites sur base d'ADN génomique issu de feuilles de *N. tabacum* SR1 à l'aide des primers forward et reverse spécifiques de la séquence PDF1pro d'une taille de 2057 bp et de la séquence HEC2pro d'une taille de 2099bp (Annexe n°1).

Afin de déterminer la température idéale d'hybridation permettant d'amplifier la plus grande quantité d'ADN, les séquences PDF1pro et HEC2pro ont été amplifiées suivant différentes températures d'hybridation (50, 55, 60°C) à l'aide de la FastStart DNA polymérase qui offre aux séquences amplifiées une queue polyadénine dont l'importance est primordiale pour l'intégration future de l'insert d'intérêt dans le vecteur pGEM-T easy.

Les produits PCR obtenus à ces différentes températures ont ensuite été placés sur un gel d'électrophorèse afin de vérifier si l'amplification a bien eu lieu (**Figure 13**).

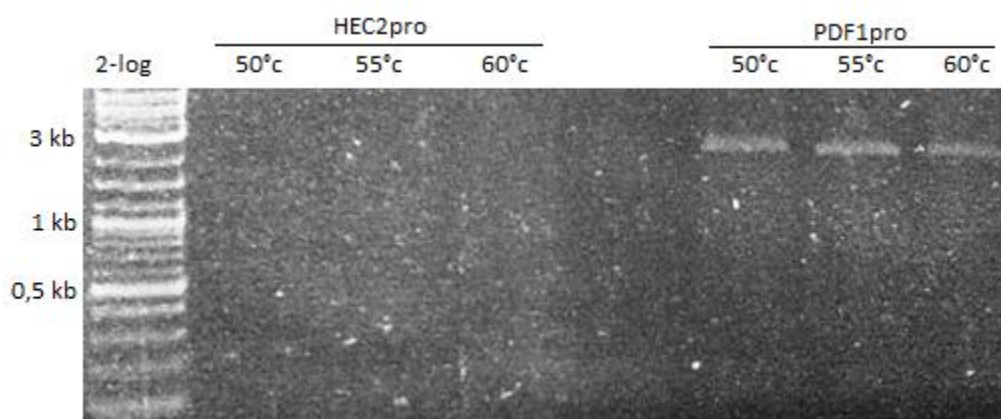


Figure 13 : Gel d'électrophorèse avec l'amplification PCR de la séquence promotrice de HEC2 et de PDF1 sur base d'ADN génomique de tabac aux températures d'hybridation de 50, 55 et 60°C à l'aide de FastStart DNA polymérase (autres conditions PCR dans l'annexe n°1).

Suite à l'observation des bandes obtenues aux environs de 2kb, on observe que l'amplification s'est bien déroulée pour PDF1pro aux trois températures testées mais la quantité en ADN semblait optimale à 55°C au vu de l'intensité légèrement plus élevée de cette bande sur le gel d'électrophorèse. De ce fait, le produit PCR généré avec une hybridation à 55°C a été sélectionné pour les constructions à venir pour PDF1pro.

Par contre, pour HEC2pro aucune amplification PCR n'a pu être observée. L'expérience a été répétée de nombreuses fois mais sans succès. La PCR a été reproduite mais cette fois à l'aide d'une Phusion DNA polymérase à 48, 52 et 55°C (**Figure 14**).

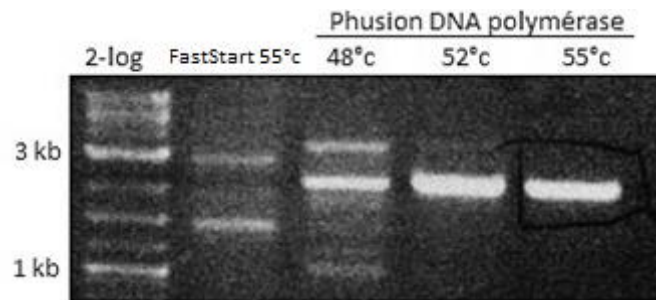


Figure 14 : Gel d'électrophorèse avec l'amplification PCR de la séquence promotrice de HEC2 sur base d'ADN génomique de tabac aux températures d'hybridation de 48, 52 et 55°C avec la Phusion DNA polymérase dans les trois derniers puits. Dans le premier puits, se trouve le résultat de la même amplification PCR mais avec la FastStart DNA polymérase à 55°C qui est infructueuse (détail des conditions PCR dans l'annexe n°1)

Suite à l'observation des bandes obtenues aux environs de 2kb, on observe que l'amplification s'est le mieux déroulée à la température de 55°C. Mais suite à l'utilisation de la Phusion DNA polymérase le produit PCR formé n'est pas pourvu d'une queue polyadénine nécessaire à l'intégration de HEC2pro dans pGEM-T easy. De ce fait une manipulation supplémentaire a été réalisée pour ajouter une queue polyadénine. Le produit PCR obtenu avec la Phusion DNA polymérase a été traité avec un mélange contenant 3 µl de tampon MgCl₂ (18mM), 1 µl de dNTPs (10mM) et un 1µl de FastStart DNA polymérase (5 U/µL) qui va permettre l'ajout de la queue polyadénine. Le tout a été incubé pendant 15 min à 72°C au bain marie.

4.1.2 Clonage de PDF1pro et de HEC2pro dans le vecteur pGEM-T easy

En vue de leur intégration dans pGEM-T easy les produits PCR de PDF1pro et HEC2pro ont été purifiés (voir point 3.1.3). La quantité d'ADN contenue dans PDF1pro et HEC2pro purifiés ont été quantifiées à l'aide du nanodrop (voir point 3.1.4) nous révélant respectivement une concentration de 15,8 ng/µl et de 77,7 ng/µL. De ce fait, suivant le protocole de clonage dans pGEM T-easy, PDF1pro et HEC2pro y ont été insérés (voir point 3.1.6).

Pour obtenir une pré-sélection des colonies ayant potentiellement intégré nos produits PCR, les cellules transformées ont été étalées sur des boîtes LB + ampicilline avec traitement IPTG/Xgal (voir point 3.1.6).

Il en résulte plusieurs colonies bleues (dû à la présence de β-galactosidase synthétisée dans les vecteurs pGEM-T easy dépourvus d'une insertion de nos produits PCR) et une seule colonie blanche pour chacun de nos produits PCR qui après minipréparation d'ADN (annexe n°7) et restriction (voir point 3.1.7) par Not1 ont été observés sur gel d'électrophorèse (**Figure 15**).

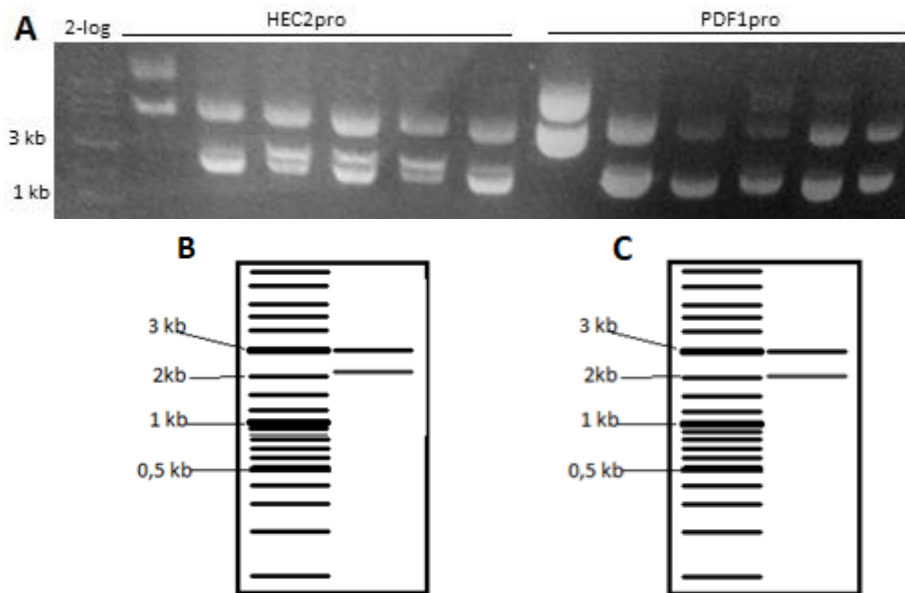


Figure 15 : (A) Gel d'électrophorèse présentant la restriction avec l'enzyme Not1 vérifiant si l'insert PDF1pro a été inséré dans pGEM-T easy avec une présélection des colonies à l'aide d'un traitement des milieux de culture avec IPTG/Xgal. (B & C) Profil de restriction in silico attendu de la restriction par l'enzyme Not1 de HEC2pro (B) et de PDF1pro (C) dans pGEM-T easy obtenu à l'aide du programme ApE.

Ce profil de restriction est fort étrange, car il ne correspond à rien d'attendu. Mais l'ADN traité dans le premier puit de HEC2pro et PDF1pro issu de leur seule colonie blanche montre un profil unique par rapport aux autres provenant de colonies bleues. De fait une autre restriction avec les enzymes Ecor1 et Xba1 a été menée pour éclaircir la situation. Ces dernières devraient offrir un profil de restriction présentant 3 bandes sur le gel situées à 2997 bp, 1477 bp et 637 bp pour HEC2pro et situées à 2997 bp, 1428 bp et 644 bp pour PDF1pro selon ApE (voir point 3.1.8) (Figure 16).

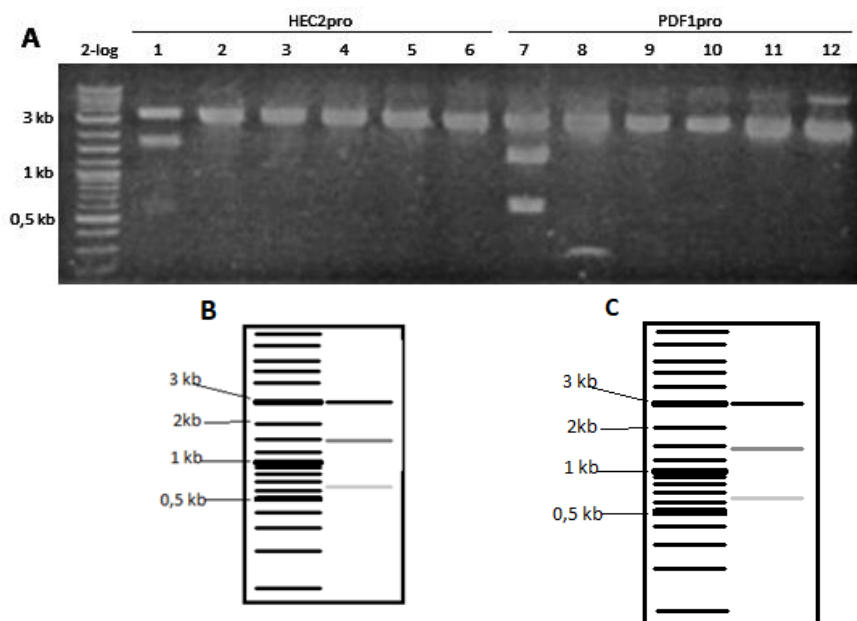


Figure 16 : (A) gel d'électrophorèse présentant la restriction avec les enzymes Ecor1 et Xba1 vérifiant si les inserts HEC2pro et PDF1pro ont été inséré dans pGEM-T easy avec une présélection des colonies à l'aide d'un traitement des milieux de culture avec IPTG/Xgal. Le puits n°1 et n°7 présentent les profils attendus et contiennent donc respectivement nos inserts HEC2pro et PDF1pro. (B & C) Les profils de restriction in silico attendu de la restriction par les enzymes Xba1 et Ecor1 de HEC2pro (B) et PDF1pro (C) dans pGEM-T easy obtenus à l'aide du programme ApE.

Finalement, on remarque le profil attendu autant pour HEC2pro que pour PDF1pro au niveau de leur premier puits respectif sur le gel d'électrophorèse correspondant à la minipréparation d'ADN de la colonie blanche extraite de notre milieu de culture traité à l'IPTG/Xgal. Les autres puits sont issus des colonies bleues extraites en cas de faux négatif.

Suite à ce résultat, les constructions ont été envoyées au séquençage pour obtenir la confirmation de l'insertion de la bonne séquence dans le bon sens.

4.1.3 Clonage de HEC2pro et PDF1pro dans le vecteur pAUX3131 GUS-Vénus

Suite au séquençage confirmant l'insertion de HEC2pro et PDF1pro dans pGEM-T easy, HEC2pro et PDF1pro ont été isolés du vecteur pGEM-T easy par l'enzyme Not1 sur gel d'électrophorèse puis extraits et purifiés (**Figure 17**).

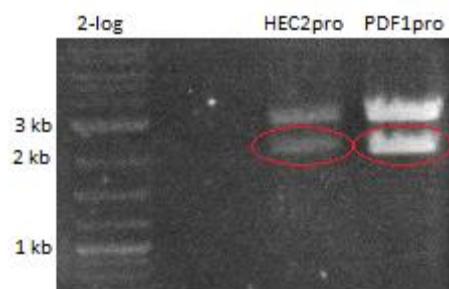


Figure 17 : Gel d'électrophorèse présentant la restriction avec l'enzyme Not1 des inserts HEC2pro et PDF1pro (entourés en rouge sur le gel) avec la bonne orientation, insérés dans le vecteur pGEM-Teasy.

La quantification nanodrop de HEC2pro et PDF1pro purifiés annonçait respectivement une concentration de 22,3 ng/μl et de 8,8ng/μl.

A côté, le vecteur pAUX3131 GUS-Vénus a été linéarisé via Not1, déphosphorylé, puis purifié et quantifié au nanodrop donnant une concentration de 24,5 ng/μl.

Selon cette concentration, une réaction de ligation de HEC2pro et PDF1pro dans le vecteur pAUX3131 GUS-Vénus a pu être mise en œuvre dans le but d'ajouter un tag GUS-Vénus à HEC2pro et PDF1pro.

La confirmation de l'insertion ainsi que de la bonne orientation dans le vecteur pAUX3131 GUS-Vénus a été mise en évidence à l'aide d'une restriction avec les enzymes Kpn1 et Sph1 pour PDF1pro (**Figure 18**).

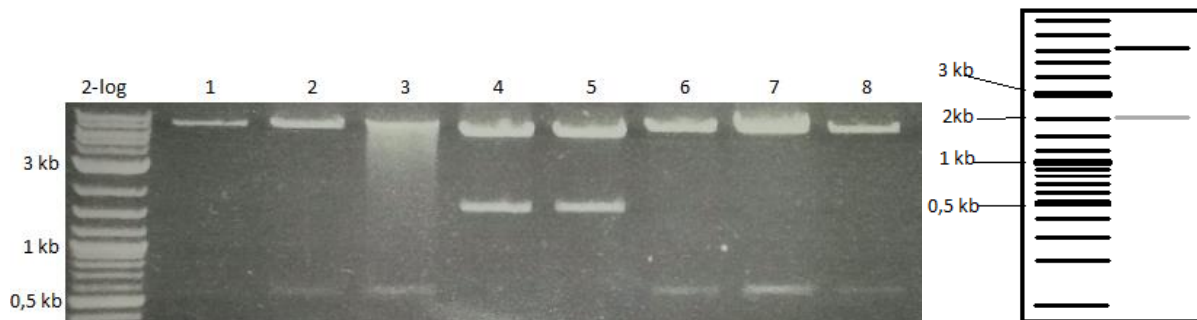


Figure 18 : A gauche, gel d'électrophorèse présentant la restriction avec les enzymes Kpn1 et Sph1 de l'insert PDF1pro dans le vecteur pAUX3131 GUS-Vénus. On observe dans les puits 4 et 5 la présence de PDF1pro dans pAUX3131 GUS-Vénus avec la bonne orientation. A droite, profil de restriction in silico avec la bonne orientation attendue sur le gel d'électrophorèse obtenu à l'aide du programme ApE.

Le profil désiré devait montrer l'orientation forward de PDF1pro dans pAUX3131 donnant un fragment à ± 6279 bp et un autre à ± 2060 bp alors que l'orientation non désirée aurait montré des fragments à ± 7 kb et ± 1 kb. Sur la figure ci-dessus, on observe bien une orientation forward de PDF1pro pour les échantillons du 4^{ième} et 5^{ième} puits.

Concernant HEC2pro, la confirmation de son insertion ainsi que de sa bonne orientation dans le vecteur pAUX3131 GUS-Vénus a été mise en évidence à l'aide d'une restriction avec les enzymes Kpn1 et Nco1 (**Figure 19**).

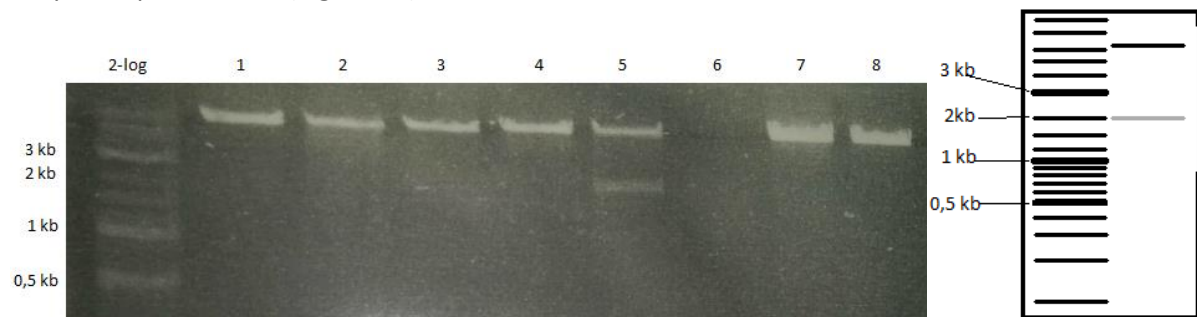


Figure 19 : A gauche, gel d'électrophorèse présentant la restriction avec les enzymes Kpn1 et Nco1 de l'insert HEC2pro dans le vecteur pAUX3131 GUS-Vénus. On observe dans le puits 5 la présence de HEC2pro dans pAUX3131 GUS-Vénus avec la bonne orientation. A droite, profil de restriction in silico avec la bonne orientation attendue sur le gel d'électrophorèse obtenu à l'aide du programme ApE.

Le profil désiré devait montrer l'orientation forward de HEC2pro dans pAUX3131 donnant un fragment à 6391 bp et un autre à 1982 bp alors que l'orientation non désirée aurait montré des fragments à ± 7 kb et ± 1 kb. Sur la figure ci-dessus, on observe bien une orientation forward de HEC2pro pour l'échantillon du 5^{ième} puits.

4.1.4 Clonage de HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus dans le vecteur binaire pMODUL3408

Les constructions HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus obtenues précédemment se sont vues extraites du vecteur pAUX3131 à l'aide de l'enzyme de restriction Ise1 (**Figure 20**).

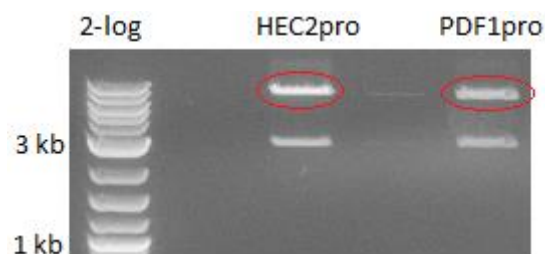


Figure 20 : Gel d'électrophorèse présentant HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus extraits du vecteur pAUX3131 à l'aide de l'enzyme de restriction Ise1. Le fragment du dessus est celui qui contient nos constructions d'intérêt avec le tag GUS-Vénus.

Les bandes supérieures sur le gel d'électrophorèse correspondent à nos constructions HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus qui ont été isolées et purifiées. La quantité d'ADN présente dans ces constructions a été quantifiée au nanodrop et donnait une concentration de 41 ng/ μ l pour HEC2pro:GUS-Vénus et de 36 ng/ μ l pour PDF1pro:GUS-Vénus.

A côté, le vecteur binaire pMODUL3408 a été linéarisé par restriction avec *Isce1* et déphosphorylé (voir point 3.1.9). Ce dernier a ensuite été purifié et sa concentration quantifiée au nanodrop (66 ng/μl).

Des réactions de ligation de HEC2pro:GUS-Vénus et de PDF1pro:GUS-Vénus dans le vecteur pMODUL3408 linéarisé ont été réalisées.

La vérification de l'insertion de l'insert dans le vecteur binaire s'est faite au travers d'une restriction par l'enzyme *Not1* qui devrait faire ressortir notre HEC2pro (**Figure 21**) et notre PDF1pro (**Figure 22**) présentant chacun une taille de ± 2kb .

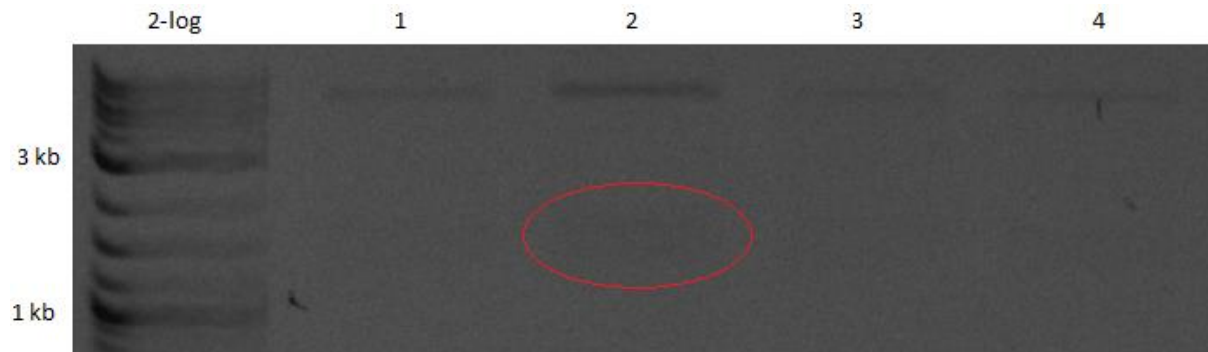


Figure 21 : Gel d'électrophorèse dont les couleurs ont été inversées pour plus de clarté présentant la restriction avec l'enzyme *Not1* de la construction HEC2pro:GUS-Vénus insérée dans le vecteur binaire pMODUL3408. En rouge est entouré le profil de restriction attendu prouvant bien la présence de HEC2pro:GUS-Vénus dans le vecteur binaire pMODUL3408.

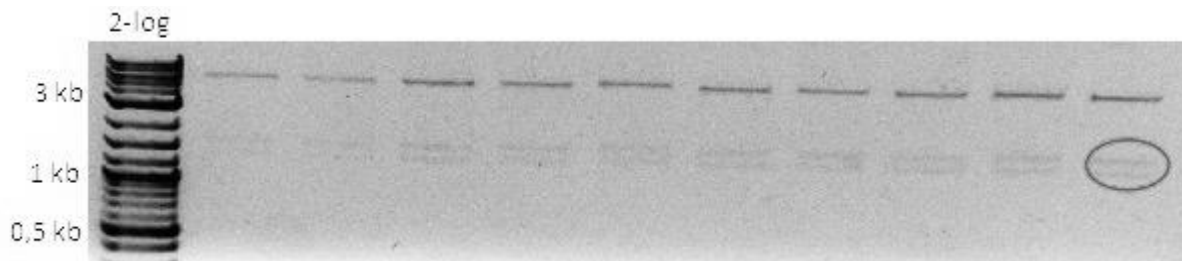


Figure 22 : Gel d'électrophorèse dont les couleurs ont été inversées pour plus de clarté présentant la restriction avec l'enzyme *Not1* de la construction PDF1pro:GUS-Vénus insérée dans le vecteur binaire pMODUL3408. En rouge est entouré le profil de restriction attendu prouvant bien la présence de PDF1pro:GUS-Vénus dans le vecteur binaire pMODUL3408.

Même si le signal est dur à percevoir, le vecteur binaire pMODUL3408 semble avoir bien intégré nos constructions HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus. La représentation des constructions génétiques générées dans le vecteur binaire apparaît dans la **Figure 23**.

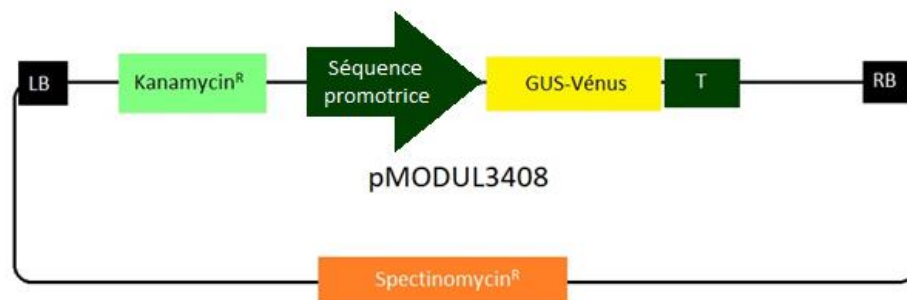


Figure 23 : représentation schématique de la construction génétique intégrant une de nos séquences promotrices soit HEC2pro soit PDF1pro flanquée du tag GUS-Vénus dans le vecteur binaire pMODUL3408 (la carte du vecteur binaire pMODUL3408 se trouve dans l'annexe n°2).

Ces constructions génétiques formées ont par la suite été transformées dans *Agrobacterium tumefaciens*. Après le développement des colonies d'*A. tumefaciens* supposées présenter nos constructions, une vérification supplémentaire a été réalisée à nouveau via l'enzyme de restriction Not1 pour voir si nos constructions y étaient bien présentes (**Figure 24** pour HEC2pro) (**Figure 25** pour PDF1pro).



Figure 24 : Gel d'électrophorèse présentant la restriction avec l'enzyme Not1 de la construction HEC2pro:GUS-Vénus inséré dans *A. tumefaciens*. Le contrôle positif est HEC2pro:GUS-Vénus inséré dans le vecteur binaire pMODUL3408 également digéré par Not1, on observe que tous les clones correspondent avec le contrôle positif.

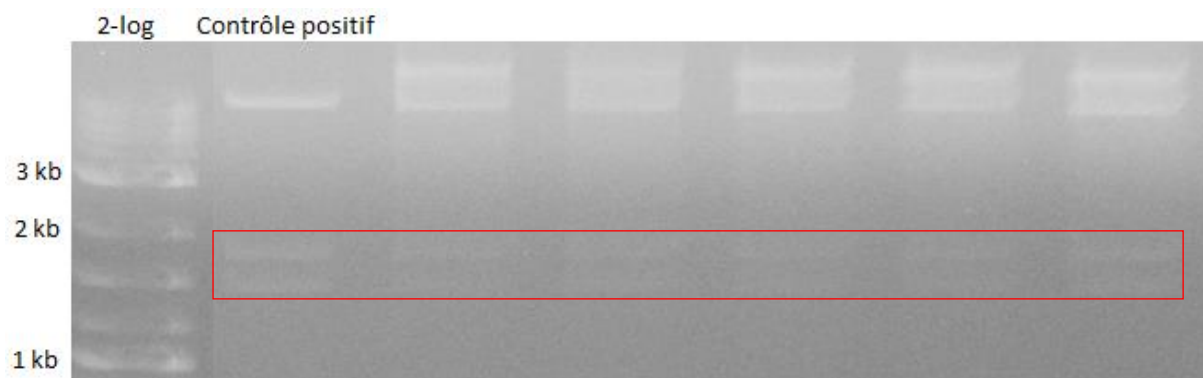


Figure 25 : Gel d'électrophorèse présentant la restriction avec l'enzyme Not1 de la construction PDF1pro:GUS-Vénus inséré dans *A. tumefaciens*. Le contrôle positif est PDF1pro:GUS-Vénus inséré dans le vecteur binaire pMODUL3408 également digéré par Not1, on observe que tous les clones correspondent avec le contrôle positif.

On observe sur la **Figure 24** et **Figure 25** que le profil de restriction des *A. tumefaciens* est en correspondance avec le contrôle positif issu de HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus insérés dans le vecteur binaire pMODUL3408 également digérés par Not1.

4.1.5 Observation des deux lignées de *N. tabacum* transgénique HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus par microscopie confocal et par coloration GUS.

La transformation des plantes de *N. tabacum* SR1 (voir point 3.2.4) a pu se réaliser grâce à nos constructions génétiques HEC2pro:GUS-Vénus et PDF1pro:GUS-Vénus présentes dans le vecteur binaire pMODUL3408 obtenues dans *Agrobacterium tumefaciens* qui permet le transfert de nos constructions génétiques dans une plante.

Une vingtaine de plantes transgéniques ont été générées pour chacune de nos constructions malgré des soucis de contamination (champignons, bactéries,...) dans les milieux de culture (voir point 3.2.3).

L'intérêt de ces plantes transgéniques est l'observation de l'activité du promoteur des gènes *PDF1* et *HEC2* dans la plante de tabac à l'aide du double tag GUS-Vénus

Pour les deux constructions, la première observation s'est effectuée sur les feuilles de ces jeunes plantes transgéniques par microscopie confocale afin d'observer le tag Vénus à une longueur d'onde d'excitation de 514nm émettant à 527nm. Mais malheureusement, aucun signal satisfaisant n'a pu être observé.

La seconde observation a été menée avec la coloration GUS sur différentes structures de la plante : des feuilles, des bourgeons apicaux et de jeunes racines.

La réussite de cette coloration devrait révéler une couleur bleue dans les parties de la plante où le gène *PDF1* est exprimé mais à nouveau, aucun signal significatif n'a pu être relevé dans les différentes parties observées de la plante.

Sur le côté, la réussite de la méthode de coloration GUS a été validée par l'utilisation d'un contrôle positif exprimant bien *GUS* et montrant la couleur bleue caractéristique de cette méthode.

La même expérience a été menée pour les plantes transgéniques HEC2pro:GUS-Vénus mais également aucun signal significatif de l'expression de *HEC2* n'a été détecté.

4.2 Génération de constructions génétiques en vue de créer une lignée transgénique de *N. tabacum* surexprimant le gène *CNR13* et une autre surexprimant le gène *PDF1* à l'aide d'un promoteur inductible au β -estradiol.

4.2.1 Amplification de la séquence de *CNR13* nommée CNR13seq et de la séquence de *PDF1* nommée PDF1seq.

Ces amplifications se sont faites sur base d'un cDNA issu de feuilles de *N. tabacum* SR1 à l'aide des primers forward et reverse spécifiques de la séquence de *CNR13* d'une taille de 945 bp et de la séquence de *PDF1* d'une taille de 1047 bp (Annexe n°1). Il est à noter que le primer forward de CNR13seq et celui de PDF1seq ont été modelés de telle manière qu'une queue CACC sera fournie à aux séquences de ces gènes afin de permettre leurs intégrations futures dans le vecteur pENTR D-TOPO.

Après quelques tentatives infructueuses d'amplifications de CNR13seq et de PDF1seq avec la FastStart DNA polymérase, CNR13seq et PDF1seq ont été amplifiés avec succès à l'aide de la Phusion DNA polymérase (**Figure 26**)

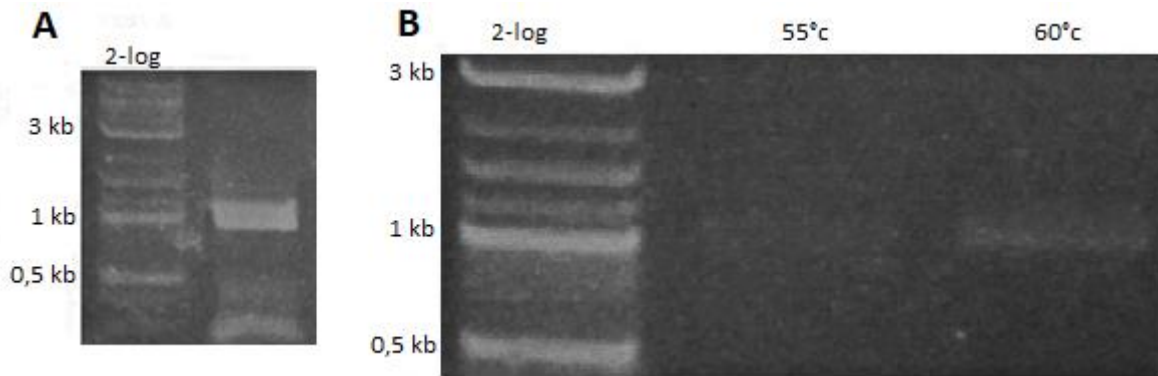


Figure 26 : (A) Gel d'électrophorèse avec l'amplification PCR de la séquence de CNR13 sur base d'un cDNA de feuilles de *N. tabacum* SR1. (B) Gel d'électrophorèse avec l'amplification PCR de la séquence de PDF1 sur base d'un cDNA de feuilles de *N. tabacum* SR1 avec une accommodation de la température d'hybridation à 60°C (conditions PCR détaillées dans l'annexe n°1).

4.2.2 Clonage de CNR13seq et PDF1seq dans le vecteur pENTR/D-TOPO

En vue de leurs intégrations dans pENTR/D-TOPO les produit PCR CNR13seq et PDF1seq ont été purifiés. Les quantités d'ADN contenues dans CNR13seq et PDF1seq après purification ont été quantifiées à l'aide du nanodrop nous révélant respectivement une concentration de 24 ng/μl et 30,6ng/μl. De ce fait, suivant le protocole de clonage dans pENTR/D-TOPO, il a été essayé d'intégrer CNR13seq et PDF1seq dans le vecteur pENTR/D-TOPO. La transformation a été maintes fois réalisée par électroporation mais aucune colonie ne s'est développée. De fait, une transformation par Heat shock (annexe n°6) a été effectuée et fût couronnée de succès même si pour PDF1seq seulement 4 colonies se sont développées sur la boîte de pétri par rapport à une quinzaine de colonies pour CNR13seq.

La vérification de l'insertion de CNR13seq dans pENTR/D-TOPO a été effectuée via deux méthodes. En premier lieu par amplification PCR (**Figure 27**).

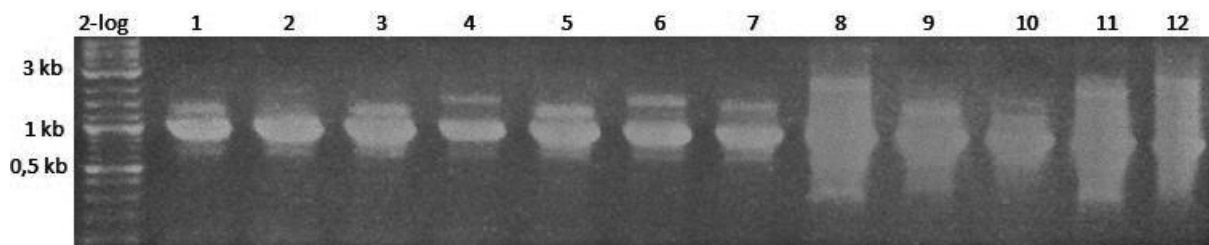


Figure 27 : Gel d'électrophorèse présentant l'amplification PCR de CNR13 dans les minipréparations d'ADN des colonies issues de la transformation des cellules thermocompétentes par le vecteur pENTR/D-TOPO ayant inséré CNR13seq. Tous les clones semblent positifs avec un signal vers 945 bp.

Ensuite les clones positifs ont été traités par l'enzyme de restriction Bstx1 dont deux sites sont présents dans l'insert afin d'avoir une seconde vérification qui devrait montrer 2 bandes sur le gel d'électrophorèse, une à ± 2839 bp et une autre à ± 686 bp (**Figure 28**).

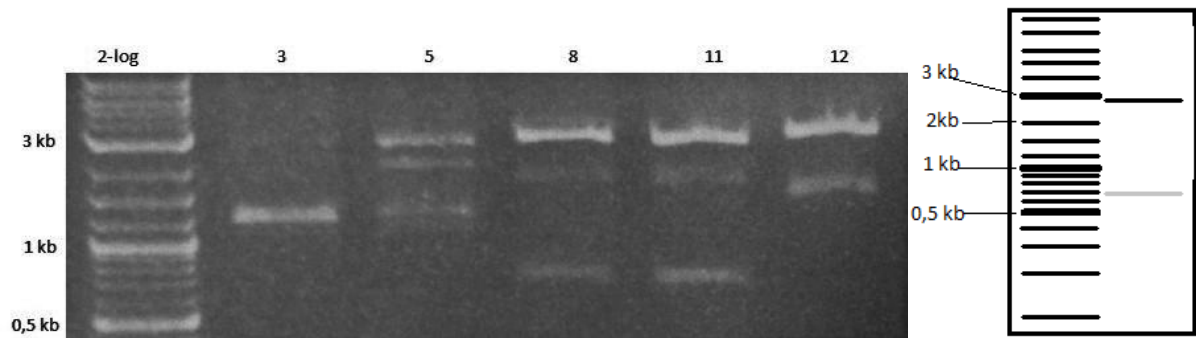


Figure 28 : A gauche, gel d'électrophorèse présentant la restriction par l'enzyme *Bstx1* de *CNR13seq* inséré dans le vecteur *pENTR/D-TOPO*. Les puits 8 et 11 présentent un profil similaire à celui attendu. A droite, profil de restriction *in silico* attendu de la restriction par l'enzyme *Bstx1* de *CNR13seq* dans *pENTR/D-TOPO* obtenu à l'aide du programme *ApE*.

Les deux profils positifs identifiés dans les puits 8 et 11 ont été envoyés au séquençage qui a confirmé la présence de *CNR13seq* dans la bonne orientation au sein du vecteur *pENTR/D-TOPO*.

Concernant la vérification de l'insertion de *PDF1seq* dans *pENTR/D-TOPO*, cette dernière s'est faite par restriction avec les enzymes de restriction *Asc1* et *Not1* libérant l'insert ce qui devrait résulter à l'apparition de 2 bandes sur le gel d'électrophorèse, une à ± 2555 bp et une autre à ± 1072 bp selon l'estimation *in silico* réalisée avec *ApE* (**Figure 29**).

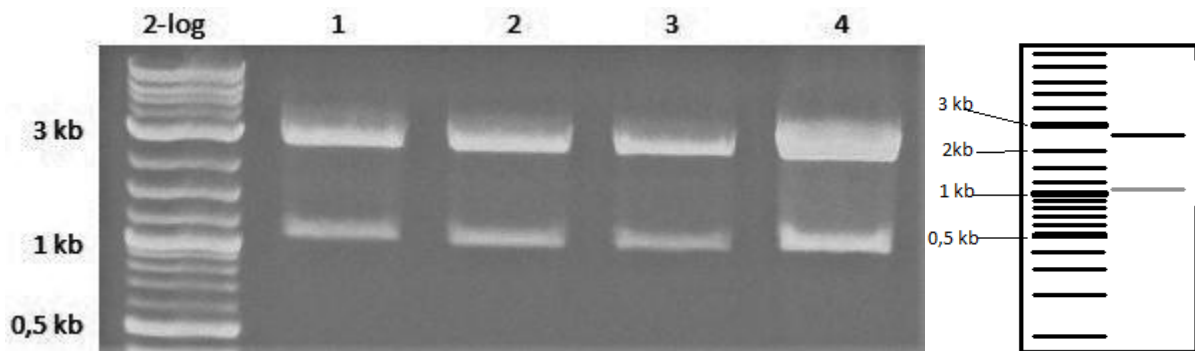


Figure 29 : A gauche, gel d'électrophorèse présentant la restriction par les enzymes de restriction *Asc1* et *Not1* de *PDF1seq* inséré dans le vecteur *pENTR/D-TOPO*. Tous les clones correspondent au profil attendu *in silico* sur *ApE* avec une forte concentration qui peut être relevées dans le quatrième puits dû à l'intensité des bandes. A droite, profil de restriction *in silico* attendu de la restriction par les enzymes *Asc1* et *Not1* de *PDF1seq* dans *pENTR/D-TOPO* obtenu à l'aide du programme *ApE*.

Le profil des 4 colonies traitées est positif mais dans le 4ième puits, la quantité en ADN semble beaucoup plus importante. Les échantillons du deuxième et quatrième puits ont été envoyés au séquençage. A l'analyse du résultat, l'échantillon du quatrième puits montrait une parfaite correspondance avec la séquence voulue avec la bonne orientation, confirmant bien l'intégration de *PDF1seq* dans *pENTR/D-TOPO*.

4.2.3. Clonage de CNR13seq et PDF1seq dans le vecteur binaire pMDC7

Suite à l'analyse des séquences, les meilleurs résultats ont été utilisés pour réaliser une réaction LR dans le vecteur binaire pMDC7 (annexe n°2) contenant le promoteur inducible au β -estradiol. L'introduction de l'insert repose sur une réaction de recombinaison entre les séquences attL présentes dans le vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO et les séquences attR présentes dans le vecteur de destination pMDC7 (**Figure 30**). Ce qui a permis l'échange de nos séquences d'intérêts avec le gène létal *ccdB*. Ensuite, cette nouvelle construction a été transformée par électroporation et étalée sur milieu LB où, au vu de la présence du gène létal dans le vecteur pMDC7 non recombiné, seul les vecteurs pMDC7 ayant intégré CNR13seq ou PDF1seq sont censés être présents dans les colonies se développant sur milieu LB + Spectinomycine.

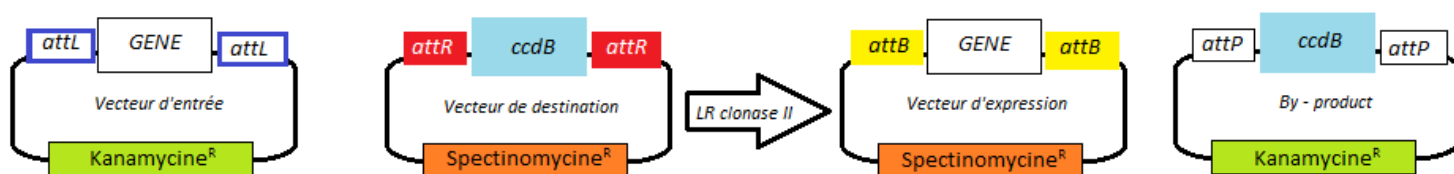


Figure 30 : Principe de la réaction LR. La réaction de recombinaison catalysée par la LR clonase II permet l'échange des séquences entre les séquences de recombinaison attL et attR présentes dans le vecteur d'entrée et de destination respectivement. Après réaction, les bactéries ayant reçu un plasmide non recombiné mourront étant donné que la séquence *ccdB* code pour un gène létal.

Après minipréparation d'ADN des colonies obtenues, des vérifications de l'insertion de CNR13seq par restriction à l'aide de l'enzyme de restriction EcoR1 (**Figure 31**) ainsi que par amplification PCR (**Figure 32**) ont été menées.

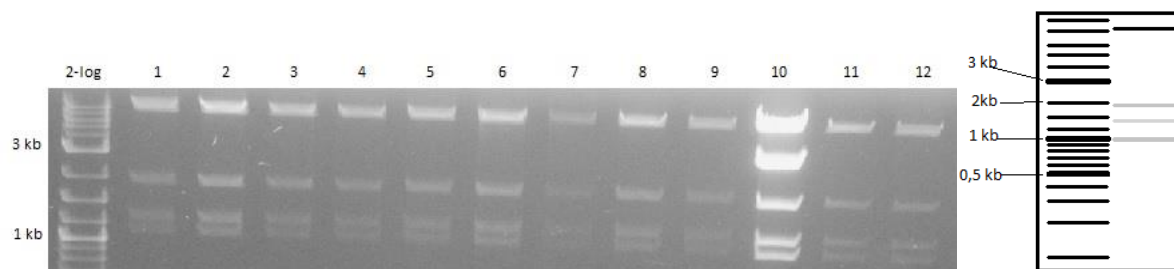


Figure 31 : A gauche, gel d'électrophorèse présentant la restriction par *EcoR1* de la construction ESTpro:CNR13seq dans pMDC7. Le résultat d'un puits n°10 résulte probablement d'une digestion partielle de l'ADN. A droite, profil de restriction *in silico* attendu de la restriction par l'enzyme *EcoR1* de CNR13seq dans pMDC7 obtenu à l'aide du programme ApE.

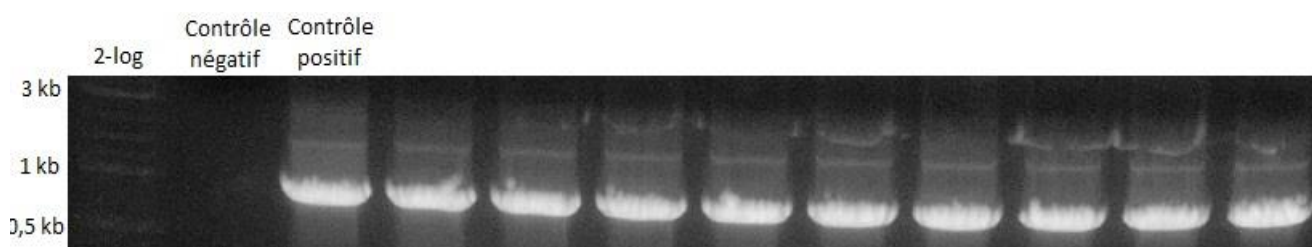


Figure 32 : Gel d'électrophorèse présentant l'amplification PCR de CNR13 sur la construction ESTpro:CNR13seq dans pMDC7. Tous les clones semblent positifs avec un signal vers 945 bp. Le contrôle négatif est simplement l'amplification menée sur de l'eau distillée et le contrôle positif est l'amplification PCR de CNR13seq dans pENTR/D-TOPO dont la présence de CNR13seq a été validée par séquençage.

Suite à ces analyses, notre vecteur binaire présente bien notre construction ESTpro:CNR13seq (**Figure 32**) dans tous les clones.

Concernant PDF1seq, une vérification de l'insertion de notre construction a été menée par restriction à l'aide de l'enzyme de restriction Pvu2 (**Figure 33**) et pour être complémentaire une vérification par amplification PCR a été menée (**Figure 34**).

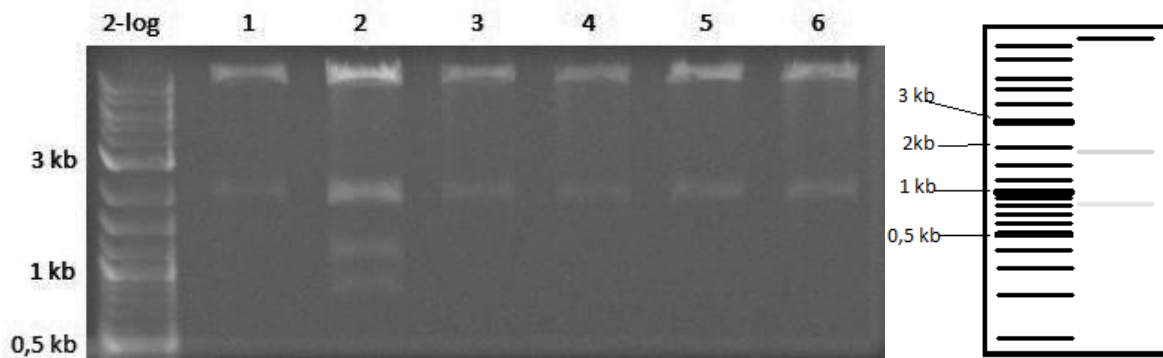


Figure 33 : A gauche, gel d'électrophorèse présentant la restriction par Pvu2 de la construction ESTpro:PDF1seq dans pMDC7. A droite, profil de restriction in silico attendu de la restriction par l'enzyme Pvu2 de PDF1seq dans pMDC7 obtenu à l'aide du programme ApE. Il est à noter que la bande à 2 kb ne peut être présente que si PDF1seq a été intégré dans pMDC7 sinon la restriction du vecteur vide pMDC7 donnerait une bande à 1 kb.

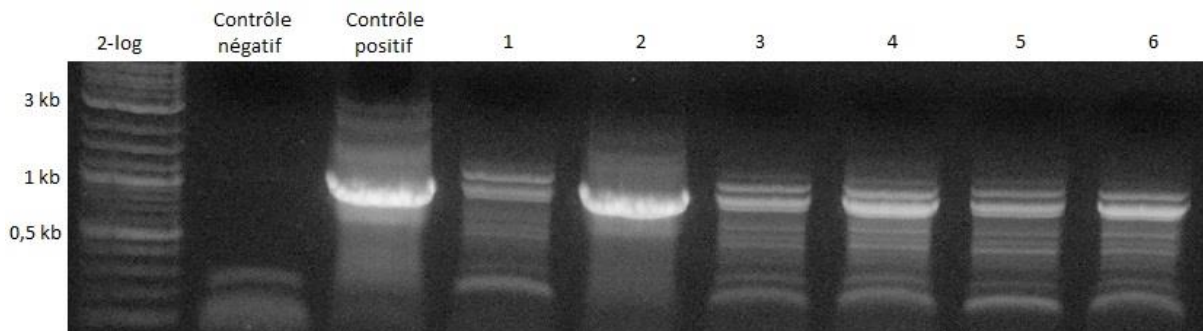


Figure 34 : Gel d'électrophorèse présentant l'amplification PCR de PDF1 sur la construction ESTpro:PDF1seq dans pMDC7. Un signal correspondant à 1047 bp semble être présent dans tous les clones mais seul le clone n°2 présente un signal unique avec un profil similaire au contrôle positif. Le contrôle négatif est simplement l'amplification menée sur de l'eau distillée et le contrôle positif est l'amplification PCR de PDF1seq dans pENTR/D-TOPO dont la présence de PDF1seq a été validée par séquençage.

Suite à ces analyses, notre vecteur binaire présente bien notre construction ESTpro:PDF1seq dans le 2ième puits.

La représentation des constructions génétiques générées dans le vecteur binaire apparait dans la **Figure 35**.

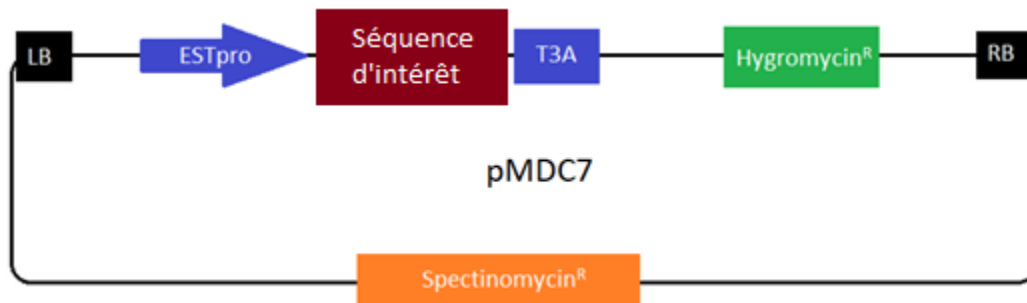


Figure 35 : représentation schématique de la construction génétique intégrant une de nos séquences d'intérêt soit CNR13seq soit PDFseq flanquées d'un promoteur inducible au β -estradiol dans le vecteur binaire pMDC7.

Par après, nos constructions génétiques générées ont été transformées dans *Agrobacterium tumefaciens*.

Suite à cela, des plantes de *N. tabacum* ont été transformées avec nos constructions mais malheureusement aucune plante n'a survécu. L'expérience a été réitérée et actuellement des cals cellulaires se développent sur les feuilles de tabac transformées (**Figure 36**).

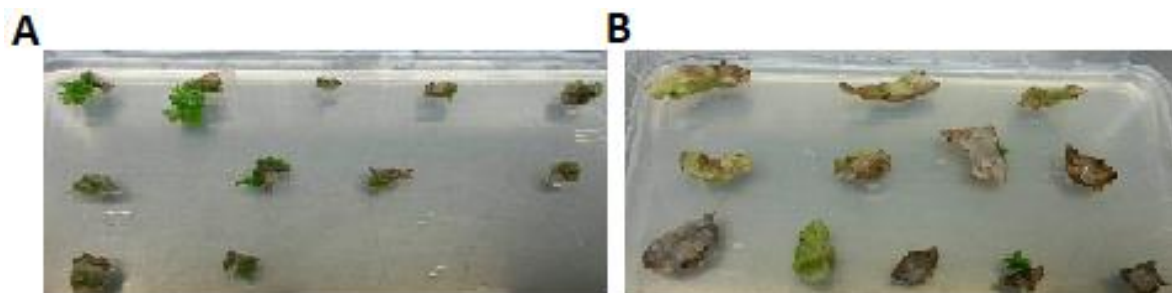


Figure 36 : Photos de cals cellulaires de tabac transgénique ayant intégré la construction (A) ESTpro:CNR13seq et (B) ESTpro:PDF1seq à l'aide d'*A. tumefaciens*. Photos prises le 15/12/2017.

4.3 Génération de constructions génétiques en vue de créer une lignée transgénique de *N. tabacum* surexprimant le gène *HEC2* à l'aide d'un promoteur inducible au β -estradiol.

4.3.1 Amplification de la séquence de *HEC2* nommée HEC2seq

Cette amplification s'est faite sur base d'un cDNA issu de feuilles de *N. tabacum* SR1 à l'aide des primers forward et reverse spécifiques de la séquence de *HEC2* d'une taille de 768 bp (Annexe n°1). Il est à noter que le primer forward de HEC2seq a été modelé de telle manière qu'une queue CACC soit ajoutée en amont de la séquence codante d'*HEC2* afin de permettre son intégration future dans le vecteur pENTR D-TOPO.

Après quelques tentatives d'amplifications infructueuses avec la FastStart DNA polymérase, La séquence codante d'*HEC2* a finalement été amplifiée avec succès à l'aide de la Phusion DNA polymérase (**Figure 37**)

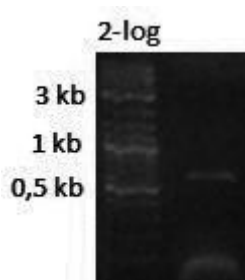


Figure 37 : Gel d'électrophorèse avec l'amplification PCR de la séquence de *HEC2* sur base d'un cDNA de feuilles de *N. tabacum* SR1 à l'aide de la Phusion DNA polymérase.

4.3.2 Clonage de HEC2seq dans le vecteur pENTR/D-TOPO

En vue de son intégration dans pENTR/D-TOPO, la séquence codante d'*HEC2* amplifiée par PCR a été quantifiée au nanodrop, nous révélant une concentration de 20,3 ng/ μ l. Suivant le protocole de clonage dans pENTR/D-TOPO, il a été tenté à maintes reprises d'intégrer HEC2seq mais sans résultats, que ce soit par transformation avec des cellules électrocompétentes ou thermocompétentes.

4.4 Constructions génétiques permettant d'altérer l'expression du gène *CNR13* par interférence ARN de façon inducible

4.4.1 Modélisation de l'amiRNA_*CNR13* par amplification PCR.

La construction de l'amiRNA a été réalisée suivant le protocole de Rebecca Schwab (2005) (http://www4.ncsu.edu/~rgfranks/research/protocols/artificial%20miRNAs/Cloning_of_artificial_miRNAs.pdf). Vu que deux pools d'amorces PCR étaient à disposition pour former un amiRNA visant *CNR13*, la création de deux constructions amiRNA a été réalisée, amiRNA_*CNR13* et amiRNA_*CNR13*_2 par triple PCR (**Figure 38**)

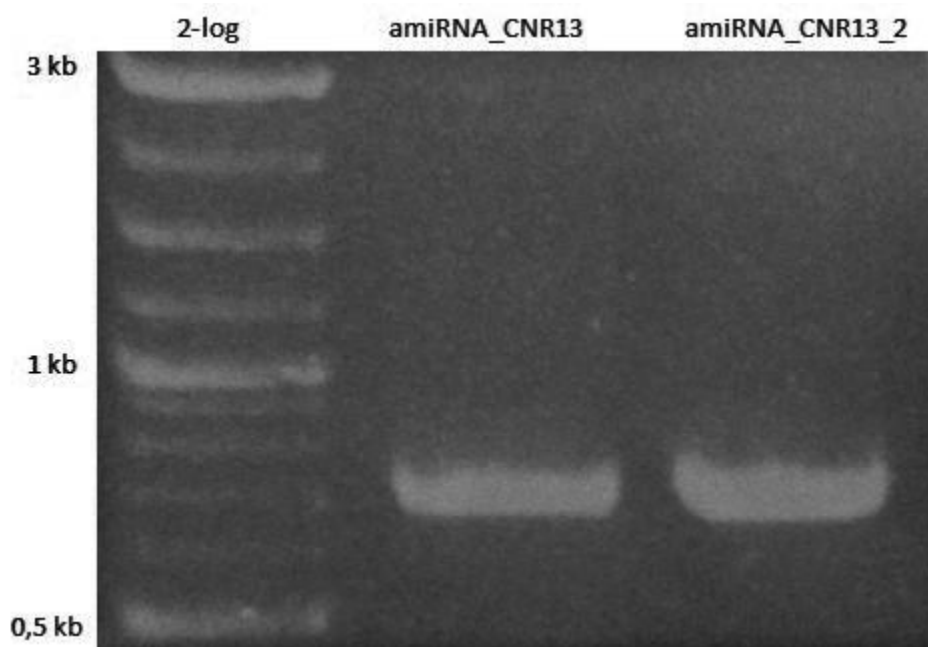


Figure 38 : Gel d'électrophorèse avec l'amplification PCR de deux séquence amiRNA pour le gène CNR13. Les conditions d'amplification PCR se retrouvent dans l'annexe n°1 : « Construction visée : lignée amiRNA »

4.4.2 Clonage de amiRNA_CNR13 et amiRNA_CNR13_2 dans le vecteur pENTR/D-TOPO

En vue de leurs intégrations respectives dans pENTR/D-TOPO les produit PCR amiRNA_CNR13 et amiRNA_CNR13_2 ont été purifiés et quantifiés à l'aide du nanodrop, nous révélant une concentration de 186,7 ng/μl pour amiRNA_CNR13 et 160 ng/μl pour amiRNA_CNR13_2. Les deux séquences amiRNA ont ensuite été intégrées dans pENTR/D-TOPO par TOPO cloning.

La vérification de l'insertion des amiRNAs dans pENTR/D-TOPO s'est faite par amplification PCR (**Figure 39**). Il est à noter que juste une seule colonie a poussée pour la construction amiRNA_CNR13 dans pENTR/D-TOPO.

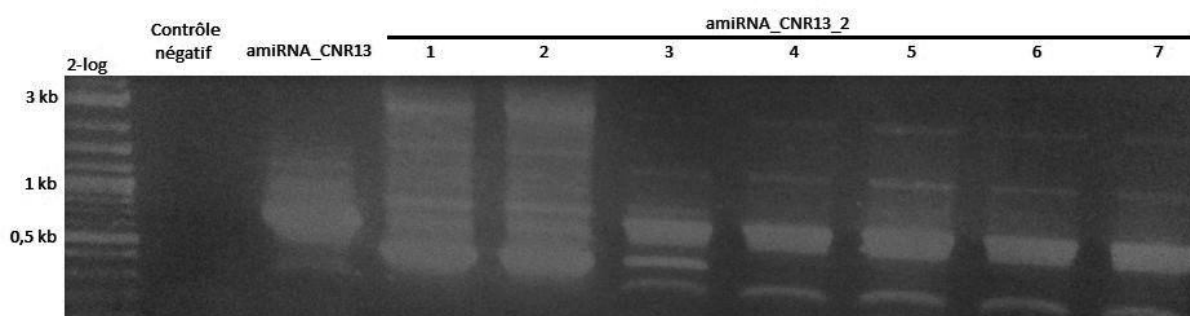


Figure 39 : Gel d'électrophorèse présentant l'amplification PCR de l'amiRNA de CNR13 sur les constructions amiRNA_CNR13 et amiRNA_CNR13_2 intégré dans pENTR/D-TOPO. Le contrôle négatif est simplement l'amplification menée sur de l'eau distillée.

De là, les meilleurs résultats (l'amiRNA_CNR13 et le clone n°7 pour l'amiRNA_CNR13_2) pour chacune des constructions ont été envoyés au séquençage qui a bien validé la présence de nos constructions amiRNA d'intérêts dans le vecteur pENTR/D-TOPO.

4.4.3. Clonage de amiRNA_CNR13 et amiRNA_CNR13_2 dans le vecteur binaire pMDC7

Suite à la validation des séquences présentes dans le vecteur pENTR/D-TOPO ces dernières ont été transférées par réaction LR dans le vecteur binaire pMDC7 contenant le promoteur inductible au β -estradiol comme expliqué au point 4.2.3.

Au vu de la présence du gène létal *ccdB* dans le vecteur pMDC7 non recombiné, seul les vecteurs pMDC7 ayant intégré l'amiRNA de *CNR13* sont censés être présents dans les colonies se développant sur milieu de culture bactérienne.

Après minipréparation d'ADN des colonies obtenues, une vérification de l'insertion de nos constructions a été menée par PCR (**Figure 40**)

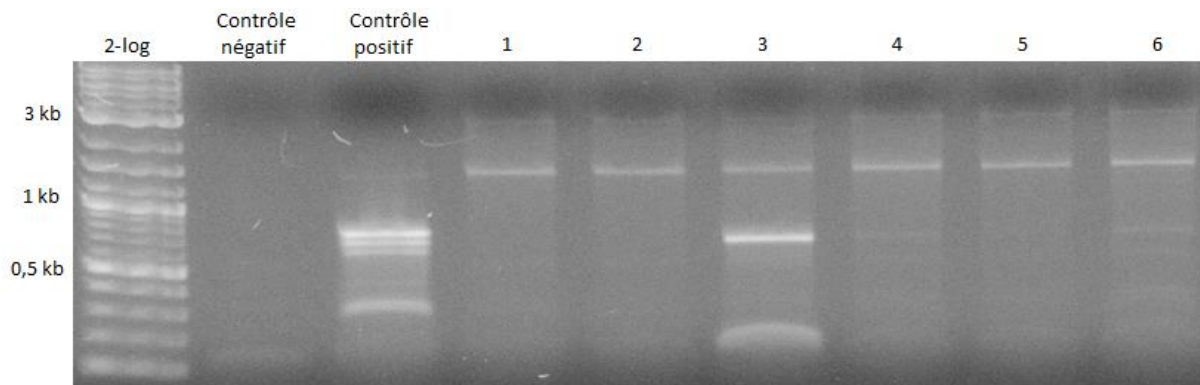


Figure 40 : Gel d'électrophorèse présentant l'amplification PCR de l'amiRNA de *CNR13* sur la constructions *ESTpro:amiRNA_CNR13* dans *pMDC7*. Il semblerait que seul le troisième clone possède notre construction d'intérêt au vu de son signal équivalent au contrôle positif. Le contrôle négatif est simplement l'amplification menée sur de l'eau distillée et le contrôle positif est l'amplification PCR de l'amiRNA de *CNR13* dans *pENTR/D-TOPO* dont la présence de *amiRNA_CNR13* a été validée par séquençage.

Suite à ces analyses, notre vecteur binaire présente bien notre construction *ESTpro:amiRNA_CNR13* pour le clone n°3 (**Figure 40**). La représentation de la construction génétique générée *ESTpro:amiRNA_CNR13* dans le vecteur binaire pMDC7 apparaît dans la **Figure 41**.

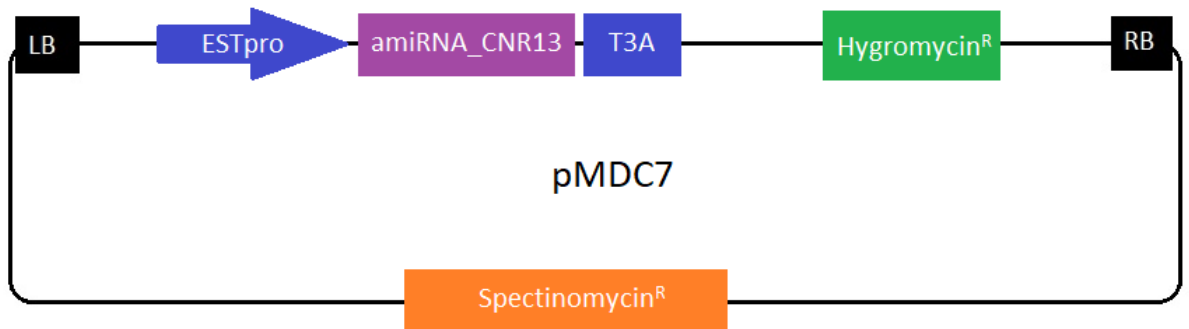


Figure 41 : représentation schématique de la construction génétique ESTpro:amiRNA_CNR13 dans le vecteur binaire pMDC7.

Par contre, l'intégration de l'amiRNA_CNR13_2 dans pMDC7 a été effectuée deux fois sans succès puis a été mise sur le côté afin de se concentrer sur la construction ESTpro:amiRNA_CNR13 générée. La construction réussie a ensuite été transformée dans *Agrobacterium tumefaciens*.

Suite à cela, des plantes de *N. tabacum* ont été transformées avec notre construction mais malheureusement aucune plante n'a survécu. L'expérience a été répétée et actuellement des cals cellulaires se développent sur les feuilles de tabac transformées (**Figure 42**).



Figure 42 : Photo de cals cellulaires de tabac transgénique ayant intégré la construction ESTpro:amiRNA_CNR13 à l'aide d'*A. tumefaciens*. Photo prise le 15/12/2017.

4.5 Amplification PCR menée sur base de cDNA de trichomes matures pour les séquences des gènes PDF1, CNR13 et HEC2.

Suite à l'extraction de trichomes matures de *Nicotiana tabacum* et à la transformation en cDNA de ces derniers réalisée par Aldana Ramirez et Thomas Bouvy, il a été possible d'effectuer une amplification PCR pour la séquence de nos gènes *CNR13*, *PDF1* et *HEC2* sur cette base au lieu d'utiliser du cDNA de feuilles de tabac comme précédemment (**Figure 43**). Les conditions PCR utilisées sont les mêmes que celles de l'annexe n°1.

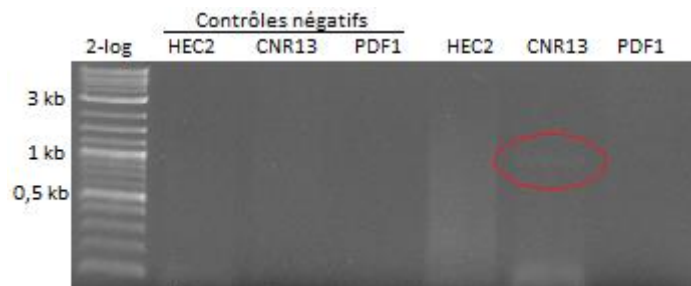


Figure 43 : Gel d'électrophorèse présentant l'amplification PCR d'un cDNA de trichomes matures pour les séquences de *HEC2*, *CNR13* et *PDF1*. Entouré en rouge, une faible bande aux environs de 1 kb correspond à l'amplification réussie de *CNR13*. Le contrôle négatif est simplement l'amplification menée sur de l'eau distillée (les conditions PCR sont dans l'annexe n°1).

On observe sur la figure ci-dessus que seule la séquence de *CNR13* est amplifiée dans les trichomes matures de *N. tabacum* confirmant bien la présence de ce gène dans les trichomes.

En complément à ce résultat, il a été réalisé par le mémorant Thomas Bouvy plusieurs amplifications PCR pour la séquence de *HEC2* sur différentes matrices accompagnées de contrôle positif à l'aide de l'actine (**Figure 44**).

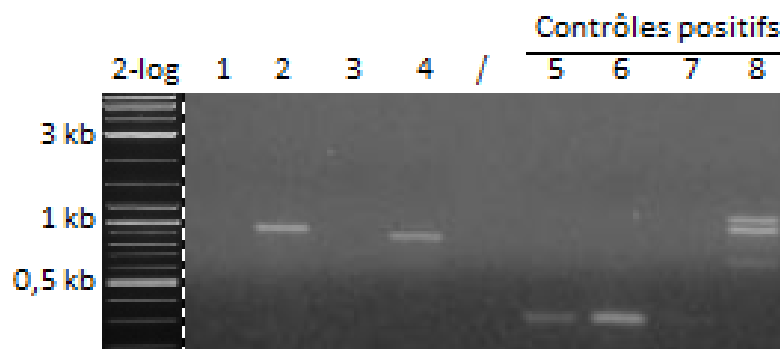


Figure 44 : (Puits de 1 à 4) Gel d'électrophorèse présentant l'amplification PCR de la séquence de *HEC2* sur base : d'un cDNA de trichomes matures de *N. tabacum* pour le puits n°1, de cDNA de foliole de *N. tabacum* pour le puits n°2, d'ARN de trichome mature de *N. tabacum* pour le puits n°3 et d'ADN génomique de *N. tabacum* pour le puits n°4. (Puits de 5 à 8) Amplification PCR de l'actine sur les mêmes bases que les amplifications précédentes servant de contrôle positif précédentes. De fait le puits 5 est le contrôle positif du puits 1, le puits 6 est le contrôle positif du puits 2, le puits 7 est le contrôle positif du puits 3 et le puits 8 est le contrôle positif du puits 4 (les conditions PCR sont les mêmes que pour la séquence *HEC2* dans l'annexe n°1).

On observe sur la figure ci-dessus que l'amplification PCR de *HEC2* dans les puits n°1 et n°3 utilisant respectivement du cDNA de trichomes matures et de l'ARN de trichomes matures de *N. tabacum* ne provoque aucune amplification ce qui est en correspondance avec ce qui est observé sur la **Figure 43**. Par contre pour le puits n°2 cette même amplification PCR prenant pour base du cDNA de folioles de *N. tabacum* porte fruit. Il en est de même pour le puits n°4 dont la matrice d'amplification est de l'ADN génomique de *N. tabacum*.

5 Discussion

L'objectif global de ce mémoire était de parvenir à une meilleure connaissance et compréhension quant au développement des trichomes multicellulaires glandulaires de *Nicotiana tabacum* au travers de l'étude des gènes *HEC2*, *PDF1* et *CNR13*.

Le choix de ces gènes émane d'une liste de gènes up-régulés dans une plante de tabac surexprimant le gène *Woolly*, présentant suite à cette surexpression un phénotype de développement anormal des trichomes (Yang et al., 2015).

L'étude de ces gènes s'est faite par la réalisation de diverses constructions génétiques qui devait permettre la création de lignées transgéniques stables de tabac.

En premier lieu, la création de lignées rapportrices pour *PDF1* et *HEC2* dont les promoteurs propres ont été flanqués d'un tag GUS-Vénus afin de pouvoir déterminer le profil d'activité du promoteur de ces gènes.

En second lieu, la création de lignées surexprimant les gènes *PDF1*, *HEC2* et *CNR13* avec un promoteur inductible au β -estradiol afin d'observer l'impact de la surexpression de ces gènes sur le phénotype des trichomes de tabac.

Et dernièrement, la création d'une lignée entraînant un silencing du gène *CNR13* par technique amiRNA avec un promoteur inductible au β -estradiol afin d'observer l'impact du silencing de ce gène sur le phénotype des trichomes de tabac.

5.1 Plantes transgéniques de *Nicotiana tabacum* rapportrices de l'expression des gènes *HEC2* et *PDF1* à l'aide d'un tag GUS-Vénus.

Les constructions génétiques rapportrices de l'expression des gènes *HEC2* et *PDF1* ont pu être générées avec succès dans le vecteur binaire pMODUL3408 comme montré au point 4.1.4. L'insertion de cette construction a même été prouvée dans les colonies d'*Agrobacterium tumefaciens* qui ont servi à l'intégration de nos constructions dans la plante de *N. tabacum* (voir point 4.1.4).

Les plantes infectées par *A. tumefaciens* ont été placées sur un milieu de culture (voir point 3.2.3) traité avec un antibiotique, la kanamycine. Du fait de la présence de cet antibiotique, seules les plantes ayant intégré notre construction génétique présentant un tag GUS-Vénus mais aussi un gène de résistance à la kanamycine sont censées se développer.

Au vu du grand nombre de plantes matures générées (plus de 20 pour chacune des constructions), il y a de grandes chances que parmi celles-ci certaines aient intégré notre construction génétique. Même si pour le moment, aucun signal par révélation Vénus ou coloration GUS n'a été détecté.

5.2 Constructions génétiques générées comportant un promoteur inductible au β -estradiol permettant de surexprimer les gènes *PDF1*, *CNR13*, *HEC2* et permettant d'induire le silencing d'un gène à l'aide d'un amiRNA pour le gène *CNR13*.

La surexpression ou l'inhibition de l'expression de gènes à l'aide d'un promoteur inductible au β -estradiol offre l'avantage de contrôler l'expression de nos gènes cible et de fait, d'observer l'impact de la surexpression ou l'inhibition de l'expression du gène dans la plante de *N. tabacum* au moment désiré.

Pour la surexpression des gènes *PDF1* et *CNR13*, les constructions génétiques ESTpro:PDF1seq et ESTpro:CNR13seq avec un gène de résistance à l'hygromycine ont pu être générées (voir point 4.2.3) dans le vecteur binaire pMDC7, ce qui ne fut pas le cas pour le gène *HEC2* où juste l'amplification PCR du gène a été réussie (voir point 4.3.1).

Concernant l'inhibition de l'expression du gène *CNR13* par technique amiRNA, sur deux constructions amiRNAs amplifiées par triple PCR et introduites dans le vecteur pENTR/D-TOPO, une seule a pu être recombinée dans le vecteur binaire pMDC7 pour offrir la construction finale, ESTpro:amiRNA_CNR13 (**Figure 40**).

Les trois constructions réussies ont été intégrées dans les plantes de tabac et ont commencé à développer des cals cellulaires (**Figure 36 & Figure 42**) sur les milieux de culture traités à l'hygromycine. Par contre très peu de cals se sont développés par rapport au nombre de plantes infectées.

Il est aussi important de citer que lors de l'amplification PCR d'un cDNA de trichomes matures de *N. tabacum* SR1 avec les primers pour les gènes *PDF1*, *HEC2* et *CNR13*, seul l'amplification de *CNR13* a été obtenue confirmant la présence de ce gène dans les trichomes matures de *N. tabacum* (**Figure 43**).

Pour compléter cette donnée, des PCR menées pour le gène *HEC2* (réalisées par Thomas Bouvy) sur différentes structures du tabac accompagnent ce résultat mais indiquent une expression assez marquée de *HEC2* dans des cDNA de foliole, ce qui n'écarte pas l'hypothèse d'une expression de *HEC2* dans les trichomes en développement (**Figure 44**).

6. Perspectives

6.1 Intérêt des lignées rapportrices porteuses d'un tag GUS-Vénus

A l'heure actuelle, aucun signal pour les lignées transgéniques rapportrices (*PDF1* et *HEC2*) n'a été enregistré mais cela ne signifie pas pour autant que les constructions soient défectueuses. Une raison serait que les gènes se manifestent à un stade plus tardif du développement de la plante de tabac.

Cette supposition s'appuie sur l'expression connue des gènes étudiés dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana* dont les informations peuvent être facilement obtenues sur la base de données : " <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>". Pour *HEC2*, son expression semble être active seulement pendant certaines étapes du développement floral de la plante ce qui pourrait également être le cas pour *N. tabacum* expliquant ainsi l'absence d'expression détectée dans nos plantes transgéniques. Des lignées transgéniques rapportrice *HEC2p::GUS* générée chez *A. thaliana* par Gremski et al. (2007) montre cet expression au niveau des stigmates, du septum, du pollen et des nectaires (Gremski et al., 2007).

Mais pour *PDF1*, si on suit le même raisonnement que pour *HEC2* chez *A. thaliana*, une expression aurait dû être observée au SAM (shoot apical meristem) où son expression est censée être assez active selon le site :

"http://bar.utoronto.ca/efp2/Arabidopsis/Arabidopsis_eFPBrowser2.html". Une expérience de coloration GUS menée par Abe et al. (1999) sur des plantes d'*A. thaliana* transgénique *PDF1p::GUS* permis de mettre en évidence l'expression de *PDF1* dans le méristème apical et les jeunes feuilles d'une plantule de 8 jours ainsi que sur différentes structures du système floral (Abe et al., 1999). Mais étant ici avec *N. tabacum*, l'expression de *PDF1* ne se remarquera peut-être que lors du développement floral.

Un exemple à citer montrant l'intérêt des gènes impliqués en partie dans le développement floral est la surexpression de *AmMIXTA* dans la plante de *Nicotiana tabacum* qui provoqua l'apparition de trichomes glandulaires longs surnuméraires par rapport à la plante wild type (Glover et al. 1998) alors que chez *Antirrhinum majus MIXTA* a pour rôle la formation de cellules coniques dans les pétales de la plante.

De ce fait une analyse sur les organes floraux une fois que ceux-ci se seront développés pourrait nous révéler la présence de nos gènes que ce soit sur les trichomes de la fleur ou ailleurs. La localisation de l'expression de ces gènes dans la plante de tabac reste une information intéressante et utile pour un autre projet de recherche dans le cas où une expression de ces gènes est détectée dans une partie de la plante inattendue.

Aussi, la création d'autres lignées transgéniques de tabac rapportrices de l'expression d'autres gènes supposés intervenir dans l'initiation et le développement des trichomes issus de la liste de gènes up-régulés dans la plante de tabac surexprimant le gène *Woolly* présente une piste à explorer (Yang et al., 2015).

6.2 intérêt de la formation de lignées de plantes de *N. tabacum* transgéniques munie d'un promoteur inductible au β -estradiol permettant d'actionner la surexpression ou l'inhibition de l'expression de gènes clés dans le développement des trichomes.

Il est tout d'abord important de rappeler que *Nicotiana tabacum* est un modèle fort intéressant pour l'ingénierie métabolique vu que ce dernier synthétise un nombre important de précurseurs naturels (IPP/DMAPP) au sein de ses trichomes glandulaires (Huchelmann et al., 2017). De fait, l'étude de gènes susceptibles d'intervenir dans l'initiation et le développement des trichomes au travers de l'observation de plantes transgéniques présentant une surexpression ou une inhibition de ces gènes semble être une décision de choix. La création de ce type de plantes transgéniques selon ces critères permettrait de mieux comprendre la formation des trichomes sur la plante de *N. tabacum* afin de pouvoir être un jour en mesure de réguler à souhait la formations des trichomes glandulaires de cette plante.

Malgré qu'aucune des lignées de tabac transgéniques porteuse d'un promoteur inductible au β -estradiol pour les séquences ciblées n'aient pu être amenée jusqu'à terme, il est tout de même possible de spéculer sur le ressorti de l'application de la surexpression de ces gènes ainsi que de l'effet de leur silencing en se basant sur les résultats obtenus dans la littérature sur d'autres plantes modèles ou en se basant sur la fonction du gène.

Pour la surexpression du gène *HEC2* chez *Arabidopsis thaliana*, il a été rapporté que les plantes transgéniques ayant intégré la construction 35s::*HEC2* démontraient un phénotype avec des fleurs portant au niveau du carpelle plus de stigmates (Gremski et al., 2007) laissant supposer que la surexpression de *HEC2* chez *Nicotiana tabacum* pourrait mener à un phénotype augmenté en stigmates et potentiellement en trichomes dont la structure est fort proche de celle des stigmates. Entre autre, l'expression de *HEC2* détectée dans des folioles de tabac (**Figure 44**) laisse présager un impact au niveau du développement foliaire et des jeunes structures en développement sur les feuilles de tabac tels que les trichomes et les stomates.

Concernant la construction de lignées transgéniques surexprimant le gène *PDF1* chez *Arabidopsis thaliana*, aucun article mentionnant la surexpression de ce gène n'a su être trouvé mais selon les lignées transgéniques rapportrices de l'expression de ce gène à l'aide d'un tag GUS (Abe et al., 1999), il est possible d'émettre des hypothèses sur la résultante de la surexpression de ce gène. De fait, il serait attendu de par la surexpression de *PDF1* d'observer des altérations au niveau des inflorescences, du développement protodermique ou du système floral dans notre lignée de tabac transgénique.

En dernier lieu, un article récent rapporte que le gène *CNR13* (pour lequel des lignées transgéniques surexprimant et inhibant son expression sont en cours de formation dans *N. tabacum*) présente un impact sur le développement des trichomes de la plante de maïs (Rosa et al., 2017). En effet, suite à l'utilisation d'éthyl méthanesulfonate (EMS), agent chimique mutagène créant des mutations aléatoires, la plante de maïs transgénique nommée « narrow odd dwarf » (nod) associée avec la mutation du gène *CNR13* a été créée. Celle-ci présente une diminution de prolifération cellulaire, des cellules plus petites et une différenciation cellulaire altérée qui s'observe au niveau des stomates et des trichomes. Par conséquent, on s'attend à observer, dans nos lignées transgéniques de tabac dans lesquelles l'expression de *CNR13* est affectée, un impact sur la différenciation cellulaire des structures spécialisées que sont les stomates et les trichomes.

Pour être complémentaire dans nos données, il serait intéressant par la suite de former un silencing amiRNA pour *HEC2* et *PDF1*. La formation de lignées transgéniques de tabac inhibant l'expression de ces deux gènes pourrait apporter des informations qui permettraient de mieux interpréter les résultats futurs des lignées surexprimant ces gènes. De plus comme pour *HEC2*, réaliser une analyse PCR sur du cDNA de trichomes matures et de cDNA de foliole de *N. tabacum* permettrait de mettre en évidence l'expression de *PDF1*, *CNR13* ainsi que d'autres gènes dans ces structures.

7. Conclusion

Le but de ce mémoire était d'obtenir des lignées transgéniques de tabac permettant l'observation, l'augmentation et l'inhibition de l'expression de gènes susceptibles d'intervenir dans l'initiation et le développement des trichomes glandulaires de *Nicotiana tabacum*.

Mais à l'heure actuelle, des plantes transgéniques ayant intégré les constructions génétiques *PDF1pro:GUS-Vénus* et *HEC2pro:GUS-Vénus* ont pu être générées. L'analyse de ces lignées rapportrices n'a rien démontré jusqu'à présent mais on ne peut exclure qu'une expression à un stade plus tardif du développement de la plante puisse être observée.

Concernant la réalisation de plantes transgéniques comprenant un promoteur inductible au β -estradiol permettant d'induire l'expression ou l'inhibition d'un gène selon la construction génétique insérée, seules les constructions génétiques finales dans le vecteur binaire pMDC7 ont été obtenues pour la surexpression de l'expression de *PDF1*, de *CNR13* et l'inhibition de l'expression de *CNR13* par technique amiRNA. Des cals cellulaires de *N. tabacum* se sont développés et sont en cours de sélection. Comme pour *HEC2*, l'analyse de la présence des autres gènes dans du cDNA de trichomes est une donnée à récolter pour souligner la pertinence de l'étude de ces gènes dans l'initiation et le développement des trichomes.

En conclusion, le mémoire réalisé constitue une bonne base de travail mais ne représente que les prémices à de nombreuses constructions à réaliser et à analyser dans les années à venir afin d'obtenir toutes les données permettant de comprendre au mieux l'initiation et le développement des trichomes glandulaires chez *Nicotiana tabacum*.

Bibliographie

- Abe, M., Takahashi, T., Komeda, Y., 1999. Cloning and characterization of an L1 layer-specific gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 40, 571–580.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62:293-300. PMID 14888646
- Cui, J.-Y., Miao, H., Ding, L.-H., Wehner, T.C., Liu, P.-N., Wang, Y., Zhang, S.-P., Gu, X.-F., 2016. A New Glabrous Gene (*csgl3*) Identified in Trichome Development in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *PLOS ONE* 11, e0148422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148422>
- Glas, J., Schimmel, B., Alba, J., Escobar-Bravo, R., Schuurink, R., Kant, M., 2012. Plant Glandular Trichomes as Targets for Breeding or Engineering of Resistance to Herbivores. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 17077–17103. <https://doi.org/10.3390/ijms131217077>
- Glover, B.J., 2000. Differentiation in plant epidermal cells. *Journal of Experimentation Botany*, Vol. 51, No. 344, pp. 497-505.
- Glover, B.J., Perez-Rodriguez, M., Martin, C., 1998. Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcription factor. *Development* 125, 3497–3508.
- Gremski, K., Ditta, G., Yanofsky, M.F., 2007. The HECATE genes regulate female reproductive tract development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 134, 3593–3601. <https://doi.org/10.1242/dev.011510>
- Haustein, and David Groneberg 2010. *Tobacco or health*. Heidelberg: Springer Verlag,. Print.
- Horsch, R.B. & Fry, J.E. & Hoffmann, N.L. & DA, Eichholtz & Rogers, S.G. and & Fraley, Robert. (1985). A Simple and General-Method for Transferring Genes Into Plants. *Science*. 227. 1229-1231. [10.1126/science.227.4691.1229](https://doi.org/10.1126/science.227.4691.1229).
- Huchelmann, A., Boutry, M., Hachez, C., 2017. Plant Glandular Trichomes: Natural Cell Factories of High Biotechnological Interest. *Plant Physiology* 175, 6–22. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00727>
- Hülkamp, M., Miséra, S., Jürgens, G., 1994. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* 76, 555–566.
- Hülkamp, M., Schnittger, A., Folkers, U., 1998. Pattern Formation and Cell Differentiation: Trichomes in *Arabidopsis* as a Genetic Model System, *International Review of Cytology*, Vol. 186 ,0014-1696199.
- Inoue H. , Nojima H. , and Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28

- Ishida, T., Kurata, T., Okada, K., Wada, T., 2008. A Genetic Regulatory Network in the Development of Trichomes and Root Hairs. *Annual Review of Plant Biology* 59, 365–386. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092949>
- Knapp, S., Chase, M.W., Clarkson, J.J., 2004. Nomenclatural Changes and a New Sectional Classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon* 53, 73. <https://doi.org/10.2307/4135490>
- Larkin, J.C., Young, N., Prigge, M., Marks, M.D., 1996. The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis*. *Development* 122, 997–1005.
- Levin, D.A., 1973. The role of trichomes in plant defense. *The quarterly review of biology* 48, 3–15.
- Ma, D., Hu, Y., Yang, C., Liu, B., Fang, L., Wan, Q., Liang, W., Mei, G., Wang, L., Wang, H., Ding, L., Dong, C., Pan, M., Chen, J., Wang, S., Chen, S., Cai, C., Zhu, X., Guan, X., Zhou, B., Zhu, S., Wang, J., Guo, W., Chen, X., Zhang, T., 2016. Genetic basis for glandular trichome formation in cotton. *Nature Communications* 7, 10456. <https://doi.org/10.1038/ncomms10456>
- Marks, M.D., 1997. Molecular genetic analysis of trichome development in *Arabidopsis*. *Annual review of plant biology* 48, 137–163.
- Matías-Hernández, L., Jiang, W., Yang, K., Tang, K., Brodelius, P.E., Pelaz, S., 2017. AaMYB1 and its orthologue AtMYB61 affect terpene metabolism and trichome development in *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 90, 520–534. <https://doi.org/10.1111/tpj.13509>
- Matzke, M.A., Matzke, A.J.M., 2004. Planting the Seeds of a New Paradigm. *PLoS Biology* 2, e133. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020133>
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- Ossowski, S., Schwab, R., Weigel, D., 2008. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs: Engineering small RNA-mediated gene silencing. *The Plant Journal* 53, 674–690. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03328.x>
- Payne, T., Clement, J., Arnold, D., Lloyd, A., 1999. Heterologous myb genes distinct from GL1 enhance trichome production when overexpressed in *Nicotiana tabacum*. *Development* 126, 671–682.
- Pesch, M., Hülkamp, M., 2009. One, two, three...models for trichome patterning in *Arabidopsis*? *Current Opinion in Plant Biology* 12, 587–592. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.015>
- Rosa, M., Abraham-Juárez, M.J., Lewis, M.W., Fonseca, J.P., Tian, W., Ramirez, V., Luan, S., Pauly, M., Hake, S., 2017. The Maize MID-COMPLEMENTING ACTIVITY Homolog CELL NUMBER REGULATOR13/NARROW ODD DWARF Coordinates Organ Growth and Tissue Patterning. *The Plant Cell* 29, 474–490. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00878>

- Schellmann, S., Hulskamp, M., 2005. Epidermal differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a model system. *The International Journal of Developmental Biology* 49, 579–584. <https://doi.org/10.1387/ijdb.051983ss>
- Schillmiller, A.L., Last, R.L., Pichersky, E., 2008. Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *The Plant Journal* 54, 702–711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03432.x>
- Serna, L., 2004. A network of interacting factors triggering different cell fates. *The Plant Cell* 16, 2258–2263.
- Serna, L., 2005. Epidermal cell patterning and differentiation throughout the apical–basal axis of the seedling. *Journal of Experimental Botany* 56, 1983–1989. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri213>
- Serna, L., Martin, C., 2006. Trichomes: different regulatory networks lead to convergent structures. *Trends in Plant Science* 11, 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.04.008>
- Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., Ivanov, N.V., 2014. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nature Communications* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4833>
- Tominaga-Wada R., Ishida T., Wada T., Jeon, K.W., 2011. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Academic Press. Elsevier/Academic Press.
- Von Eichborn S., Abshagen M.-L. 2015. Tobacco: Antisocial, Unfair, Harmful to the Environment.
- Wagner, G.J., 1991. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant physiology* 96, 675–679.
- Wagner, G.J., 2004. New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Annals of Botany* 93, 3–11. <https://doi.org/10.1093/aob/mch011>
- Werker, E., 2000. Trichome diversity and development. *Advances in botanical research* 31, 1–35.
- Yadav, R.K., Tavakkoli, M., Xie, M., Girke, T., Reddy, G.V., 2014. A high-resolution gene expression map of the *Arabidopsis* shoot meristem stem cell niche. *Development* 141, 2735–2744. <https://doi.org/10.1242/dev.106104>
- Yan, T., Chen, M., Shen, Q., Li, L., Fu, X., Pan, Q., Tang, Y., Shi, P., Lv, Z., Jiang, W., Ma, Y., Hao, X., Sun, X., Tang, K., 2017. HOMEODOMAIN PROTEIN 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua*. *New Phytologist* 213, 1145–1155. <https://doi.org/10.1111/nph.14205>
- Zhao, M., Morohashi, K., Hatlestad, G., Grotewold, E., Lloyd, A., 2008. The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development* 135, 1991–1999. <https://doi.org/10.1242/dev.016873>

Annexe

Annexe n°1 : Tableau des amorces pour les différentes Polymérase Chain Réaction.

Nom du produit PCR	Amorce	Séquence (5'-3') des amorces	Conditions PCR	Matrice utilisée
Construction visée : Lignées rapportrice porteuse d'un tag GUS-Vénus				
HEC2pro	Forward	AGGAGGAACTTCTCAGGAAGG	95°C 3', 95°C 45', 55°C 45'', 72°C 1'45'', 72°C 7' 35 cycles Polymérase : Phusion	ADN génomique de tabac
	Reverse	AGCTTTTGTTAGACTTATCACTC		
PDF1pro	Forward	AGGTATTTTGACTAAATTACATATTG	95°C 3', 95°C 45', 55°C 45'', 72°C 1'45'', 72°C 7' 35 cycles Polymérase : Hifi	ADN génomique de tabac
	Reverse	CTTTGTTTGCTTTCAAAGGAGAG		
Construction visée : lignées surexprimant le gène ciblé				
PDF1seq	Forward	CACCATGGGGAAGAGGGAAGAAG	95°C 2', 95°C 30', 60°C 45'', 72°C 1', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Phusion	cDNA de tabac
	Reverse	AGCTCTGGGCTTGAGCCGACCC		
CNR13seq	Forward	CACCATGGCTTCATGGGAACATTTTGGG	95°C 2', 95°C 30', 50°C 45'', 72°C 1', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Phusion	cDNA de tabac
	Reverse	AAACATACACAAGAGAGGTTCTGA		

Nom du produit PCR	Amorce	Séquence (5'-3') des amorces	Conditions PCR	Matrice utilisée
Construction visée : lignées surexprimant le gène ciblé				
HEC2seq	Forward	CACCATGGATATTGAGATGCTCAAATC	95°C 2', 95°C 30', 55°C 45'', 72°C 1', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Phusion	cDNA de tabac
	Reverse	AGCATCTGCATATTGTTGAATATTTTG		

Nom du produit PCR	Amorce	Séquence (5'-3') des amorces	Conditions PCR	Matrice utilisée
Construction visée : lignée amiRNA				
CNR13miR (fragment a)	Forward (A)	CACCCTGCAAGGCGAT TAAGTTGGGTAAC	95°C 2', 95°C 30', 55°C 35'', 72°C 35'', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Hifi	pRS300*
	Reverse (IV)	GAATTCGGTCTAACTATCGATACTCTACATATATATTCCT		
CNR13miR (fragment b)	Forward (III)	GAGTATCGATAGTTAGACGGAATTCACAGGTCGTGATATG	95°C 2', 95°C 30', 55°C 35'', 72°C 35'', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Hifi	pRS300*
	Reverse (II)	GAGTGTCGATAGTTACACGGAATCAAAGAGAATCAATGA		
CNR13miR (fragment c)	Forward (I)	GATTTCCGTGTA ACTATCGACACTCTCTCTTTTGTATTCC	95°C 2', 95°C 30', 55°C 35'', 72°C 35'', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Hifi	pRS300*
	Reverse (B)	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG		
CNR13miR (produit 3x PCR)	Forward (A)	CACCCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	95°C 2', 95°C 30', 55°C 35'', 72°C 1'', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Hifi	CNR13miR fragment a + b + c
	Reverse (B)	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG		

*Carte du vecteur pRS300 à l'annexe n°2

Nom du produit PCR	Amorce	Séquence (5'-3') des amorces	Conditions PCR	Matrice utilisée
Construction visée : lignée amiRNA				
CNR13miR_2 (fragment a)	Forward (A)	CACCCTGCAAGGCGAT TAAGTTGGGTAAC	95°C 2', 95°C 30', 55°C 35'', 72°C 35'', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Hifi	pRS300*
	Reverse (IV)	GAAATGTTCCGGTGTAACTATTGCTCTACATATATATTCCT		
CNR13miR_2 (fragment b)	Forward (III)	GAGCAATAGTTACACCGAACATTTACAGGTCGTGATATG	95°C 2', 95°C 30', 55°C 35'', 72°C 35'', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Hifi	pRS300*
	Reverse (II)	GAGCGATAGTTACACGGAACATATCAAAGAGAATCAATGA		
CNR13miR_2 (fragment c)	Forward (I)	GATATGTTCCGTGTAACATATCGCTCTCTCTTTTGTATTCC	95°C 2', 95°C 30', 55°C 35'', 72°C 35'', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Hifi	pRS300*
	Reverse (B)	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG		
CNR13miR_2 (produit 3x PCR)	Forward (A)	CACCCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	95°C 2', 95°C 30', 55°C 35'', 72°C 1'', 72°C 7' 32 cycles Polymérase : Hifi	CNR13miR fragment a + b + c
	Reverse (B)	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG		

*Carte du vecteur pRS300 à l'annexe n°2

Annexe n°2 : Cartes des différents vecteurs

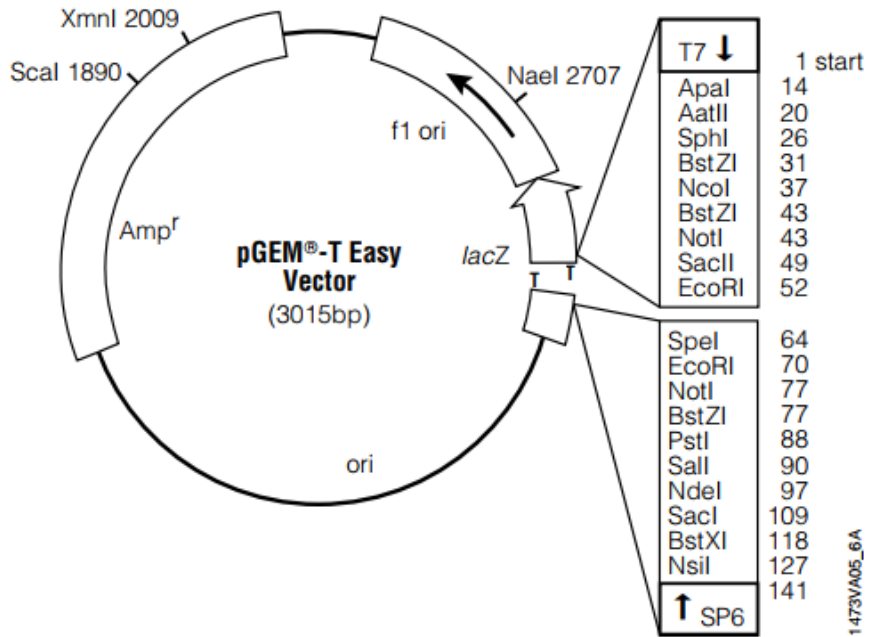


Figure 45 : Carte du vecteur pGEM-T Easy

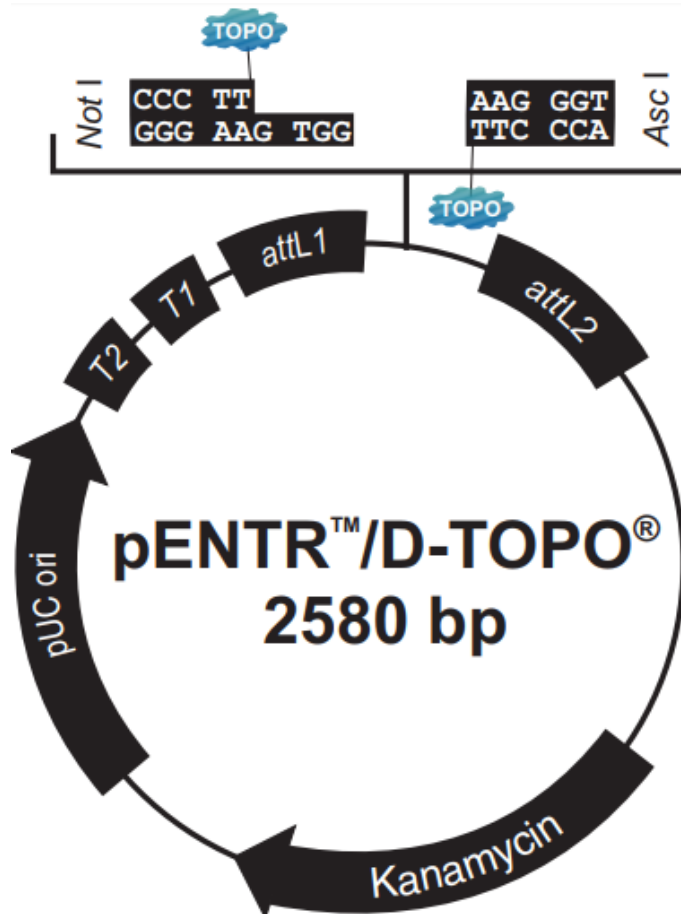


Figure 46 : Carte du vecteur pENTR/D-TOPO

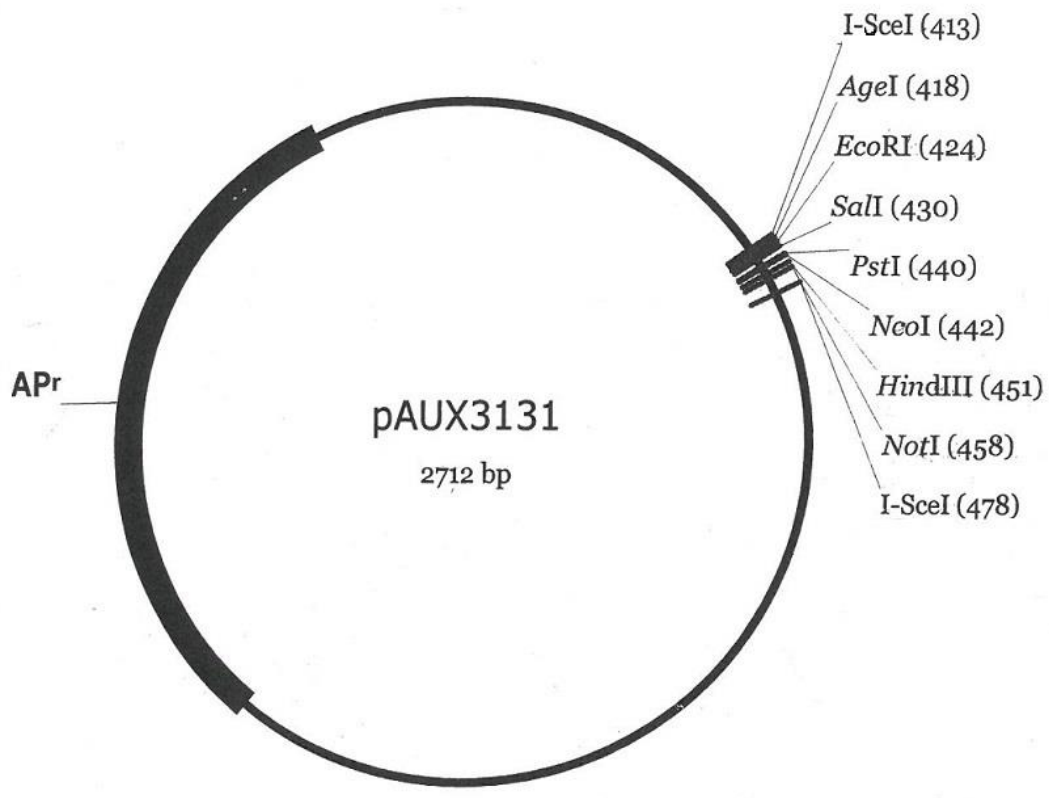


Figure 47 : Carte du vecteur pAUX3131

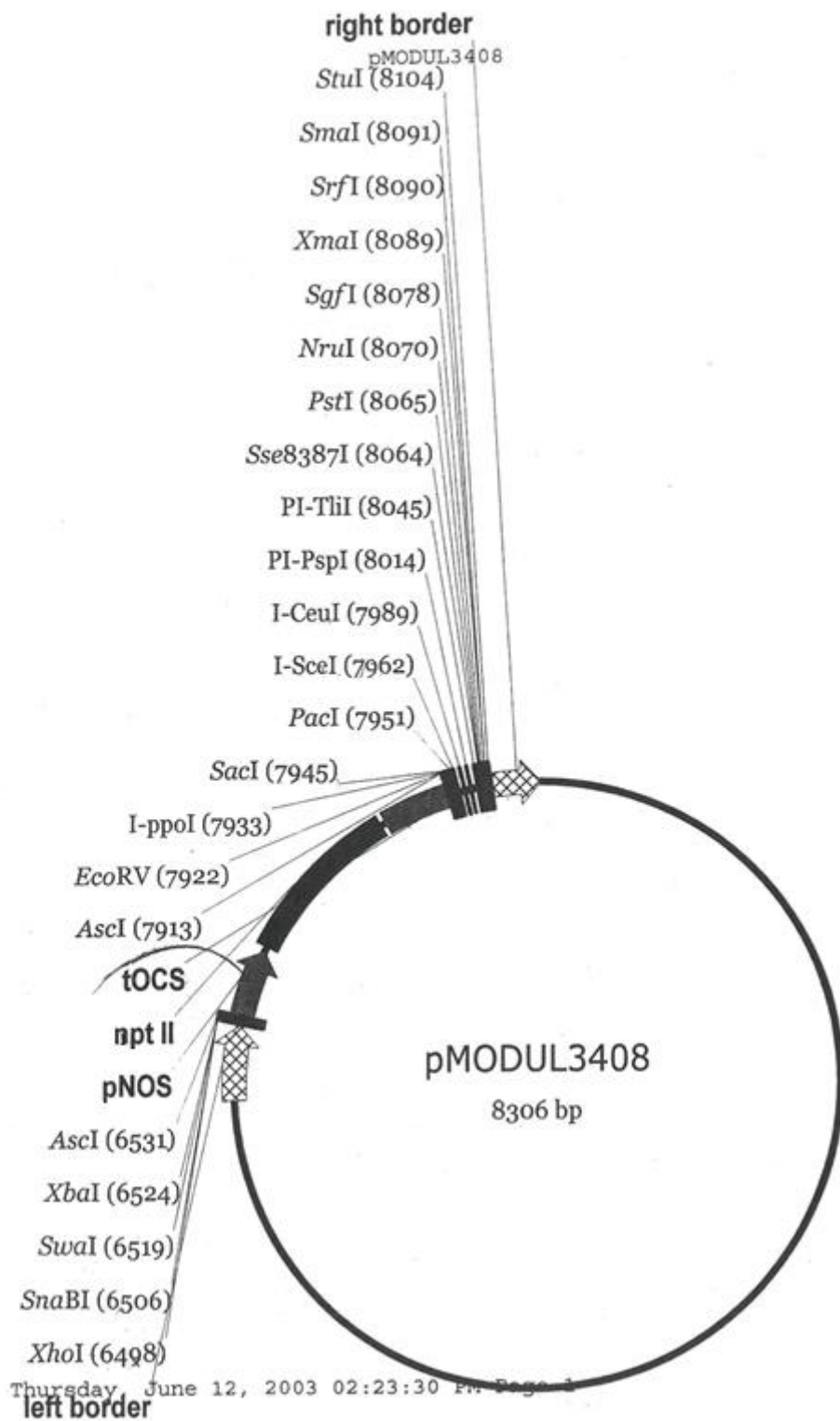


Figure 48 : carte du vecteur binaire pMODUL3408

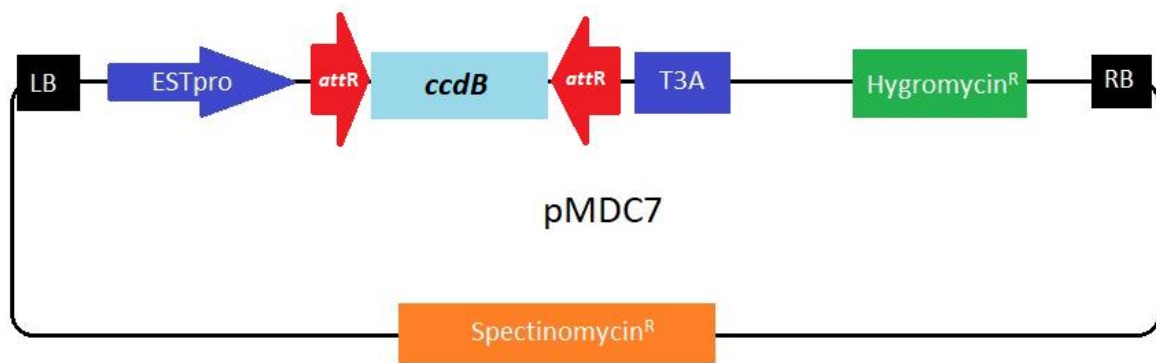


Figure 49 : Carte du vecteur binaire pMDC7 avec le gène létal *ccdB*

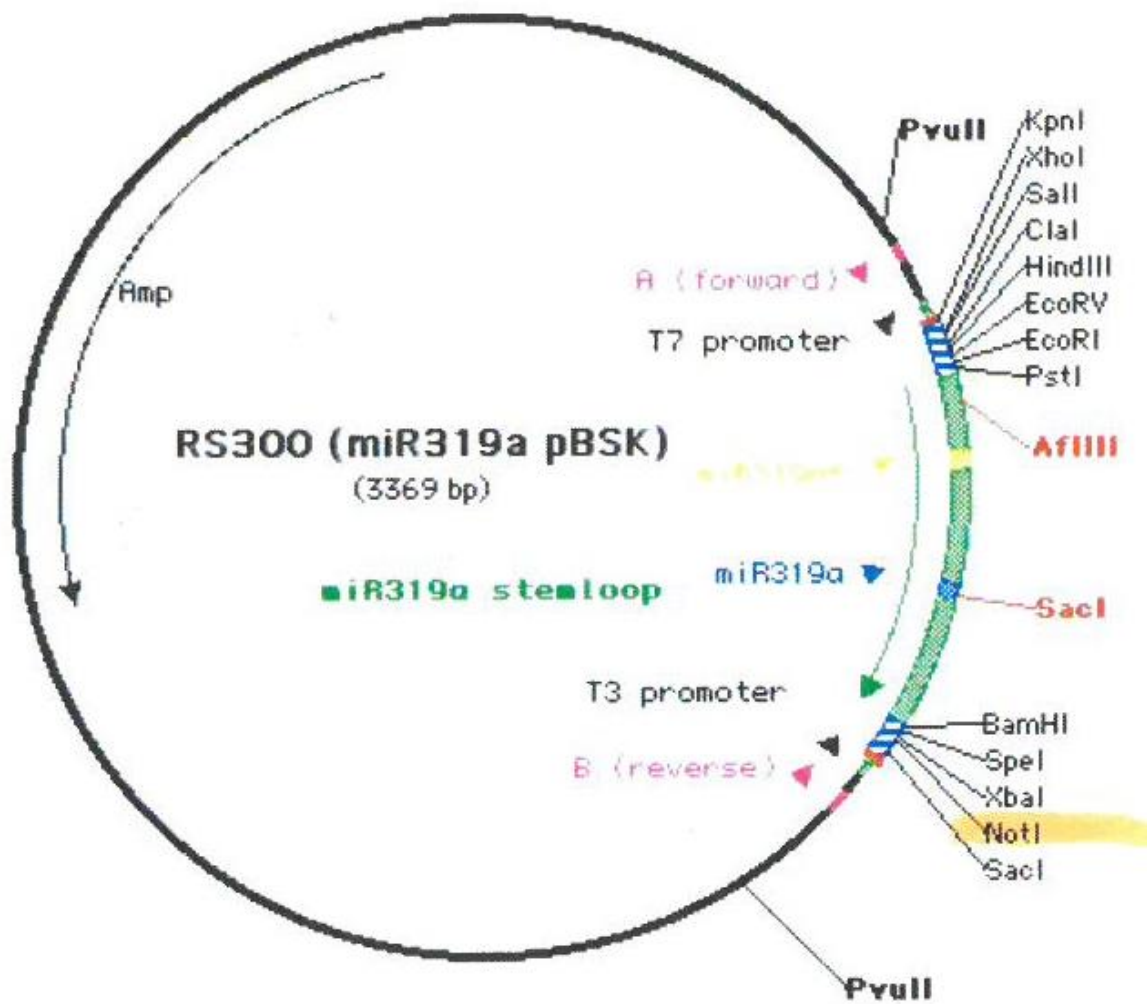


Figure 50 : Carte du vecteur pRS300

Annexe n°3 : Les souches bactériennes et milieu de culture bactérien

Souches d'*Escherishia coli* compétentes

Les souches d'*Escherishia coli* JM109 et DH5α ont servi respectivement à la préparation de cellules électrocompétentes et thermocompétentes en vue de la réalisation de constructions génétiques.

Souche d'*Agrobacterium tumefaciens* compétente

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV a permis le transfert du matériel génétique désiré au sein d'une plante.

Le milieu de culture bactérien

Le milieu Lysogenic Broth ou plus couramment appelé "milieu LB" est le milieu le plus fréquemment utilisé pour la culture bactérienne (Bertani G., 1951). Sa composition (en pourcentage massique, kg/l de solution) est la suivante :

- 0,5% Yeast extract
- 1 % Bacto tryptone
- 1% NaCl
- 2% Agar, si un milieu gélifié est désiré
- Antibiotique (à ajouter après autoclavage et refroidissement de la solution selon le marqueur de sélection utilisé) :
 - 0,01% de spectinomycine
 - 0,01% d'ampicilline
 - 0,005% de kanamycine

Attention, dans le cas de la confection de boîtes de culture d'*Agrobacterium tumefaciens*, 3 antibiotiques sont utilisés : 0,002% de rifampicine, 0,004% de gentamycine et 0,005% du marqueur de sélection du vecteur binaire qui est ici la spectinomycine (voir annexe n°2)

Annexe n°4 : préparation de cellules électrocompétentes et thermocompétentes

Préparation de cellules électrocompétentes

- Inoculer 1L de milieu LB contenu dans un erlenmeyer avec 10 mL d'une culture fraîche d'E. coli JM109 qui a incubé une nuit à 37°C avec agitation dans du milieu LB
- Laisser proliférer les cellules à 37°C sur agitateur orbital (90 rpm) jusqu'à obtention d'une absorbance comprise entre 0,5 et 0,8 pour une longueur d'onde de 600 nm
- Récolter et refroidir l'erlenmeyer sur glace pendant 15 à 30 minutes. Ensuite, centrifuger à 8000 rpm à une température de 4°C (3 lavages) :
 - 5 min, enlever le surnageant et resuspendre dans 300 mL d'eau distillée froide
 - 10 min, enlever le surnageant et resuspendre dans 300 mL d'eau distillée froide
 - 5 min, enlever le surnageant et resuspendre dans 300 mL d'eau distillée froide
- Centrifuger à 8000 rpm à une température de 4°C pendant 5 min et resuspendre dans 20 mL de glycérol 10% froid à transférer dans un flacon adéquat.
- Centrifuger pendant 7 min selon les mêmes conditions, enlever le surnageant et resuspendre dans 10 mL de glycérol 10%
- Prélever alors des fractions de 45-50µL à placer dans des tubes eppendorf à conserver à -80°C

Préparation de cellules thermocompétente (Inoue Method (Inoue et al. (1990)))

- Inoculer une boîte de pétri avec du milieu LB sans antibiotique avec E. coli DH5α, laisser pousser une nuit à 37°C
- Sélectionner une colonie bactérienne sur la boîte de petri et transférer cette dernière dans un erlen de 250 mL contenant 25 mL de LB. Incuber la culture pendant 6-8H à 37°C avec agitation vigoureuse
- Préparer 3 erlen de 1 L contenant chacun 250 mL de milieu LB et insérer 10 mL de votre culture précédente dans le premier erlenmeyer, 4 mL dans le second et 2 mL dans le troisième. Incuber alors pendant une nuit à 18-22°C avec une agitation modérée les 3 solutions
- Le matin suivant, mesurer l'absorbance à 600 nm des 3 cultures toutes les 45 min jusqu'à ce que l'une des cultures atteigne une absorbance de 0,55. Transférer alors l'erlen présentant la bonne absorbance dans un bain de glace pendant 10 minutes et jeter les deux autres cultures.
- Récolter les cellules par centrifugation à 2500 g pendant 10 min à 4°C, enlever le surnageant et laisser le culot séché à l'air ambiant pour 2 min.
- Resuspendre les cellules dans 80 mL de tampon de transformation Inoue refroidi sur glace
- Récolter les cellules par centrifugation à 2500 g pendant 10 min à 4°C, enlever le surnageant et laisser le culot sécher à l'air ambiant pour 2 min.
- Resuspendre les cellules dans 20 mL d'Inoue transformation buffer ice cold, ajouter 1,5 mL de DMSO et mélanger bien.
- Prélever des fractions de 100-150µL à placer dans des tubes eppendorf à conserver à -80°C

Annexe n°5 : Réalisation d'une électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

- Mettre de l'agarose (rapport p/v : 1%) dans du tampon TBE (de composition : 0,9M Tris base ; 0,9M d'acide Borique et 20mM d'EDTA)
- Faire bouillir l'agarose au four à micro-ondes
- Laisser refroidir et ajouter du bromure d'éthidium (BET) (rapport p/v : 0,01%).
- Couler le gel
- Ajouter aux échantillons 1/5 du volume du loading buffer Orange G (orange G 0,15% (p/v) ; glycérol 60% (p/v) ; Na₂EDTA 60 mM)
- Charger 5 µl de 2-log DNA Ladder (New England Biolabs) dans le premier puit servant d'échelle de poids moléculaire
- Charger les échantillons sans dépasser le volume des puits
- Lancer l'électrophorèse en laissant migrer les échantillons pendant 25 min à 135 mV
- Observer l'ADN lié au BET sous une lampe UV (265 nm)

Annexe n°6 : Les différentes techniques de transformation

Transformation par électroporation (avec la souche bactérienne d'*Escherishia coli* JM109)

- Placer des cuvettes d'électroporation sur glace
- Dessaler l'ADN intégré dans un vecteur pendant 15 min sur un filtre de nitrocellulose 0,025 µm placé à la surface d'un bain d'eau stérile
- Ajouter 2 µl d'ADN dessalé à 50 µl de cellules électrocompétentes (*Escherishia coli* JM109)
- Transférer le mélange dans une cuvette d'électroporation (1 mm)
- Placer la cuvette dans l'appareil (Eppendorf Eporator) et appuyer sur start
- Ajouter 1 ml de LB dans la cuvette, mélanger et transférer dans un tube Eppendorf stérile
- Incuber 1 h à 37°C au bain marie
- Étaler 150 µl de la solution sur une boîte LB avec l'antibiotique de sélection propre au vecteur utilisé
- Incuber une nuit à 37°C pour obtenir des colonies exploitables

Transformation par Heat Shock (avec la souche bactérienne d'*Escherishia coli* DH5α)

- Dessaler l'ADN intégré dans un vecteur pendant 15 min sur un filtre de nitrocellulose 0,025 µm placé à la surface d'un bain d'eau stérile
- Ajouter 2 µl d'ADN dessalé à 50 µl de cellules thermocompétente (*Escherishia coli* DH5α) placées dans un eppendorf, mélanger et laisser 5 minutes sur glace
- Réaliser un choc thermique en plaçant 45 secondes à 42°C l'eppendorf dans un bain marie
- Ajouter 1 ml de LB, mélanger
- Incuber 1 h à 37°C au bain marie
- Étaler 150 µl de la solution sur une boîte LB avec l'antibiotique de sélection propre au vecteur utilisé
- Incuber une nuit à 37°C pour obtenir des colonies exploitables

Transformation par électroporation (avec la souche bactérienne *Agrobacterium tumefaciens* GV)

- Placer des cuvettes d'électroporation sur glace
- Ajouter 2 µl d'ADN à 50 µl de cellules électrocompétentes (*Agrobacterium tumefaciens* GV)
- Transférer le mélange dans une cuvette d'électroporation (1 mm)
- Placer la cuvette dans l'appareil (Bio Rad Gene Pulser), configurer la machine avec une résistance de 400Ω, une capacité de 25 µF et une tension de 1,25kV ensuite appuyer sur start
- Ajouter 1 ml de LB dans la cuvette, mélanger et transférer dans un tube Eppendorf stérile
- Incuber 4 h à 30°C au bain marie
- Étaler 150 µl de la solution sur une boîte LB + rifampicilline + gentamycine + l'antibiotique de sélection propre au vecteur utilisé
- Incuber 2 à 3 jours à 37°C pour obtenir des colonies exploitables

Annexe n°7 : La minipréparation d'ADN

Liste des solutions à préparer :

- Ethanol 70%
- Ethanol 100%
- Une solution de GTE (Glucose/Tris/EDTA)
Glucose 50 mM - Tris 25 mM - EDTA 10 mM - pH 8,0 (HCl)
Stériliser à l'autoclave et conserver à 4°C
- Une solution de NaOH/SDS
NaOH 0,2 N - SDS 1% à préparer immédiatement avant utilisation à partir de solutions stock concentrées 2 fois
- Une solution d'acétate de potassium 5 M, pH 4,8
Prendre 29,5 ml d'acide acétique glacé et y ajouter des granules de KOH jusqu'à atteindre pH 4,8. Porter à 100 ml avec H₂O et conserver à température ambiante.
- Une solution RNase A DNase-free 10 mg.ml⁻¹ :
Dissoudre la RNase A dans du tampon TE à une concentration de 10 mg.ml⁻¹ puis faire bouillir 10 à 30 min. Conserver à -20°C.

Une fois les solutions prêtes, la manipulation de minipréparation d'ADN s'effectue comme suit :

- Inoculer 3-4 ml de milieu LB à partir d'une seule colonie bactérienne. Laisser pousser jusqu'à saturation (une nuit, +- 16 h) à 37°C.
- Centrifuger la culture bactérienne 1 min à vitesse maximale (température ambiante) afin de la culotter, enlever le surnageant avec une pipette Pasteur.
- Resuspendre dans 100 µl de solution GTE (à 4°C) et laisser reposer 5 min à température ambiante.
- Ajouter 200 µl de solution NaOH/SDS, mélanger en retournant le tube et mettre sur glace pendant 5 min.
- Ajouter 150 µl de solution d'acétate de potassium (à 4°C), mélanger en retournant le tube, et mettre sur glace pendant 5 min.
- Centrifuger 15 min à 4°C à la vitesse maximale pour séparer les débris cellulaires et l'ADN chromosomique.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- Mélanger avec 450 µl de phénol/chloroforme (1:1), centrifuger 5 min (vitesse max, température ambiante).
- Prélever le surnageant de la phase supérieure, y ajouter 450 µl d'éther, centrifuger 2 min (vitesse max, température ambiante) et éliminer le surnageant.
- Mélanger (vortex) avec 800 µl d'éthanol 100% (-20°C) et laisser reposer 2 min à température ambiante.
- Centrifuger 20 min à vitesse maximale (température ambiante) pour récupérer l'ADN plasmidique dans le culot.
- Éliminer le surnageant, ajouter 1 ml d'éthanol 70%, centrifuger 2 min (vitesse max, température ambiante), et éliminer le surnageant.

- Sécher le culot sous vide (SpeedVac : manual evaporation, 55°C, 1.300 min⁻¹, 10 min).
- Resuspendre le culot dans 30 µl d'H₂O contenant 1 µl de la solution RNase A DNase-free 10mg.ml⁻¹

Les minipréparations d'ADN ainsi réalisées peuvent être directement utilisées ou stockées pour un usage ultérieur à -20°C.

Caractérisation de gènes potentiellement impliqués dans le développement de trichomes glandulaires longs chez *Nicotiana tabacum* : création de lignées rapportrices et modulation de l'expression par RNA silencing ou surexpression

Réalisé par : Vanderborcht Nicolas

Résumé

Les trichomes sont des structures uni ou pluricellulaires dérivant du protoderme et se développant sur les parties aériennes végétatives et reproductives des plantes. Ces structures sont non-essentiels à la survie de la plante mais remplissent différents rôles dans l'adaptation de la plante à son environnement.

Les trichomes pluricellulaires sont souvent séparés en deux groupes, les trichomes glandulaires et les trichomes non-glandulaires. Parmi les trichomes glandulaires, on retrouve des trichomes avec une ou plusieurs petites têtes glandulaires au sommet d'une tige, éventuellement ramifiée (capitate) et des trichomes formant une large glande pourvue d'un espace de stockage des composés sous-cuticulaire (peltate).

La particularité des trichomes glandulaires est leur capacité à synthétiser une grande quantité de métabolites secondaires aussi appelés métabolites spécialisés.

Nicotiana tabacum possède à la fois des trichomes glandulaires de type *capitate* et *peltate*.

Notre compréhension des processus d'initiation et de développement des trichomes multicellulaires glandulaires reste lacunaire pour de nombreuses espèces dont *N. tabacum*. Ceci, contrairement aux trichomes unicellulaires (non glandulaires), tels que ceux d'*Arabidopsis thaliana*, où les aspects cytologiques et moléculaires du développement sont déjà bien caractérisés.

Pour *N. tabacum*, l'initiation et le développement des trichomes semble être ordonnés par un réseau transcriptionnel différent de celui opérant chez *A. thaliana*.

Dans le but de découvrir les potentiels intervenants, différentes constructions génétiques sur des gènes supposés intervenir dans l'initiation et le développement des trichomes de cette plante ont été réalisées en vue de la création de lignées transgéniques stables de tabac.

En premier lieu, la création de lignées rapportrices pour *PDF1* et *HEC2* dont les séquences promotrices ont été placées en amont d'un gène rapporteur *GUS-Vénus* afin de pouvoir déterminer le profil d'activité de ces promoteurs.

En second lieu, la création de lignées surexprimant les gènes *PDF1*, *HEC2* et *CNR13* avec un promoteur inductible au β -estradiol afin d'observer l'impact de la surexpression de ces gènes sur le phénotype des trichomes de tabac.

Et dernièrement, la création d'une lignée entraînant un silencing du gène *CNR13* par technique amiRNA avec un promoteur inductible au β -estradiol afin d'observer l'impact du silencing de ce gène sur le phénotype des trichomes de tabac.

Mots-clés : Trichomes, *Nicotiana tabacum*, constructions génétiques, surexpression, silencing, lignées rapportrices.