

## Transformation des protoplastes de chicorée (*Cichorium intybus*) par électroporation

Malika ABID<sup>1,2</sup>, Aatika MIHAMOU<sup>1</sup>, Abdelmajid BELABED<sup>1\*</sup>  
& Serge RAMBOUR<sup>2</sup>

(Reçu le 08/11/1999 ; Révisé le 05/10/2000 ; Accepté le 21/11/2000)

### تحويل خلايا "الشيكوري" *Cichorium intybus* بالثقيب الضوئي

باستعمالنا للبناء البلازميدي (pTDE 4) حاوي المورث (uid A) المراقب من طرف المحفز (CaMV35S)، وضعنا الشروط الضرورية لتأهيل الخلايا المفردة (Protoplastes) لنبات *Cichorium intybus* لاستقبال البناء البلازميدي السالف ذكره، وذلك عن طريق الثقيب الضوئي (elétroporation). بعد 24 ساعة من التجربة، تم كشف نشاط المورث بيتا كليكونيداز، بينما تواصل تعبير المورث uid A في المستعمرات الخلوية (microcals) بعد سبعة أيام من عملية الثقيب الضوئي. وهذا يؤكد اندماج المورث في المخزون الوراثي للخلايا المستقبلة.

**الكلمات المفتاحية :** الخلية المفردة- الثقيب بالضوء- البناء البلازميدي- *Cichorium intybus*

### Transformation des protoplastes de chicorée (*Cichorium intybus*) par électroporation

En utilisant la construction plasmidique pTDE4 où le gène *uidA* est régulé par le promoteur 35S CaMV, on a établi les conditions nécessaires pour l'électroporation des protoplastes de chicorée. L'activité du gène de la  $\beta$ -glucuronidase est détectée 24 h après le choc électrique. L'expression du gène *uidA* n'est pas transitoire dans les cellules, car l'activité est maintenue dans les microcals formés après 7 jours d'électroporation, ce qui prouve l'intégration du gène dans le génome des cellules électroporées.

**Mots clés :** Protoplaste - Électroporation - Test Gus - ADN plasmidique - ADN entraîneur

### Transformation of chicory (*Cichorium intybus*) protoplasts by electroporation

Using pTDE4 construction containing *uidA* gene under the control of 35S CaMV promoter, we have established the conditions required for the transformation of chicory protoplasts. The transfected cells exhibited glucuronidase activities 24 h after electroporation. This activity was not transient since *uidA* expression was detected in microcals formed 7 days after transformation. This result showed integration of the plasmid DNA into the host chromosome.

**Key words :** Protoplaste - Electroporation - GUS assay - Carrier DNA - Plasmidic - DNA

<sup>1</sup> Laboratoire d'Amélioration et de Productions Végétales, Faculté des Sciences, université Mohamed 1er, Route Sidi Maâfa, Oujda (Maroc)

<sup>2</sup> Laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire Végétale 59655 Villeneuve d'Ascq- France

\* Auteur correspondant, e-courrier : belabed@sciences.univ-oujda.ac.ma

## INTRODUCTION

*Cichorium intybus* est une asteracée bisannuelle qui présente de remarquables propriétés d'organogenèse. Elle est capable de régénérer des plantes entières à partir de tous ses organes : racines tubérisées, feuilles, cotylédons et anthères. La régénération à partir des protoplastes a été également réalisée avec succès.

Les protoplastes sont des cellules végétales momentanément débarassées de leurs parois. Ils sont sphériques et limités uniquement par le plasmalemme. Conservant les potentialités des cellules végétales entières et, en particulier, leur capacité à régénérer des plantes, les protoplastes se prêtent à des manipulations d'ordre génétique pouvant contribuer à l'amélioration des espèces végétales ou à l'étude des séquences de régulation des gènes.

L'électroporation est une technique développée dans les années 80. Elle exploite les propriétés physiques des membranes cellulaires. L'action d'un champ électrique sur les protoplastes crée une différence de potentiel transmembranaire provoquant une désorganisation de la membrane qui devient perméable à diverses molécules exogènes. Ce phénomène d'électroperméation peut être inversé.

La séparation de charge à travers le plasmalemme entraîne l'apparition d'une force électrostatique conduisant à une compression de la membrane et à la formation de pores. La formation des pores n'a lieu que lorsque le voltage appliqué à la membrane devient supérieur à la valeur du potentiel transmembranaire toujours présent. Le champ électrique s'ajoute au potentiel membranaire (une différence de potentiel d'environ -100 mV existe au niveau du plasmalemme).

Quand le champ électrique est important, un grand nombre de pores se forment d'abord à l'équateur des protoplastes, à l'opposé de l'anode. Lorsque le champ électrique appliqué traverse toute la cellule, les pores se forment sur les deux faces (côtés anode et cathode) du protoplaste.

L'électroporation a été utilisée avec succès pour introduire des gènes étrangers chez le riz (Zhang *et al.*, 1988 ; Shimamoto *et al.*, 1989 ; Battraw & Hall, 1992), le soja (Dhir *et al.*, 1991) et les agrumes (Hidaka & Omura, 1993).

Plusieurs paramètres électriques et biologiques sont mis en jeu dont seule leur maîtrise conditionne le succès du transfert direct de gènes. Au cours de ce travail, on a exploité les connaissances déjà acquises sur l'obtention, la culture et la régénération des protoplastes foliaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof par Crépy *et al.* (1982), Sasaki *et al.* (1986) et Rambaud *et al.* (1990) pour tenter de déterminer les conditions permettant l'électroporation des protoplastes de la chicorée.

## MATÉRIELS & MÉTHODES

### 1. Préparation des protoplastes

Les graines de chicorée (*Cichorium intybus* L. var Witloof) désinfectées sont mises à germer sur le milieu de Heller gélosé contenant 20 g/l de saccharose. Les plantules sont cultivées en photopériode de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité et sous une intensité lumineuse de 14  $\mu\text{mole} \cdot (\text{m}^2)^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  fournis par des tubes fluorescents de type "Deluxe cool white". Après 12 jours de culture, les feuilles sont lacérées au niveau de l'épiderme inférieur puis mises dans le milieu de macération PO (Sasaki *et al.*, 1986) en présence de cellulase (345L) et de pectinase (M2L) (Tableau 1) face lacérée contre le milieu. Après la macération à 30°C, les protoplastes sont filtrés sur un filtre stérile en acier inoxydable de 80  $\mu\text{m}$  de vide de maille puis centrifugés pendant 10 min à 100 g. Le surnageant est éliminé à l'aide d'une pipette Pasteur stérile alors que le culot est redissous dans le milieu PO (milieu de Murashige & Skoog (1962), vitamines de Morel & Wetmore (1951), 10 g de saccharose et 90 g de mannitol, pH = 5.5), puis recentrifugé pendant 10 min. L'opération est répétée 3 fois afin d'éliminer les enzymes dont la présence générerait la reconstitution de la paroi et, par conséquent, la division. Au bout de la 3<sup>ème</sup> centrifugation, les protoplastes sont comptés dans

**Tableau 1. Effet de la concentration de la caylase-345 et de la durée de macération sur la production des protoplastes vivants** (La concentration de la caylase-M2 est maintenue à 0,5 mg.l<sup>-1</sup>)

Durée de macération à 30°C	Concentration d'enzymes	Taux de survie après isolement des protoplastes (%)	Taux de survie 24 h après isolement (%)
5 h 30	3 mg.ml <sup>-1</sup> 345	81	50
16 h	1 mg.ml <sup>-1</sup> 345	95	75

une cellule de Nageotte. La concentration des protoplastes est ajustée à  $10^6$  protoplastes.ml<sup>-1</sup>. Puis, ils sont resuspendus dans un tube Falcon de 15 ml dans du milieu d'électroporation (10 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, et 0,3 M Mannitol). Les protoplastes sont ensuite incubés pendant 5 min à 45°C puis mis dans de la glace. L'ADN du plasmide circulaire (issu de la construction pTDE4 dont l'ADN-T comprend le gène *uidA* régulé par le promoteur 35S CaMV et le gène *nptII* contrôlé par le promoteur NOS) et l'ADN entraîneur (ADN du sperme de hareng) sont ajoutés à la suspension de protoplastes dans un volume inférieur à 50 µl. Un volume de 800 µl de la suspension de protoplastes est placé dans une cuvette d'électroporation (0,4 cm Bio-Rad) préalablement refroidie. La cuvette est mise dans l'électroporateur qui fournit des impulsions à décroissance exponentielle. Une décharge électrique est envoyée à une capacitance de 960 µF. La cuvette est refroidie sur de la glace pendant 10 min. Les protoplastes sont mis en suspension à raison de  $10^5$  protoplastes dans 3 ml de milieu MC<sub>1</sub> (Milieu PO avec 2 mg.l<sup>-1</sup> de ANA et 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP).

## 2. Détermination des paramètres de survie des protoplastes

Afin d'avoir un nombre important de protoplastes, différentes durées de macération ont été utilisées. La concentration de cellulase a été réduite lors des macérations de longue durée. En effet, des concentrations de 3 et de 1 mg.ml<sup>-1</sup> de cellulase (345L) et des durées de macération de 5 h 30 et de 16 h ont été testées.

L'application du voltage a été optimisée afin d'obtenir des pourcentages élevés de protoplastes vivants. Des impulsions électriques d'intensité variant de 200 à 600 V à une capacitance de 960 µF ont été testées sur les suspensions contenant  $10^6$  protoplastes.ml<sup>-1</sup> dans le milieu d'électroporation. Après électroporation, les protoplastes sont remis en culture à raison de  $10^5$  protoplastes dans 3 ml de milieu MC<sub>1</sub>. La calcéine est utilisée comme sonde fluorescente pour l'étude de la perméabilisation des protoplastes électroporés à 300 V.

## 3. Survie des protoplastes après traitement électrique

Le pourcentage de protoplastes vivants est déterminé par observation directe sous microscope. Les protoplastes vivants sont repérés

grâce à :

- leur forme parfaitement sphérique ;
- leur cytoplasme clair et réfringent.

## 4. Concentrations du plasmide et de l'ADN entraîneur

Afin de trouver les conditions optimales de transfert d'ADN dans les protoplastes de chicorée, on a fait varier la concentration d'ADN plasmidique. Pour une densité de  $10^6$  protoplastes.ml<sup>-1</sup>, des concentrations d'ADN plasmidique de 0, 25, 50 ou 75 µg.ml<sup>-1</sup> ont été utilisées d'une part. D'autre part, des électroporations ont été effectuées en présence ou en absence de 50 µg d'ADN entraîneur.

## 5. Test GUS

La détection de la β-glucuronidase dans les cellules est faite 24 h après électroporation selon le protocole de Jefferson *et al.* (1987). Le nombre de protoplastes exprimant le gène *uidA* dans chaque boîte de Pétri (environ  $10^5$  protoplastes au total) est compté sous microscope 24 h après le test. L'efficacité de transformation est calculée en se basant sur le nombre de cellules montrant une activité GUS et rapportée au nombre total de protoplastes mis en culture.

La fréquence de la transformation est le rapport du nombre de protoplastes exprimant le gène *uidA* sur le nombre total de protoplastes observés.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

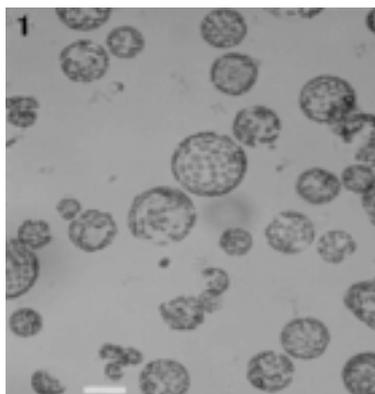
### 1. Isolement des protoplastes

Les protoplastes sont isolés à partir de jeunes feuilles de chicorée. Les enzymes caylase-345 et caylase-M2 utilisées en association sont dissoutes dans le milieu PO qui constitue le milieu de macération. La caylase-345 a été utilisée aux concentrations de 3 et 1 mg.ml<sup>-1</sup>. La durée de macération en présence de 3 mg.ml<sup>-1</sup> de caylase-345 est de 5 h 30 et de 16 h pour une concentration de 1 mg.ml<sup>-1</sup>. La caylase-M2 semble contenir des protéases qui détériorent les cellules quand sa concentration dépasse 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>. De ce fait, sa concentration est maintenue à 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>.

Les résultats obtenus montrent que le nombre de protoplastes libérés est important après 16 h de macération (Tableau 1, Figure 1). Ce nombre diminue rapidement au bout de 24 h. On observe à

la fois des protoplastes nécrosés et de nombreux chloroplastes provenant de la lésion des protoplastes en suspension dans le milieu.

Pour la suite du travail, on a utilisé la solution enzymatique contenant 1 mg.l<sup>-1</sup> de caylase-345 et 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de caylase-M2. L'incubation est réalisée à l'étuve à 30°C à l'obscurité pendant 16 h.



**Figure 1. Protoplastes isolés à partir de jeunes feuilles de chicorée**

## 2. Électroporation

Afin de déterminer la valeur de la différence de potentiel (d.d.p.) pour laquelle un taux élevé de survie est obtenu, les protoplastes isolés sont soumis à une série de décharges électriques allant de 200 à 600 V/cm à une capacité de 960 µF. Les résultats (Tableau 2) montrent que le taux de survie est fonction de l'intensité de la décharge électrique. À partir de 400 V, le nombre de protoplastes viables est réduit 2,5 fois par rapport au témoin n'ayant subi aucun traitement électrique.

**Tableau 2. Pourcentage de survie des protoplastes après traitement électrique et après 24 h de culture**

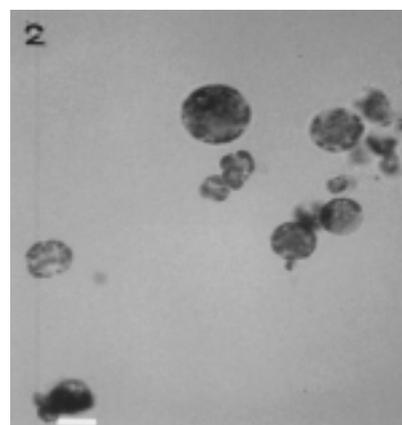
	Témoin	200 V	300 V	400 V	500 V	600 V
% de survie des protoplastes	75	54	43	29	16	11

Le témoin n'est pas soumis à l'électroporation.

Les protoplastes de la chicorée sont donc très sensibles aux chocs électriques. L'électroporation à 200 V permet d'obtenir le meilleur taux de survie. Cependant pour la suite du travail, on a pensé

qu'elle ne serait pas efficace pour l'électroporation. Par conséquent, on a choisi d'appliquer une d.d.p. de 300 V même si le pourcentage de survie est diminué d'environ 10% (Tableau 2). Le temps d'électroporation à 300 V est de 25 ms.

Afin de vérifier si les protoplastes sont perméables après le choc électrique, une aliquote de suspension de protoplastes est resuspendue dans une solution de calcéine à une concentration finale de 2,5 mM. La calcéine permet d'étudier la perméabilité des protoplastes après le choc électrique. La perméabilité des protoplastes a été observée sous microscope à fluorescence après 24 h de culture à 30°C. Les protoplastes fluorescents apparaissent bien circulaires et ne montrent aucun changement morphologique dû à l'électroporation (Figure 2).



**Figure 2. Aspect des protoplastes de chicorée après électroporation**

Les protoplastes sont suspendus dans 2,5 mM de calcéine et sont observés sous microscope à fluorescence. Les protoplastes viables apparaissent rouges.

Afin de déterminer la concentration optimale de transfert d'ADN dans les protoplastes de chicorée, on a fait varier la concentration d'ADN plasmidique. Ainsi, pour une densité de 10<sup>6</sup> protoplastes.ml<sup>-1</sup>, des concentrations d'ADN plasmidique de 0, 25, 50 ou 75 µg.ml<sup>-1</sup> ont été utilisées. Par ailleurs, des électroporations ont été effectuées en présence ou en absence de 50 µg d'ADN entraîneur. Ce dernier protège l'ADN plasmidique contre les attaques des désoxyribonucléases non spécifiques.

Le test GUS est effectué selon la méthode de Jefferson *et al.* (1987) 24 h après l'électroporation. L'efficacité de la transformation est exprimée en fonction du nombre de cellules exprimant le gène

*uidA*. Le nombre de cellules bleues dans chaque boîte de Pétri contenant  $10^5$  protoplastes/boîte est compté 24 h après le test GUS.

Les résultats (Tableau 3) montrent que le nombre de cellules exprimant le gène *uidA* est corrélé à la quantité d'ADN plasmidique utilisée. En effet, la fréquence de transformation la plus élevée ( $2,1 \cdot 10^{-4}$ ) est obtenue pour une concentration d'ADN plasmidique de 75  $\mu\text{g}$ .

**Tableau 3. Fréquence de transformation des protoplastes en fonction de la concentration de l'ADN plasmidique et de la présence ou l'absence de l'ADN entraîneur utilisé à 50  $\mu\text{g}$**

Concentration de l'ADN plasmidique en $\mu\text{g}$	0	25	50	75
Fréquence de transformation $\cdot 10^{-5}$ avec ADN entraîneur	0	$4 \pm 1$	$11 \pm 3$	$21 \pm 5$
Fréquence de transformation $\cdot 10^{-5}$ sans ADN entraîneur	0	0	0	$2 \pm 1$

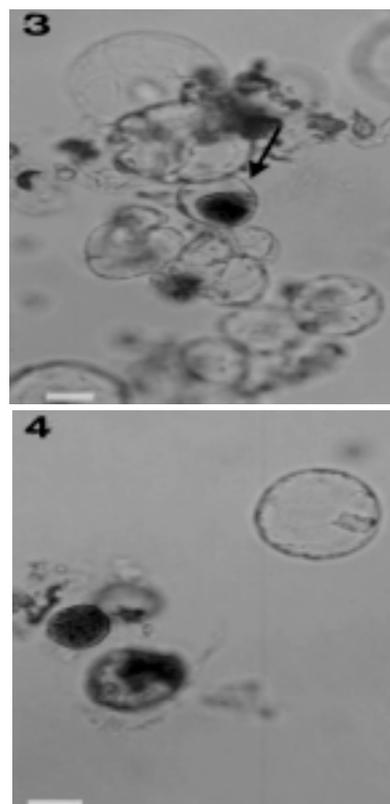
Ces résultats sont les moyennes de trois répétitions indépendantes

L'expression du gène *uidA* est détectée 24 h après l'électroporation (Figures 3 et 4). Cette expression se maintient dans les cellules en division en formant un microcal (Figure 5). Ceci prouve, d'une part, l'intégration et l'expression du gène *uidA* dans les protoplastes et, d'autre part, la possibilité de régénérer des cellules qui peuvent être transformées de façon stable.

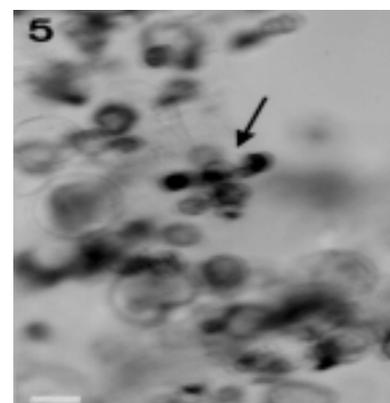
La présence de l'ADN entraîneur est nécessaire pour l'expression du gène *uidA* dans les protoplastes. En effet, la fréquence de transformation est nulle en l'absence d'ADN entraîneur. Il semble que ce dernier augmente l'expression transitoire en protégeant l'ADN plasmidique contre les attaques des désoxyribonucléases non spécifiques.

Les cellules soumises au test GUS ont une taille réduite et une morphologie altérée. Cette déformation des protoplastes peut être due à un effet négatif du substrat X-GLUC sur les cellules. Ceci rend difficile le dénombrement des cellules transformées.

En ce qui concerne l'électroporation des protoplastes de chicorée, un protocole a été établi pour mesurer l'expression transitoire. Un compromis entre la concentration plasmidique, la présence de l'ADN entraîneur et le pourcentage de viabilité après électroporation est nécessaire pour une meilleure fréquence d'expression transitoire.



**Figure 3 et 4. Activité GUS sur des protoplastes de chicorée électroporés (flèches)**



**Figure 5. Activité GUS maintenue sur un microcal issu de la division d'un protoplaste de chicorée transformé (barre =20mm)**

Dans la plupart des cas d'électroporation, une viabilité de plus de 50% donne généralement un meilleur résultat. Parmi les différents paramètres étudiés, il a été observé qu'un choc électrique de 300 V/cm et une concentration d'ADN plasmidique de 75  $\mu\text{g}$  en présence de l'ADN entraîneur fournissent un meilleur résultat. Le nombre de cellules mis en culture après 24 h d'électroporation est de l'ordre de  $63 \cdot 10^5$ . La fréquence de

transformation ( $2,1.10^{-4}$ ) est satisfaisante comparée à celle qui est trouvée par Mukhopad & Desjardins (1994) chez les protoplastes d'*Asparagus officinalis* électroporés ( $1,6.10^{-4}$ ). L'augmentation de la fréquence de transformation chez les protoplastes de chicorée électroporés provient de la forte concentration d'ADN plasmidique utilisée. Mukhopad & Desjardins (1994) ont montré que la fréquence de transformation est proportionnelle à la concentration d'ADN à électroporer. Le test histochimique révèle une activité GUS 24 h après l'électroporation. Cette expression se maintient dans les microcals 7 jours après l'électroporation (Figure 5). Aucune expression du gène de la  $\beta$ -glucuronidase n'a été détectée chez les protoplastes non électroporés ou électroporés en absence de l'ADN plasmidique.

## CONCLUSION

L'électroporation est une méthode prometteuse et efficace pour l'introduction des gènes dans la chicorée. Le promoteur (35S CaMV) utilisé nous a permis de détecter l'expression du gène 24 h après le choc électrique.

L'expression paraît stable dans les cellules puisqu'elle persiste dans les microcals. Cette technique permettra d'évaluer rapidement de nouveaux vecteurs pour leur expression dans les cellules de chicorée et d'étudier la régulation des promoteurs. Elle permettra aussi d'envisager une régénération de plantes transformées.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Battraw M. & Hall TC. (1992) Expression of a chimeric neomycin phosphotransferase II gene in first and second generation transgenic rice plants. *Plant Sci.* 82 : 191-202
- Crepy L., Chupeau M. & Chupeau Y. (1982) The isolation and culture of leaf protoplasts of *Cichorium intybus* and their regeneration into plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 107 : 123-131
- Dhir KS., Dhir S., Hepburn A. & Widholm J. (1991) Factors affecting transient gene expression in electroporated *Glycine max* protoplasts. *Plant cell Rep.* 10 : 106-110
- Hidaka T. & Omura M. (1993) Transformation of *Citrus* protoplasts by electroporation. *J. J. S. Hort. Sci.* 6(2) : 371-376
- Jefferson R., Kavanagh TA. & Bevan. MW. (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6 : 3901-3907
- Mukhopad Hyay. & Desjardins Y. (1994) Direct gene transfer to protoplasts of two genotypes of *Asparagus officinalis* L. by electroporation. *Plant Cell Rep.* 13 : 421-424
- Rambaud C., Dubois J. & Vasseur J. (1990) Some factors related to protoplast culture and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of Magdeburg chicory (*Cichorium intybus* var. Magdeburg). *Agronomie* 10 : 767-772
- Saski N., Dubois J., Millecamps J. & Vasseur J. (1986) Régénération de plantes de chicorées Witloof cv. "Zoom" à partir de protoplastes : influence de la nutrition glucidique et azotée. *C. R. Acad. Sci. Hort. Sci.* Paris 302 : 165-170
- Shimamoto K., Terada R., Izawa T. & Fujimoto H. (1989) Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338 : 247-276
- Zhang W. & Wu R. (1988) Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor. Appl. Genet.* 76 : 835-840