

# Travaux pratiques de Biologie cellulaire végétale

## *Introduction générale*

Le présent rapport se rapporte aux travaux pratiques de biologie cellulaire végétale. Celui-ci sera divisé en trois parties : Etude de la dynamique de la paroi cellulaire et du cytosquelette lors de la régénération de protoplastes, la transformation transitoire de protoplastes, la mise en évidence de l'activité de la pompe à protons via le gène rapporteur GUS.

Le matériel cellulaire de base sera constitué de protoplastes. Les protoplastes sont des cellules végétales sans paroi. Ceux-ci ont été obtenus expérimentalement via une digestion de la paroi cellulosique. Il est nécessaire de digérer la paroi des cellules dans un milieu hypertonique qui permettra aux cellules de ne pas exploser en l'absence de paroi du à la pression osmotique<sup>1</sup>.

Nous avons lors du laboratoire réalisé des protoplastes à partir de cellules d'Arabidopsis Thaliana. Le protocole a été réalisé stérilement sous hotte à flux laminaire. Une suspension cellulaire de cellules d'A. Thaliana de 50 ml a été prélevée et transférée dans un Falcon de 50 ml. Après centrifugation à 100g pendant 7min, le surnageant a été éliminé délicatement et remplacé par 30 ml de solution enzymatique stérile. La solution enzymatique contient de la cellulase et de la pectinase. La paroi cellulaire est détruite par hydrolyse de la cellulose en bêta-glucose via la cellulase. La pectinase hydrolyse elle la pectine en sucres et acides galacturoniques. On laisse la réaction enzymatique se produire une nuit à 25°C dans l'obscurité dans un agitateur. Une succession de centrifugations, de re suspensions et de lavages permettront finalement de récupérer nos protoplastes. Ainsi, la culture a été transférée dans un Falcon de 50 ml et centrifugée à 100g pendant 7min. Le culot a été re suspendu dans 10 ml de sucrose 0,4M en inversant délicatement le Falcon de 50 ml. Le tout étant ensuite transféré dans un tube de 15 ml. Une nouvelle centrifugation à 100g pendant 7min a été réalisée. Les protoplastes flottant à la surface ont été récupérés avec un tips ayant un bout coupé. Cette astuce permet de ne pas les endommager lors de l'aspiration. Les protoplastes ont été transférés dans un tube de 15ml. Ceux-ci sont re suspendus dans 10ml de solution MS/Mannitol, une solution de lavage. On re centrifuge encore à 100g pendant 7 min et nous éliminons le surnageant. Les deux dernières étapes citées (re suspension et centrifugation) sont répétées encore deux fois. Le culot final est re suspendu avec 3 à 4 ml de solution MS/Mannitol. Les protoplastes étant des cellules sans parois sont donc très fragiles et ont toujours été manipulés avec précaution.

# ***Etude de la dynamique de la paroi cellulaire et du cytosquelette lors de la régénération de protoplastes***

## **Introduction**

D'une part, la dynamique du cytosquelette sera étudiée via un marquage de la pectine, de la tubuline ainsi que de l'appareil de golgi. Ce marquage sera dit immunologique car nous utiliserons des anticorps pour visualiser l'organite d'intérêt. Ainsi, des anticorps primaires cibleront un constituant défini du protoplaste : pectine, tubuline ou golgi. Ce sont ensuite des anticorps secondaire marqué par un fluorochrome qui permettront la visualisation de la cible des anticorps primaires.

D'autre part, les protoplastes dont le protocole expérimental pour être obtenu a été décrit en détail dans l'introduction générale vont être étudiées avec un test au calcofluor. Le calcofluor est une molécule utilisée généralement pour mettre en évidence la cellulose dans la paroi des cellules végétales. En soumettant les protoplastes au calcofluor, nous devrions mettre en évidence l'absence de paroi cellulaire. Nous pourrions comparer les résultats avec des cellules « normales » et étudier l'évolution de la régénération de la paroi cellulaire des protoplastes au cours du temps. Ainsi nous observerons des protoplastes du jour même et des protoplastes ayant régénérés durant 24h.

Quatre marquages ont été effectués sur nos protoplastes, et dans certains cas sur des cellules normales d'*Arabidopsis Thaliana*. Ainsi, le premier marquage vise la tubuline. Celle-ci est marquée via les anticorps primaires anti  $\alpha$ -tubuline. Ceux-ci sont révélés par l'anticorps secondaire anti-souris SV qui est couplé à un ALEXA 488. Nous marquerons ainsi des cellules normales mais également des protoplastes perméabilisés. La perméabilisation des protoplastes est réalisée grâce au Triton X100, un détergent non ionique<sup>2</sup>. La perméabilisation des protoplastes est sensée permettre une meilleur incorporation de nos anticorps par les protoplastes. Le deuxième marquage aura pour but de mettre en évidence la pectine via des anticorps primaires 2F4. Les anticorps secondaires seront comme pour le premier marquage de l'anti-souris couplé à une ALEXA 488. Pour ce marquage, nous nous focaliserons sur des protoplastes perméabilisés au Triton X100. Le troisième marquage visera comme le deuxième, la pectine mais les protoplastes ne seront cependant plus perméabilisés au Triton X100. Le dernier marquage visera à mettre en évidence le golgi sur des protoplastes perméabilisés. Nous aurons ainsi utilisés comme anticorps primaire de l'anti GM130 que nous mettrons en évidence par l'ajout de l'anticorps secondaire anti souris SV couplé à un ALEXA 488.

Remarques : le protocole de marquage s'effectue sur lame ou nous effectuons 8 dépôts cellulaires. Nous réaliserons pour chaque marquage, un CTL anticorps primaire et un CTL anticorps secondaire. Le marquage commence par une fixation des cellules ou des protoplastes au PFA (paraformaldéhyde). Avant le marquage à l'anticorps primaire, la paroi cellulaire est affaiblie à l'aide d'une solution enzymatique (afin de permettre un meilleur marquage des cibles se trouvant à l'intérieur des cellules. Ce protocole n'est pas nécessaire dans le cas des protoplastes.). Dans les cas cités précédemment, on perméabilise les cellules au Triton X100. (Pour le marquage de la pectine, un traitement préalable à la pectine méthyle estérase est nécessaire afin d'hydrolyser les groupements méthylester de la pectine contenue dans la paroi cellulaire). Après un rinçage avec un tampon, le premier marquage est effectué. L'incubation de l'anticorps primaire dure 45 min, afin de bien laisser le temps aux anticorps de marquer leurs cibles. Après un nouveau rinçage, l'anticorps secondaire sera ajouté. Finalement, les noyaux seront marqués avec du ToPro (agent intercallant de l'ADN) et les lames seront fixées au Mowiol avant d'être observée au microscope confocal après un temps de stockage.

## Résultats

### Marquage microtubules, pectine et golgi via immunofluorescence.

#### *Marquage tubuline.*

Nous avons réalisé un marquage de la tubuline sur des cellules « normales » d'Arabidopsis Thaliana mais également sur des protoplastes. La tubuline marquée ciblée par l'anticorps primaire sera révélée par l'anticorps secondaire, celui-ci ayant été marqué par une ALEXA 488. La tubuline apparaîtra en vert sur nos micrographies.

La figure 1 nous illustre le marquage de la tubuline sur une cellule normale d'Arabidopsis Thaliana. La tubuline apparaît colorée de couleur verte et présente un aspect filamenteux clairement identifiable. La forme de la cellule est allongée et les filaments de microtubules semblent assemblés de manière parallèles dans le sens de la largeur.

Figure 1 : Mise en évidence des microtubules sur des cellules d'Arabidopsis Thaliana en immunofluorescence. Révélation de l'anticorps primaire par un anticorps secondaire (anti-souris) couplé à Alexa 488.

Il est intéressant de comparer la structure normale d'une cellule à un protoplaste. Celui-ci n'ayant plus de paroi cellulaire. Dans toutes les observations réalisées, dont une illustrée en figure 2, nous observons un changement global de la forme de la cellule. Celle-ci n'est plus allongée mais semble sphérique. Cet aspect est sans doute dû à la disparition de la paroi. La forme la plus stable pour la cellule dans le milieu (avec une pression isotonique) étant une sphère. Il semble évident que l'arrangement des microtubules soit totalement modifié par rapport aux cellules normales. Les microtubules apparaissent ainsi en vert sous la forme d'un grand enchevêtrement filamenteux.

Figure 2 : Mise en évidence des microtubules dans protoplastes d'Arabidopsis Thaliana. Mise en évidence du changement de morphologie par rapport à une cellule normale. Révélation de l'anticorps primaire par un anticorps secondaire (anti-souris) couplé à Alexa 488.

#### *Marquage pectine déestérifiée sur des protoplastes*

La pectine est un constituant de la paroi cellulaire végétale. Nous ne devrions donc pas en retrouver comme nous utilisons des protoplastes, cellules sans parois. Cependant, nous pouvons observer un signal dans les protoplastes traités sans Triton. En réalité, la paroi cellulaire végétale a déjà commencé à se régénérer, ce qui explique la présence de pectine tout autour du protoplaste voir figure 3. Une très faible fluorescence est observée à l'intérieur du protoplaste.

Figure 3 : Mise en évidence de la pectine sur protoplaste d'Arabidopsis Thaliana non perméabilisés par Triton X100. Anticorps secondaire couplés à Alexa 488.

La perméabilisation du protoplaste au Triton a permis l'entrée à l'intérieur du protoplaste de la pectine. Nous pouvons donc observer la pectine présente sous forme de nombreux spots verts à l'intérieur du protoplaste, illustration en figure 4.

Figure 4 : Mise en évidence de la pectine sur protoplaste d'Arabidopsis Thaliana traité au Triton X 100. Visualisation via anticorps secondaire couplé à ALEXA 488.

### ***Marquage Golgi sur des protoplastes***

L'observation des micrographies nous permet de mettre en évidence la localisation du golgi dans des protoplastes. Ceux-ci apparaissent nombreux sous la forme d'un ensemble de taches verte réparties dans l'ensemble du protoplaste. Une zone plus dense au centre de la cellule semble être la marque de la présence du noyau. Le golgi semblerait être en communication étroite avec le réticulum endoplasmique. De plus la reconstitution des membranes cellulaires pourrait passer par l'intermédiaire des vésicules du golgi. Ceci expliquerait l'activité important du golgi mise en évidence par ce marquage. Illustration en figure 5.

Figure 5 : Mise en évidence du Golgi dans protoplaste Arabidopsis Thaliana. Marquage via anticorps secondaires couplés à ALEXA 488.

### ***Analyse des Contrôles Ac 1° et Ac 2°***

Les contrôles Ac 1° et Ac 2° permettaient de mettre en évidence un éventuel bruit de fond parasite en fluorescence. En effet, l'utilisation d'un seul anticorps, soit le primaire, soit le secondaire devait donner un résultat ou aucune fluorescence n'était visible. L'anticorps primaire ayant besoin de l'anticorps secondaire pour être révélé, l'anticorps secondaire ayant besoin de l'anticorps primaire pour se fixer. Nous avons donc eu un résultat correspondant

aux résultats théoriques à savoir aucune fluorescence observée pour Ac 1° 2F4 seul, Ac 1° tubuline seul, Ac 1° GM130 seul et Ac 2° anti Souris V seul. Illustration en figure 6.

Figure 6 : Contrôle Anticorps primaire et secondaire. De gauche à droite : Ac 1° 2F4 seul, Ac 1° tubuline seul, Ac 1° GM130 seul et Ac 2° anti Souris V seul.

### **Marquage au Calcofluor**

Nous avons tout d'abord observé des cellules normales d'Arabidopsis Thaliana. Le calcofluor est localisé sur tout le contour des cellules en bleu (figure 7). Afin de déterminer si nous visualisons bien la paroi de la cellule végétale, nous avons observé des cellules plasmolysées (figure 8). Celles-ci présentent un décollement de la membrane cytoplasmique avec la paroi cellulaire. Nous observons le même résultat que dans la figure 7, ce qui nous amène à conclure que le calcofluor a bien mis en évidence la paroi cellulaire de la cellule.

Figure 7 : Mise en évidence de la paroi cellulaire végétale de cellules normales d'Arabidopsis Thaliana par un marquage au Calcofluor et observation en fluorescence.

Figure 8 : Marquage au calcofluor de cellules d'Arabidopsis Thaliana plasmolysées. Le Calcofluor mettant bien en évidence la paroi cellulaire végétale et non la membrane plasmique. Observation moitié fluorescence/moitié visible.

L'observation de protoplastes jeunes, n'ayant pas eu le temps de régénérer leur paroi cellulaire, ne devrait donc présenter aucune visualisation du calcofluor. En figure 9 nous pouvons visualiser un jeune protoplaste en lumière directe. Le passage en fluorescence avec le microscope, figure 10, nous montre la disparition de la paroi (plus de trace du calcofluor). Après 24h, la paroi cellulaire se régénère à plusieurs endroits. La présence de cellulose caractéristique de la paroi est visualisable grâce au calcofluor en figure 11.

Figure 9 : Visualisation en lumière directe de protoplastes d'Arabidopsis Thaliana.

Figure 10 : Visualisation du même groupe de protoplastes d'Arabidopsis Thaliana qu'en figure 9 mais en fluorescence. Seule une seule cellule présente un marquage au calcofluore (Erreur).

Figure 11 : Visualisation de la régénération de la paroi cellulaire de protoplaste d'Arabidopsis Thaliana à l'aide de Calcofluor. Micrographie prise après 24h de régénération.

## **Conclusion**

Durant cette première partie du rapport, nous avons étudié la dynamique du cytosquelette chez des protoplastes d'Arabidopsis Thaliana.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence grâce au calcofluor qu'après un temps de 24h, un protoplaste, soit une cellule sans paroi, commençait à régénérer sa paroi cellulaire végétale.

Les microtubules sont des acteurs importants du cytosquelette. Ils ne suffisent cependant pas à maintenir la forme de la cellule en absence de paroi cellulaire principalement composée de cellulose. La pectine est également localisée dans la paroi cellulaire. Le marquage du golgi nous a permis de montrer sa grande activité dans un protoplaste. Le golgi intervenant dans la régénération de la paroi cellulaire.

L'utilisation de PFA comme fixateur de la cellule entraîne irréversiblement la mort de la cellule. Il pourrait être intéressant d'étudier la dynamique des microtubules sans faire appel à des anticorps et sans tuer les cellules. Le recours à un gène rapporteur tel la GFP aurait peut être permis le marquage des microtubules sans avoir pour autant tué les protoplastes et cellules d'Arabidopsis Thaliana.

# **Transformation de protoplastes**

## **Introduction**

Pour cette deuxième partie du TP, nous étudierons une transformation transitoire de protoplastes à l'aide de la GFP, *green fluorescent protein*.

Les protoplastes d'*Arabidopsis Thaliana* sont comme précisés dans l'introduction générale des cellules dont la paroi cellulosique a été enlevée par un traitement enzymatique. Les protoplastes ont été placés dans une solution de sucrose 0,4M ce qui permettra par la suite de culotter les débris cellulaires après centrifugation. L'isolation et la purification des protoplastes sera ainsi de meilleure qualité. Après 3 lavages successifs (centrifugation, récupération du culot et re suspension dans du MS manitol), les protoplastes vivants sont comptés à l'aide d'une cellule de Fuchs- Rosenthal. Nous avons ainsi déterminé que le nombre de protoplastes vivants par ml de solution que nous avons obtenu était de 500000 protoplastes. Ce nombre est très faible par rapport à la quantité de protoplaste dont nous aurions du avoir besoin pour mener à bien toutes nos expériences, soit de 1 à 4 millions de protoplastes par ml de solution. Afin de compenser ce manque, nous ajouterons à nos protoplastes des protoplastes plus anciens. Cette méthode n'est pas idéale car les anciens protoplastes auront déjà régénérés un peu leur paroi. Comme nous souhaitons au final transformer nos protoplastes en insérant un plasmide à l'intérieur de ceux-ci, il est fort à parier que le rendement de notre expérience sera faible.

La transformation des protoplastes réalisée au cours de ce TP est dite transitoire. En effet, il n'y aura aucune intégration d'ADN exogène dans le génome végétal. Nous transformerons les protoplastes avec le vecteur plasmide PMDC83. Les protoplastes transformés perdront progressivement le plasmide au cours du temps. Le plasmide utilisé lors de ce TP contient un gène de résistance à la kanamycine, un gène de résistance à l'hygromycine et le gène rapporteur de la GFP sous le contrôle de deux promoteurs 35S. A l'aide de polyéthylène glycol (PEG), nous faciliterons l'entrée du plasmide dans le protoplaste, le PEG induisant une déstabilisation de la membrane plasmique. Plus la concentration de PEG sera importante plus la membrane sera déstabilisée et plus le plasmide aidé par l'ADN carrier pourra s'incorporer dans la cellule. Cependant une concentration trop élevée de PEG peut avoir des effets néfastes pour la cellule suite à une trop grande déstabilisation des membranes.

Le faible taux de protoplastes vivants recueilli nous a conduits à réduire nos expériences. Nous avons donc réalisé une transformation de protoplaste suivant 50µg de plasmide avec une concentration en PEG de 40%. En choisissant ces paramètres, nous favorisons la probabilité d'avoir un maximum de réponse à la GFP. Remarquons cependant que les cellules traitées aux PEG sont destinées à mourir. Cependant, le taux de survie serait plus important que dans le cas d'autres méthodes comme l'électroporation délicate à réaliser avec des cellules aussi fragiles que les protoplastes. Une grande quantité de plasmides étant injectée ayant normalement une grande facilité de rentrer à l'intérieur des protoplastes vu la concentration en PEG. Nous avons également réalisé un contrôle. Celui-ci ne contiendra ni plasmides ni ADN de saumon. Nous ne devrions pas y observer de fluorescence.

Remarque : Dans le cas des levures la transformation est accompagnée d'un traitement au LiAc. Nous n'utiliserons pas ce composé lors de cette expérience l'objectif de la manipulation se limitant à une transformation transitoire et non une intégration du plasmide dans le génome du protoplaste.

## Résultats

Nous commencerons par le contrôle. Celui-ci est illustré d'une part dans le visible (figure 12) et d'autre part en fluorescence (figure 13).

Figure 12 : Contrôle GFP soit protoplastes sans plasmides ni ADN carrier. Observation dans le visible.

Figure 13 : Contrôle GFP soit protoplastes sans plasmides ni ADN carrier. Observation en fluorescence. Zone similaire à la figure 12.

Il est très difficile de comprendre les résultats obtenus. Nous avons réalisé un contrôle soit des protoplastes sans ajout d'aucun plasmide ni d'ADN carrier. Or nous observons clairement de la fluorescence de la GFP. Ainsi certaines cellules présentes une granulation fluorescente verte. Peut être que le contrôle illustré ci-dessus correspond à d'autres paramètres. Ou que nous ayons une contamination de nos protoplastes.

En figure 14, nous pouvons observer les résultats obtenus après transformation des protoplastes d'Arabidopsis Thaliana avec 50µg de plasmide PMDC83 avec une concentration de 40% de PEG.

Figure 14 : Transformation de protoplastes d'Arabidopsis et visualisation de la GFP en fluorescence.

La transformation attendue semble bien avoir eu lieu. La couleur verte caractérisant les protoplastes devrait selon toute vraisemblance être due à l'expression de la GFP. La GFP s'exprimerait dans tout le cytoplasme du protoplaste. Le plasmide ayant pu rentrer dans le protoplaste grâce à une fragilisation de la membrane à l'aide du PEG.

Dans le cas où nous aurions souhaité marquer plus spécifiquement une partie du protoplaste, la membrane ou le noyau par exemple, nous aurions pu combiner le gène de la GFP à une protéine membranaire dans le cas du marquage de la membrane. Un couplage de la GFP à une séquence d'adressage au noyau aurait été utile pour envoyer la GFP et son expression à l'intérieur du noyau.

## Conclusion

Durant cette partie du TP, nous avons essayé de transformer des protoplastes d'Arabidopsis Thaliana avec un plasmide exprimant la GFP. Le peu de protoplaste à notre disposition nous a

contraint à ne tester qu'une seule condition soit 50µg de plasmide et 40% de PEG. Nous avons pu visualiser la GFP dans le cytoplasme de nos cellules. Cependant, nous ne pouvons donner beaucoup de crédit à nos résultats tant les résultats obtenus lors du contrôle semblent incohérent.

Dans l'éventualité où nous aurions voulu intégrer la GFP dans le génome de la plante, et non d'une manière transitoire telle que l'expérience a été réalisée aux tp, nous aurions pu utiliser *Agrobacterium tumefaciens*. Il s'agit d'une bactérie de la famille des Rhizobium. Cette bactérie dispose d'un plasmide pTi capable de s'auto insérer dans l'ADN de cellules végétales. Il est possible de remplacer une partie de ce plasmide par une séquence de son choix. Nous aurions pu y insérer la GFP qui aurait alors été insérée par la suite dans le génome de la plante<sup>3</sup>.

## **Test de l'activité GUS**

### **Introduction**

Dans cette troisième et dernière partie du rapport, nous tenterons de réaliser une mise en évidence histologique de l'activité glucuronidase (GUS) dans une plante transformée. Nous transformerons des plants de tabac en insérant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur d'une pompe à protons (PMA2). Nous pourrions donc observer l'expression du gène GUS aux endroits de localisation de la pompe à proton activée.

Nous tenterons de localiser l'activité de la pompe à proton dans une fleur de tabac ainsi que des prélèvements d'épiderme de plant de tabac.

Ainsi, les prélèvements d'épiderme de tabac se font à l'aide d'une lame de rasoir sur une feuille relativement jeune et verte.

Les prélèvements (épidermes et fleurs) sont ensuite colorés dans une solution de coloration. Cette solution contient du X-gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucoside), une molécule transformée in situ par l'enzyme Gus (la  $\beta$ -glucuronidase) en un composé coloré qui précipite ensuite à l'endroit de sa production. Nous devrions donc pouvoir ainsi localiser l'activité du gène GUS dans l'épiderme et dans les fleurs. Le X gluc est ajouté en dernier lieu lors de la préparation de la solution de coloration. La solution contient outre le X gluc, du DMSO (diméthylsulfoxyde), du  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , de l'EDTA, de la Kferricyanide et de la Kferrocyanide de potassium qui catalysent la dimérisation oxydative des dérivés d'X-Gluc (hydrolysé par l'activité GUS). Remarquons que dans notre solution de coloration, nous avons ajouté du Triton X100 permettant la perméabilisation des membranes cellulaires et permettant ainsi une meilleure entrée dans les cellules de la solution de coloration. Pour finir le protocole de coloration, nous passons les épendorfs et récipients contenant nos échantillons deux minutes sous une cloche à vide. Nous placerons enfin nos échantillons à incuber à 37°C jusqu'au lendemain pour l'observation des tissus et la localisation des cellules exprimant l'activité glucuronidase. Nous observerons les épidermes placés entre lames et lamelles au microscope à fond clair et à contraste de phase. Les fleurs seront quand à elles observées au binoculaire.

### **Résultats**

L'observation au microscope pour les fragments d'épiderme et au binoculaire pour la fleur nous a permis de localiser l'activité de la pompe à proton PMA2.

La coloration due au gène GUS se marque par la coloration des trichomes situés sur l'épiderme de la feuille d'un plant de tabac. Le trichome apparaît ainsi coloré en vert/bleu. Illustration en figure 11. La figure 12 illustre quand à elle un artefact. En effet, le trichome n'a pas été coloré mais bien la tige portant le trichome. Très peu de cas similaires ont été observés.

Figure 11 : localisation de la pompe à proton PMA2 dans les trichomes d'un épiderme de feuille de tabac. Mise en évidence en bleu/vert par le gène rapporteur GUS.

Figure 12 : Trichome d'épiderme de tabac non marqué par GUS. Détail, tige portant le trichome marquée par le gène rapporteur GUS.

La figure 13 illustre une des observations d'une fleur du plant de tabac. Nous pouvons localiser l'activité de la pompe à proton à deux endroits distincts. Soit, une première activité au niveau des anthères de la fleur ainsi qu'une activité au niveau des pétales de la fleur. La localisation de la pompe à proton étant déterminée par la présence ou non de la couleur bleue.

Figure 13 : observation au binoculaire d'une fleur de tabac transformée par le gène GUS pour mettre en évidence la localisation de la pompe à proton PMA2. Marquage de couleur bleue au niveau des anthères et des pétales.

## Conclusion

Durant cette troisième partie du TP, nous avons localisé la présence de la pompe à protons PMA2 au niveau des trichomes de l'épiderme de feuilles de tabac ainsi que dans les anthères et les pétales de la fleur de tabac. Cette localisation a été rendue possible grâce à l'utilisation du gène rapporteur GUS et son insertion dans la région promotrice de la pompe à protons. Son activation était caractérisée par la présence d'un colorant bleu/vert. Les bons résultats obtenus nous amène également à dire que l'utilisation du gène rapporteur GUS possède de nombreux avantages étant facile à manipuler, ne présentant pas de danger pour l'utilisateur et présentant des résultats facilement exploitables.

L'activité de la pompe à protons pourrait être analysée par une autre méthode que par la quantification de l'expression de GUS. PMA2 est une pompe à protons qui rejette les  $H^+$  à l'extérieur de la cellule. Une possibilité de mesurer l'activité de la pompe serait de mettre en évidence l'acidification du milieu extracellulaire due à l'activité de la pompe<sup>4</sup>.

L'utilisation du gène rapporteur GUS ne se limite pas à la localisation spatio temporelle d'un gène d'intérêt. Ainsi, le système rapporteur GUS a été utilisé pour mettre en évidence l'écologie bactérienne et en particulier les compétitions entre différentes souches de rhyzobium par rapport à leurs interactions avec des plantes.

C'est ainsi que Wilson et al ont pu comparer la compétition de 10 souches différentes de rhyzobium pour cinq cultivars différents de *Phaseolus Vulgaris*. L'activité de chaque souche de rhyzobium étant quantifiée par la quantité d'expression de GUS dans sa plante cible<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/protoplaste/protoplaste.html>

<sup>2</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Triton\\_X-100](http://en.wikipedia.org/wiki/Triton_X-100)

<sup>3</sup> <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transgenese/agrobacterium/agro.htm>

<sup>4</sup> <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/119/2/627>

<sup>5</sup> Application of the GUS marker gene technique to high-throughput screening of rhizobial competition. Wilson et al, *Canadian Journal of Microbiology*; Aug 1999; 45, 8; Academic Research Library, pg. 678