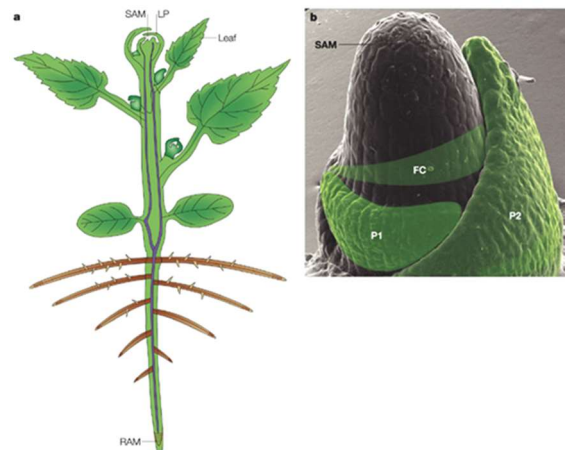
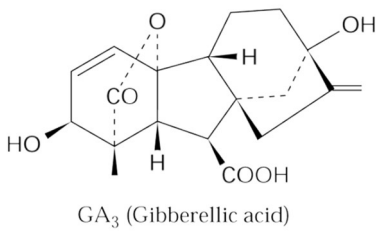




Licence Sciences de la Vie, 3<sup>ème</sup> Année

Biologie du Développement Végétal

2015-2016



Travaux Pratiques



# Avant propos

## Matériel à prévoir

- Blouse
- marqueur noir fin et indélébile

**Le port de la blouse est obligatoire. En cas d'absence de votre blouse, vous ne serez pas accepté dans la salle de TP.**

## Déroulement des TP BDV :

Séance 1 : lundi 4/04 (13h-18h; SNII4)

### Culture *in vitro*

- Préparation des milieux (CIV et H&D)
- Préparation des boîtes de culture (CIV et H&D)
- Mise en culture des explants de tabac
- Mise en culture de plantes transgéniques (ProDR5::GUS et ProGA1::GUS) (H&D)

Séance 2 : lundi 11/04 (13h-18h; SNII4)

### Hormones et Développement

- Coloration histochimiques et observations microscopiques (H&D)
- Stérilisation et Semis des graines (H&D)
- Introduction aux logiciels d'analyse d'image (Mesurim et/ou ImageJ) sur la croissance végétale (H&D)
- Examen oral de 15 min

Séance 3 : lundi 18/04 (13h-18h ; SNII4)

### Hormones et Expression Génique

- Extraction d'ARNs totaux (H&EG)
- Dosage et vérification des ARNs (H&EG)
- PCR semi quantitative
- Observations en microscopie (H&EG)
- Observations des résultats et analyse d'image (CIV et H&D)
- Rédaction du Compte rendu CIV

## Sécurité et élimination des déchets :

Les gels d'agarose et le matériel jetable ayant été en contact avec du **bromure d'éthidium** ou bien du **cyanure** doivent être jetés uniquement dans les poubelles spécifiques prévues pour ce type de déchets.

De même, tout matériel en **verre cassé** doit être jeté uniquement dans les poubelles spécifiques "verre".



## CULTURE IN VITRO

Le but de ce TP est tout d'abord de **vous initier aux fondements techniques de la culture *in vitro*** et notamment aux **notions d'asepsie**. Il vous permettra également de suivre, au cours des séances, le **devenir d'explants foliaires** suivant la composition du milieu et ainsi évaluer le rôle de la balance hormonale.

Lors de la culture *in vitro* de tissus végétaux, il est possible d'orienter l'organogénèse de l'explant en ajoutant dans le milieu de culture des hormones de croissance végétales exogènes. Bien que l'adjonction d'hormones végétales dans le milieu de culture doive être adaptée à chaque matériel végétal, l'équilibre auxine/cytokinine apparaît comme un élément déterminant de cette orientation.

Au cours de ce TP, vous allez observer l'effet de l'ajout de différentes hormones végétales, en concentrations variables, sur le développement de disques foliaires de tabacs cultivés *in vitro*.

### Déroulement de la séance 1

- Préparation des milieux de cultures pour les TPs « Culture *in vitro* » et « Hormones et Développement ».
- Mise en culture des explants de tabac.
- Mise en culture de plantes transgéniques.
- 

## I- préparation des milieux de cultures

Pour cultiver des explants/graines/plantules *in vitro*, il est nécessaire de fournir tous les éléments chimiques nécessaires à leur développement (carbone, azote, oligoéléments, vitamines, régulateurs de croissance, etc...). Cependant, ce milieu nutritif est également favorable au développement des microorganismes qui est plus rapide que celui de la plante. C'est pourquoi il convient de les cultiver en conditions aseptiques c'est-à-dire en absence de tout microorganisme.

Le milieu nutritif choisi est un milieu de culture fréquemment utilisé dans les laboratoires de biologie végétale pour la culture de cellules, de tissus et de plantes entières : le milieu de Murashige et Skoog (Milieu MS ; annexe 1). Ce milieu nutritif de base contient tous les nutriments dont une plante a besoin pour croître, mais aussi des éléments qui ne sont pas essentiels à la nutrition de la plante (ex : ion iodure). En fonction des besoins de culture spécifique ce milieu de base peut-être modifié. Par exemple, pour la culture d'*Arabidopsis thaliana* la concentration du milieu est diluée par 2 (milieu MS  $\frac{1}{2}$ ). De plus on ajoute de l'agar, un produit obtenu à partir d'algues rouges, pour gélifier le milieu de culture et ainsi disposer d'un milieu de culture solide. Enfin, il faudra ajouter de façon stérile les phytohormes et les éléments minéraux au milieu MS afin d'obtenir les milieux de compositions différentes.

\* Chaque binôme disposera de 200 mL de milieu de Murashige & Skoog (**A**) de composition suivante :

- Milieu de culture Murashige & Skoog	4,4	g.L <sup>-1</sup>
- Saccharose	15	g.L <sup>-1</sup>
- Agar	7	g.L <sup>-1</sup>

Remarque: le pH de ce milieu a été ajusté à 5,7 (KOH 1N), puis a été stérilisé par autoclavage (120°C/ 20 min/ 1 bar). Ce milieu minimal ainsi stérilisé est maintenu en surfusion à 55°C.

\* D'autre part, **le groupe** dispose de 200 mL de milieu stérile Murashige & Skoog liquide (**MS0**) à 4,4 g. L<sup>-1</sup> (pH 5,7).

\* Afin d'obtenir les différents milieux B, C, D et E, ajouter au milieu A les hormones de croissance suivante :

	Milieu contrôle <b>A</b>	Milieu <b>B</b>	Milieu <b>C</b>	Milieu <b>D</b>	Milieu <b>E</b>
<u>Cytokinine</u> N6-Benzyladénine (N6BA) en mg. L <sup>-1</sup>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
Volume à prélever pour 25 mL de milieu	—	—	—	—	—
<u>Auxine</u> Acide naphthalène acétique (NAA) en mg. L <sup>-1</sup>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0,1</b>	<b>1</b>	<b>0,05</b>
Volume à prélever pour 25 mL de milieu	—	—	—	—	—

Des solutions mères de NAA et N6BA stériles et concentrées à 1 mg. mL<sup>-1</sup> vous seront fournies en début de séance. **Attention à ne pas ouvrir les tubes en dehors de la hotte !!**

\* Couler vos différents milieux (à l'aide d'un tube stérile) dans des boîtes de Pétri stériles (25 mL par boîte ; 1 boîte par condition).

 **Précisez votre n° de groupe et de binôme, la date et la nature du milieu.**

## II- Désinfection des feuilles de tabacs

Les feuilles de tabacs sont désinfectées dans un bain de Domestos® 10% pendant 10 min puis abondamment rincées sous hotte à flux laminaire avec de l'eau distillée stérile. Les feuilles sont ensuite rapidement séchées sur papier filtre stérile.



### III- Mise en culture des disques foliaires

 **Les manipulations doivent être effectuées sous hotte à flux laminaire.**

- Couper à l'emporte-pièce 15 disques de feuilles de tabacs de 5 mm de diamètre et placer les dans une boîte de Pétri contenant du milieu MS liquide.
- Sécher les disques sur les deux faces sur du papier filtre stérile.
- Répartir les disques sur les 5 boîtes de milieux gélosés à tester (A, B, C, D et E), face inférieure contre la gélose.
- Fermer les boîtes avec du Scellofrais® et les placer dans une enceinte de culture (photopériode 16h, température 23°C).

### IV- Stérilisation de graines d'*Arabidopsis thaliana*

 **Les manipulations doivent être effectuées sous hotte à flux laminaire!**

Des graines d'*A. thaliana* sont placées dans un tube Eppendorf en présence de 1 mL d'éthanol 70% (Attention, très inflammable ). Après avoir inversé le tube plusieurs fois, l'éthanol est remplacé par 1 mL d'eau de Javel 6° Cl (Attention, corrosif ). Les graines sont incubées 5 min puis centrifugées (vitesse maximum) 1 min pour ôter l'eau de Javel. Les graines sont rincées avec 1 mL d'eau stérile. L'eau est alors remplacée par 0,5 à 1 mL d'agar 0,15% stérile.

Les graines sont alors directement disposées sur les boîtes de pétri à l'aide d'un Pipetman et de pointes jaunes stériles dont l'embout aura été préalablement coupé. Laissez les boîtes ouvertes quelques minutes afin de permettre à l'agar de sécher.

- WT
- pGA1::GUS (GA1, promoteur du gène codant la ent-copalyl diphosphate synthase)
- pDR5::GUS (DR5, promoteur synthétique sensible à l'auxine)

### V- Analyse des résultats

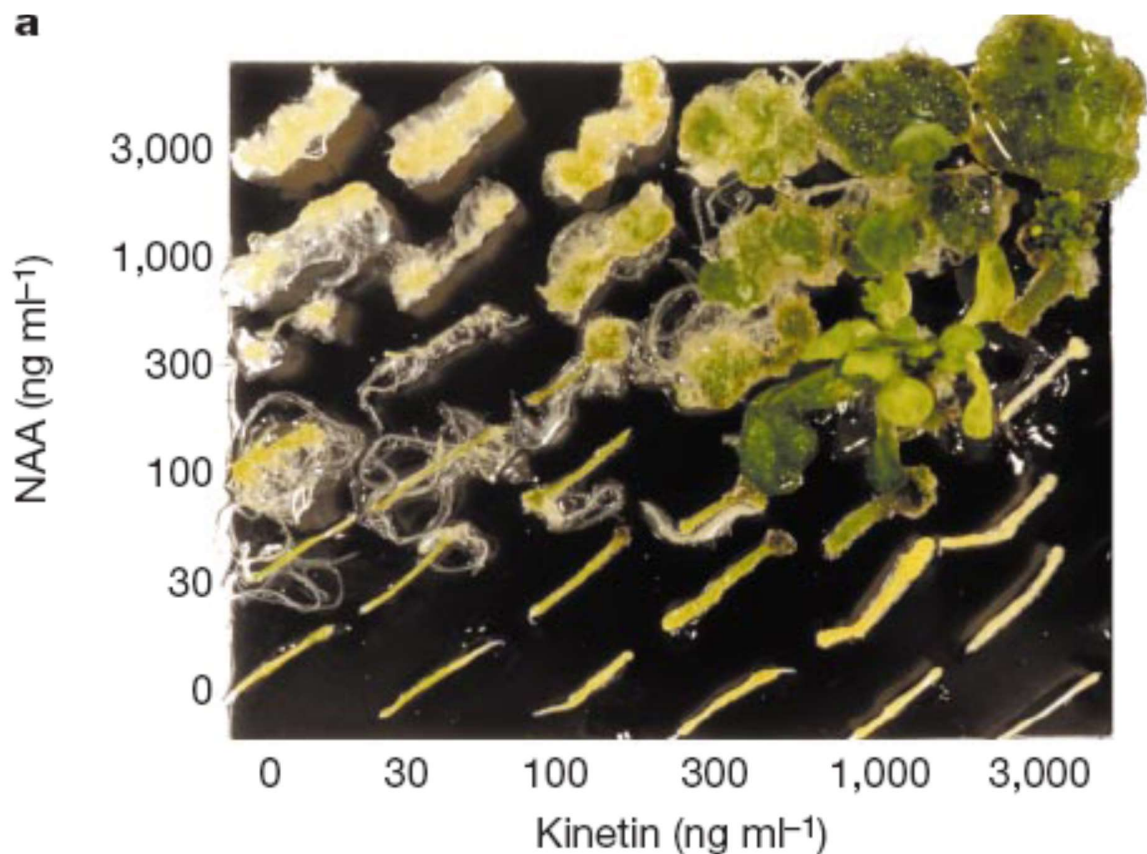
**Observez les cultures chaque semaine.**

Concluez quant au rôle des hormones et de leur équilibre sur le devenir de culture de disques et cals foliaires de tabacs.

**Annexe 1 : Composition du milieu minéral de MURASHIGE et SKOOG**

Macroéléments (mg.mL <sup>-1</sup> )		Microéléments (mg.mL <sup>-1</sup> )		Vitamines (mg.mL <sup>-1</sup> )	
KNO <sub>3</sub>	1900	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	Acide nicotinique	0,5
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	370	MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	22,3	Aneurine	0,1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8,6	Pyridoxine	0,1
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	440	KI	0,83		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	NaMoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25		
		CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025		
		CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025		
		Na <sub>2</sub> -EDTA	37,3		
		FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	27,8		

**Figure 1: Callus growth of hypocotyls segments in different auxin and cytokinin concentrations.** Hypocotyl segments were excised and cultured on media containing different levels of kinetin and NAA. After 21 days in culture, the induced calli were arranged and photographed.





## HORMONES ET DEVELOPPEMENT

Maintenant que vous vous êtes familiarisés avec la culture en conditions stériles, nous allons étudier le rôle de différentes phytohormones sur des processus physiologiques simples tels que la germination ou encore la croissance végétative chez *Arabidopsis thaliana*.

### Déroulement de la séance 2

- Coloration histochimique pour le TP « Hormones et Expression Génique ».
- Désinfection et semis des graines d'*Arabidopsis*.
- **EXAMEN** oral
- Traitement lumineux différents sur plantules d'*A. thaliana*

### I. Préparation des milieux de cultures

\* Préparer **pour chaque binôme** 300 mL de milieu de Murashige & Skoog (**MS**) de composition suivante :

- Milieu de Murashige & Skoog	2,2	g.L <sup>-1</sup>
- Saccharose	15	g.L <sup>-1</sup>
- Agar	7	g.L <sup>-1</sup>

Ajuster le pH à 5,7 avec du KOH 1N

Stériliser les milieux par autoclavage (120°C/ 20 min/ 1 bar)



\* Préparer, à partir du milieu MS (maintenu à 55°C), les boîtes de Pétri carrées suivantes (**Vf = 50 mL**) en précisant votre n° de groupe et de binôme, la date et la nature du milieu :

- 1 boîte MS
- 1 boîte MS + ABA (10 µM)
- 1 boîte MS + GA<sub>3</sub> (10 µM)
- 1 boîte MS + PAC (50 µM)
- 1 boîte MS + N6-Benzyladénine (N6BA, 5 µM)
- 1 boîte MS + N6BA (5 µM) + AgNO<sub>3</sub> (10 µM)
- 1 boîte MS + AgNO<sub>3</sub> (10 µM)

Des solutions mères concentrées des différentes phytohormones (ABA = 10 mM ; GA<sub>3</sub> = 10 mM ; PAC = 50 mM et N6BA = 5 mM) stériles, vous seront fournies en début de séance ainsi qu'une solution de AgNO<sub>3</sub> à 10 mM.

## II. Stérilisation de graines d'*Arabidopsis thaliana*

 **Les manipulations doivent être effectuées sous hotte à flux laminaire!**

Des graines d'*A. thaliana* sont placées dans un tube Eppendorf en présence de 1 mL d'éthanol 70% (Attention, très inflammable ). Après avoir inversé le tube plusieurs fois, l'éthanol est remplacé par 1 mL d'eau de Javel 6° Cl (Attention, corrosif ). Les graines sont incubées 5 min puis centrifugées (vitesse maximum) 1 min pour ôter l'eau de Javel. Les graines sont rincées avec 1 mL d'eau stérile. L'eau est alors remplacée par 0,5 à 1 mL d'agar 0,15% stérile.

Les graines sont alors directement disposées sur les boîtes de pétri à l'aide d'un Pipetman et de pointes jaunes stériles dont l'embout aura été préalablement coupé. Laissez les boîtes ouvertes quelques minutes afin de permettre à l'agar de sécher.

## III. Action des différentes phytohormones sur le développement

Au cours de ce TP, l'effet de l'acide abscissique, de l'acide gibbérellique, de l'auxine et des cytokinines va être observé sur la germination ainsi que sur la croissance de la racine et de l'hypocotyle.

Les boîtes seront fermées à l'aide de Scellofrais et enveloppées dans du papier aluminium, puis placées, sauf indication contraire, dans une enceinte climatique (photopériode 16h, 3000 lux, température 23°C).

### a- ABA

Nous allons ici étudier le rôle de l'ABA sur la germination. Pour cela, cent graines seront réparties sur 2 boîtes de milieu : soit du milieu MS seul, soit du milieu MS supplémenté de 10  $\mu\text{M}$  d'ABA. Les boîtes seront recouvertes de papier aluminium et maintenues à température ambiante. La fréquence de germination ainsi que le développement des graines seront comparés entre les 2 boîtes au bout de 7-14 jours d'incubation.

### b- N6-Benzyladénine (N6BA)

Les phytohormones interagissent les unes avec les autres de façon antagoniste ou synergique afin de mettre en place les différents programmes de développement. C'est pourquoi, nous allons essayer de voir ici le rôle des cytokinines mais aussi les relations éventuelles entre les cytokinines et l'éthylène sur la croissance.

Trois conditions sont retenues : 50 graines sont mise à germer sur du milieu MS supplémenté (i) avec du N6BA 5  $\mu\text{M}$ , (ii) avec de l'AgNO<sub>3</sub> 20  $\mu\text{M}$  (inhibiteur de la réponse à l'éthylène), (iii) avec du N6BA 5  $\mu\text{M}$  et de l'AgNO<sub>3</sub> 20  $\mu\text{M}$ . Après 7-14 jours d'incubation la



croissance racinaire sera mesurée. Ces mesures seront comparées à celles d'une boîte contrôle (graines sur milieu MS seul).

### c- Gibbérellines

Cinquante graines sont mises à germer sur du milieu MS supplémenté de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  ou de 100  $\mu\text{M}$  de Paclobutrazol. Après 7-14 jours d'incubation la germination et la croissance de l'hypocotyle sera mesurée. Ces mesures seront comparées à celles d'une boîte contrôle (graines sur milieu MS seul).

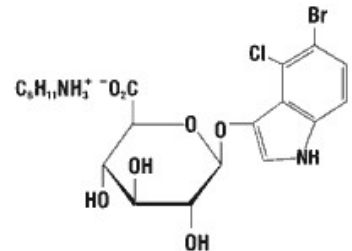
## IV. Localisation in planta de l'expression de gènes

Afin de s'intéresser à l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation et/ou de synthèse des phytohormones, nous allons utiliser différentes lignées transgéniques d'*A. thaliana* exprimant le gène *uidA* (codant la glucuronidase) sous le contrôle de différents promoteurs :

- Sauvage (WT)
- pGA1::GUS (GA1, promoteur du gène codant la ent-copalyl diphosphate synthase)
- pDR5::GUS (DR5, promoteur synthétique sensible à l'auxine)

L'expression du gène rapporteur *uidA* devrait ainsi permettre d'avoir d'une part une information sur la localisation in planta de l'expression du promoteur et d'autre part connaître l'effet des hormones sur l'expression de ces gènes.

L'activité glucuronidase (GUS) est détectée par coloration histochimique à l'aide d'un substrat chromogène de cet enzyme : le X-gluc (acide 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronique).



Cette expérience sera réalisée sur plantules entières d'*A. thaliana* âgées d'environ 10 jours.

**Protocole** : Chaque binôme prendra en charge la coloration de 2 conditions différentes.

Le matériel végétal (deux à trois plantules) est placé dans un tube Eppendorf (2 mL) puis est successivement préfixé dans l'acétone 90% froid pendant 1 heure à  $-20^{\circ}\text{C}$ , lavé 2 fois avec du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4 puis immergé dans le mélange réactionnel constitué de :

0,5 mg/mL X-gluc  
 0,5 mM de ferrocyanide de potassium  
 0,5 mM de ferricyanide de potassium

}  $V_F = 5 \text{ mL}$

7

Préparé dans le tampon phosphate  
de sodium 100 mM pH 7,4

Des solutions mères 10 fois concentrées seront mises à votre disposition.

**Attention** : ces produits sont toxiques. (🖐️). Les produits doivent être manipulés sous la sorbonne et les déchets doivent être jetés uniquement dans les poubelles spécifiques (poubelle déchets liquides / poubelle déchets solides).

Selon la vitesse de pénétration du produit dans les tissus, laisser agir de 1 heure (37°C) à une nuit (!) à **l'obscurité** (recouvrir les tubes de papier aluminium). Rincer au tampon phosphate et observer à l'aide des loupes binoculaires et de microscopes mis à votre disposition.

## **V- Présentation des logiciels d'imagerie permettant de mesurer la croissance végétale**

Voir la présentation et le site : [sites.unice.fr/EB](http://sites.unice.fr/EB)  
Logiciels [ImageJ](#) et [Mesurim](#).

Démarrage du traitement lumineux sur plantule WT d'*A. thaliana*.

## **VI- Préparation de l'oral et présentation orale**

## **VII- Analyse des résultats**

Vous présenterez l'ensemble des résultats obtenus (fréquence de germination, croissance de la racine et/ou de l'hypocotyle) sous forme de tableau ou de graphe. Une analyse de l'action des différentes hormones en fonction des résultats vous est demandée.

## HORMONES ET EXPRESSION GENIQUE

Au cours de ce TP, vous vous intéressez à l'étude du rôle de la perception lumineuse sur l'expression génique :

### Déroulement de la séance


- Préparation, dosage et analyse des ARN
- Transcription inverse
- PCR et analyse des résultats
- Analyse des résultats des TPs CIV et H&D
- Rédaction du compte rendu CIV

## I. Perception lumineuse et modulation de l'expression génique.

A l'aide d'une approche de biologie moléculaire, la RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), vous allez étudier le niveau d'expression de gènes clef impliqués la perception lumineuse chez *A. thaliana*.

Vous disposerez de 4 lots de plantules d'*A. thaliana* âgées d'environ 10 jours préalablement incubées avec :

- obscurité
- lumière bleue
- lumière verte
- lumière rouge

 **Recommandation très importante** : travaillez avec des **gants** tout au long du TP afin d'une part pour vous protéger et d'autre part pour éviter la contamination de vos échantillons par des RNases.

### 1) Extractions des ARN totaux

Chaque binôme prendra en charge l'extraction d'ARN totaux à partir de 2 conditions biologiques (soit **CTRL obscurité, lumière bleue, lumière verte ou lumière rouge**).

## **Protocole : (voir kit « RNeasy Plant Mini kit »)**

**Les centrifugations sont réalisées à 11000 x g.**

- Prélever 100 mg de tissus frais et les réduire en poudre fine dans l'azote liquide (⚠) à l'aide d'un pilon (Attention aux brûlures liées au froid, car l'azote liquide est à la température de - 196°C !!!)
- Transférer immédiatement la poudre dans un microtube froid (spatule refroidie dans l'azote liquide) et attendre l'évaporation complète de l'azote (Ne pas chauffer).
- Ajouter 450 µL de tampon RLC (☒). Homogénéiser vigoureusement les échantillons.
- Transférer le lysat sur une colonne QIAshredder spin column (violette) placée sur un tube de 2 mL et centrifuger 2 min afin de le filtrer.
- Eliminer la colonne, transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf, puis ajouter 500 µL d'éthanol 96-100% (☒) au filtrat. Mélanger par pipetage.
- Déposer l'échantillon (650 µL) sur une colonne RNeasy mini spin column (rose) sur un tube de collecte de 2mL. Centrifuger 15 s pour permettre la liaison des ARN sur la colonne. Jeter le surnageant.
- Ajouter 700 µL de RW1 (Membrane Desalting Buffer) et centrifuger 15 s. Jeter le surnageant.
- Ajouter 500 µL de solution RPE) et centrifuger 15 s. Jeter le surnageant.
- Ajouter 500 µL de solution RPE) et centrifuger 2 min. Jeter le surnageant.
- Mettre la colonne sur un nouveau tube de 1,5 mL. Ajouter au centre de la colonne 40 µL d'eau RNase free. Centrifuger 1 min pour éluer l'ARN.

## **2) Dosage et vérification des ARN totaux**

Les ARN totaux ainsi obtenus sont dosés au spectrophotomètre. Pour cela, 5 µL d'ARN sont dilués dans 995 µL d'eau DEPC stérile puis la densité optique de la solution est mesurée successivement à 230nm, 260 nm et 280 nm.

- Déterminer la concentration d'ARN totaux extraits (ng/µL) sachant que  $DO_{260} = 1$  correspond à 40 µg/mL d'ARN.
- Estimer la qualité de la préparation ( $1,8 < DO_{260}/DO_{280} < 2,1$  et  $DO_{260}/DO_{230} < 2$ )

## **3) Vérification de la qualité des ARN totaux**

L'agarose à 1% (m/v) est dissous par chauffage (micro-onde) dans du tampon d'électrophorèse TAE 0,5X (0,04 M Tris acétate; 0,002 M EDTA) puis refroidi à  $t^{\circ} < 50^{\circ}C$ . Du bromure d'éthidium à 0,4 µg/mL (☒, solution mère à 500 µg/µL) est ajouté à la solution d'agarose en surfusion qui est ensuite coulée dans un support adapté muni d'un peigne. Après solidification, le gel est immergé dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration (TAE 1X).

Du tampon de charge est ajouté à 2 µg d'ARN avant d'être déposé sur gel et soumis à une migration à 80-85 Volts pendant environ 30 minutes. L'ARN est ensuite visualisé aux UV.

 **Analyser vos résultats. Les échantillons d'ARN qui seront considérés comme les plus conservés et les plus homogènes seront utilisés pour la transcription inverse.**

#### **4) Transcription inverse**

Cette étape sera réalisée au laboratoire par nos soins. La transcription inverse consiste à convertir les ARNm présents dans votre préparation d'ARN totaux en **ADN complémentaire simple brin (ADNc)**, qui sera votre matrice pour les réactions de PCR.

 **Décrivez les différentes étapes de la transcription inverse.**

##### **Protocole : kit Omniscript (Quiagen)**

###### **Etape 1 : Traitement à la DNaseI RNase free**

1. Prélevez 3 µg d'ARN (Calculer le volume correspondant)
  2. Ajoutez 1 µL de Tampon 10 X
  3. Ajoutez 1 µL de DNaseI
  4. Complétez le volume à 10 µL avec de l'H<sub>2</sub>O DEPC
- **Incuber 30 min à 37°C puis 10 min à 75°C pour inactiver la DNase**
  - **Mettre dans la glace (4°C)**
  - **Garder sur glace 2µL de fraction** aliquote pour faire un control de PCR et ajouter 2µL d'H<sub>2</sub>O DEPC pour conserver le volume constant après traitement.

###### **Etape 2: Dénaturation de l'ARN traité à la DNase**

5. Ajouter un mélange composé de :  
2 µL de dNTP (kit, concentré à 5 mM) + 2 µL de « random primer » + 2 µL d'H<sub>2</sub>O DEPC
6. Dénaturer 10 min à 65°C et remettre dans la glace

###### **Etape 3: Reverse transcription**

7. Ajouter un mélange constitué de :  
1 µL de RNase inhibitor (pré-dilué 4X) + 2 µL de tampon 10X RT + 1 µL de reverse transcriptase OmniScript
8. Incuber 1h à 37°C puis mettre dans la glace
9. Pour la PCR, utiliser 1 µL de votre ARN reverse transcrit (ADNc)

## 5) PCR

Chaque binôme analysera le profil d'expression par PCR de 2 gènes d'intérêts et d'un gène contrôle constitutif dans 2 conditions biologiques (soit **CTRL obscurité, lumière bleue, lumière verte ou lumière rouge**).

Le niveau d'expression de plusieurs gènes va être analysé simultanément dans la salle :

- *PhyA* (Phytochrome A)
- *PhyB* (Phytochrome B)
- *Cab 1* (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)
- *Cop1* (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1)
- *Rbcs 1A* (ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit)
- Housekeeping gene ( ) ACT8 (at1g49240), ACT2 (at3g18780), UBC (at5g25760), TUB4 (at5g44340) ou EF-1a (at5g60390)

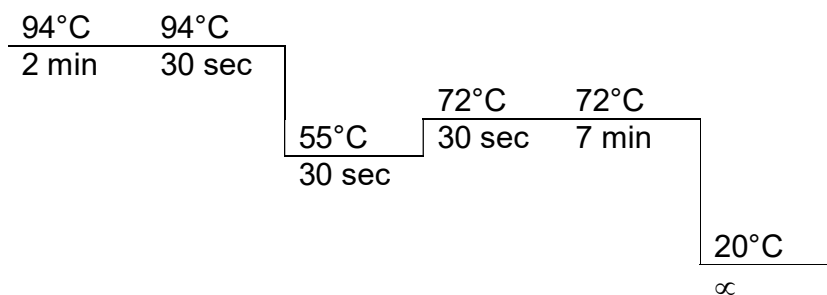
### **Protocole :**

Afin de diminuer les pipetages (et les erreurs qui leurs sont liées), un mélange réactionnel sera réalisé (**en omettant les amorces**).

Dans un tube PCR (200 µL) refroidi, ajouter :

	1 réaction	Mélange réactionnel (3,5 réactions)
Tampon PCR avec MgCl <sub>2</sub> (10X)	1X	
Tampon de charge (10X)	1X	
dNTP (2,5 mM)	200 µM	
H <sub>2</sub> O	qsp 20 µL	
ADN Taq polymerase (1 u/µL)	1 u	
ADNc	1 µL	
Ajouter dans les 3 tubes individuellement		
Amorce 5' (10 pmoles/µL)	10 pmoles	
Amorce 3' (10 pmoles/µL)	10 pmoles	

Mélanger par tapotement, puis placer les tubes dans l'appareil PCR programmé de la façon suivante :





## PRIMERS :

### PHYA

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	3871	20	60.02	55.00	3.00	3.00	tcgcatctacagtggtctgc
RIGHT PRIMER	4212	20	60.02	50.00	2.00	1.00	tctgttgcgctcctgtttctg

SEQUENCE SIZE: 5102  
INCLUDED REGION SIZE: 5102

PRODUCT SIZE: **342**, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

### PHYB

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	781	20	60.00	45.00	5.00	0.00	gtgctgttcaatcgcagaaa
RIGHT PRIMER	1101	20	60.00	55.00	5.00	2.00	cctggaccacaagaacaggt

SEQUENCE SIZE: 3850  
INCLUDED REGION SIZE: 3850

PRODUCT SIZE: **321**, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

### Cab 1

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	73	20	59.96	55.00	3.00	0.00	GCCTCAACAATGGCTCTCTC
RIGHT PRIMER	382	20	59.99	55.00	4.00	1.00	CCCACCTGCTGTGGATAACT

SEQUENCE SIZE: 1044  
INCLUDED REGION SIZE: 1044

PRODUCT SIZE: **310**, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

### Rbcs 1A

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	228	20	59.69	55.00	4.00	0.00	CCACTATGGTCGCTCCTTTC
RIGHT PRIMER	545	20	59.96	50.00	4.00	1.00	TTGTCCAGTACCGTCCATCA

SEQUENCE SIZE: 1025  
INCLUDED REGION SIZE: 1025

PRODUCT SIZE: **318**, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

### Cop1

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	125	20	60.04	50.00	6.00	0.00	GAGCACCGATCTGGATAAA
RIGHT PRIMER	460	20	60.07	45.00	5.00	3.00	TTCTCTTCCTTTCCGCAAGA

SEQUENCE SIZE: 2028  
INCLUDED REGION SIZE: 2028

PRODUCT SIZE: **336**, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

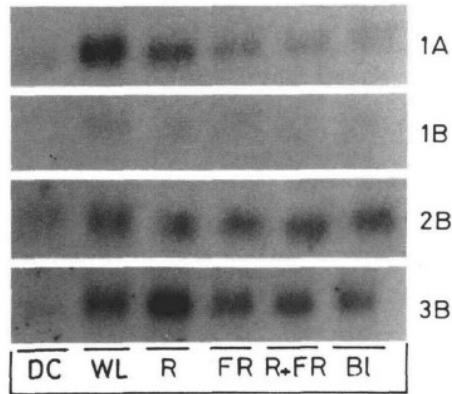
### EF-1 $\alpha$

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	881	20	60.00	55.00	6.00	3.00	CAGGGTTGACCACTGAGGTT
RIGHT PRIMER	1240	20	59.99	50.00	3.00	0.00	TAACCATACCAGCGTACCA

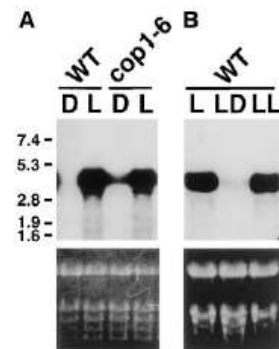
SEQUENCE SIZE: 1764  
INCLUDED REGION SIZE: 1764

PRODUCT SIZE: **360**, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00





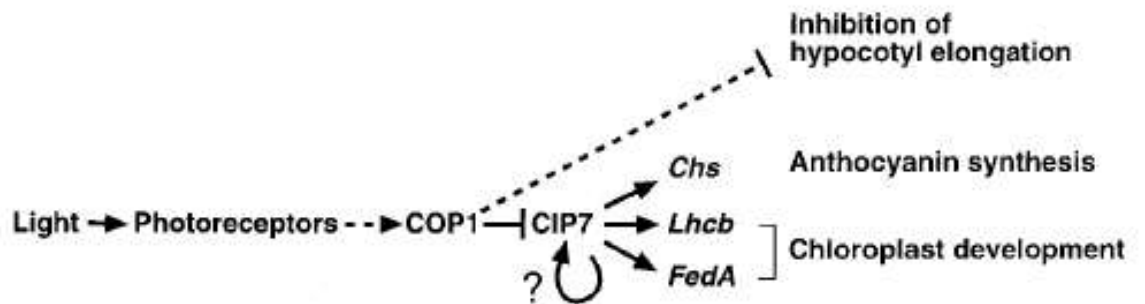
**Figure 1.** Phytochrome regulation of the *rbcS* mRNA levels in *Arabidopsis*. Total RNA was extracted from etiolated seedlings given light treatments as indicated after 9 d of growth in the dark. DC, Dark-grown control; WL, 24-h white light, fluence rate 100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; R, single pulse red light, fluence 5000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ ; FR, single



**Figure 6.** CIP7 Expression Is Regulated by Light and COP1.

(A) Equal amounts of total RNA from 5-day-old seedlings of wild type (WT) and *cop1-6* mutants grown under dark (D) and continuous light (L) were subjected to RNA gel blot analysis by using an anti-sense CIP7 riboprobe.

(B) Similar mRNA gel blot with total RNA samples from 5-day-old wild-type seedlings grown under continuous light (L) and then transferred to the dark (LD) or left in the light (LL) for 2 days. Numbers at left indicate positions of size markers in kilobases.



Proposed Role of CIP7 in Light Control of Gene Expression and Development.

Lhcb = cab