

OPTIMISATION GENETIQUE DE LA TRANSFORMATION D'*OCIMUM BASILICUM* PAR *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

Aïdam Atsou Vincent¹, Odah Komi¹, Etse Kodjo Djidjolé¹, Glato Kodjo¹, and Jocelyne Tremouillaux-Guiller²

¹Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales, Faculté des Sciences, Université de Lomé, BP : 1515 Lomé, Togo

²Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Biochimie Végétales, Faculté des Sciences Pharmaceutiques Université François Rabelais F-3700 Tours, France

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Literature reports that roots are source of important compounds possessing pharmaceutical properties. So, we have oriented our work toward the transgenic root establishment of *O. basilicum* obtained from *Agrobacterium rhizogenes*, a natural bacterium of the soil responsible for the formation of the "hairy root". This genetic transformation was achieved from the leaves and segments of stems allowed to initiate of abundant roots, displaying the typical characteristics of the hairy root syndrome, as a rapid growth on solid and in liquid media without hormones. The root initiation seems to arise from the target cells near to the inner and outer phloem after mother plant infection. A bacterial inoculation at the central nervure level of the leaves led to an efficient and original protocol of transformation. Indeed numerous transgenic root clones, from *Ocimum* explants, could be obtained. Finally, the transformed state of the roots was confirmed by molecular analysis showing the obvious integration of the genes *rol* of *A. rhizogenes* responsible of the "hairy root" phenotype.

KEYWORDS: *Ocimum basilicum*, genetic transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, secondary metabolites.

RESUME: Les racines sont d'importantes sources de composés d'intérêt pharmaceutique surtout lorsqu'ils sont produits dans les cellules de ces organes. Ainsi, avons-nous orienté nos travaux vers la transformation génétique d'*O. basilicum*, via la bactérie naturelle du sol, *Agrobacterium rhizogenes*, responsable de la formation de ces hairy root. La transformation génétique réalisée à partir de feuilles et de segments de tiges a permis le développement d'abondantes racines, au phénotype caractéristique du « hairy root », sur milieu solide et en milieu liquide. La formation de telles racines prend naissance à partir de cellules cibles, voisines des tubes criblés de l'explant infecté. L'inoculation bactérienne au niveau de la nervure centrale des feuilles est très efficace et constitue un protocole tout à fait original. Cette transformation conduit à des pourcentages élevés de racines et nettement plus rapide. Enfin, l'état transformé des racines est vérifié par des analyses moléculaires confirmant que les clones ont intégré certains gènes *rol* d'*A. rhizogenes* responsables de l'induction du phénotype « hairy root ».

MOTS-CLEFS: *Ocimum basilicum*, transformation génétique, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, métabolites secondaires.

1 INTRODUCTION

Ocimum basilicum L., est une plante médicinale qui appartient à la famille des Lamiaceae et répandue en zone tropicale humide. *O. basilicum* dont toutes les parties sont utilisées en thérapie traditionnelle pour traiter un grand nombre de maladies comme des infections respiratoires, la diarrhée, les maux de tête, la fièvre, les maux d'yeux et les infections cutanées. L'extrait de la plante possède des activités antimicrobiennes [1] ; des activités antibactériennes [2] antifongiques [3] ; antipaludéennes [4] et anti-protozoaires [5]. Elle est utilisée comme vermifuge en raison de ces propriétés

antihelminthiques. Cette plante est également utilisée contre la dysenterie et les maux de dents. La décoction des feuilles est recommandée dans les affections de l'estomac et aussi comme fébrifuge. Enfin, cette décoction agit sur les vers intestinaux, quel que soit leur stade de développement. Le jus des feuilles écrasées dans un peu d'eau est prescrit en instillations nasales ou auriculaires lors de céphalées, d'otites et de sinusites. Une préparation associant les fleurs, les feuilles et fruits avec de l'huile est recommandée dans certaines affections rhumatismales. Par ailleurs, cette plante est utilisée contre les ulcères, les tumeurs et également utiliser pour fortifier le système nerveux. Les cendres des racines servent à soigner certaines dermatoses. En plus, *O. basilicum* possède aussi des propriétés insecticides dues à la présence d'huiles essentielles. Traditionnellement elle est utilisée pour éloigner les termites et les fourmis à cause de son odeur qu'elle dégage. Les composés actifs extraits sont présents sous forme de molécules aromatiques volatiles issues d'une huile extraite des feuilles et sont composés essentiellement de thymol (32-65%) et d'eugénols [6]. Elle contient également des anthocyanes, des terpènes et des lactones [7]. Cette transformation nous permet d'amplifier la production de métabolites secondaires par la plante ce qui permettrait aux malades de se soigner à moindre coût.

2 MATERIEL ET METHODES

MATÉRIEL VÉGÉTAL

Des plants d'*Ocimum basilicum* cultivés dans le phytotron du laboratoire de Biologie moléculaire et Biochimie végétale (Faculté des Sciences Pharmaceutiques – Université François Rabelais – Tours) ont été utilisés. Ces plants sont issus du Laboratoire de Physiologie et de Biotechnologie Végétales (Faculté des Sciences- Université de Lomé). Des segments de tige et des feuilles entières ont été utilisés pour les expériences de transformation génétique.

SOUCHE D'AGROBACTERIUM RHIZOGENES

La transformation génétique est réalisée avec la souche sauvage 15834 d'*Agrobacterium rhizogenes*. Les agrobactéries sont entretenues sur le milieu solide YEM (Yeast Extrait-Manitol) pendant un mois à 4°C. Avant de réaliser l'infection des explants, elles sont subcultivées sur le même milieu solide pendant 48 heures à une température de 27°C.

METHODES

DESINFECTION DES EXPLANTS

Les fragments de tiges et les feuilles prélevés sur des plants cultivés au phytotron sont débarrassés de tous les microorganismes susceptibles de contaminer le milieu de culture. Avant de procéder à la désinfection de ces explants, les extrémités des fragments de tiges et du pétiole des feuilles sont obturées avec de la cire en surfusion. Les opérations de désinfection s'effectuent par trempage des explants dans différentes solutions sous agitation, suivant le protocole présenté dans le *tableau 1* ci-dessous.

Tableau 1: Méthode de désinfection des explants d'*O.basilicum*

Opérations	Produits utilisés	Durée
Lavage après obturation	Eau savonneuse	2 minutes
Rinçage	Eau du robinet	2 minutes
Trempage	Ethanol 70% (v/v)	1 minute
Rinçage	Eau stérile	1 minute
Trempage	Hypochlorite de calcium 7% (v/v)	5 minutes
Rinçage (x 3)	Eau stérile	2 minutes/rinçage

Toutes les solutions de désinfection renferment une goutte de Tween 80 stérile, un agent mouillant, qui assure un meilleur contact entre la surface des explants et les produits chimiques utilisés. Les explants sont séchés après rinçage, à l'aide de papier absorbant stérile. Les opérations de désinfection s'effectuent sous une hotte à flux laminaire vertical.

INFECTION DES EXPLANTS PAR UNE SOUCHE SAUVAGE D' *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

L'infection des explants est réalisée à l'aide d'une culture d'*A. rhizogenes* « 15834 » âgées de 48 heures. Ainsi, on prélève avec la pointe d'une lame stérile de scalpel, une petite colonie bactérienne que l'on introduit dans une blessure effectuée au scalpel au niveau de la nervure principale d'une feuille ou le long d'un segment de tige. Pour des explants constitués de tiges feuillées de vitroplants, l'infection se pratique à l'aide d'une aiguille stérile. Les explants témoins sont blessés mais non infectés. Ensuite les échantillons sont placés dans des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) sur le milieu de [8] ou milieu MS solide supplémenté de 30g.L⁻¹ de saccharose et de vitamines B5. Le pH du milieu de culture est ajusté à 5,7 avant autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes.

Les co-cultures sont effectuées pendant 48 heures à 28°C. Les explants sont ensuite transférés sur le même milieu minéral et vitaminé de base, dilué au demi et additionné de 1g.L⁻¹ de céfotaxime pour pallier toute récurrence bactérienne ultérieure. Toutes les cultures sont ensuite stockées dans une pièce à 24 ± 1°C avec une photopériode de 12h.

Selon le type d'expérience, en moyenne une trentaine d'explants sont utilisés pour l'étude.

ISOLEMENT DES CLONES DE « HAIRY ROOT »

De courtes racines apparaissent au site de blessure, puis sont excisées et mises en culture sur un milieu solide de composition identique au précédent. Les clones qui présentent une bonne croissance sont sélectionnés pour être transférés en culture liquide.

CULTURE EN MILIEU LIQUIDE

Pour initier la culture en milieu liquide des clones sont sélectionnés à partir de segments de tige et de feuilles. Dix pointes racinaires de 2 cm environ, prélevées sur chaque clone sont mises en culture dans des Erlenmeyers de 250 mL, contenant 50 mL de milieu liquide MS additionné de vitamines B5 et de saccharose à 30 g/L. Les cultures sont maintenues à l'obscurité, à la température de 24 ± 1°C et sous agitation à 100 rpm. Après trois semaines de culture le poids de la matière fraîche de chacun des clones est déterminé.

EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE SACCHAROSE SUR LA PRODUCTION DE BIOMASSE

Une expérience est réalisée à partir d'un clone sélectionné après trois passages en milieu liquide. Des racines sont introduites dans le milieu MS additionné de vitamines B5 et de saccharose à différentes concentrations : 20 ; 30 ; 40 ; 50 g/L. Les cultures sont maintenues à l'obscurité à la température de 24 ± 1°C et sous agitation à 100 rpm. Chaque condition expérimentale est répétée 3 fois. A la fin de deux semaines de cultures le poids des matières fraîche et sèche est déterminé.

EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE

L'ADN génomique est extrait à partir de 400 à 500 mg de tissus végétaux. Chaque échantillon d'un clone de « hairy root » est congelé à - 85 °C est broyé dans l'azote liquide. Cette extraction est réalisée à l'aide du kit « Dneasy Plant Minikit » de Qiagen® selon les instructions du fabricant.

La concentration de l'échantillon est déterminée à partir d'une solution obtenue après dilution de 12 µL d'éluat d'ADN dans 288 µL d'eau milliQ® stérile, par mesures de l'absorbance qui sont faites au spectrophotomètre à 260 et 280 nm (1 unité d'absorbance correspond à 50 µg/mL d'ADN). Le rapport des absorbances 260/280 renseigne sur la pureté de l'ADN extrait.

AMPLIFICATION PAR PCR

La PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne, est une méthode qui permet l'amplification en chaîne de fragments d'ADN dont on connaît, en partie, la séquence nucléotidique indispensable pour la détermination des amorces. Cette réaction d'amplification comprend une étape de pré-dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 2 minutes, puis 35-40 cycles PCR suivis d'une étape d'élongation finale de 7 minutes à 72°C.

Chaque réaction PCR comprend : X µL d'ADN, 0,5 µL de chaque amorce (10 µM), 0,5 µL de dNTP (10mM), 0,25 µL de Taq polymérase, 2,5 mL de Tampon buffer 10x, 1,5 mL de MgCl₂ (25mM) pour un volume final de 25 µL. Les réactions d'amplification sont effectuées dans un thermocycleur (iCycler™, Bio-Rad®) programmé pour 40 cycles PCR.

Les amorces utilisées sont spécifiques des gènes *rol A*, *rol B*, *rol C* et du gène *vir D* (tableau2)

Tableau 2: Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées au cours des expériences de PCR

Gène	Amorce 1 (sens)	Amorce 2 (antisens)	Taille du fragment ADN amplifié
rol A	CAGAAATGGAATTAGCCGGACTA	TTAATCCCGTAGGTTTGTTCG	307pb
Rol B	ATGGATCCCAAATTGCTATTCC	GTTTACTGCAGCAGGCTTCATG	762pb
Rol C	ATGGCTGAAGACGACCTGTGT	GCCGATTGCAAACCTGCACTC	539pb
Rol D	ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCA	GGAGACTTTCAGCATGGAA	437pb

ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE DES ADN

La détermination de la taille, de la quantité et de la pureté d'un fragment d'ADN, ainsi que la séparation de plusieurs ADN s'effectuent par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % (m/v). Le gel est préparé à l'aide d'un tampon TAE 0,5X (Tris acétate 40mM, EDTA 1mM) et contient 0,4 µg mL⁻¹ de BET (bromure d'ethidium), un agent intercalant des bases de l'ADN, qui permet la visualisation des bandes attendues (0,375 g d'agarose, 25 mL de TAE 0,5X, 1 µL de BET). Les produits de PCR sont additionnés d'un tampon de charge B.O 6X (bleu orange) dont le volume représente 1/10^{ème} de celui des produits. La migration se déroule dans le tampon TAE 0,5X pendant 1h environ à 50 V.cm⁻¹. La taille de l'ADN est déterminée après comparaison avec des marqueurs de taille 100pb DNA ladder (Promega).

3 RESULTATS

FORMATION DE RACINES TRANSGENIQUES A PARTIR DE FEUILLES ET DE FRAGMENTS DE TIGE D'*OCIMUM*

DEVELOPPEMENT DES RACINES

Des feuilles bien développées et des segments de tiges d'*Ocimum basilicum* sont infectés par la souche sauvage 15834 d'*Agrobacterium rhizogenes*. Les bactéries sont cocultivées avec les explants sur le milieu solide MS à 27 °C et à l'obscurité pendant 48 heures, période de compétence des bactéries nécessaire pour transformer le génome végétal. Après ce laps de temps les explants sont transférés sur le milieu solide MS dilué de moitié et additionné de cefotaxime, puis stockés dans la chambre de culture.

Une semaine après l'inoculation, un cal blanc apparaît au site de blessure sur la nervure centrale, à partir duquel des racines se développent (Fig.1).

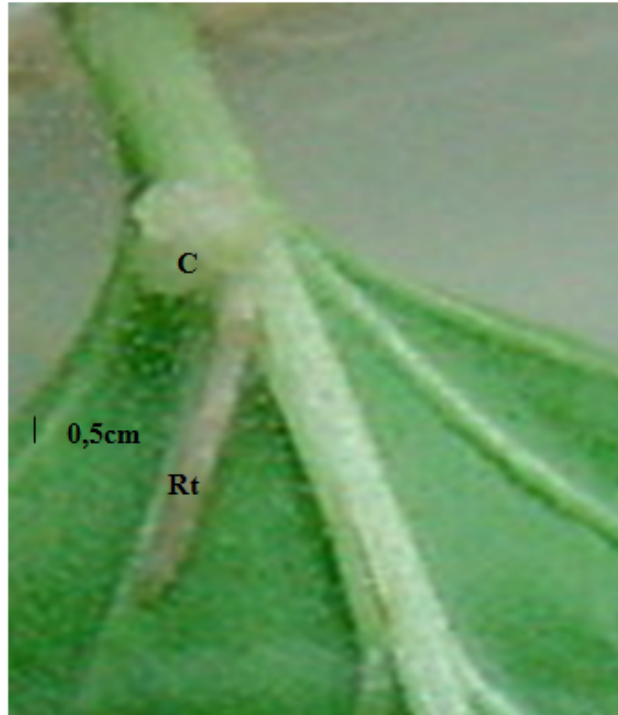


Fig. 1. Formation de racines transgéniques (Rt) à partir d'une feuille d'*O. basilicum* infectée par la souche sauvage 15834 d'*Agrobacterium rhizogenes* après production de cal (C) au site d'inoculation

Au bout de 1 à 2 semaines de culture les premières racines apparaissent au site de blessure des feuilles et présentent les caractéristiques du phénotype hairy root : absence de géotropisme et présence des ramifications latérales recouvertes de nombreux poils absorbants. Ces ramifications secondaires ou « branching » sont de plusieurs ordres (Fig.2). Enfin, une croissance autotrophe aux régulateurs de croissance montre le caractère transformé de ces organes.

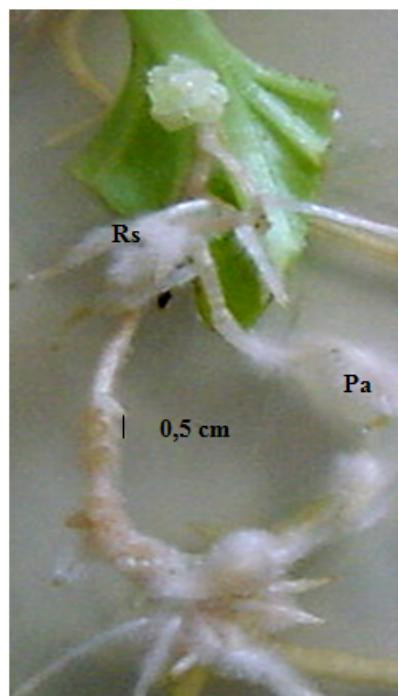


Fig. 2. Formation de racines secondaires (Rs) couvertes de poils absorbants (Pa)

Au niveau des segments de tiges, l'apparition des racines n'est pas précédée par une formation de cal au site de blessure. Ces racines présentent les mêmes caractéristiques morphologiques et physiologiques, typiques du hairy root que celles des feuilles (Fig.3).



Fig. 3. Développement de racines transgéniques (Rt) d'*Ocimum basilicum* à partir de segments de tiges. Formation des racines secondaires (Rs) et des poils absorbants (Pa)

DETERMINATION DU POURCENTAGE DE TRANSFORMATION

Dès l'apparition des racines sur les explants, nous évaluons le pourcentage de transformation des racines en tenant compte du phénotype comme il est porté au *Tableau 3* ci-dessous.

Tableau 3 : Pourcentage d'explants d'*Ocimum basilicum* aptes à initier des racines putativement transformées après deux semaines de culture

Jours après inoculation bactérienne	Pourcentage de transformation (%)		
	Témoins	Segments de tige traités	Feuilles traitées
7	0	62	64
14	0	85	90

-Pourcentage sur 20 explants

Les pourcentages de transformation, observés à partir de la première semaine suivant l'infection bactérienne, sont évalués à 64 % pour les feuilles et 62 % pour les segments de tiges. Ces valeurs passent dès la deuxième semaine respectivement à 90 % et 85 % pour les feuilles et les segments de tiges (Tableau 3).

Ces valeurs élevées montrent une bonne sensibilité du modèle *Ocimum basilicum* à la souche d'agrobactéries choisie.

ETABLISSEMENT DES CLONES DE « HAIRY ROOT »

DEVELOPPEMENT SUR MILIEU SOLIDE

Lorsque les racines, toujours connectées au site de blessure de l'explant, atteignent une longueur de 0,5 à 1 cm, elles sont excisées et transférées individuellement dans une boîte de Pétri contenant le milieu solide MS additionné de 30 g/L de saccharose, de vitamines B5 et de 1 g/L de cefotaxime, pour l'établissement de clones de « hairy root ». Chaque racine est induite spécifiquement par une bactérie, par conséquent, chacune des racines initiées au site de blessure d'un même explant conduit à des clones de « hairy root » différents. En effet, chacun de ces clones est le produit de l'expression des gènes bactériens intégrés dans le génome d'une cellule-hôte. Il faut rappeler que dans le cas des souches dites hypervirulentes, le transfert de l'ADN-TR et de l'ADN-TL est découplé et que, d'autre part, le transfert de chacun de ces segments d'ADN-T peut-être lui-même incomplet.

Quatre semaines après la mise en culture, les clones de racines en se développant présentent des caractéristiques très marquées du phénotype « hairy root ». Leur croissance est rapide sur milieu MS privé de régulateurs de croissance. De plus,

ces racines produisent de nombreuses ramifications ou « branching d'ordre 1, 2, 3 » caractérisées par une absence totale de géotropisme (Figs. 4 a, b).

La culture en milieu liquide de ces clones est possible après une production suffisante de biomasse de « hairy root » sur milieu solide.

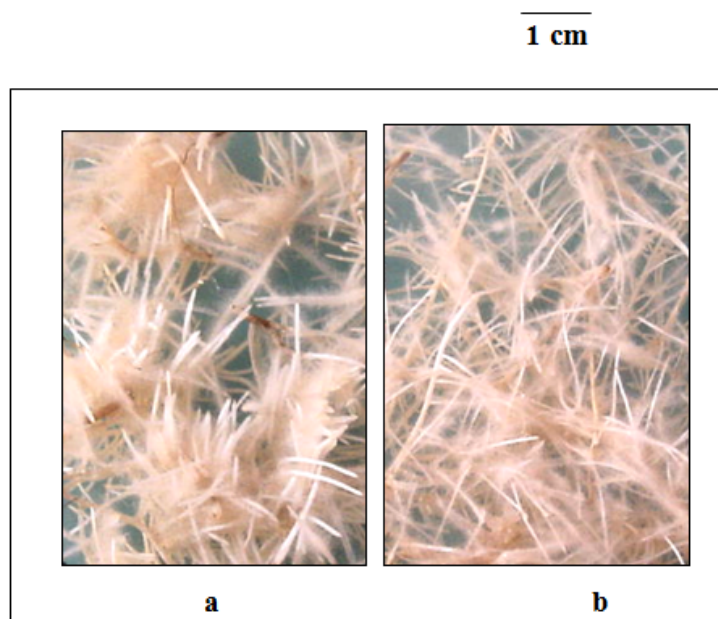


Fig. 4. Après quatre semaines de culture, développement de racines transgéniques d'*Ocimum basilicum*; à partir d'explants de feuilles (a) et de segments de tiges (b) sur milieu solide

DEVELOPPEMENT EN MILIEU LIQUIDE

Dix pointes de racines de 2 cm, prélevées à partir de chaque clone provenant de la culture en milieu solide sont introduites dans 50 mL de milieu liquide MS additionné de vitamines B5. Ainsi, plusieurs clones sont sélectionnés sur milieu solide, les clones 1, 2X, 7 provenant de segments de tiges et les clones 3, 3C, et 6 originaires de feuilles. La culture en milieu liquide agité conduit généralement à une croissance rapide et à une production de biomasse importante. Après dix jours, les clones présentent de nombreuses ramifications qui s'entremêlent en se développant. Quatre semaines plus tard, le poids de matière fraîche produite par chacun des clones, est compris entre 17,15 et 23,06 g. La biomasse des clones 1, 3C et 7 est légèrement supérieure à celle des autres clones (Figures. 5 a, b, c) et le poids de matière sèche par ces clones est respectivement de 0,65 ; 0,73 et 0,64 g. Nous pouvons conclure, au vu des présents résultats, que le transfert des racines d'*Ocimum* du milieu solide en milieu liquide est donc possible. Ce transfert constitue généralement une étape critique à franchir avant de parvenir à l'établissement du « hairy root » en culture liquide. Le milieu liquide MS utilisé est, semble-t-il, favorable à la culture du « hairy root » d'*O.basilicum*, car il génère une croissance rapide des racines.

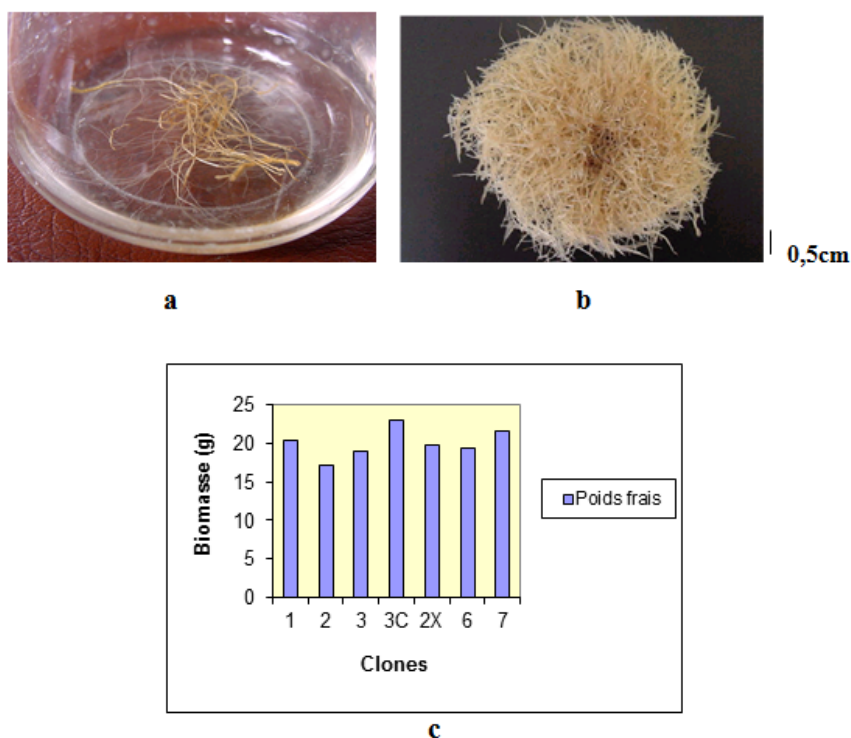


Fig. 5. (a) Croissance de racines transgéniques d'*O. basilicum* en milieu liquide MS. (b) Racines transgéniques très ramifiées après dix jours de culture en milieu liquide. (c) Biomasse de sept clones de racines après quatre semaines de culture en milieu liquide

EFFET DU SACCHAROSE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LA BIOMASSE

Les racines présentant un phénotype « hairy root » sont capables de croître sans apport exogène de phytohormones dans le milieu, mais demeurent cependant hétérotrophes au carbone, en raison de l'absence de l'assimilation chlorophyllienne. Il faut donc ajouter des glucides au milieu de culture. La concentration optimale en saccharose ou autres glucides pour la croissance de chaque espèce de « hairy root » reste à déterminer.

Trois subcultures, chacune d'une durée de 10 à 15 jours, sont nécessaires comme laps de temps de passage pour établir des clones de « hairy root » en milieu liquide, mais également pour tester l'efficacité d'un nutriment dans un milieu donné. Dans la présente expérimentation, l'effet du saccharose est vérifié à partir du clone 1 choisi parmi l'ensemble de clones cultivés en vue de leur établissement. Différentes concentrations en saccharose (20, 30, 40, 50 g/L) sont additionnées au milieu de culture de ce clone, afin de déterminer la concentration conduisant à une production optimale de biomasse.

Après dix jours de culture, la biomasse des racines du clone 1, cultivé en présence de différents teneurs en saccharose, augmente proportionnellement avec la concentration de ce glucide pour atteindre une valeur maximale à 40 g/L. Au-delà de ce seuil, elle diminue. Les analyses statistiques révèlent une différence significative entre l'effet des concentrations en saccharose et la biomasse des racines du clone 1. Le test de Newman-Keuls réalisé au seuil de 5 % classe le saccharose à 40 g/L comme étant la concentration qui donne les meilleures moyennes. En proportion, on observe une production plus importante de matière sèche toujours à cette concentration comme l'indiquent les résultats portés au *Tableau 4*.

Tableau 4 : Effet du saccharose sur la production de biomasse du clone 1 après 10 jours de culture en milieu liquide MS. Comparaison des moyennes entre lignes d'après le test de Newman-Keuls au seuil de 5 %

Biomasse (gr)	Saccharose (g.L ⁻¹)			
	20	30	40	50
MF	2.67b ± 0.55	5.15ab ± 0.6	7.29a ± 0.55	6.04ab ± 0.2
MS	0.15b ± 0.03	0.31ab ± 0.04	0.49a ± 0.04	0.40a ± 0.02
MS/MF	0.056	0.060	0.067	0.066

Moyenne ± se sur 5 répétitions

ANALYSES MOLECULAIRES DES RACINES TRANSFORMEES

DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN ADN TOTAL DES EXTRAITS

Pour vérifier l'intégration des gènes *rol* dans le génome végétal et confirmer la transformation génétique des racines, l'ADN total de clones de « hairy root » d'*O. basilicum* est extrait de cellules à l'aide d'un kit (*Dneasy Plant Minikit – Qiagen – Allemagne*). Ainsi la concentration en ADN total est déterminée à partir d'échantillons de « hairy root » correspondant aux clones 1, 2X, 3C, 3, 6, 7, choisis parmi les plus performants quant à leur croissance. La concentration d'ADN total pour chacun des clones varie de 15 à 85 µg.mL⁻¹ (ou 15 à 85 ng µL⁻¹) et le degré de pureté est compris entre 0.6 et 2.0 (Tableau 5).

Tableau 5 : Concentration en ADN total des échantillons de « Hairy root »

Clones	[ADN] (µg.mL ⁻¹)	Degré de pureté
1	67.5	1.4
2X	48.75	1.6
3C	15	2.0
3	85	1.3
6	28.75	0.6
7	26.75	0.6

ABSENCE DE CONTAMINATION BACTERIENNE DANS LES RACINES TRANSGENIQUES

L'absence d'agrobactéries à l'intérieur des cellules de « hairy root » d'*Ocimum basilicum*, est vérifiée par une réaction PCR des ADN extraits de racines en présence d'amorces du gène *vir-D1*. Sachant que les gènes de virulence ne sont jamais transférés dans le génome des cellules, les bactéries de souche sauvage 15834 sont utilisées comme un témoin positif. Il en résulte qu'un seul fragment d'ADN de 437 pb correspondant au gène *vir D1* est amplifié uniquement à partir de l'échantillon bactérien (Fig. 6).

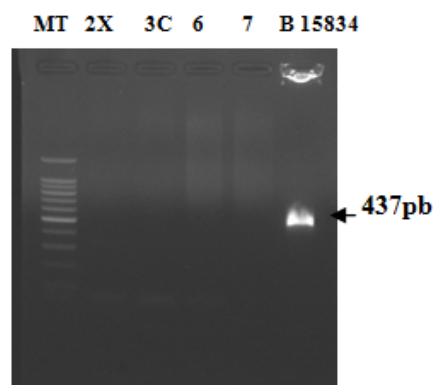


Fig. 6. Analyse des produits PCR obtenus en présence d'amorces spécifiques de gènes *vir D*, des ADN extraits des bactéries d'*A. rhizogenes* (15834), et d'échantillons des racines transformées des clones (2X, 3C, 6, 7) après électrophorèse sur gel d'agarose MT: marqueur de taille 100 pb (Promega)

VERIFICATION DE L'INTEGRATION DES GENES *rol* DANS LE « HAIRY ROOT » D'*OCIMUM BASILICUM*

L'intégration des gènes *rol* dans les cellules de racines transformées des clones d'*Ocimum basilicum* est confirmée par analyses PCR en utilisant les amorces correspondant aux séquences des gènes *rol* A, B et C. Ainsi, l'électrophorégramme montre des bandes attendues de 307 pb correspondant au gène *rol* A observées à partir des extraits d'ADN des clones 2X, 3C et 6 étudiés. Une bande similaire est amplifiée à partir de l'ADN bactérien d'*A. rhizogenes* 15834 prise comme témoin positif. Celle-ci est absente sur ce gel dans les extraits du clone 7 (Fig.7).

Concernant le gène *rol* B, l'ADN extrait des racines montre une amplification des séquences de ce gène. Des bandes très nettes de 762 pb, sont observées à partir des extraits d'ADN des racines appartenant à trois clones. L'ADN extrait du clone 7 conduit à une très faible amplification d'une bande de 762 pb peu perceptible sur la figure (Fig.8).

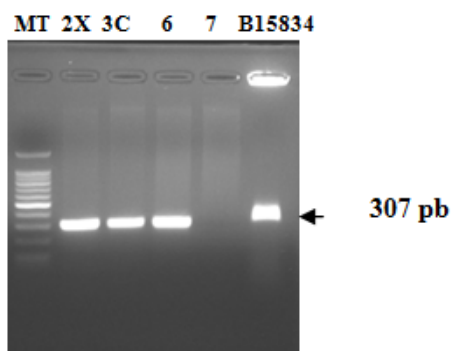


Fig. 7. Analyse des produits PCR obtenus en présence d'amorces spécifiques de gènes *rol* A, des ADN extraits des bactéries d'*A. rhizogenes* (15834), et d'échantillons des racines transformées des clones (2X, 3C, 6, 7) après électrophorèse sur gel d'agarose MT: marqueur de taille 100 pb (Promega)

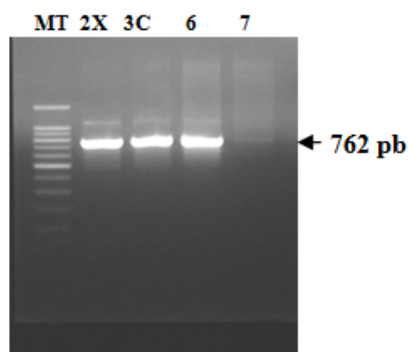


Fig. 8. Analyse des produits PCR obtenus en présence d'amorces spécifiques de gènes *rol* B, des ADN extraits d'échantillons des racines transformées des clones (2X, 3C, 6, 7) après électrophorèse sur gel d'agarose MT: marqueur de taille 100 pb (Promega)

L'intégration du gène *rol* C est vérifiée également par PCR en utilisant les amorces spécifiques de ce gène. Comme précédemment la souche d'*A. rhizogenes* sert de témoin positif. On observe uniquement la présence d'une bande de 539 pb à partir des extraits des racines du clone 2X. Aucune amplification correspondant à ce gène n'apparaît pour les extraits des autres clones. La même bande est amplifiée à partir de l'ADN de la bactérie d'*A. rhizogenes* 15834 (Fig. 9).

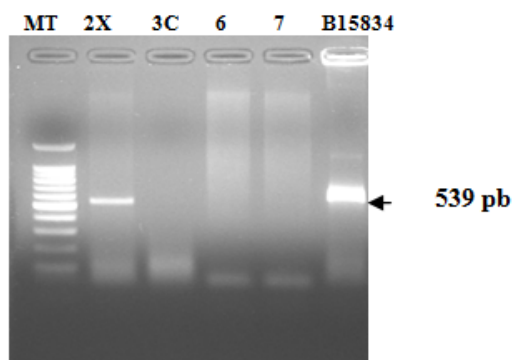


Fig. 9. Analyse des produits PCR obtenus en présence d'amorces spécifiques de gènes *rolC*, des ADN extraits des bactéries d'*A. rhizogenes* (15834), et d'échantillons des racines transformées des clones (2X, 3C, 6, 7) après électrophorèse sur gel d'agarose
 MT: marqueur de taille 100 pb (Promega)

La transformation génétique est donc démontrée par l'intégration totale ou partielle des gènes *rol A*, *B* et *C* dans les racines des différents clones de « hairy root » d'*O. basilicum* étudiés.

4 DISCUSSION

La transformation génétique d'*O. basilicum*, après infection par les bactéries d'*A. rhizogenes* de la souche 15834, est possible à partir des deux types d'explants étudiés. Dès la première semaine après inoculation, la formation des racines adventives est directement obtenue à partir des cellules-cibles de l'explant infecté. Quelques semaines après la mise en culture de fragments de racines isolées sur le milieu solide, des clones se développent rapidement et présentent toutes des caractéristiques du phénotype « hairy root » : croissance sans régulateurs, absence de géotropisme, nombreuses ramifications et présence de poils absorbants. Le protocole préconisant l'inoculation bactérienne au niveau de la nervure centrale est efficace car les bactéries peuvent atteindre rapidement les cellules cibles. Malgré cette action très virulente sur les cellules-cibles des explants d'*Ocimum basilicum*, la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* 15834, ne semble pas présenter la même efficacité sur les cellules-cibles d'*Ocimum gratissimum*. Cette inefficacité pourrait en partie résulter des propriétés antimicrobiennes et antivirales de la plante comme il a été rapporté par certains auteurs ([9] et [10]). Cependant, les deux explants d'*O. basilicum* conduisent néanmoins à des pourcentages élevés de transformation, en effet 90 % de feuilles et 80 % de tiges développent des racines deux semaines environ après l'infection.

La littérature montre que l'efficacité de « l'agroinfection » dépend du choix de l'espèce végétale, du génotype de la plante et de la souche bactérienne testée. En présence de la souche A4 d'*A. rhizogenes* et de disques foliaires, des pourcentages de transformation élevés chez *Nicotiana tabacum* (98%) et beaucoup plus faible chez *Datura metel* (34%) ont été rapportés [11]. Des pourcentages plus ou moins importants ont été obtenus pour certains génotypes de peuplier [12].

Le transfert des clones de racines d'*Ocimum basilicum* en milieu liquide MS agité conduit à une croissance rapide et à une production importante de biomasse. Après quatre semaines, le poids de matière sèche est respectivement de 0,65 ; 0,73 et 0,64 g pour les clones 1, 3C et 7. Nos résultats rejoignent ceux de [13] qui ont montré dans des conditions expérimentales similaires, que la biomasse maximum des racines en milieu liquide WPM était de 0,70 g après six semaines de culture. Ces auteurs ont utilisé comme explants de départ des vitroplants obtenus après germination *in vitro* d'*O. basilicum*.

Les cultures de « hairy root », capables d'assurer leur croissance sans apport de régulateurs de croissance n'en demeurent pas moins hétérotrophes au carbone. Une croissance optimale des racines d'*O. basilicum* est observée chez le clone 1, en présence d'une concentration de 40 g/L de saccharose. D'après [13], d'une manière générale, les concentrations nécessaires à ce disaccharide pour assurer une bonne croissance des racines varient de 20 à 30 g/L. L'apport de glucides n'a pas que pour but d'optimiser la croissance des tissus, il peut également orienter l'organogénèse [14].

Les analyses moléculaires confirment par intégration génomique des gènes *rol A*, *B*, et *C*, l'état transformé des clones d'*O. basilicum*. Bien que l'intégration de ces gènes soit démontrée seulement pour le clone 2X, le gène *rol A* est obligatoirement intégré dans le génome de tous nos clones sélectionnés, comme l'indique la présence de la bande de 762 pb, (gène *rol B*) détectée dans ces quatre clones. Par contre, l'absence du gène *rol C* peut être consécutive à un transfert incomplet de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale.

L'absence de ce gène chez trois des quatre clones ne remet pas en cause la formation et le bon développement d'un « hairy root ». En effet, il a été démontré que le transfert et l'expression d'un gène *rol A* ou *C*, est capable de développer un « hairy root » chez certaines espèces végétales comme *Populus tremula* [15]. Néanmoins, chez certaines espèces, la transformation est plus délicate et l'action du gène *rol B* plus prépondérante. [16] et [17] ont souligné le rôle morphogène de ce gène et son implication majeure dans la formation de méristèmes racinaires. Quant aux gènes *rol A* et *rol C*, travaillant en synergie avec le gène *rol B*, ils sont connus pour promouvoir la croissance des racines et sont massivement exprimés lors de l'élongation de ces organes [18]. L'intégration des gènes *rol A* et *B* est donc suffisante pour induire la rhizogénèse à partir des cellules transformées d'*O.basilicum*, du moins à partir des génotypes utilisés dans le présent travail.

5 CONCLUSION

Cette étude nous a permis d'obtenir la transformation rapide et efficace des racines d'*O. basilicum*, source de production de métabolites secondaires par la plante ce qui constitue un palliatif pour les soins thérapeutiques et permettrait aussi aux malades de se soigner à moindre coût.

REFERENCES

- [1] Adebolu TT, Oladimeji S A, 2005, Antimicrobial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* on selected diarrhoea causing bacteria in southwestern Nigeria. Afr J. of Biotechnol Vol. 4 (7), pp. 682-684.
- [2] Altamura M. M., Capitani F., Gazza L., Capone I., Costantino P. 1994 : The plant oncogene *rolB* stimulates the formation of flower and root meristemoids in tobacco thin cell layers. New Phytol 126: 283-293
- [3] Ayisi N., K., Nyadedzor C. 2003 : Comparative *in vitro* effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *alchornea cordifolia* and *Elaeophorbium drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. Antiviral Research 58 (3): 25-33
- [4] Di Cola A., Costantino P., Spano L. 1996 : Cell commitment and *rolB* gene expression in the induction of root differentiation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46: 203-209
- [5] Dubey N.K., Tiwari T.N., Mandin D., Andriamboavonjy H., Chaumont J-P. 2000 : Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). Fitoterapia 71 : 567-569
- [6] Ezekwesili CN, Obiora KA, Ugwu OP, (2004). Evaluation of Anti-Diarrhoeal Property of Crude Aqueous Extract of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) In Rats. Biokemistri 16(2):122-131.
- [7] Holetz FB, Nakamura TU, Filho BPD, Cortez DAG, Díaz JAM,
- [8] Ijaluola G, Anyiwo I, Thomas C,(1980) *Ocimum gratissimum* and blood coagulation. J. of research in Ethnomedian 1:19 – 21.
- [9] Jasik J. B., Caricato G. and Mantell S. 1997: Characterisation of morphology and root formation in the model woody perennial shrub *Solanum aviculare* Forst. Expressing *rolABC* genes of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Sci. 124: 57-68
- [10] Kyung-Hwan Han, Gordon M.P., Strauss S.H. 1997: High-frequency transformation of cottonwoods (genus *populus*) by *Agrobacterium rhizogenes*. Can. J. For. Res. 27: 464-470
- [11] Lemos JA, Passos X S, Fernandes OFL, Paula JR, Ferri PH, Souza LKH, Lemos AA, Silva MRR, (2005). Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. toward *Cryptococcus neoformans*, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100(1): 55-58.
- [12] Margara J. et Piollat M.-T. 1985 : Evolution de l'aptitude à l'organogénèse *in vitro* à partir des feuilles de *Saintpaulia ionantha* au cours des cultures successives. C. R. Acad. Sc. Paris, t. 301, Série III, no 5 :265-268
- [13] Moyano E., Fornalé S., Palazon J., Cusido R.M., Bonfill M., Morales C. et Pinol M. T. 1999 : Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. Phytochemistry 52 : 1287-1292
- [14] Murashige T, Skoog F, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497
- [15] Nakamura CV, Nakamura TU, Bando E, Melo AFN, Cortez DAG, Filho BPD. (1999) Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94(5): 675-678.
- [16] Nilson O., Moritz T., Sandberg B., Olsson O. 1996: Expression of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene in a Deciduous Forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. Plant Physiol 112: 493-502
- [17] Pino JA, Rosado A, Fuestes V, (1996) Composition of the essential oils from the leaves and lowers of *Ocimum gratissimum* L. grown in Cuba. J. of Essential Oil Res. 8:139 – 141
- [18] Tada H., Ikeda Y., Omoto T., Shimomura K., Ishimaru K. 1996: Rosmarinic acid and related phenolics in adventitious root cultures of *Ocimum basilicum* L., Plant tissue Culture letters 13 (1): 69-74