UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INRS- INSTITUT ARMAND-FRAPPPIER
(Centre de microbiologie et de biotechnologie)

EXPRESSION DE LA PROTÉINE VPg DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU NAVET DANS LES PLANTES

PAR
HENRIETTE GAUTHIER

(Mémoire pour l'obtention du grade de maitrise ès science (M.Sc.)

Examinateur externe	**Dr. François Belzile**
Président du jury	**Dr. Rolf Morosoli**
Directeur de recherche	**Dr. Jean-François Laliberté**

JUILLET 2001

À ma famille

TABLE DES MATIÈRES.....III

LISTE DES TABLEAUX.....VII

LISTE DES FIGURES.....VIII

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....X

INTRODUCTION.....1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....3

1. Les virus de plante.....4
2. Le virus du TuMV.....4
3. La protéine VPg.....6
4. La protéine eIF(iso)4E.....7
5. L'initiation de la traduction eucaryote.....9
6. Interaction de la protéine eIF(iso)4E avec la protéine VPg.....12
7. Utilisation des vecteurs génétiques.....13
7.1 Utilisation des vecteurs viraux.....13
7.1.1. Le vecteur viral PVX.....14
7.2 Plantes transgéniques.....15
8. Hypothèse de travail.....17

MATÉRIEL ET MÉTHODES (Première partie).....19
Expression de la VPg par l'utilisation du vecteur PVX

1. Milieu de croissance.....20

2. Souche.....20

3. Les vecteurs d'expression viraux.....20

3.1 Le vecteur pP2C2S.....20

3.2 Le vecteur PVX type sauvage.....21

3.3 Le vecteur PVX-GFP.....21

3.4 Le vecteur PVX-VPg.....21

3.4.1 Construction du vecteur PVX-VPg.....22

4. Préparation de l'ADN plasmidique pour la transcription.....23

5. Transcription.....23

6. Inoculation des plantes de *Nicotiana benthamiana*.....24

6.1. Inoculation des plantes avec l'ARN viral.....24

6.2. Inoculation des plantes avec les particules virales.....25

7. Extraction de l'ARN total des feuilles infectées.....25

8. Analyse RT-PCR.....26

MATÉRIEL ET MÉTHODES (deuxième partie)

Plantes transgéniques pour le gène codant pour la VPg

1. Construction de pJ0530.VPg.....28

2. Transformation des plantes d' *Arabidopsis thaliana*.....29

3. La technique de transformation selon Bechtold et *al*, (1993).....30

4. Sélection des transformants.....32

5. Extraction d'ADN.....34

6. Analyse PCR.....34

7. Analyse Southern.....35

8. Extraction d'ARN.....35

9. RT-PCR.....36
10. Extraction des protéines totales de plantes..... 36

11.Analyse des protéines.....37
11.1 Electrophorèse.....37
11 2 Coloration au Bleu de Coomassie.....37
11.3 Transfert des protéines.....37
11.4 Immunodétection.....38

RÉSULTATS (première partie)
Expression de la VPg par l'utilisation du vecteur PVX

1. Observation des symptômes.....40
1.1 Plantes infectées avec l'ARN.....40
1.2 Plantes infectées avec les particules virales.....41
2. Analyse moléculaire de l'expression de la VPg.....41
2.1 Analyse RT-PCR.....41

RÉSULTATS (deuxième partie)
Plantes transgéniques pour le gène codant pour la VPg

1. Sélection des transformants.....46
2. Observation des symptômes.....49
3. Analyse moléculaire de la VPg.....49
3.1 Analyse de l'ADN.....49
3.2 Analyse de l'ARN.....50
3.3 Analyse des protéines.....51

DISCUSSION (première partie)

Expression de la VPg par l'utilisation du vecteur PVX.....59

DISCUSSION (deuxième partie)

Plantes transgéniques pour le gène codant pour la VPg.....63

CONCLUSION.....69

REMERCIEMENTS.....71

BIBLIOGRAPHIE.....72

LISTES DES TABLEAUX

Tableau I: Lignées résistantes provenant de trois lots de graines B1, B2 et B3.....48

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Virus de la mosaïque du navet (TuMV).....5

Figure 2: Représentation schématique d'un ARNm type avec les protéines associées aux éléments régulateurs.....11

Figure 3: Le modèle co-dépendant de la traduction.....11

Figure 4: Comparaison entre les niveaux d'expression du gène étranger produits par un transgène versus les niveaux d'expression produits par réplication autonome d'un vecteur viral.....15

Figure 5: Interaction de la protéine VPg avec la protéine eIF4E.....18

Figure 6: Le plasmide binaire Bin-Hyg-TX.....29

Figure 7: Transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana*.....31

Figure 8: Sélection des transformants.....33

Figure 9: Plante de *Nicotiana benthamiana* inoculée avec l'ARN PVX-GFP.....43

Figure 10: Plantes de *Nicotiana benthamiana* inoculées avec l'ARN-PVX et avec l'ARN PVX-VPg 44

Figure 11: Réactions RT-PCR réalisées à partir de l'ARN de plantes de *Nicotiana benthamiana* présentant des symptômes.....45

Figure 12: Plantes d'*Arabidopsis thaliana* transformées avec le gène codant pour la VPg.....52

Figure 13: Phénotypes observés ches les plantes d'*Arabidopsis thaliana* de la génération T-3 transformées avec le gène codant pour la VPg.....53

Figure 14: Phénotypes observés chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana* de la génération T-1 transformées avec le gène codant pour la VPg.....54

Figure 15: Analyse de type Southern des produits PCR réalisée à partir de l'ADN extrait des plantes d' *A. thaliana* présentant des symptômes atypiques.....55

Figure 16: Analyse de type Southern des réactions RT-PCR réalisée à partir de l'ARN extrait de plantes d'*A. thaliana* représentant trois plantes atypiques provenant de trois lignées indépendantes.....56

Figure 17: Analyse des réactions RT-PCR réalisée à partir de l'ARN des plantes d'*A.thaliana* présentant des symptômes atypiques.....57

LISTES DES ABRÉVIATION

4E-BP:	"4E-binding protein" (protéine de liaison au facteur eIF4E)
6K:	protéine de 6kDa
aa:	acide aminé
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
ARN:	acide ribonucléique
ARNt:	ARN de transfert
ARNm:	ARN messager
CaMV:	"cauliflower mosaic virus" (virus de la mosaïque du chou-fleur)
CI:	"cylindrical inclusion" (corps d'inclusion cylindriques)
CP:	capside
DEPC:	diéthyl pyrocarbonate
D.O.	densité optique
eIF:	facteur eucaryotique d'initiation de la traduction
ELISA:	"enzyme-linked-immunosorbent assay" (épreuve d'immunodétection enzymatique)
GFP:	"green fluorescent protein" (protéine fluorescente verte)
GUS:	gène codant pour la ß-glucuronidase
HC:	"helper component" (protéine auxiliaire)
iso:	isoforme
j.a.l.:	jours après l'inoculation
MS	Murashige et Skoog
NIa:	corps d'inclusion nucléaires "a"
P1:	protéine N-terminale
Pa:	Pascal
pb:	paire de bases
PCR:	"polymerase chain reaction" (réaction de polymérisation en chaîne)
Pol:	polymérase
Pro:	protéase
p/v:	poids/volume
PVX:	"potato virus X" (virus X de la pomme de terre)
RNAse:	ribonucléase
RT:	transcription inverse
SDS-PAGE:	"SDS-polyacrylamide gel electrophoresis"
T:	transformant
Ti:	"tumor inducing" (inducteur de tumeur)

TMV:	"tobacco mosaic virus" (virus de la mosaïque du tabac)
TuMV:	"turnip mosaic virus" (virus de la mosaique du navet)
TVMV:	"tobacco vein mottling virus" (virus de la veine mouchetée du tabac)
U:	Unité
UV:	Ultraviolet
VPg:	"viral protein genome-linked" (protéine virale liée de façon covalente à l'ARN)
VPgPro:	protéine virale à activité protéase
v/v:	volume/volume

INTRODUCTION

La VPg ("Virus Protein linked to the genome") est une protéine virale qui se lie de façon covalente à l'extrémité 5' du génome du TuMV ("Turnip Mosaic Virus"). Les travaux effectués au laboratoire utilisant le système double-hybride ont démontré que la VPg interagit avec une protéine de l'hôte: la protéine eIF4E. Cette protéine lie la structure coiffée retrouvée en 5' des ARNm. Elle est un élément clé dans l'initiation de la traduction des ARNm. Surexprimée, elle provoque la transformation cellulaire et sous-exprimée, elle entraîne un ralentissement de croissance des cellules de mammifère. Notre hypothèse veut que la liaison de la VPg à la protéine eIF4E diminue l'activité de celle-ci et une nouvelle population d'ARNm serait traduite. On obtiendrait ainsi des phénotypes différents chez la plante exprimant la VPg.

Pour démontrer notre hypothèse, nous avons utilisé deux systèmes d'expression: le vecteur viral PVX et les plantes transgéniques.

Nous avons infecté des plantes de *Nicotiana benthamiana* avec des transcrits d'ARN du vecteur PVX contenant le gène VPg et avec des transcrits du vecteur PVX seul. Dix jours après l'inoculation, toutes les plantes montraient des signes d'infection. L'analyse des plantes par RT-PCR nous révéla par contre que le vecteur PVX délétait le gène VPg.

Comme alternative, nous avons travaillé avec des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*. Ces plantes ont été transformées à l'aide d'une suspension bactérienne contenant le gène VPg inséré dans le plasmide Ti. Ce plasmide contient un gène de résistance à l'hygromicine permettant la sélection des plantes transformées. Les plantes résistantes présentant des symptômes atypiques (retard de croissance, rosette feuillue et difforme, plantes naines, système racinaire peu développé) ont été analysées pour leur contenu en ADN et en ARN. Nous avons montré par PCR que toutes les plantes sélectionnées contenaient le gène et le messager VPg.

Nous avons alors certaines évidences qui supporte notre hypothèse voulant que la VPg exprimée chez la plante entraîne un changement phénotypique, possiblement en modifiant la programmation de la traduction des ARNm cellulaires.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les virus de plante

Les virus sont des éléments génétiques qui dévient les processus cellulaires d'un hôte pour leur propre reproduction. Le matériel génétique des virus végétaux peut être de l'ARN simple ou double brin, ou de l'ADN simple ou double brin. Durant son stage extracellulaire, le génome viral est habituellement protégé par une capside protéique. La plupart des infections virales végétales sont disséminées par des insectes prédateurs de la plante (Camirand, 1989).

Les potyvirus, apparentés au supergroupe des picornavirus, représentent le plus grand et le plus important groupe de virus infectant les plantes. Ils engendrent des pertes économiques importantes pour l'agriculture. Il y a presque 200 espèces reconnues appartenant à ce groupe ou qui sont possiblement membre de ce groupe (Barnet, 1992; Shukla et *al.*, 1994). Les potyvirus sont généralement constitués de particules filamenteuses de 680 à 900 nm de long par 12 à 15 nm de diamètre.

Le génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin d'environ 8,500 à 9,800 nucléotides encapsidé dans une enveloppe protéique (Barnet, 1992; Shukla et *al*, 1994). Cet ARN est polyadénylé à son l'extrémité 3' et lié a une protéine à son extrémité 5': la protéine VPg. Le virion en poids est constitué approximativement de 5% d'ARN et 95% de protéines. Au cours de l'infection, les potyvirus forment des corps d'inclusion dans le noyau et le cytoplasme des cellules végétales.

2. Le Virus de la mosaïque du navet (TuMV)

Le virus de la mosaïque du navet a un spectre d'hôtes très large, il infecte les crucifères (navet, chou-fleur, brocoli, canola etc.). Il provoque l'apparition de mosaïques (alternance de taches claires et foncées sur les feuilles), la déformation des feuilles, une diminution de croissance de la plante ainsi que la formation de corps d'inclusions (Wittmann et *al*, 1997). Il est le deuxième en importance pour les pertes causées par les virus

phytopathogènes.

Le TuMV fait partie du groupe des potyvirus. Le génome complet du TuMV a été séquencé (figure 1). Il possède une séquence 5' non traduite de 129 nucléotides, un cadre de lecture ouvert de 9489 nucléotides et une séquence 3' non traduite de 212 nucléotides (Nicolas et Laliberté, 1992). Il code pour une polyprotéine de 358 kDa (3,163 acides aminés) qui est hydrolysée par trois protéinases virales (P1, HC et Pro) en 10 protéines matures. Les protéines P1, HC et P3 seraient impliquées dans la régulation de la transcription. Les protéines C1, VPg, Pro et Pol constitueraient le noyau de base des protéines de la réplication. La CP est la protéine de la capside et elle est impliquée dans la propagation du virus. Les protéines 6K1 et 6K2 n'ont pas de rôle connu mais elles seraient probablement impliquées dans la réplication. L'extrémité 5' de l'ARN ne possède pas de structure coiffée, mais elle est liée de façon covalente à une protéine virale: la protéine VPg ("Virus Protein linked to the Genome") (Murphy et *al.*, 1996; Murphy et *al*, 1999), (figure 1).

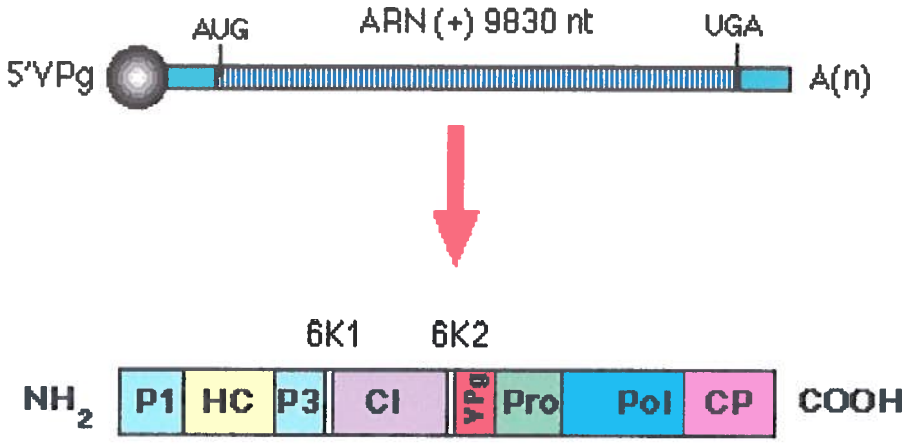


Figure 1: Virus de la mosaïque du navet (TuMV). Le génome viral est composé d'un ARN simple brin de polarité positive. Il est lié de façon covalente à la protéine virale VPg à l'extrémité 5' et possède une queue poly (A) à l'extrémité 3' (Haut). Au cours de l'infection son génome est traduit en une polyprotéine de 358kDa qui est ensuite hydrolysée par trois protéinases virales (P1, HC et PRO) en 10 protéines matures (bas).

3. La Protéine VPg

La VPg a été identifiée chez plusieurs virus de plantes et d'animaux. Parmi les virus dont le génome est une molécule d'ARN de polarité positive, cinq familles - lutéovirus, picornavirus, comovirus, népovirus et potyvirus- possèdent une protéine VPg à leur extrémité 5' (Wimmer, 1988). Ces quatre dernières familles de virus partagent d'autres similarités dans la structure de leur ARN (queue de polyA à l'extrémité 3'), leur organisation génomique (groupe caractéristique de gènes de réplication), et leur stratégie d'expression (l'ARN virale est traduit en une seule polyprotéine qui subit une autoprotéolyse) (Strauss et Strauss, 1988).

La protéine formant des corps d'inclusions "a" (NIa) de certains potyvirus est une protéine précurseur à la VPg et possède une activité protéolytique. Elle est analogue à la VPgPro ("Viral Protein Genome linked-Proteinase") (Dougherty et Parks, 1991). La VPgPro constitue une des trois protéinases nécessaires à l'hydrolyse de la polyprotéine virale et est considérée comme enzyme-clé de l'expression génomique du virus. La VPgPro reconnaît au moins sept sites de clivage de la polyprotéine virale et est en grande partie responsable de la modification protéolytique de la polyprotéine (Dougherty et Smeler, 1992). La VPgPro est composée de deux domaines, possède un site interne de clivage, et est responsable de sa propre hydrolyse en VPg et en Pro (Laliberté et *al.*, 1992). Le domaine VPg situé à l'extrémité N-terminale lie l'ARN viral tandis que le domaine Pro, à l'extrémité C-terminale, possède l'activité protéolytique (Riechman et *al.*, 1992). L'association de la VPg par un lien covalent avec l'extrémité 5' de l'ARN viral aurait un rôle dans l'initiation de la réplication virale, tel que démontré chez les picornavirus (Flanegan et *al*, 1990; Khun et Wimmer, 1987). Par analogie avec les picornavirus, la VPg du TuMV pourrait être nécessaire à l'amorce de la synthèse de l'ARN viral (Porter, 1992).

La protéine VPg aurait un rôle important à jouer dans l'initiation de l'infection. Des études ont été faites sur la capacité d'une souche de potyvirus, le TVMV ("Tobacco vein mottling virus") à vaincre un gène de résistance de l'hôte, le gène *va*, un gène récessif.

Ce gène est utilisé commercialement pour conférer une résistance à l'infection des plantes de *Nicotiana tabacum* par certains potyvirus (Nicolas et *a*l, 1997). La VPg posséderait un déterminant qui induirait la perte de résistance chez un cultivar commercial Burly tobacco possédant un allèle homozygote pour le gène *va*. Selon les analyses des séquences d'ADN, il y aurait dans la VPg une différence de six acides aminés entre cette souche de potyvirus (TVMV-S) et la souche de type sauvage (TVMV-WT). Cette différence en acides aminés de ces deux souches affecterait le mouvement du virus d'une cellule à l'autre. Ces résultats appuient l'hypothèse voulant que la VPg doit assumer une certaine conformation afin qu'elle puisse agir avec les composants de l'hôte et faciliter le mouvement du virus dans les cellules pour établir une infection systémique.

La protéine VPg semblerait non seulement impliquée dans la transcription du virus mais elle serait également impliquée dans la traduction. En utilisant le système double-hybride qui permet l'étude des interactions protéines-protéines, il a été démontré que la protéine VPg se lie à un facteur eucaryotique d'initiation de la traduction: la protéine eIF(iso)4E d'*Arabidopsis thaliana*. Cette interaction a été également démontrée *in vitro* dans un test de type ELISA. Ce facteur est un élément clé de la régulation de la traduction des ARNm cellulaires (Wittmann et *al.*, 1997).

4. La Protéine eIF4E

La protéine eIF4E fait partie du complexe eIF4F (Figure 2). Il assiste le ribosome dans son repérage du site d'amorçage au codon AUG de l'ARNm (Lodish et *al* , 1997). La protéine eIF4E se lie à la structure coiffée m^7 GpppN des ARNm (Ohlmann et *al.*, 1997) et cette liaison favorise la formation du complexe de traduction (Hershey, 1991). Chez les plantes d'ordre supérieur, il existe une forme isomérique de l'eIF4E soit l'eIF(iso)4E (Browning, 1996). Chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana*, les ARN messagers de l'eIF4E et de l'eIF(iso)4E se retrouvent à des endroits différents. La protéine eIF4E est distribuée dans presque toute la plante mais très peu dans les racines, tandis que la

protéine eIF(iso)4E est particulièrement abondante dans les organes floraux ainsi que dans les jeunes tissus en développement. Ceci suggère que les deux isoformes auraient des fonctions différentes dans le développement et le métabolisme de la plante (Rodriguez et *al,* 1998). Chez les mammifères, l'eIF4E est présente en quantité limitée dans la cellule. Elle constitue un élément de contrôle du développement et de la croissance cellulaire. Son activité d'attachement à la coiffe est modifiée par la phosphorylation. Elle est également régulée par les protéines 4E-BPs ("4E-binding proteins") qui lorsque liées à l'eIF4E empêchent la formation du complexe eIF4F. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae,* une rupture du gène codant pour l'eIF4E est léthale. Les mutants dont l'affinité pour la coiffe a été altérée reprogramment la sélection des ARNm pour la traduction (Altmann et Trachsel, 1997).

Le complexe eIF4F joue plusieurs rôles importants durant l'initiation incluant la reconnaissance de la coiffe, le recrutement de la sous-unité 40S ribosomale et le déroulement de la structure secondaire 5' de l'ARNm. Il n'est donc pas étonnant que plusieurs virus codent pour des protéines qui vont modulé l'activité de ce complexe. La sous-unité eIF4E qui se lie à la coiffe est souvent une cible possiblement parce que son activité est modulée à au moins deux niveaux (son état de phosphorylation et l'activité des protéines 4E-BPs) et aussi parce qu'elle est présente en quantité limitée dans la cellule (Flint et *al,* 2000). Le complexe eIF4F peut être inactivé par le clivage de l'eIF4G, une réaction qui se produit dans les cellules infectées par certains picornavirus (Haghighat et *al,* 1996). Les adénovirus et les virus influenza affectent l'état de phosphorylation de eIF4E (Zhang et *al,* 1994; Feigenblum et Schneider, 1993). Le virus encéphalomyocarditis inactive le facteur d'initiation en augmentant la capacité de liaison de la protéine 4E-BP1 (Gingras et *al,* 1996).

Il a été démontré dans les cellules de mammifères que la sur-expression du facteur eIF4E cause une transformation maligne des cellules en culture (Lazaris-Karatzas et *al,* 1990). Une augmentation du taux d'expression de eIF4E entraîne une traduction sélective pour certaines protéines telles que l'ornithine décarboxylase et la cycline. La traduction des ARN codant pour ces protéines est normalement réprimée dans la cellule (Rosenwald et *al,* 1993; Rousseau et *al,* 1996). Il a été démontré également que la sous-expression de

eIF4E entraîne une diminution de la croissance cellulaire et également une diminution du taux de traduction (De Benedetti et *al*, 1991). Ces études *in vitro* qui soulignent l'importance de l'eIF4E dans la régulation du cycle de la division cellulaire ont été corroborées à des observations cliniques: des quantités importantes de eIF4E ont été observées dans certains cancers humains (Flynn et Proud, 1996; Keller et *al*, 1998; Kerekatte et *al*, 1997).

5. L'initiation de la traduction chez les eucaryotes

Étant donné que le facteur eIF4E joue un rôle extrêmement important dans la traduction, il serait bon ici de rappeler les étapes importantes qui se déroulent au cours de l'initiation de la traduction des ARNm eucaryotes.

On divise d'habitude la synthèse protéique en trois étapes: amorçage ou initiation, élongation et terminaison. Chaque étape fait appel à des événements biochimiques importants et particuliers à chacune d'elles. La phase d'initiation implique l'assemblage du ribosome 80S au codon de départ pour la traduction de l'ARNm et la formation de la première liaison peptidique de la protéine naissante. L'élongation implique le déplacement du ribosome le long de l'ARNm permettant la synthèse protéique. Au cours de la terminaison, il y a relâchement de la protéine nouvellement synthétisée et dissociation du ribosome (Gallie, 1996).

L'initiation est considérée comme étant une étape limitante de la synthèse protéique. Par conséquent cette étape est hautement régulée dans la traduction. Les facteurs d'initiation ont pour fonction de rassembler l'ARNm, les sous-unités ribosomales et l'initiateur Met-tRNA pour former un complexe fonctionnel au codon d'initiation (Fig. 2). Trois facteurs assistent la sous-unité 40S du ribosome dans sa fixation à l'ARNm et au repérage du site d'amorçage. Ces facteurs sont les facteurs eIF4F, eIF4A et eIF4B. Le facteur eIF4F par l'intermédiaire de sa sous-unité eIF4E se lie à la structure coiffée (m7 GpppN) située à l'extrémité 5' de l'ARNm. Après cette association les facteurs eIF4A et

eIF4B se lient à l'ARNm par l'intermédiaire de l'association des facteurs eIF4F et de la coiffe. Les facteurs eIF4A et eIF4B qui ont tous les deux une activité hélicase vont défaire la structure secondaire présente à l'extrémité 5' permettant ainsi à la sous-unité 40S de se positionner sur l'ARNm. Après le déroulement de la structure secondaire, la sous-unité 40S (qui est liée au facteur eIF2, au GTP et à l'initiateur Met-tRNA) se lie à l'extrémité 5' de l'ARNm et progresse le long de la séquence leader non traduite à la recherche du codon d'initiation AUG. Lorsque la sous-unité 40S a localisé le codon d'initiation, la sous-unité 60S vient rejoindre la sous-unité 40S pour créer le ribosome 80S, unité fonctionnelle pour la traduction (Gallie, 1996).

L'initiation de la traduction est régulée non seulement par les éléments de contrôle qui agissent à l'extrémité 5' de l'ARNm, mais également par des facteurs qui interviennent à l'extrémité 3. Ainsi la structure coiffée en 5' et la queue poly A en 3' avec leurs protéines associées seraient des régulateurs bifonctionnels et agiraient de façon synergique. Cette observation a conduit au développement d'un modèle de la traduction co-dépendante (Gallie, 1991) (Figure 3). Le mécanisme qui permettrait l'interaction des deux extrémités impliquerait la liaison des facteurs d'initiation associés à la coiffe avec la queue poly A. Il se produirait en même temps une stabilisation mutuelle des deux extrémités (Gallie, 1991).

Toutes les régions dans l'ARNm sont impliquées dans la régulation de la traduction: la séquence leader en 5', la région codante et l'extrémité 5' non traduite. La structure coiffée en 5' et la queue de polyA à l'extrémité 3' sont des éléments additionnels importants du contrôle de la traduction. Les ARNm viraux qui ne possèdent pas de coiffe ou de queue polyA ont développé des structures alternatives qui sont fonctionnellement équivalentes.

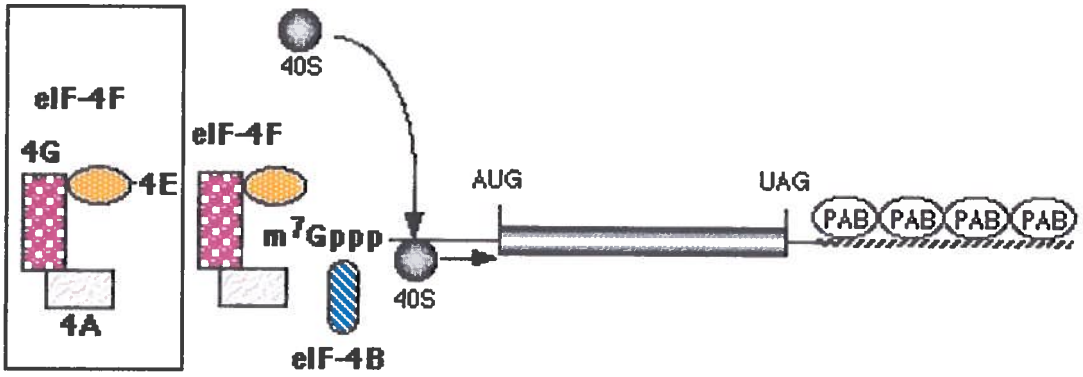


Figure 2. Représentation schématique d'un ARNm type avec les protéines associées aux éléments régulateurs. Les facteurs d'initiation eIF4F et eIF4B sont associés à la structure coiffée à l'extrémité 5' et les protéines PAB (poly (A)-binding proteins) sont liées à la queue poly (A) à l'extrémité 3'. Après la liaison du facteur d'initiation, la sous-unité ribosomale 40S se retrouve près de l'extrémité 5' et se déplace le long de la séquence leader 5' en recherche du codon d'initiation AUG.

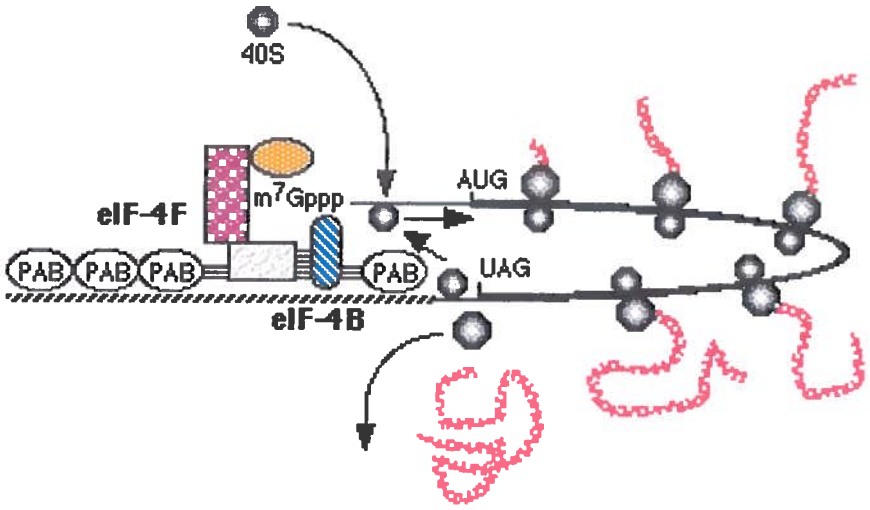


Figure 3. Le modèle co-dépendant de la traduction. Les protéines eIF4F et eIF4B sont liés à la coiffe à l'extrémité 5' et à la queue poly (A) par l'intermédiaire de PAB. Les contacts protéine-protéine entre la eIF4F/eIF4B, eIF4F/PAB et eIF4B/PA qui stabilisent la liaison ARNm/protéines sont représentées par des barres multiples. Ce complexe stable maintient une proximité entre les extrémités de l'ARNm et permet le recyclage efficace des ribosomes. La sous-unité 60S est dissociée de l'ARNm à la fin de la traduction tandis que la sous-unité 40S est réutilisée à l'extrémité 5' pour une seconde initiation de la traduction.

6. Interaction de la protéine eIF(iso)4E avec la protéine VPg

L'infection virale est le résultat d'un jeu complexe d'interactions entre les protéines encodées par les génomes viraux et les protéines de l'hôte (Quadt et *al.*, 1993). Chez certains virus de plantes, l'association des protéines virales et cellulaires a été démontrée par co-purification des complexes à partir de plantes infectées. Cependant, il y a peu de connaissances concernant l'identification des protéines virales et cellulaires impliquées dans la réplication (Wittmann, 1997).

Récemment, il a été démontré que la VPg se lie à la protéine cellulaire eIF4E et à son isoforme la protéine eIF(iso)4E d'*Arabidopsis thaliana* (Wittmann et *al.*, 1997). Elle se lie également à la eIF(iso)4E de *Tricicum aestivum* (blé). Une séquence de 35 aa de la VPg responsable de cette interaction a été identifiée. La substitution d'un résidu d'acide aspartique dans cette région abolit complètement l'interaction *in vitro*. Des plantes de *Brassica perviridis* qui ont été infectées avec un cDNA infectieux du TuMV ont montré des symptômes viraux tandis que d'autres plantes infectées avec un mutant cDNA, le D77N dont le résidu d'acide aspartique a été substitué par un autre aa demeurèrent asymptômatiques. La comparaison de séquence de huit potyvirus dans cette région indique que le résidu Asp77 est hautement conservé. Sa position est également adjacente à des résidus qui sont également très conservés dans cette région de la VPg (Murphy et *al*, 1991; Murphy et *al*, 1996; Riechmann et *al*, 1992).

Ces résultats nous indiquent qu'il y aurait participation de la protéine virale VPg dans l'initiation de la traduction de l'ARN du TuMV (Léonard et *al*, 2000).

Dans une expérience *in vitro* de type ELISA, un analogue de la coiffe le m^7GTP, (mais non le GTP) inhibe la formation du complexe VPg-eIF(iso)4E. Ceci suggère que la VPg et les ARNm cellulaires compétitionneraient pour la liaison à l'eIF(iso)4E (Léonard et *al*, 2000).

Afin de vérifier l'importance de l'interaction de la VPg avec le facteur d'initiation de la traduction eIF(iso)4E nous avons utilisé deux stratégies pour exprimer la VPg dans les plantes: l'utilisation du vecteur viral PVX et les plantes transgéniques. L'interaction de la VPg avec le facteur d'initiation de la traduction eIF(iso)4E entraîneraient des changements phénotypiques *in planta.*

7. Utilisation des vecteurs génétiques

7.1 Utilisation des vecteurs viraux

L'utilisation des vecteurs viraux pour l'expression de gènes étrangers dans les plantes a permis le développement d'outils biotechnologiques intéressants comme alternative au croisement conventionnel et aux méthodes transgéniques (Scholthuf et Scholthuf, 1996). Les virus se multiplient en grande nombre comme des entités autonomes dans une cellule de plante et permet l'amplification d'un gène étranger inséré dans son génome. L'expression génique par les vecteurs viraux n'a pas l'effet de positionnement souvent observé lorsque des gènes étrangers s'intègrent de façon stable dans le chromosome de la plante (Soshi et *al*, 1990)

La réplication autonome des virus offre de nombreux avantages à utiliser les vecteurs viraux pour l'expression transitoire de gènes étrangers. Ils se multiplient abondamment et procurent par conséquent un haut niveau d'expression du gène d'intérêt inséré dans le génome viral (Fig. 4). Le taux maximum d'expression survient dans une très courte période de temps, habituellement après une à deux semaines après l'inoculation. L'expression des gènes étrangers peut être analysée rapidement dans une population de plantes hôtes. Cette propriété est particulièrement avantageuse pour l'étude des gènes qui induisent des effets phénotypiques que l'on peut observer facilement.

Les vecteurs viraux peuvent être construits à partir de virus à ADN simple ou double brin et à partir de virus à ARN simple brin de polarité positive. Avec les nouvelles technologies qui ont permis la transcription de l'ARN viral en cDNA, les virus à ARN sont de plus en plus utilisés. Le cDNA viral peut être inséré dans un vecteur plasmidique bactérien pour le clonage moléculaire. De plus, le système de transcription *in vitro* facilite la synthèse des transcrits infectieux à partir des clones cDNA (Scholthof et Scholthof, 1996).

Malgré les nombreux avantages associés à l'utilisation des vecteurs viraux, ceux-ci ont également certains désavantages. Des erreurs peuvent se produire au cours de la réplication dues aux réplicases virales qui ne sont pas toujours fidèles. Il peut aussi y avoir une instabilité génomique qui cause la délétion du gène étranger. Le risque de perdre le gène est plus grand lorsque l'insert est de grande taille. Les inserts de petites tailles sont relativement stables si ceux-ci n'interviennent pas avec les processus de repliement et d'empaquetage du génome viral (Scholthof et Scholthof, 1996).

7.1.1. Le vecteur viral PVX

Dans ce projet, nous avons utilisé le vecteur viral PVX pour exprimer la VPg. Ce vecteur a été construit à partir du virus PVX, le virus X de la pomme de terre qui est membre des potexvirus. C'est un virus a ARN de polarité positive. Il possède une structure coiffée (m^7 GpppG) à son extrémité 5' et est polyadénylé à l'extrémité 3'. Ce vecteur possède plusieurs avantages. Il se propage rapidement et il infecte la plante toute entière. L'infection est systémique quelques jours seulement après l'inoculation. Il peut supporter un insert de taille relativement grande si on le compare aux vecteurs construits à partir des virus à ADN. Il procure de hauts niveaux d'expression du gène étranger. Il présente cependant une certaine instabilité probablement à cause de facteurs associés à l'insertion du gène (Baulcombe et *al*, 1992). Le vecteur PVX est facile d'utilisation pour l'inoculation mécanique des plantes hôtes. Il est particulièrement utile pour le criblage phénotypique de l'expression du gène étranger. (Scholthof et Scholtho, 1996).

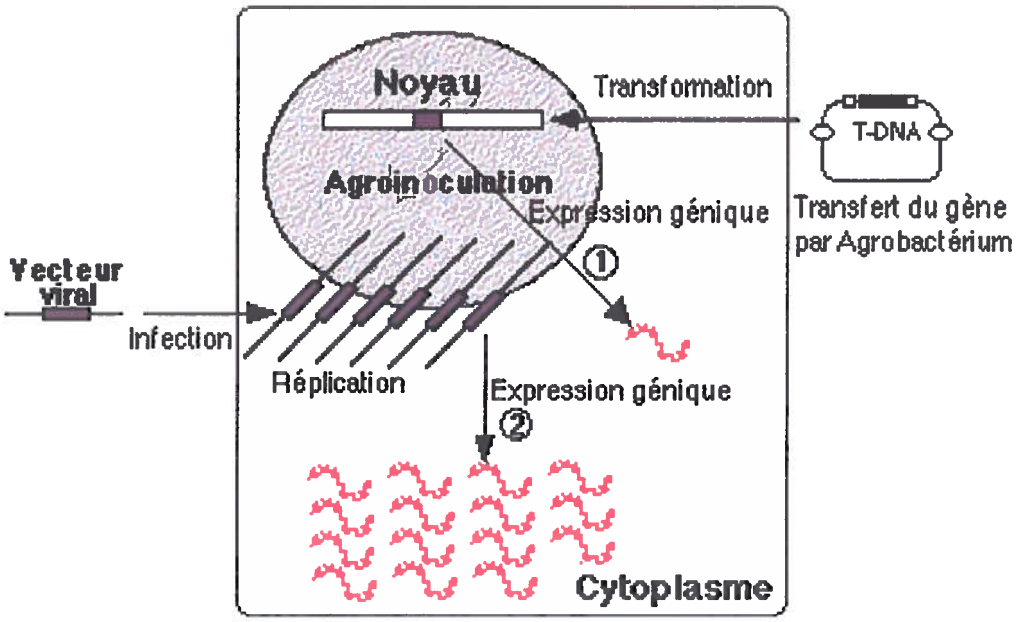


Figure 4. Comparaison entre les niveaux d'expression (lignes ondulées rouges) du gène étranger (petit rectangle foncé dans le chromosome blanc) produits par un transgène ① versus les niveaux d'expression produits par réplication autonome d'un vecteur viral ②.

7.2. Plantes transgéniques

Dans ce projet, nous avons utilisé également des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* comme méthode alternative pour exprimer la VPg. Il s'agit d'une méthode de transformation *in situ* par *Agrobacterium tumefaciens*, une bactérie gram-négative que l'on retrouve dans le sol. Cette bactérie a la capacité d'infecter un certain nombre de plantes dicotylédones[1] et gymnospermes[2]. La transformation des cellules végétales par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* est causée par le plasmide Ti (Tumor inducing). Seul une portion du plasmide Ti est excisée et insérée au hasard dans le génome nucléaire. Ce fragment est appelé T-DNA (ADN de transfert). Le T-DNA possède à

chacune de ses extrémités des régions composées d'une séquence de 24 bases répétées. Tout l'ADN situé entre ces bordures sera transféré vers le génome végétal (Camirand, 1989). Cette particularité du plasmide Ti a été utilisé en biotechnologie végétale pour la transformation stable de plantes. Un gène étranger peut être inséré à la place du gène T du plasmide Ti, détruisant de ce fait son pouvoir tumorigène. En utilisant un gène de sélection, on parvient à sélectionner les plantes recombinantes (Lodish et *al, 1995*).

Arabidopsis thaliana est une plante de la famille de la moutarde (Brassicacée). Cette plante possède plusieurs avantages. Elle est de petite taille (30 cm) ce qui facilite sa croissance en serre (on peut faire germer 5,000 graines dans un seul plat de Pétri et faire pousser chaque plante sur 1 cm de sol seulement). Elle a un temps de régénération très court (6 semaines). On connaît sa génétique, elle possède le plus petit génome connu chez les plantes supérieures (70,000 kpb), les séquences codantes du génome représentent environ 25%, ce qui est relativement élevé pour un génome de plante.
(Camirand, 1989).

Nous avons utilisé la méthode d'infiltration *in planta* pour transformer des plantes d'*Arabidopsis thaliana*. Cette méthode ne nécessite pas de culture de tissu, donc une économie de temps appréciable pour la sélection des transformants. De plus, on évite les événements dûs aux variations somaclonales qui surviennent au cours de la culture tissulaire. Ces événements génèrent des mutations qui interfèrent dans l'analyse des transformants (Bechtold et *al*, 1993).

---

1. Dicotylédones: plantes dont l'embryon possède deux cotylédons. Le cotylédon est la partie de la graine qui procure à l'embryon la nourriture nécessaire à son développement avant le début de la photosynthèse.

2. Gymnospermes: plantes vasculaires qui produisent des graines non protégées et auxquelles appartiennent les conifères.

8. Hypothèse de travail

Une interaction de la protéine virale VPg avec la protéine de l'hôte eIF(iso)4E a été démontrée dans le système double-hybride et également *in vitro* à l'aide d'un test de type ELISA (Wittmann et *al*, 1997). Cette interaction a également été étudiée chez les plantes de *Brassica pervidisis*. Ces plantes ont été infectées avec un clone infectieux cDNA du TuMV et également avec un clone cDNA du TuMV muté dans la région de la VPg qui abolit l'interaction avec la protéine eIF(iso)4E. Selon cette étude, il semblerait que l'interaction VPg-eIF(iso)4E serait un élément critique pour la production virale (Léonard et *al*, 2000). Dans ce projet, nous voulons maintenant savoir si la protéine VPg exprimée par l'intermédiaire de vecteurs génétiques pourrait produire un changement de phénotype chez la plante. Selon le modèle proposé (figure 5), la protéine virale VPg en se liant à la protéine de l'hôte eIF(iso)4E inhiberait la traduction de certains ARNm cellulaires. La VPg exprimée chez la plante produirait alors des effets phénotypiques suite au changement de programmation de la traduction des ARNm cellulaires.

Modèle d'action

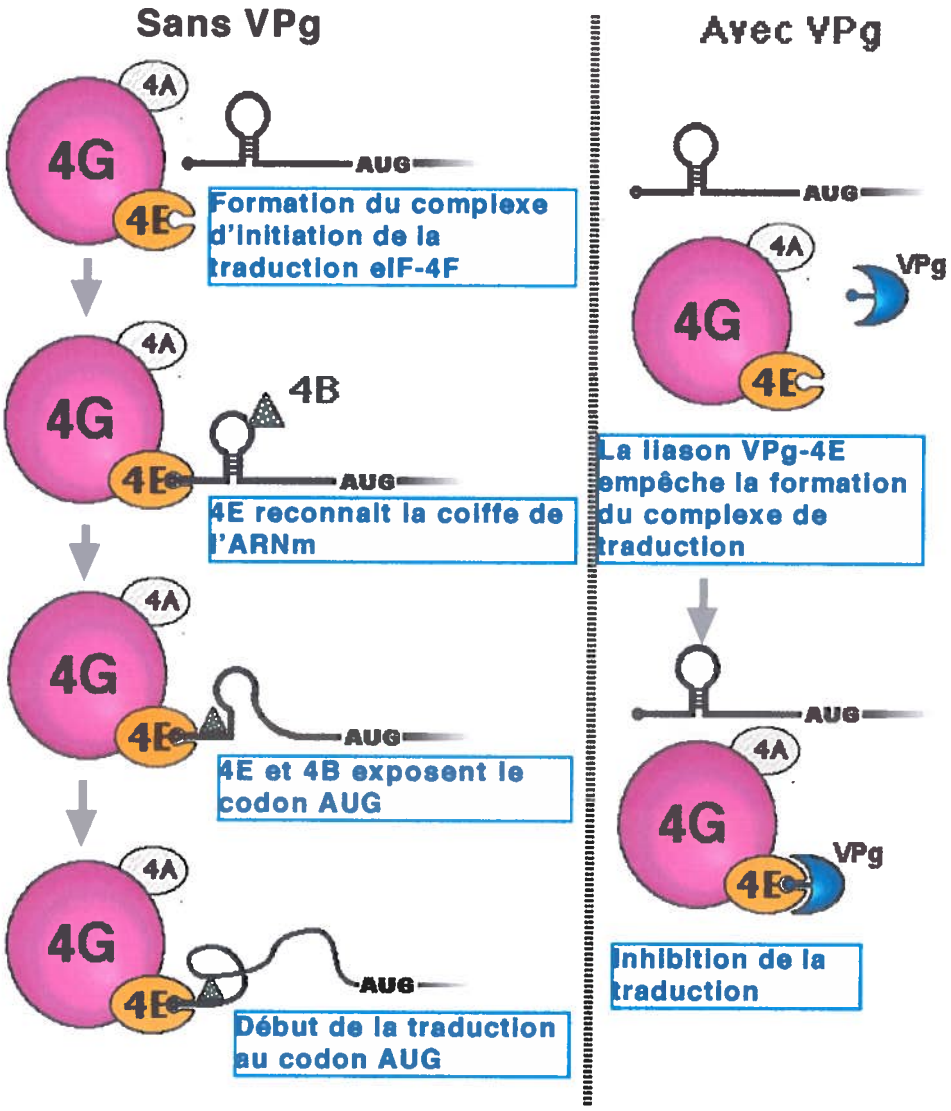


Figure 5. Interaction de la protéine VPg avec la protéine eIF4E. Le modèle de la traduction de l'ARN messager en absence (à gauche) ou en présence (à droite) de la VPg.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

(Première partie)

Expression de la VPg par l'utilisation du vecteur PVX

1. Milieu de croissance

Le milieu LB (p/v: 1% tryptone, 1% NaCl et 0.5% d'extrait de levure) a été utilisé pour la croissance de *E.coli*. Les bactéries ont été incubées sur milieu solide (1.5% p/v d'agar) ou liquide à 37°C. Cent µg/ml d'ampicilline a été ajouté au milieu pour maintenir la sélection des plasmides.

2. Souche

La souche *E.coli* XL-1 Blue (Stratagene) (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac*, [F'*proAB*, *lacI*^{q}ZΔ *M15*, Tn10 (tet^{r})]) a servi au criblage des transformants pour la production de l'ADN plasmidique.

3. Vecteurs d'expression viraux

3.1 Le plasmide pP2C2S

Le vecteur pP2C2S est un vecteur d'expression PVX de 9,714 pb. Il contient un cDNA complet du PVX introduit dans le vecteur bactérien pUC19. Il possède deux sites de clonage: *Cla*I et *Sal*I Ces sites sont positionnés dans le génome viral à 5,684 pb du début de la séquence virale, et devant le gène de la capside. Un site unique de restriction *Spe*I situé à l'extrémité 3' permet la linéarisation du plasmide pour la transcription *in vitro* de l'ARN viral. Le vecteur possède également le promoteur du phage T7 pour l'ARN polymérase nécessaire à la transcription. Il contient finalement un gène conférant la résistance à l'ampicilline pour la sélection des transformants.

3.2 Le plasmide PVX type sauvage

Le plasmide PVX de type sauvage est identique au vecteur pP2C2S sauf qu'il ne contient pas les sites de restriction *Cla*I et *Sal*I dans le génome viral. Ce vecteur servira de contrôle positif de l'infection.

3.3 Le plasmide PVX-GFP

Le vecteur PVX-GFP est le vecteur pP2C2S auquel on a cloné le gène marqueur *gfp*. Ce gène code pour la protéine GFP ("Green Fluorescent Protein"). Elle provient d'une méduse *Aquaria victoria* et elle a l'avantage de produire une fluorescence très prononcée lorsqu'elle est exposée à la lumière UV. Elle ne requiert pas de substrat ou de cofacteur autre que l'oxygène moléculaire pour former une molécule fluorescente. La protéine GFP semble non toxique pour les cellules végétales, elle est très stable et elle a aussi l'avantage de maintenir une fluorescence visible pour une période de temps relativement longue nécessaire à l'expérimentation. Le gène *gfp* est incorporé dans le génome viral comme gène rapporteur de l'infection. Son expression permet de suivre la progression du virus dans la plante.

Ces trois vecteurs d'expression: pP2C2S, PVX et PVX-GFP nous ont été fournis par le Dr. David Baulcombe, The Stainsbury Laboratory, John Innes Institute, Norwich, UK.

3.4 Le plasmide PVX-VPG

Le vecteur PVX-VPg est le vecteur d'expression pP2C2S dans lequel nous avons cloné le gène codant pour la protéine VPg entre les sites *Cla*I et *Sal*I.

3.4.1. Construction du vecteur PVX-VPg

Pour construire le vecteur PVX-VPg, nous avons d'abord amplifié le gène VPg cloné dans le vecteur pet21b(+) (Novagen) (Ménard et *al*, 1995) en introduisant les sites de restriction *Cla*I et *Sal*I dans les amorces. Deux amorces ont été synthétisées: l'amorce pet 21a (sens) et l'amorce 21b(+) (antisens).

Amorce pet 21a (sens)

5'- AACAATTCCCATCGATAAATAATTTT- 3'

*Cla*I

Amorce pet 21b (antisens)

5'- CGTTTAGAGCTCCCCGGGGGGTTAT- 3'

*Sal*I

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume de 100 µl contenant 20 ng d'ADN plasmidique, 50 pmoles de chacune des amorces, 2.5 U de *Taq* polymérase (Bio/Can Scientific), 10µl de tampon *Taq* (500 mM KCL, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 0.1% triton X-100, 1 mM DTT), 0.2 mM de dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$. Les conditions suivantes ont permis l'amplification à l'aide du DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus): cycles 1 et 2: 94°C/1 min, 37°C/30 sec, 72°C/2 min; cycles 3 à 34: 94°C/2 min, 50°C/30 sec, 72°C/2 min; cycle 35: 72°C/10 min. Le produit d'amplification a été purifié par Geneclean 111 (Bio 101) et digéré avec les enzymes *Cla*I et *Sal*I. Le produit de digestion a été séparé sur gel d'agarose 0,8%. Les fragments d'amplification VPg ont été récupérés par Geneclean 111 et inséré dans le vecteur pP2C2S aux sites de restriction *Cla*I et *Sal*I. Les ligations et transformations ont été effectuées suivant les protocoles définis dans Sambrook et *al*, 1989. Les cellules transformées ont été étalées sur milieu LB agar contenant 100 ug/ml d'ampicilline. Des colonies indépendantes ont été inoculées dans un

milieu LB, incubées avec agitation à 37°C durant 12 à 16 heures. L'ADN des plasmides recombinants a été extrait par miniprep et la présence de l'insert a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose suite à la digestion des plasmides.

4. Préparation de l'ADN plasmidique pour la transcription

L'ADN plasmidique des vecteurs pP2C2S, PVX, PVX-GFP, et PVX-VPG pour la transcription a été préparé à l'aide de la trousse Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen).

5. Transcription

Toutes les solutions et matériel doivent être exempt de RNAses. Les solutions ont donc été préparées avec de l'eau traitée au DEPC (diéthyl pyrocarbonate). Le matériel disposable stérile est considéré comme non contaminé par les RNAses (Sambrook et *al*, 1989). Le matériel à électrophorèse est traité avec du NaOH 0.5M, et bien rincé à l'eau traitée au DEPC.

Vingt-cinq µg de l'ADN plasmidique des clones pP2C2S, PVX, PVX-GFP et PVX-VPg ont été linéarisés avec l'enzyme *Spe*I à 37°C durant 15 à 18 heures dans un volume de 50 µl. Les produits de digestion ont ensuite été extraits par phénol-chloroforme suivi d'une précipitation à l'éthanol. Une linéarisation complète du plasmide est nécessaire puisque l'ADN linéaire est un gabarit beaucoup plus efficace que l'ADN circulaire. Un microlitre de la réaction de digestion a été vérifiée sur gel d'agarose 0.8% afin de s'assurer d'une complète linéarisation des plasmides.

Les réactions de transcription ont été réalisées dans les conditions suivantes: Tampon T7, 1X (Tris-HCl 40 mM pH8.0, $MgCl_2$ 8 mM, spermidine 2 mM, NaCl 25 mM), DTT 5 mM, RNAse inhibitor 1U/ml (Pharmacia), 2 mM de chacun des ribonucléotides ATP, CTP et UTP, 2 mM GTP, 0.5 mM de $m^7G(5')ppp(5')G$ (Boohringer Manheim), 5 ug d'ADN linéarisé, eau DEPC. La réaction se fait dans un

volume total de 50 µl. Les réactions ont été incubées durant 5 minutes à 37°C. Cinquante U/µl d'ARN polymérase (Gibco BRL) ont été ensuite ajoutées suivi d'une incubation à 37°C durant 25 minutes. Finalement, 0.2 mM de GTP a été ajouté à la réaction suivi d'une incubation additionnelle à 37°C durant 35 minutes.

L'ARN synthétisé a été extrait au Trizol (Gibco BRL) et précipité à l'isopropanol. Le culot a été lavé à l'éthanol 75% puis solubilisé dans 50 µl d'eau DEPC à 55°C-60°C durant 10 minutes. Les conditions d'électrophorèse pour l'ARN étaient celles décrites selon Sambrook et *al*, 1989. Un marqueur de poids moléculaire sur une échelle de 0.24 à 9.49 kb a été utilisé (RNA ladder, Gibco BRL) pour identifier la taille des transcrits.

Une autre méthode a été utilisée pour produire l'ARN, celle utilisant la trousse mMessage mMachine (Ambion) désignée spécialement pour produire de grandes quantités d'ARN *in vitro* avec la T7 ARN polymérase. Les conditions de transcription utilisées ont été celles décrites selon le manuel d'instruction "Large Scale *In Vitro* Transcription Kits for Synthesis of Capped RNAs".

6. Inoculation des plantes *Nicotiana benthamiana*

6.1. Inoculation des plantes avec l'ARN viral

La solution d'inoculation est composée de pyrophosphate de sodium 110 mM pH 9.0, EDTA 3.0 mM et de benthonite 3%. L'ARN est ajouté à la solution d'inoculation à la concentration de 50 ng/µl.

Les jeunes plantes ayant 4 à 6 feuilles ont été utilisées pour l'infection. Avant l'inoculation, les plantes ont été privées de lumière pour une période de 24 heures. Deux feuilles adjacentes de chaque plante ont été légèrement blessées en frottant la surface avec du carborundum (Fisher), un abrasif doux qui abîme légèrement la feuille et permet l'absorption du produit d'inoculation sur la surface foliaire. Dix µl de solution d'inoculation contenant 0.5 à 2.5µg d'ARN a été déposée sur chaque feuille, de sorte que

chaque plante soit infectée avec 1 à 5µg d'ARN total. La solution pénètre dans la feuille en exerçant un léger massage avec un doigt ganté. Après 5 minutes, les feuilles ont été rincées abondamment avec de l'eau DEPC pour enlever le carborundum.

Pour la croissance, les plantes ont été placées dans une pièce à 25°C en alternance de lumière durant 16 heures et de noirceur durant 8 heures.

Chaque jour les plantes ont été observées pour l'apparition des symptômes. Les plantes inoculées avec l'ARN PVX-GFP ont été examinées sous illumination UV afin de suivre la progression de l'infection dans les plantes.

Les feuilles des plantes infectés présentant des symptômes atypiques ont été congelées à -70°C.

6.2. Inoculation des plantes avec les particules virales

Les feuilles infectées des plantes pP2C2S, PVX, PVX-GFP et PVX-VPg ont été broyées à l'aide de pilons dans des mortiers contenant un tampon Tris-borate 50 mM pH 8.2 à raison de un gramme de tissu végétal par ml de tampon. Les plantes ont été infectées avec 100 µl du surnageant des broyats de feuilles infectées. Elles ont été inoculées et entretenues de la même façon que les plantes traitées avec l'ARN total produit dans les réactions de transcription *in vitro*.

7. Extraction de l'ARN total des feuilles infectées

Les feuilles infectées ont été broyées à l'aide de pilons dans des mortiers préalablement refroidis dans un congélateur à azote liquide. L'ARN a été extrait à partir de 100 à 200 mg de tissu broyé à l'aide du Trizol LS (Gibco BRL) en suivant les instructions du fournisseur.

8. Analyse RT-PCR

Deux amorces ont été synthétisées pour l'amplification du gène VPg par RT-PCR dans les extraits d'ARN des feuilles infectées: l'amorce PVX-1A (sens) et l'amorce PVX-2 (antisens). Ces amorces sont situés de part et d'autre des sites d'insertion *Cla*I et *Sa*lI dans le virus PVX. L'amorce PVX-1A est située en amont du site *Cla*I (5568-5588 pb) et l'amorce PVX-2 est située en aval du site *Sal*I (5763-5782 pb) dans le génome viral PVX. L'amplification donne un fragment de 872 pb (215 pb du vecteur PVX, 562 pb du gène VPg et 95 pb du vecteur pet 21b (+)). Un produit d'amplification de 215 pb indique l'absence du gène VPg dans l'ARN tandis qu'un produit d'amplification de 872 pb indique sa présence.

Amorce PVX-1A (sens)

5'- GATGCAGAAACCATAAGGGC - 3'

Amorce PVX-2 (antisens)

5'- GTGGTAGTTGAGCTAGTTGA - 3'

La réaction RT-PCR a été réalisée en une seule étape en utilisant la trousse RT-PCR de Life Technologies Gibco BRL (SuperScript™ one step RT-PCR). La procédure suivie a été celle recommandée par le fournisseur. La réaction a été réalisée dans un volume de 50 µl contenant 1 µl d'ARN, le tampon de réaction 1X (0.2mM de chaque dNTP et 1.2 mM $MgSO_4$), 50 pmoles de chacune des amorces, le mélange enzymatique: la transcriptase inverse et l'ARN polymérase (Super Script II/*TAQ* mix). Les conditions suivantes ont permis la transcription et l'amplification à l'aide du DNA thermal cycler

(Perkin-Elmer Cetus): 1 cycle pour la transcription: 45°C/30 min, 94°C/2 min; 40 cycles pour l'amplification: 94°/15 sec, 60°C/30 sec, 72°C/1 min, 1 cycle pour terminer la réaction à 72°C/10 min. Les produits d'amplification ont été analysés sur gel d'agarose 0.8%.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

(Deuxième partie)

Plantes transgéniques pour le gène codant pour la VPg

Nous avons utilisé une deuxième approche pour exprimer la VPg: la transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana* par *Agrobacterium tumefaciens*. Le plasmide pJ0530 , un dérivé du plasmide Bin-HYG-TX (figure 6) a été utilisé. La portion T-DNA du plasmide contenant la VPg est exporté dans le génome nucléaire des cellules végétales permettant la transformation dans la plante.

1. Construction de pJ0530.VPg

La construction de pJ0530.VPg a été générée comme suit: le plasmide pet21b(+).VPg a été digéré avec les enzymes de restriction *Xba*I et *Xho*I et séparé sur gel d'agarose 0.8%. Le fragment VPg a été purifié par geneclean 111 et a été inséré dans le vecteur pJ0530 aux sites *Xba*I et *Sal*I, le site *Sal*I étant compatible avec le site *Xho*I. L'insertion du fragment dans le vecteur a été réalisé avec la T4 ADN ligase (Pharmacia Biotech) selon Sambrook et *al*, (1989). La transformation des cellules compétentes d'*Agrobacterium tumefaciens* par le plasmide pJ0530.VPg été effectué dans le laboratoire du Dr. Joël J. Milner, Institut of Biomedical and Life Sciences, University of Glasglow, Scotland.

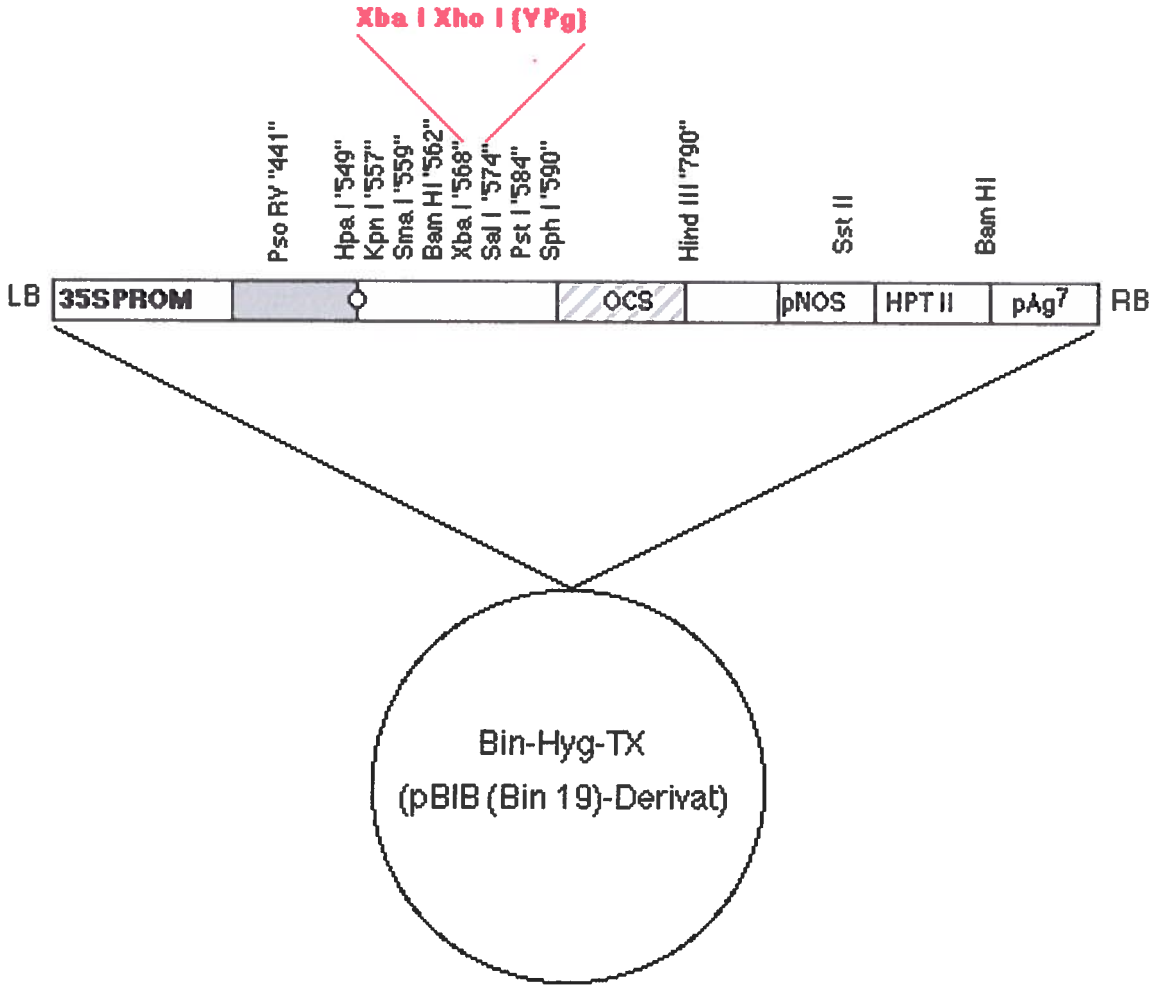


Figure 6. Le plasmide binaire Bin-Hyg-TX est un plasmide dérivé du plasmide Ti (Tumor-inducing) d'*Agrobacterium tumefaciens*. Il possède une origine de réplication non sélective. Il contient des séquences répétées de 24 pb de part et d'autre du T-DNA (LB et RB), un site multiple de clonage entre les bordures LB et RB, des gènes conférant la résistance à la kanamicine et à l'hygromicine, le promoteur 35S du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur) qui dirige la transcription et des signaux de polyadénylation à l'extrémité 3'.

2. Transformation des plantes d' *Arabidopsis thaliana*

La transformation a été effectuée par infiltration sous vide des plantes d'*Arabidopsis thaliana*, (ecotype: landsberg erecta *gl*l) par une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide pJ0530.VPg. Cette opération a été effectuée au laboratoire du Dr. Jöel J. Milner, Université de Glasglow. La figure 7 est une

représentation schématique des étapes de la transformation.

3. La technique de transformation selon Bechtold et *al*, (1993)

La culture des agrobactéries se fait dans un milieu LB en présence d'antibiotiques (50 mg/L de rifampicine, 100 mg/L de gentamicine et 200 mg/L de kanamicine). Les cellules croissent durant environ 14 heures à 28°C ou jusqu'à ce qu'elles atteignent 0.8 de D.O. à 600 nm de longeur d'onde. Après centrifugation, le culot bactérien est resuspendu dans 1/3 de son volume initial dans le milieu d'infiltration: Murashige et Skoog contenant 10 µg/L de 6- benzylaminopurine et 5% de sucrose (Murashige, T. et Skoog, F. 1962). Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* en début de floraison sont retirées du sol, rincées à l'eau et immergées dans la solution concentrée d'*Agrobacterium* puis mises sous vide (10^4 Pa) durant 20 minutes avec agitation occasionnelle. Les plantes traitées sont repiquées dans un nouveau terreau et recouvertes d'un plastique transparent durant 2 jours pour éviter la déshydratation et pour favoriser l'enracinement. Après 4 à 6 semaines de croissance dans une pièce à 25°C en alternance de lumière et de noirceur de 16 heures le jour et de 8 heures la nuit, les graines de la génération T-1 sont récoltées (Figure 7).

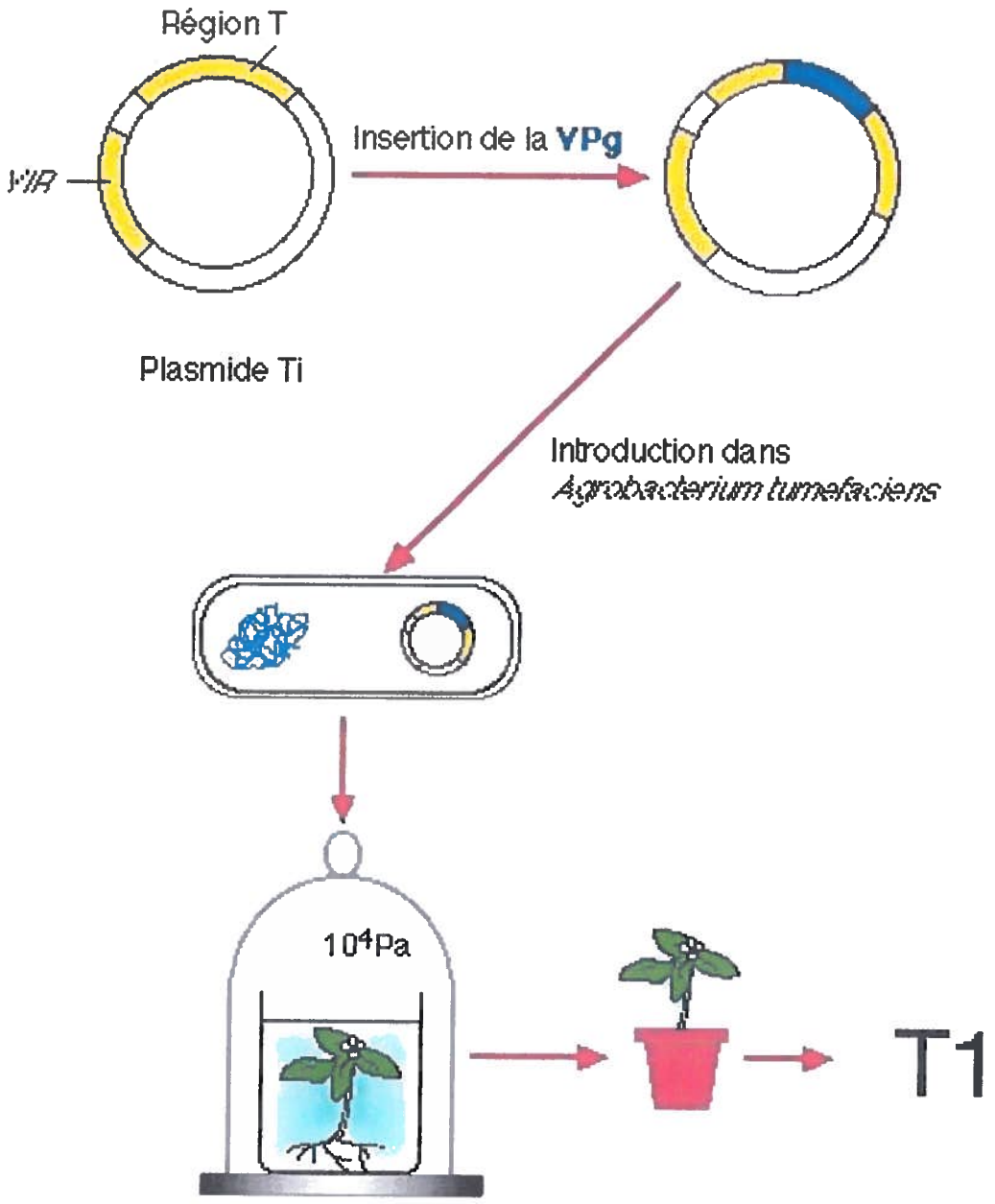


Figure 7. Transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana*. La VPg est insérée dans le vecteur binaire, le plasmide Ti (pJ0530). Le plasmide pJ0530.VPg est ensuite introduit dans *Agrobacterium tumefaciens*. La plante est immergée dans la solution d'agrobactéries. Une pression de 10^4 Pa permet l'infiltration des bactéries dans la plante et la transformation de celle-ci.

4. Sélections des transformants

Les graines ont été stérilisées comme suit: un lavage à l'éthanol 70%, 10 minutes; un lavage à l'eau de javel commerciale diluée 1/5, 30 minutes et cinq lavages à l'eau distillée stérile, cinq minutes chacun. Les graines ont séjournées une nuit dans le dernier lavage à l'eau. Les manipulations ont été faites dans un environnement stérile sous une hotte laminaire biologique. Les graines ont été semées dans des plats de Pétri de 10 cm de diamètre contenant du milieu MS 1/2 X (Murashige et Skoog), 3% de glucose, de l'hygromicine 20 ug/ml, de l'agar 7g/L (Sigma). Le milieu a été ajusté à pH 5.5 avec du NaOH.

Pour semer, les graines ont été suspendues à raison de 1000 graines/500 µl dans de l'agar 0.18% préalablement stérilisé et gardé à la température de la pièce. Elles ont été déposées à l'aide d'une pipette Gilson P-1000 et de pointes tronquées pour agrandir l'ouverture afin de faciliter le passage des graines. Pour les deuxième et troisième sélection, les graines ont été traitées de la même façon, sauf qu'elles ont été dispersées sur agar à la concentration d'environ 15 à 25 graines/100 µl. Les plats de Pétri ont été placés dans une pièce à 25°C sous luminosité continue jusqu'à l'apparition de trois à quatre feuilles. Les jeunes plantes ont ensuite été retirées de l'agar et mises dans des pots contenant du terreau. (Figure 8). Les plantes ont été recouvertes de plastique transparent durant 2 ou 3 jours pour faciliter leur adaptation. Ensuite la croissance s'est poursuivie sous conditions de jour long: 16 heures de lumière en alternance avec 8 heures de noirceur. Les plantes ont été observées attentivement chaque jour. Parvenues à maturité, les plantes présentant des phénotypes atypiques ont été sélectionnées, les graines ont été récoltées et les feuilles ont été congelées à -70°C.

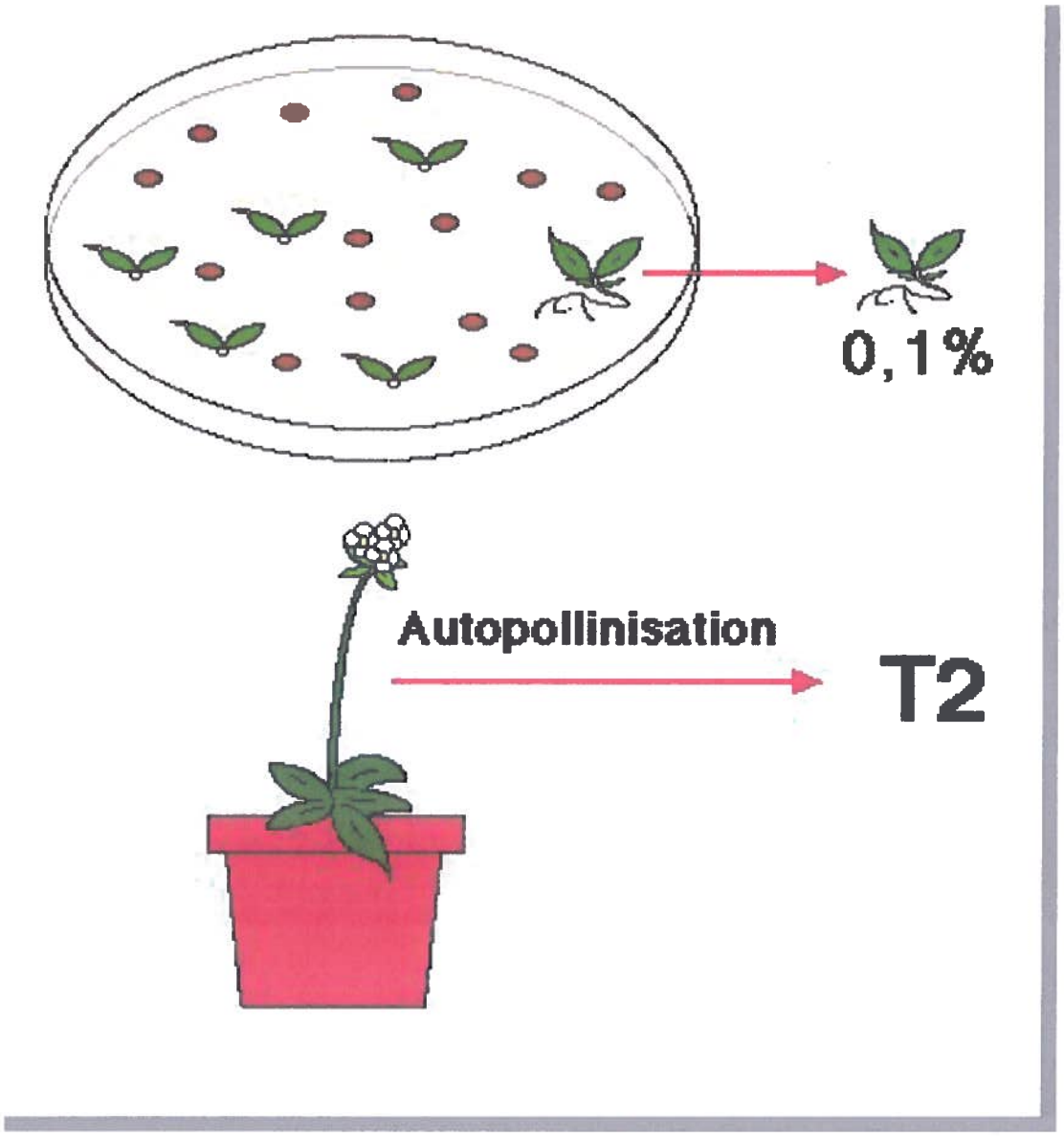


Figure 8. Sélection des transformants. Les plantes résistantes à l'hygromicine dépassent le stade du cotylédon et développent deux feuilles matures avec un système racinaire abondant.

5. Extraction de l'ADN

Le tissu végétal a été pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène très fine à l'aide d'un pilon dans un mortier refroidi dans un congélateur à azote liquide. À l'aide d'une spatule, la poudre congelée a été transférée dans un tube à microcentrifuge de 1.5 ml; 300µl du réactif Plant DNazol (Life Technologie) par 0.1 g de tissu végétal ont été ajoutés, bien mélangés par inversion et le tube a été incubé à 25°C/5 min avec agitation. Trois cent µl de chloroforme ont été ajoutés, mélangés à l'aide d'un vortex et le tube a été incubé à 25°C/ 5 min avec agitation. Les extraits ont été centrifugés à 12,000g/10 min dans une microcentrifuge. La phase aqueuse a été précipitée avec 225 µl d'éthanol 100%, incubée à 25°C/ 5 min et centrifugée à 5,000g/ 4 min. Le culot a été lavé avec 300 µl du mélange DNazol-éthanol (1 volume de DNAzol et 0.75 volume d'éthanol 100%), incubé à 25°C/5 min, centrifugé, lavé avec de l'alcool 70% et dissout dans 50 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Après solubilisation, l'ADN a été centrifugé à 12,000g pour enlever les polysaccharides.

6. Analyse PCR

L'ADN végétal extrait des plantes d'*Arabidopsis thaliana* a été analysé par PCR. Deux amorces ont été utilisées pour l'amplification de la VPg dans les extraits d'ADN génomique: l'amorce JF 100 (sens) et l'amorce FT 26 (antisens). Ces deux amorces sont situées en position 5902 et 6602 dans la séquence nucléotidique du virus du TuMV.

Amorce JF 100

5'- AAAGGCAGGATCCAAAGACAG -3'

Amorce FT 26

5'- TCAAAGAGCTGTCGGTTCG -3'

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume de 100 µl contenant 2 à

10 µl d'ADN génomique, 50 pmole de chacune des amorces, 2.5U de *Taq* polymérase (Bio/Can Scientific), 10µl de tampon *Taq* (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0.1% triton X-100, 1 mM DTT), 0.2 mM de dNTP, 1.5 mM de $MgCl_2$. Les conditions suivantes ont permis l'amplification à l'aide du DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus): cycles 1 et 2: 94°C/1 min, 37°C/30 sec, 72°C/2 min; cycles 4 à 34: 94°C/2 min, 50°C/1 min, 72°C/2 min; cycle 35: 72°C/10 min. Le produit d'amplification a été analysé sur gel d'agarose 0.8% suivi d'un transfert sur membrane de nitrocellulose.

7. Analyse Southern

Une analyse de type Southern a ensuite été réalisée afin de s'assurer de l'identité de la VPg. Comme contrôle positif, nous avons utilisé la VPg amplifiée avec les mêmes amorces (JF 100 et FT26) mais en utilisant le plasmide pUC 9,900 comme gabarit. Ce plasmide contient un cDNA complet du virus du TuMV. Le transfert a été effectué selon Sambrook et *al,* 1989. Pour la détection de la VPg, nous avons utilisé la trousse DIG de la compagnie Boehringer Mannhein en suivant les instructions du fabricant. Le fragment d'amplification VPg de pUC 9,900 a servi pour la préparation de la sonde.

8. Extraction d'ARN

Pour extraire l'ARN végétal des plantes d'*Arabidopsis thaliana*, nous avons utilisé la trousse "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen). Nous avons suivi la technique telle que décrite dans le manuel d'instruction: "RNeasy Mini Handbook". Cette technique permet l'extraction d'ARN total à partir de petites quantités de matériel végétal. La méthode d'extraction isole les ARN d'une taille supérieur à 200 nucléotides. Les petits ARN comme l'ARN 5.8S, l'ARN 5S et les ARNt approximativement de 100, 120 et 70-90 nucléotides ont été éliminés. Ces ARN constituent 15 à 20% de l'ARN végétal total. La procédure RNeasy nous a permis d'obtenir un enrichissement pour les molécules de taille supérieure à 200 nucléotides. Avec cette procédure, il est possible d'obtenir jusqu'à 35µg

d'ARN à partir de 100 mg de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*.

9. RT-PCR

La réaction RT-PCR a été réalisée en une seule étape en utilisant le kit "SuperScript™ one step RT-PCR" (LifeTechnologies Gibco BRL). La réaction a été réalisée dans un volume de 50 µl contenant 1 µl d'ARN (environ 0.3 mg), le tampon de réaction 1X (0.2 mM de chaque dNTP et 1.2 mM de $MgSO_4$), 50 pmoles de chacune des amorces, le mélange enzymatique: la transcriptase inverse et l'ADN polymérase ("SuperScript II/*TAQ* mix"). Les conditions d'amplifications ont été les mêmes que celles utilisées pour amplifier la VPg dans les extraits d'ARN de feuilles infectées par le virus PVX (page 23). Nous avons utilisé les amorces JF 100 (sens) et FT 26 (antisens) dans les réactions PCR. Les amorces JF 100 et FT 26 se retrouvent en position 5902 et 6602 dans la séquence cDNA du virus du TuMV.

10. Extraction des protéines totales de plante

Cinquante à cent mg de tissu végétal conservé congelés à -70°C ont été broyés dans un tube eppendof à l'aide d'un piston jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène. Durant cette opération, les tubes ont été placés sur de la glace sèche afin d'éviter la décongélation. Le tampon d'échantillonnage 1X a ensuite été ajouté à raison de 250 µl pour 50 mg de tissu végétal. Les échantillons ont été mélangés à l'aide d'un outil à moteur haute vitesse muni d'un piston pour tube eppendof (outil "Multi Pro™ Cordless DREMEL").

11. Méthodes d'analyses des protéines

11.1 Electrophorèse

Les gels de polyacrylamide dénaturants (SDS-PAGE, Laemnli,1970) ont été utilisés pour le fractionnement des protéines par électrophorèse en utilisant l'appareil "Mini Protean II system" (Bio-Rad Laboratories). Les gels de séparation et de regroupement étaient constitués de 12% et de 5% d'acrylamide respectivement. Les échantillons à analyser ont été dénaturés par la chaleur dans un bain-marie à 95°C-100°C durant 5 minutes, mélangés et centrifugés durant 10 minutes à 12,000 g. L'électrophorèse a été réalisée dans le tampon d'électrophorèse pour protéines (25 mM Tris-base, 0.192 M glycine, 0.1% (p/v) dodecyl sulfate de sodium (SDS)) jusqu'à la fin de migration du front de bromophénol bleu (environ 1 heure 30 minutes à 150 volts). Les gels d'électrophorèse ont été effectués en double. Un gel a été utilisé pour la coloration au bleu de Coomassie afin de s'assurer de la qualité des extraits et l'autre gel a été utilisé pour l'immunodétection.

11.2 Coloration au bleu de Coomassie

Les gels ont été colorés durant 30 minutes dans la solution de coloration (10% (v/v) acide acétique glaciale, 45% (v/v) méthanol, 0.5% (p/v) Brillant Blue R250) puis décoloré dans la solution décolorante (10% acide acétique glacial (v/v), 45% (v/v) méthanol).

11.3 Transfert des protéines

Suite à l'électrophorèse, le gel réservé pour l'immunodétection a été utilisé pour le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (0.45 µm, Bio-Rad Laboratories) à l'aide d'un appareil de transfert ("Mini trans-blot electrophoretic transfer cell", Bio-Rad Laboratories). L'électrophorèse a été effectué à 100 volts durant une heure dans le tampon

de transfert (25 mM Tris-base, 0.192 M glycine, 20% (v/v) méthanol).

11.4 Immunodétection

Nous avons utilisé la trousse commerciale ELC™ (Amersham Pharmacia Biotech) pour la détection des protéines. Après le transfert des protéines, les sites résiduels de la membrane de nitrocellulose ont été bloqués par incubation durant une heure dans la solution blocante (5% (p/v) de lait en poudre dans le tampon TBS (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCL, pH 7.6)). La membrane a été lavée dans le tampon TBS contenant 0.1% de Tween 20 dans l'ordre suivant: un lavage rapide, un lavage de 15 minutes et deux lavages de cinq minutes avec agitation. La membrane a ensuite été incubée avec le premier anticorps (antisérum de lapin anti NIa) à une dilution de 1:1000 préparé dans la solution blocante durant toute la nuit avec agitation à la température ambiante. La membrane a ensuite été lavée avec le tampon TBS-Tween comme précédemment et incubée durant une heure avec un deuxième anticorps: un anti-immunoglobulines de lapin conjugué à la peroxydase (Pharmacia) dilué 1:2000 dans la solution blocante. La membrane a ensuite été lavée avec le tampon TBS-Tween dans l'ordre suivant: un lavage de 15 minutes et quatre lavages de 5 minutes, avec agitation. Les complexes antigènes-anticorps ont été révélés par l'ajout d'un substrat chemiluminescent de la peroxydase, le substrat ELC de la trousse, en suivant les directions du fabricant. La réaction enzyme-substrat se traduit par une luminescence chimique captée par une exposition de cinq minutes à une heure sur film à rayon X ("Kodak BioMax Mr ", Eastman Kodak Company).

RÉSULTATS

RÉSULTATS

(Première partie)

Expression de la VPg par l'utilisation du vecteur PVX

1. Observation des symptômes

1.1 Plantes infectées avec l'ARN

Des plantes de *Nicotiana benthamiana* ont été inoculées avec un ou cinq µg d'ARN fait à partir des vecteurs pP2C2S, PVX, PVX-GFP et PVX-VPg. Les plantes transfectées par l'ARN des vecteurs pP2C2S, PVX et PVX-GFP ont servi de témoins positifs. Des plantes inoculées avec de l'eau ont servi de témoins négatifs.

Au total six séries d'expérience ont été menées. Nous avons inoculé les plantes avec un µg d'ARN pour les quatre premières séries et avec cinq µg d'ARN pour les deux dernières séries. Chaque expérience comptait huit à dix plantes PVX-VPg, trois à quatre plantes PVX-GFP, deux plantes PVX type sauvage, deux plantes P2C2S et deux plantes inoculées avec de l'eau.

Les plantes inoculées avec l'ARN PVX-GFP étaient fluorescentes à environ quatre à cinq j.a.l. (jours après l'inoculation) avec un µg d'ARN tandis que les plantes inoculées avec cinq µg d'ARN devenaient fluorescentes plus rapidement, soit de deux à trois j.a.l. L'infection devenait systémique à 13 j.a.l. pour les plantes infectées avec un µg d'ARN et à neuf j.a.l. pour les plantes infectées avec cinq µg d'ARN. Les plantes observées sous UV ont montré que le virus a progressé très rapidement dans la plante, tout d'abord par mouvement de cellule-à-cellule, puis de façon systémique à travers le système vasculaire (Figure 9). Cependant, après 15 j.a.l. la fluorescence devenait de moins en moins prononcée pour disparaître presque complètement à 20 j.a.l.

Les symptômes observés à la lumière visible de toutes les plantes inoculées avec les différentes préparations d'ARN étaient sensiblement les mêmes, principalement, des

mosaïques, la déformation des feuilles et des retards de croissance. Nous n'avons pas été en mesure d'observer un phénotype particulier chez les plantes inoculées avec l'ARN PVX-VPg (Figure 10). Les plantes infectées avec un µg d'ARN présentaient les mêmes phénotypes que celles infectées avec cinq µg d'ARN à la seule différence qu'elles accusaient un retard à l'apparition des premiers symptômes. Après 12 à 15 j.a.l., toutes les plantes présentèrent les mêmes symptômes caractéristiques d'une infection causée par le virus PVX seul (mosaïque, déformation des feuilles, retard de croissance). Les plantes inoculées avec de l'eau demeurèrent asymptômatiques.

1.2 Plantes infectées avec les particules virales

Les plantes de *N. benthamiana* ont été inoculées avec 100 µl de surnageant provenant de broyats de feuilles infectées avec l'ARN PVX-GFP et l'ARN PVX-VPg. Trois plantes ont été inoculées avec les particules virales de PVX-GFP, 12 plantes avec les particules virales de PVX-VPg et une plante a été inoculée avec de l'eau comme témoin négatif. Par comparaison avec les plantes inoculées avec l'ARN, l'infection des plantes avec les particules virales a été plus lente à démarrer. Cependant à 13 j.a.l., l'infection était systémique. Toutes les plantes PVX-GFP et toutes les plantes PVX-VPg présentèrent les mêmes symptômes. Les phénotypes étaient semblables à ceux observés chez les plantes infectées avec les transcrits d'ARN *in vitro*. La plante inoculée avec de l'eau n'a pas développé de symptôme.

2. Analyse moléculaire de la VPg

2.1 Analyse RT-PCR

Huit plantes infectées avec l'ARN PVX-VPg présentant des symptômes ont été analysées pour la présence du gène codant pour la VPg. Après dix j.a.l., les troisièmes

feuilles de chaque plante ont été découpées et congelées à -70°C, la première feuille étant celle utilisée pour l'inoculation. Par comparaison avec la protéine GFP exprimée dans les plantes, les troisièmes feuilles étaient celles qui montraient le plus haut niveau d'expression. L'ARN extrait des feuilles infectées a été analysé par RT-PCR. Les amorces PVX-1A et PVX-2 étant situées de part et d'autre des sites d'insertion *Cla*I et *Sal*I, un fragment d'amplification de 215 pb indique l'absence du gène VPg, tandis qu'un fragment d'amplification de 872 pb indique sa présence. La taille de la VPg dans cette construction correspond à la somme des fragments PVX (215 pb), VPg (562 pb) et pET21b(+) (95 pb).

Les produits de réaction obtenus par RT-PCR ont été analysés sur gel d'agarose 0.8% (figure 11). Dans cinq échantillons, un fragment d'amplification de 215 pb indiquait la présence du PVX seul (puits 1, 2, 3, 6 et 7), un échantillon ne contenait aucun fragment (puit 4) et deux échantillons contenaient les fragments de 872 pb et de 215 pb (puits 5 et 8). Ces deux derniers échantillons indiquaient la présence simultanée du vecteur PVX-VPg et du vecteur PVX délété de la VPg. Cette figure nous montre que seuls les échantillons cinq et huit contiennent le gène codant pour la VPg.

Le gène codant pour la VPg à donc été délété rapidement dans le vecteur PVX.

Figure 9. Plante de *Nicotiana benthamiana* inoculée avec l'ARN PVX-GFP. La protéine GFP exprimée dans la plante produit une fluorescence verte brillante sous illumination UV.

A

B

C

Figure 10. Plantes de *Nicotiana benthamiana* . Plante non infectée (A), plante inoculée avec l'ARN-PVX (B) et plante inoculée avec l'ARN PVX-VPg (C). Les plantes PVX et PVX-VPg présentent des symptômes de mosaïques.

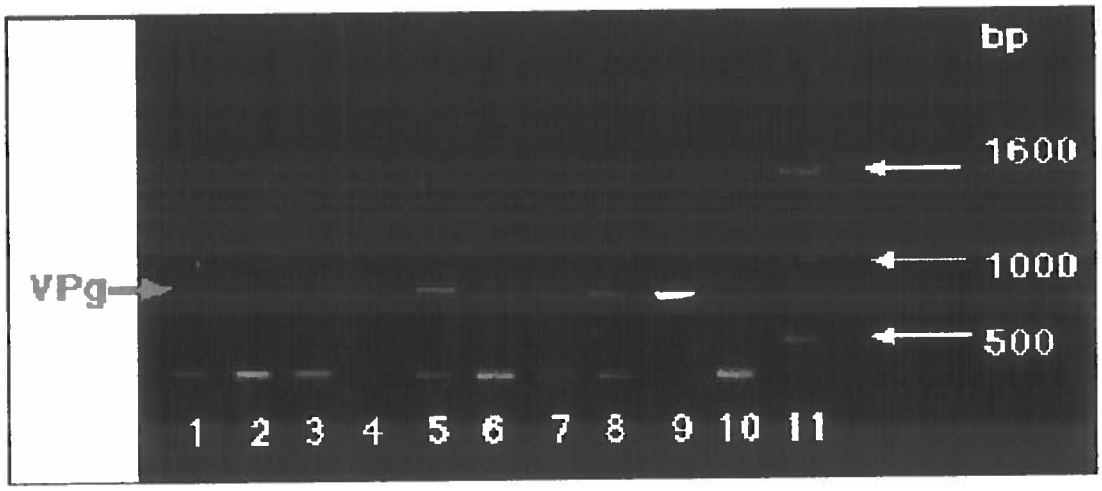


Figure 11. Réactions RT-PCR réalisées à partir de l'ARN de plantes de *N. benthamiana* présentant des symptômes. Les échantillons ont été séparés sur gel d'agarose 0.8%. Puits 1 à 8, plantes infectées avec l'ARN PVX-VPg. Puits 9, contrôle de taille de la VPg (872pb) dans le vecteur PVX. Puits 10, contrôle de taille du vecteur PVX délété de la VPg (215 pb). Puits 11, standard de poids moléculaire.

RÉSULTATS
(Deuxième partie)
Plantes transgéniques pour le gène codant pour la VPg

1. Sélection des transformants

Nous avons reçu du Dr Joël J. Milner, University de Glasgow, 3 lots de graines d'une génération T-1 (T-1 b1, T-1 b2, et T-1 b3) d'*Arabidopsis thaliana* (écotype: Landsberg erecta *gl*1). Chaque lot de graines provenaient d'un "pool" de 6 à 7 plantes infiltrées sous vide par les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide pJ0530-VPg. Le plasmide pJ0530 est un plasmide dérivé du plasmide Ti d'*A. tumefaciens* et contient une région T-DNA dans lequel le gène VPg a été cloné. Il contient également un gène de résistance: le gène codant pour l'hygromicine permettant la sélection des transformants. C'est cette portion du plasmide qui est exporté vers le génome de la plante au cours de la transformation (Figure 6).

Cinq mille graines de chaque lot de la génération T-1 ont été semées sur milieu contenant de l'hygromicine pour la sélection des transformants. Ce milieu permet la croissance des plantes contenant le gène de résistance. Cette sélection a donné au total 6 plantes résistantes. Le lot b1 a donné 4 plantes résistantes, le lot b2 a donné 2 plantes résistantes et le lot b3 n'a donné aucune plante résistante. Ces six lignées ont poussé et fleuri et les graines ont été récoltées.

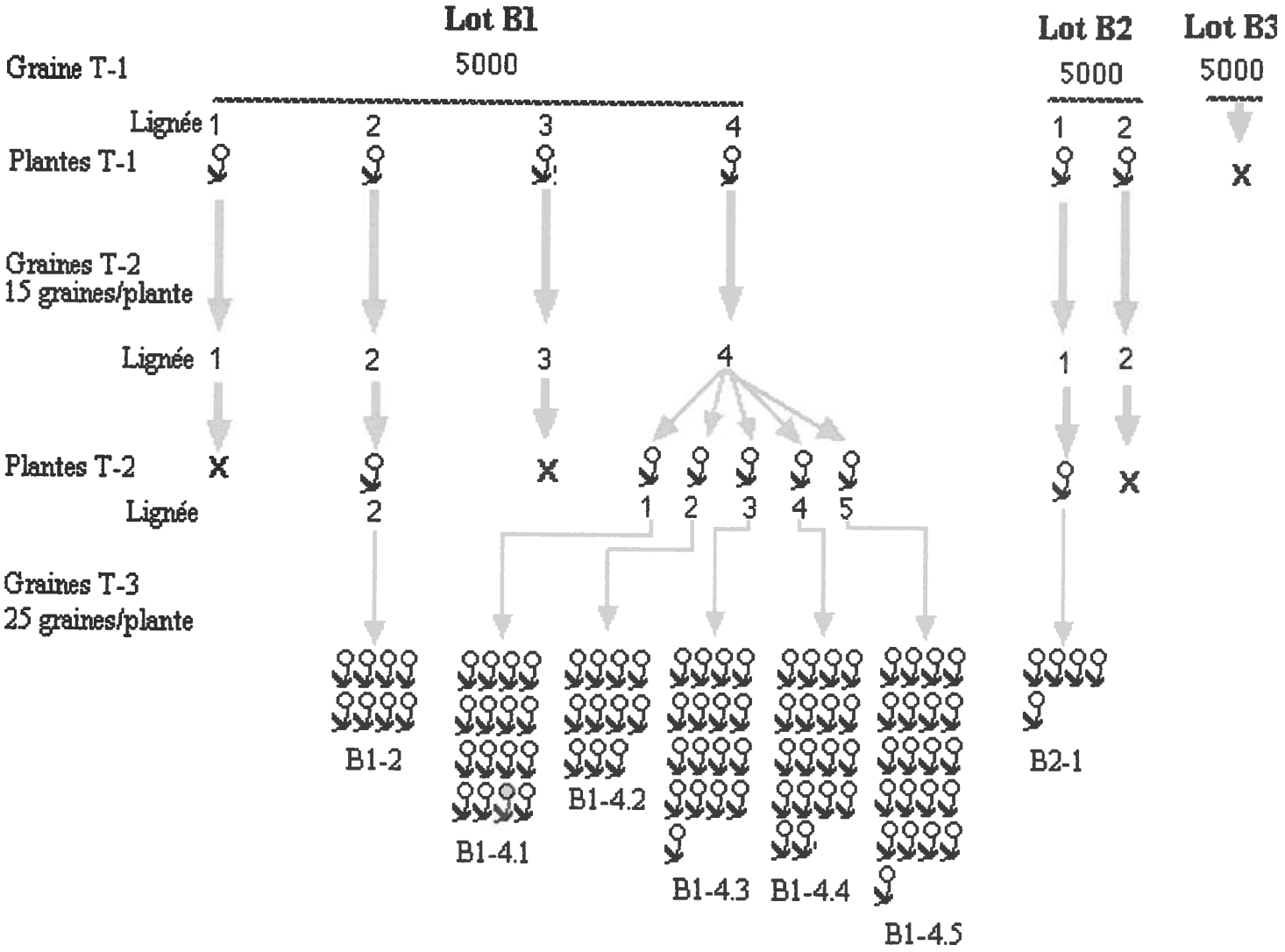
Nous avons semé 15 graines de chacune des 6 plantes de la génération T-2 sur milieu agar nutritif contenant de l'hygromicine. Les plantules qui ont développé deux ou trois feuilles et un système racinaire ont été repiquées dans un terreau. Nous avons obtenu au total 7 plantes résistantes. Une plante provenant de la lignée 2 (lot b1), cinq plantes provenant de la lignée 4 (lot b1) et une plante provenant de la lignée 1 (lot b2). Parvenues à maturité, les graines ont été récoltées. Nous avons semé 25 graines provenant des sept plantes résistantes de la génération T-2 représentant trois lignées indépendantes et nous avons

obtenu 96 plantes résistantes (Tableau 1)

Nous avons utilisé les plantes de la génération T-3 pour l'étude de l'expression phénotypique et pour l'analyse moléculaire de la VPg. Cette génération pouvait contenir d'avantage d'individus homozygotes pour la VPg et faciliter ainsi l'interprétation des résultats.

Afin d'avoir un plus grand nombre de lignées résistantes, nous avons fait une deuxième sélection. Vingt mille graines de la génération T-1 (lot b1) ont été semées sur milieu agar nutritif contenant de l'hygromicine. Cette sélection nous a donné 25 lignées résistantes. Parvenues à maturité, les graines de ces plantes ont été récoltées.

Tableau I Lignées résistantes provenant de trois lots de graines B1, B2 et B3; (5000 graines par lot).



2. Observation des symptômes

Plusieurs plantes de la génération T-3 présentèrent les mêmes symptômes: retard de croissance, rosette feuillue et difforme. La figure 12 représente une plante type de chacune des trois lignées principales T-3 b1-2, T-3 b2-1, et T3 b1-4. Nous avons également observé chez d'autres plantes des phénotypes différents. Par exemple: des plantes d'apparence normale, des plantes dont la croissance a été légèrement retardée, d'autres plantes avaient deux ou plusieurs tiges florales à la base, certains plantes avaient une rosette très feuillue et il y avait également des plantes très petites et rabougries (Figure 13).

Parmi les 96 plantes observées, environ 24% présentaient des phénotypes marqués, 33% avaient un retard de croissance et présentaient des symptômes, 30% avaient des retards de croissance mais ne présentaient pas de symptômes, 6% présentaient un léger retard de croissance et 2% avaient un phénotype normal.

Parmi les 25 lignées résistantes obtenues au cours de la deuxième sélection, seize plantes présentaient un phénotype normal ou étaient légèrement symptomatiques et neuf plantes présentaient un phénotype atypique (retard de croissance, plusieurs tiges florales à la base, feuilles asymétriques, rosette déformée et feuillue, plante rabougries, plante dont le système racinaire étaient peu développé) (figure 14).

3. Analyse moléculaire de la VPg

3.1 Analyse de l'ADN

L'ADN des plantes présentant des phénotypes a été extrait. Le tissu végétal a été pulvérisé à froid et l'ADN a été extrait au DNazol. La qualité des extraits a été vérifiée sur gel d'agarose 0.8%: la présence abondante d'ADN sur le gel nous indiquait que l'extraction avait bien fonctionnée. Le gène VPg a ensuite été amplifiée par PCR avec les amorces JF-100 et FT-26. Les amorces JF-100 (sens) et FT-26 (antisens) se retrouvent en position

5902 et 6602 respectivement dans la séquence cDNA du virus du TuMV. Les produits d'amplification ont été analysés sur gel d'agarose. Le gel a ensuite été transféré sur membrane de nitrocellulose. Une sonde spécifique pour la VPg a permis de détecter la présence du gène codant pour la VPg à l'aide de la trousse de détection DIG (Boehringer Mannheim). Parmi les sept plantes analysées, toutes contenaient un fragment de 700 pb correspondant à la taille de la VPg amplifiée avec les amorces JF-100 et FT-26 (Figure 15).

3.2 Analyse de l'ARN

Trois plantes atypiques représentant les trois lignées principales ont été analysées (T-3 b1-1, T-3 b2-1 et T-3 b1-4). L'ARN végétal a été extrait des plantes à l'aide de la trousse RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen). La qualité des extraits d'ARN a été vérifiée sur gel d'agarose 0.8%: le gel contenait des quantités abondantes d'ARN ribosomal. L'analyse RT-PCR a ensuite été effectué à l'aide de la trousse SuperScript™ (Life Technologies). Les amorces JF-100 et FT-26 ont été utilisées dans la réaction RT-PCR. Les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'agarose et transférés sur membrane de nitrocellulose. Une sonde spécifique pour la VPg a été utilisée et la VPg a été détectée par chemiluminescence. Des fragments de 700 pb indiquaient la présence de la VPg amplifiée avec les amorces JF-100 et FT-26. Les trois extraits analysés contenaient l'ARN VPg (Figure 16).

Afin de s'assurer que la VPg était bien amplifiée à partir d'un ADN transcrit dans la réaction RT-PCR et non à partir de l'ADN qui pouvait être présent en petite quantité dans les préparations d'ARN, nous avons fait une autre réaction RT-PCR en ajoutant un contrôle d'amplification qui ne contenait pas la transcriptase inverse. Les produits de la réaction RT-PCR ont été analysés sur gel d'agarose. La VPg était présente dans les 9 réactions RT-PCR provenant d'ARN de plants atypiques et elle était absente dans la réaction RT-PCR provenant de l'ARN d'un plant atypique (plant 9) sans transcriptase inverse (Figure 17).

3.3 Analyse des protéines

Les feuilles provenant de plantes atypiques ont été broyées à froid et homogénéisées dans un tampon d'échantillon 1X pour électrophorèse. Les surnageants des extraits ont été analysés sur gels de polyacrylamide dénaturants (SDS-PAGE). La qualité des extraits a été vérifiée sur un gel coloré au bleu de Coomassie: le gel contenait des quantités appréciables de protéines végétales. Un autre gel a été transféré sur membrane de nitrocellulose suivi d'une immunodétection avec un premier anticorps, un antisérum de lapin anti-NIa et d'un deuxième anticorps, un anti-immunoglobulines de lapin conjugué à la peroxydase. Un substrat chemiluminescent de la peroxydase de la trousse ELC a été utilisé pour détecter la VPg. Nous n'avons cependant pas été en mesure de détecter la protéine VPg. Un bruit de fond important sur la membrane interférait dans l'analyse des résultats.

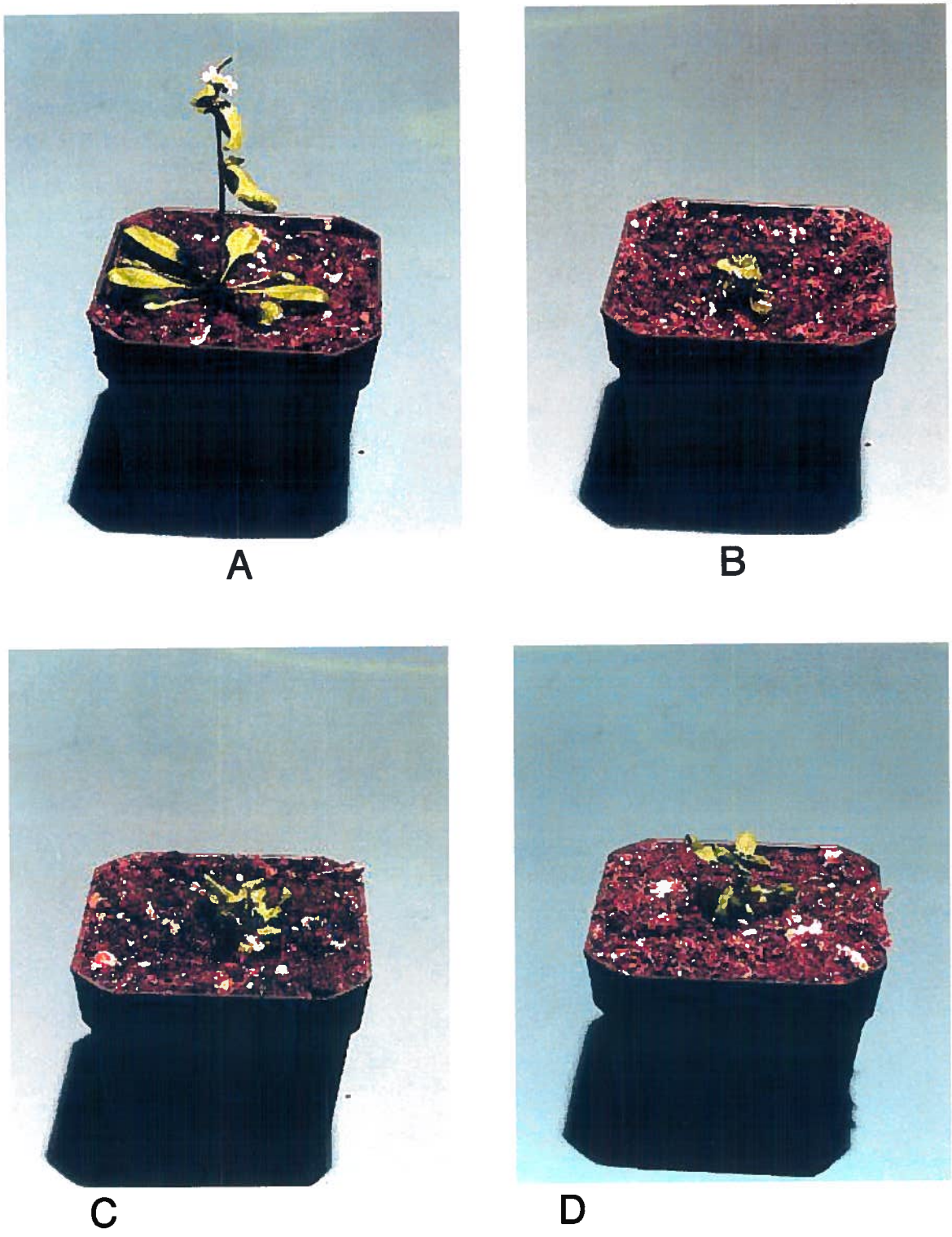


Figure 12. Plantes d'*Arabidopsis thaliana*. (A) plante non transformée. (B, C et D), plantes présentant des symptômes atypiques de trois lignées indépendantes transformées avec le gène VPg: (B) plante de la lignée b1-2; (C) plante de la lignée b1-4; (D) plante de la lignée b2-1.

Figure 13. Phénotypes observés chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana* de la génération T-3 transformées avec le gène codant pour la VPg. 1, Plante non transformée. 2 à 8, plantes transformées avec la VPg: 2, plante présentant un phénotype normal; 3, plante dont la croissance est légèrement retardée. 4, plante présentant deux tiges florales à la base. 5 et 6, plantes difformes et dont la croissance est ralentie. 7, plante présentant une rosette feuillue et difforme. 8, plante très petite et difforme.

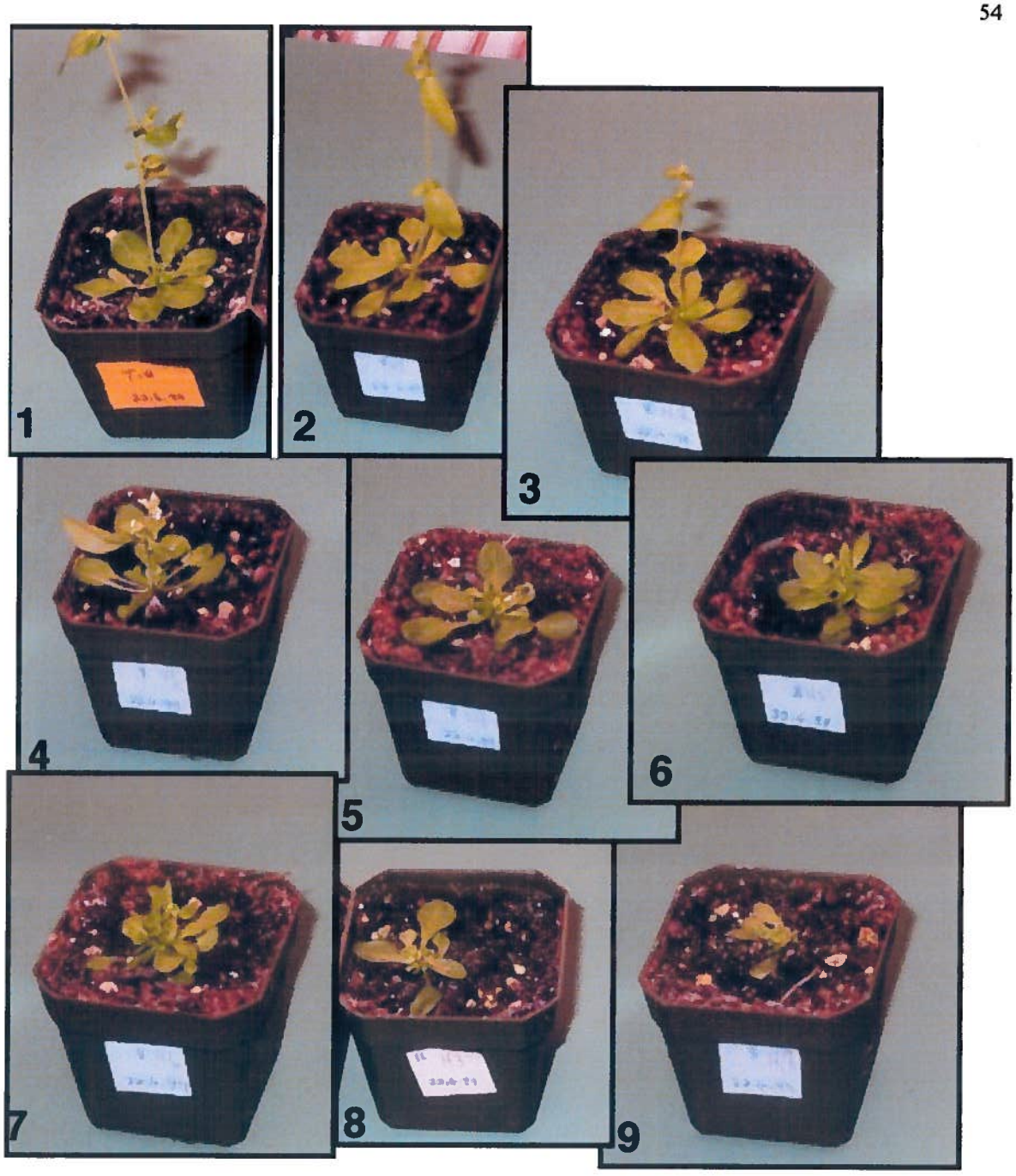


Figure 14. Phénotypes observés chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana* de la génération T-1 transformées avec le gène codant pour la la VPg. 1, plante non transformée. 2 et 3, plantes présentant un phénotype normal. 4, plante possédant deux tiges florales à la base. 5 et 6, plantes dont la croissance est ralentie. 7, plante présentant une rosette feuillue et atypique. 8, plante présentant une rosette asymétrique. 9, plante petite et difforme.

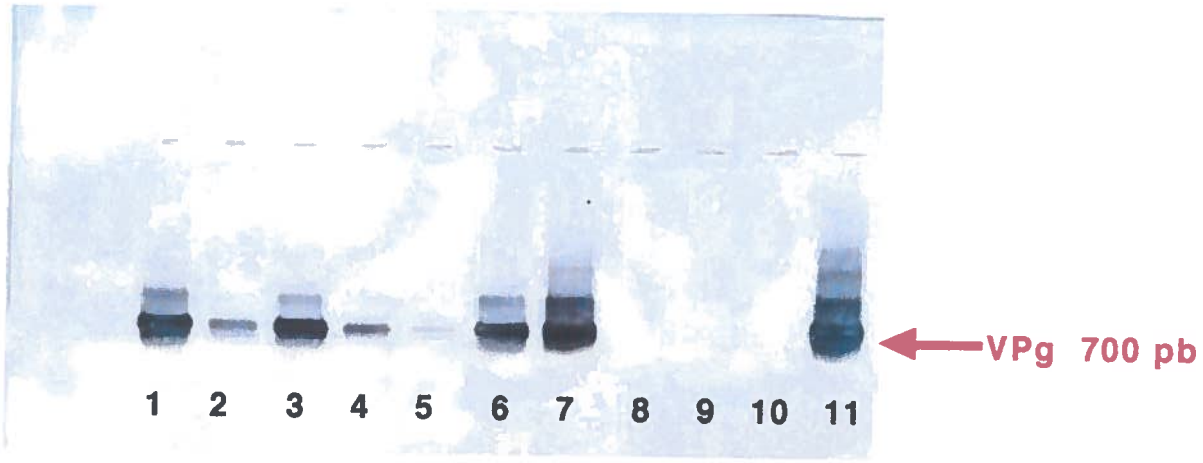


Figure 15. Analyse de type Southern des produits PCR. Les réactions d'amplification ont été réalisées à partir de l'ADN extrait des plantes d' *A.thaliana* présentant des symptômes atypiques. Puits 1 à 7, plantes atypiques. 8, 9 et 10, plantes non transformées. 11, témoin positif VPg.

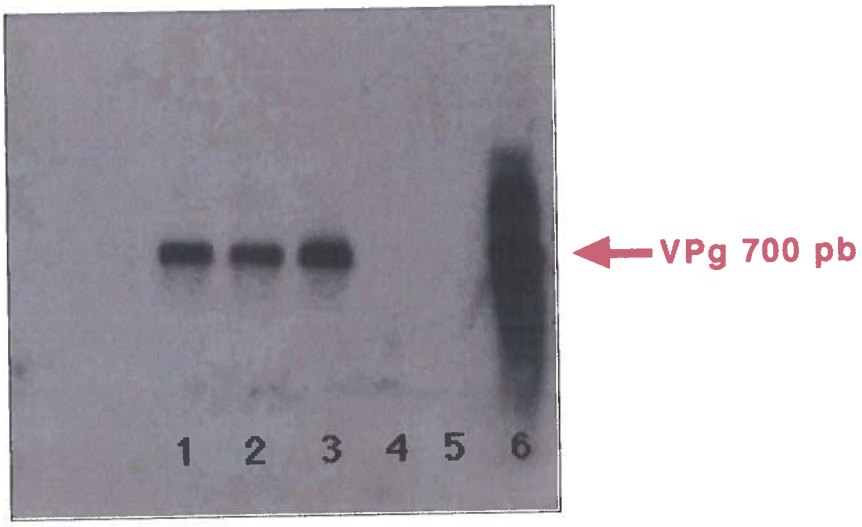


Figure 16. Analyse de type Southern des réactions RT-PCR réalisées à partir de l'ARN extrait de plantes d'*A.thaliana*. Les puits 1, 2 et 3 représentent trois plantes atypiques provenant de trois lignées indépendantes (T3 b1-1, T3 b2-1 et T3 b1-4). Les puits 4 et 5 représentent des plantes non transformées et le puits 6 est le témoin positif VPg. La VPg a été détectée par chemiluminescence.

Figure 17. Analyse des réactions RT-PCR réalisées à partir de l'ARN des plantes d'*A.thaliana* présentant des symptômes atypiques. Les échantillons ont été séparés sur gel d'agarose 0.8%. Le puits 1 représente une plante non transformée. Les puits 2 à 10 représentent des plantes atypiques. Le puits 11 représente la plante 9 sans transcriptase inverse. Le puits 12 est le témoin positif VPg. Le puits 13 est le standard de poids moléculaire.

DISCUSSION

DISCUSSION

Des études antérieures ont démontré que la protéine virale VPg du TuMV interagit avec une protéine de l'hôte, la protéine eIF(iso)4E d'*Arabidopsis thaliana* (Wittman et *al*, 1997; Léonard et *al*, 2000). L'eIF(iso)4E joue un rôle important dans l'initiation de la traduction des ARNm coiffés. Elle a pour fonction de favoriser l'association du complexe de traduction eIF4F avec l'ARNm cellulaire. L'interaction de la VPg avec l'eIF(iso)4E suggère que la protéine virale influencerait la traduction des messagers cellulaires. Dans ce projet, nous voulions savoir si la VPg exprimée dans la plante aurait pour conséquences l'apparition de nouveaux phénotypes suite à la traduction d'une nouvelle population d'ARNm. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé deux stratégies pour la production de la VPg: le vecteur viral PVX et les plantes transgéniques.

(Première partie)

1. Expression de la VPg par l'utilisation du vecteur PVX

Nous avons inoculé les plantes de *Nicotiana benthamiana* avec les vecteurs d'expression viraux PVX (type sauvage), PVX-GFP, pP2C2S et PVX-VPg. Le vecteur PVX a servi de contrôle positif pour l'infection virale. Le vecteur PVX-GFP nous a permis de suivre la progression de l'infection dans les plantes par l'expression du gène *gfp*. La protéine GFP produit une fluorescence sous illumination UV. Le vecteur pP2C2S est le vecteur PVX dans lequel deux sites de restriction *Sal*I et *Cla*I ont été ajoutés dans le génome viral pour le clonage de gènes étrangers. Celui-ci nous a également servi de contrôle pour l'infection: l'addition de deux sites de restrictions dans le génome viral pouvant interférer avec l'infectivité du virus PVX. Le vecteur PVX-VPg a été construit à partir du vecteur pP2C2S. La VPg a été cloné à l'intérieur des deux sites uniques de restriction *Cla*I et *Sal*I.

Les plantes inoculées avec l'ARN PVX-GFP montrèrent une fluorescence qui était visible très tôt après l'inoculation, avant même l'apparition de symptômes que l'on pouvait voir à la lumière du jour. Le virus se propageait rapidement dans la plante et l'infection était systémique à environ 9 j.a.l. (Figure 9). Par la suite, la fluorescence diminuait graduellement pour disparaître presque complètement après 20 j.a.l. Cependant, les symptômes de viroses demeurèrent nettement apparents à la lumière visible. Cette observation nous a permis de constater qu'après un certain temps, le virus PVX délétait le gène *gfp*.

Nous avons également inoculé des plantes avec les particules virales extraites de feuilles provenant de plantes infectées. Les plantes inoculées avec soit les transcrits d'ARN *in vitro* ou soit avec les particules virales montrèrent toutes les mêmes symptômes. Cependant certaines plantes infectées avec l'ARN PVX du type sauvage montrèrent des symptômes plus sévères que ceux infectés avec les autres transcrits PVX. Il est possible que la présence des sites d'insertion *Sal*1 et *Cla*1 a eu pour effet d'atténuer la virulence des vecteurs d'expression.

Afin d'obtenir une expression rapide de la VPg dans les plantes avant l'apparition des symptômes viraux, nous avons inoculé les plantes avec des quantités élevées d'ARN. Nous n'avons cependant pas pu observer de phénotypes particuliers dûs à l'expression de la VPg. Après l'analyse par RT-PCR de l'ARN extraites des feuilles infectées, nous avons pu observé que le vecteur PVX délétait rapidement le gène VPg (Figure 11).

Plusieurs facteurs pouvaient influencer la stabilité du vecteur PVX dans la plante: la construction du vecteur, les recombinaisons homologues, la nature et la taille de l'insert.

Le vecteur PVX contient un double exemplaire du promoteur de la capside. Un promoteur dirige la synthèse de l'ARNm pour la protéine de la capside du virus et l'autre promoteur permet la transcription de l'ARN du gène étranger (Chapman et *al*, 1992). Dans cette construction, la présence d'un promoteur double pour la capside pouvait engendré des recombinaisons homologues entre les régions dupliquées du génome viral entraînant la délétion de séquences étrangères. La délétion du gène étranger pouvait se faire

également par un mécanisme de recombinaison par choix de copie. Ce mécanisme entraînerait la délétion du gène étranger suite à l'arrêt de synthèse du complexe de réplication, de la dissociation de son gabarit et de sa ré-association à une nouvelle position sur l'ARN (Coffin, 1979). Ce mécanisme de recombinaison a été particulièrement caractérisé chez les rétrovirus mais a aussi été étudié chez les poliovirus, chez les coronavirus et chez certains virus de plante. Ces études ont montré que l'arrêt de la synthèse et le détachement de la polymérase sont associés à l'activité instable des polymérases dépendantes d'ARN (Lai, 1992) La recombinaison par choix de copie chez les virus pourrait être un mécanisme important pour la génération de diversité et la stabilisation de populations virales face à une pression sélective (Bélanger, 1999).

Pour éviter ces recombinaisons homologues, le vecteur viral pourrait être construit en utilisant un promoteur venant d'un virus apparenté (Donson et *al*, 1991). Cette stratégie a été appliquée avec succès dans la construction d'un vecteur viral à partir du virus du TMV en utilisant le gène de la capside et la séquence promotrice d'un autre tobamovirus ("odontoglossum ring spot virus"). Cette construction a permis une propagation stable du gène *DHFR* après plusieurs passages de particules virales de plante à plante (Donson et *al*, 1991).

Il a été démontré dans une réaction *in vitro* de type ELISA qu'un analogue de la coiffe, le m^7GTP inhibait la formation du complexe VPg-eIF4E. Ceci suggère que la VPg et les ARNm cellulaires compétitionnent pour la liaison à l'eIF4E (Léonard et *al*, 2000). Il se pourrait que la VPg compétitionne également avec la coiffe du virus PVX pour sa liaison avec le facteur de traduction cellulaire eIF4E. Cette compétition empêcherait la VPg de se lier à la protéine eIF4E et par conséquent, on ne pouvait observer l'apparition d'un phénotype particulier résultant d'une interaction VPg-eIF4E. Il serait alors possible que le virus PVX ait élaboré des stratégies pour être traduit de façon efficace. Le vecteur viral PVX ne serait probablement pas le vecteur de choix pour l'expression de la VPg *in planta.*

La taille de la séquence insérée dans le vecteur PVX doit être aussi petite que possible. La VPg dont la taille est de 562 pb dans la construction ne devrait pas interférer

dans la stabilité du génome. Le gène GUS de 1.8 kb est la taille maximale à avoir été insérée avec succès dans le vecteur viral (David Beaulcombe, communication personnelle). Cependant, la GFP de 457 pb, taille semblable à la VPg semble se maintenir d'une façon plus stable dans le vecteur PVX. L'instabilité génomique pourrait être due à plusieurs facteurs associés à l'insertion du gène étranger (Chapman et *al*, 1992). Il semblerait que la nature intrinsèque de la séquence étrangère aurait un rôle à jouer dans la stabilité du vecteur dans la plante. La nature virale de la VPg dans le vecteur PVX interférerait dans les processus de réplication du virus PVX. Celui-ci aurait tendance à déléter la VPg pour assurer son intégrité et conserver son caractère infectieux dans la plante.

Au cours de l'analyse moléculaire (figure 11), deux plantes ont montré la présence du gène codant pour la VPg. Cependant, nous n'avons pas pu observer de phénotypes particuliers chez ces plantes. Des facteurs autres que l'instabilité du vecteur PVX pouvaient intervenir dans l'expression de la VPg. Par exemple, le messager non-délété pouvait être très peu abondant, la quantité de protéines produites serait trop faible ou des mutations se seraient produites dans la protéine VPg. Des délétions ou insertions pouvaient aussi produire un changement de cadre de lecture dans la séquence en acides aminés de la VPg et par le fait même inactiver celle-ci. On ne peut exclure non plus la possibilité que la protéine virale pouvait être instable suite à sa synthèse dans la plante (Kobayashi et al, 1998; Nakayashiki et al, 1993).

(deuxième partie)

2. Les plantes trangéniques pour le gène codant pour la VPg

Dans la première partie de ce projet, nous avons utilisé le vecteur PVX pour exprimer la VPg dans les plantes. Nous n'avons pas pu cependant observer de phénotypes particuliers pouvant nous indiquer que la protéine virale était exprimée. Toutes les plantes infectées avec les vecteurs PVX utilisés comme contrôles ainsi que celles infectées avec le vecteur PVX contenant la VPg avaient les mêmes symptômes, c'est-à-dire des symptômes caractéristiques d'une infection par le virus PVX.

Comme deuxième approche pour exprimer la VPg, nous avons utilisé les plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*. Nous avons cultivé les plantes provenant des graines d'une génération T-2 jusqu'à la génération T-3. Nous avons observé les symptômes chez les plantes de la génération T-3 et analysé les plantes présentant des phénotypes atypiques pour la présence de la VPg dans l'ADN végétal et dans l'ARN végétal.

Plusieurs plantes observées dans trois lignées indépendantes montrèrent des symptômes semblables, c'est-à-dire des retards de croissance, des rosettes feuillues et difformes (figure 12). Nous avons également observé dans ces lignées transgéniques une variété de phénotypes différents (figure 13).

Il serait vraisemblable que cette variété de phénotypes observée soit due a une reprogrammation de la traduction des ARNm cellulaires. Selon notre hypothèse, la VPg en se liant au facteur eIF4E ou à son isoforme, le facteur eIF(iso)4E inhiberait la traduction de certains ARNm cellulaires. Les ARNm qui sont moins dépendants de la coiffe pour leur traduction ou ceux qui possèdent des structures secondaires peu développées à leur extrémité 5', seraient préférentiellement traduits (Sonenberg, 1994).

Il est toujours possible qu'un phénotype atypique puisse être dû à une

mutagénèse par insertion du T-DNA dans le génome nucléaire de la plante. Nous n'avions cependant pas de plantes transgéniques transformées avec le T-DNA sans la VPg. Ces plantes porteuses des mêmes événements de transformation auraient pu être de bons contrôles négatifs pour l'étude des phénotypes. Cependant, des expériences répétées plusieurs fois au laboratoire du Dr Joel Milner indiquent que ce contrôle ne serait pas significatif. Chaque lignée transgénique est un événement indépendant et l'insertion du T-DNA se fait essentiellement au hasard. Un phénotype particulier que l'on retrouve dans au moins deux lignées indépendantes est une bonne indication pour que ce phénotype soit causé par l'expression du transgène. (Joel J. Milner, communication personnelle). Il y a donc de fortes probabilités que les symptômes observés soient causés par l'expression de la VPg, étant donné que les mêmes phénotypes reviennent dans trois lignées de plantes transformées.

Nous avons observé des variations de croissance dans une même lignée transgénique. Il est possible que les graines semées sur milieu sélectif n'aient pas toutes la même perméabilité à l'hygromicine causant ainsi des variations dans la croissance des plantules (Joël J. Milner, communication personnelle). Ces variations de croissance pourraient également être dues à des taux d'expression différents de la VPg dans les plantes. Certaines plantules ayant développé un système racinaire et deux à trois feuilles sur milieu sélectif n'ont cependant pas poursuivi leur croissance lorsque repiquées en terre. Ces plantules ne parvenaient pas à maturité et mourraient. Un taux d'expression élevé de la VPg pourrait être toxique pour la plante et inhiber complètement la croissance de celle-ci. L'effet toxique de la VPg chez les plantes pourrait être responsable de la ségrégation anormale observée dans les lignées transformées. Théoriquement, nous aurions dû observer une ségrégation de trois plantes résistantes pour une plante sensible parmi chacune des progénitures T-2, mais ce nombre était inférieur à celui attendu: nous avons obtenu une moyenne d'une plante résistante pour cinq plantes sensibles au cours de la génération T-2. Au cours de la génération T-3, ce ratio était de une plante résistante pour deux plantes sensibles (tableau I). Un autre facteur à considérer pourrait être l'expression du gène codant pour l'hygromicine phosphotransférase. Certains auteurs (Cecchini et al, 1997) ont rapporté qu'il peut y avoir des niveaux d'expression différents de ce gène dans les plantes.

D'autres conditions physiologiques (stade de développement des graines, perméabilité des graines) et environnementales (régime en eau et en nutriments, luminosité, température, présence de pucerons et de moisissures) peuvent également influencer la croissance des plantes.

Au cours d'une deuxième sélection de 20,000 graines de la génération T-1 de plantes transformées (lot b1), nous avons obtenu 25 plantes résistantes présentant une grande variété de phénotypes (figure 14). On a pu observé neuf plantes atypiques, les autres plantes présentaient des phénotypes normaux ou avaient de légers symptômes. Comme mentionné précédemment, ces symptômes pouvaient être dûs à des niveaux différents d'expression de la VPg d'une plante à l'autre, à la nature même de la VPg exprimée, à des variations dans les niveaux d'expression de l'hygromicine. Des conditions physiologiques et environnementales pouvant aussi, mais dans une moindre mesure influencer le développement des plantes. Il y aurait aussi à considérer l'état hémizygote des plantes de la génération T-1. Il est alors normal de trouver plusieurs plantes présentant des phénotypes normaux ou mitigés et peu de plantes présentant un caractère franchement distinguable que l'on pourrait attribué à l'expression du transgène. Trois plantes avaient cependant un caractère semblable à ceux rencontrés dans trois lignées de la génération T-3 (figure 13, plantes 7, 8 et 9) c'est-à-dire, retard de croissance, rosettes feuillues et difformes. L'état hémizygote s'expliquerait du fait que la transformation des plantes aurait lieu tardivement lors du développement floral (Bechtold et *al*, 1993; Kenneth, 1991). La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* transformerait une cellule pouvant former un zygote ou le zygote lui-même (Kenneth A. et Feldmann, 1991). Les plantes homozygotes apparaîtraient dans les prochaines générations après autopollinisation des plantes. Les plantes homozygotes pour la protéine virale devraient avoir un phénotype plus accentué et plus facilement sélectionnable. Les plantes de la génération T-3 présentant des symptômes sévères (figure 12) seraient probablement homozygotes pour la VPg.

L'apparition fréquente du phénotype de croissance retardée soutient notre hypothèse qui veut que la VPg en s'associant avec la protéine eIF-4E interférerait avec le

développement normal de la plante. La protéine eIF-4E chez les mammifères joue un rôle important dans la régulation de la traduction et de la croissance cellulaire (Sonenberg, 1994). La protéine eIF-4E chez la plante jouerait un rôle semblable. La plupart des observations concernant le rôle de ce facteur ont été faites chez les mammifères. Cependant, il y aurait des similarités dans les processus d'initiation de la traduction chez les mammifères, les plantes et les levures. Il existeraient également des homologies de séquences dans ces différents facteurs d'initiation de la traduction (Browning et *al*, 1996; Gallie, 1996).

Les plantes présentant des phénotypes particuliers ont été analysées pour la présence de la VPg. La VPg a été retrouvée dans l'ADN extrait de plantes atypiques (figure 15). L'analyse par RT-PCR effectuée sur des extraits d'ARN végétal nous a révélé que l'ARN VPg était également présent dans les plantes représentant trois lignées indépendantes (figure 16). Plusieurs autres plantes atypiques ont été analysées et toutes contenaient l'ARN VPg (figure 17). Par contre, l'analyse par immunodétection ne nous a pas permis de détecter la présence de la protéine virale. La VPg semble être un antigène faiblement reconnu chez le lapin. L'anticorps produit à partir des corps d'inclusions de la protéine recombinante était utilisé à des dilutions probablement trop faible pour reconnaître la protéine virale dans les extraits de protéines de plantes transformées. De plus, un bruit de fond important sur la membrane de nitrocellulose interférait dans l'analyse des résultats. Nous pourrions également ajouter que si la VPg est très toxique pour la plante, nous serions probablement au dessous du seuil de détection par analyse "Western blot" pour révéler la présence de la protéine virale chez les plantes capables de survivre. Même si nous n'avons pas pu confirmer la présence de la protéine VPg, il y a cependant de fortes chances que la VPg soit exprimée dans les plantes étant donné la corrélation qui existe entre les symptômes sévères observés chez les plantes atypiques et la présence de l'ARN VPg.

Comme nous l'avons mentionné au cours de cette discussion, la croissance des plantes peut être influencée par différents facteurs environnementaux. Nous n'étions cependant pas dans les conditions pour que tous les facteurs soient bien contrôlés. La culture des plantes se faisait dans une pièce non adaptée pour l'horticulture. Étant donné

qu'il est difficile de contrôler tous les paramètres: humidité, lumière, photopériode, température, nutriments; des différences dans le développement des plantes pouvaient se produire et causer des ambiguïtés au cours de l'observation des symptômes. Idéalement, les plantes devraient croître dans un cabinet de croissance ou dans une pièce où tous les paramètres puissent être contrôlés automatiquement. De plus, les plantes n'étaient pas isolées les unes des autres, des pollinisations croisées pouvaient alors se produire, par exemple, un léger courant d'air dans une pièce était suffisant pour transporter le pollen d'une plante à l'autre. Cette situation rendait plus difficile l'obtention de lignées homozygotes pour la VPg. Il existe maintenant sur le marché des unités disposables adaptées pour la culture des plantes d'*Arabidopsis thaliana* ("Arasystem" de la compagnie Lehle seeds). Ces unités sont munies d'un dispositif assurant l'isolement de chaque plante et favorisant la récolte des graines.

L'analyse génétique de l'ADN et de l'ARN des plantes nous a permi de constater que le gène ainsi que le messager étaient présents. Cependant, les analyses PCR ne sont pas des méthodes absolument sûres pour confirmer hors de tout doute la présence de la VPg. Aussi, ces analyses devrait être réalisées sur un plus grand nombre d'échantillons d'ADN de plantes représentant tous les phénotypes: normaux, intermédiaires et atypiques.

Une méthode sûre pour savoir si la VPg est présente est l'analyse des protéines par immunodétection. Afin d'améliorer la sensibilité de détection, la VPg pourrait être construite en fusionnant le peptide T7tag à l'extrémité N-terminale de la protéine VPg. La séquence T7tag est reconnue par un anticorps anti-T7tag. Cet anticorps peut être utilisé à des dilutions allant jusqu'à 1:20,000, contrairement à 1:1000 pour l'anticorps anti-NIa éliminant de ce fait le bruit de fond sur la membrane de nitrocellulose. Ceci permettrait également d'augmenter le temps d'exposition sur film à rayon X.

Il serait également intéressant de voir la corrélation entre les phénotypes observés et les niveaux de protéines exprimés dans les plantes. La méthode ELISA indirecte réalisée sur des extraits de plantes (Ismail et *al*, 1987) a été utilisé avec succès pour doser la protéine P6 du CaMV exprimée dans les plantes d' *Arabidopsis Thaliana* (Cecchini et *al*,

1997).

Dans les expériences que nous avons réalisées, nous voulions voir les effets phénotypiques chez les plantes transformées avec la VPg. Une autre expérience pouvant nous apporter d'autres informations serait de transformer les plantes avec un mutant VPg, le D77N qui a perdu son affinité avec la protéine de l'hôte, le facteur eIF4E. Ces plantes devraient avoir des phénotypes normaux, tandis que les plantes transformées avec la VPg non mutée présenteraient des phénotypes atypiques. Cette expérience soutiendrait notre hypothèse voulant que la VPg exprimée chez la plante causerait des effets phénotypiques probablement en modifiant la programmation des ARNm cellulaires.

CONCLUSION

Dans ce projet, nous avons utilisé des vecteurs génétiques pour exprimer la VPg dans les plantes et voir si cette expression mènerait à l'apparition de nouveaux phénotypes. Le premier objectif a été l'utilisation du vecteur PVX et le second objectif a été l'utilisation des plantes transgéniques.

Nous nous sommes rendu compte rapidement que le vecteur PVX délétait la VPg. Cette délétion arrivait tôt en début d'infection et par conséquent nous ne pouvions voir des phénotypes particuliers pouvant être attribués à l'expression de la VPg. Plusieurs facteurs pouvaient être responsables de l'instabilité du vecteur PVX dans la plante, cependant, nous pensons que la nature même de la VPg comme protéine virale serait un facteur important pouvant causer sa délétion. La VPg pourrait compétitionner avec la coiffe du vecteur PVX afin de s'approprier le facteur d'initiation de la traduction eIF4E. Cette compétition interférerait avec le virus PVX pour l'établissement d'une infection dans la plante et celui-ci délèterait rapidement la protéine virale. De ce fait, les vecteurs viraux possédant une coiffe ne seraient probablement pas les vecteurs de choix pour exprimer la VPg. Cependant, les résultats de ces expériences ne serait pas en désaccord avec des expériences faites antérieurement démontrant une interaction de la protéine VPg avec le facteur cellulaire eIF4E: dans un test de type ELISA, la VPg compétitionnerait avec un analogue de la coiffe pour s'approprier le facteur d'initiation de la traduction.

Notre deuxième objectif consistait à exprimer la VPg dans les plantes transgéniques. Nous avons obtenu des phénotypes atypiques dans trois lignées de plantes transformées de la troisième génération (T-3). Au cours d'une deuxième sélection, nous avons obtenu 25 plantes résistantes, et parmi ces plantes, trois présentaient le même phénotype observé au cours de la première sélection. L'analyse moléculaire nous a permis de constater la présence du gène VPg et de son messager dans les plantes atypiques. Nous considérons que cette corrélation entre les symptômes observés et la présence de l'ADN-VPg et de l'ARN-VPg seraient de bonnes indications pour que l'on puisse attribuer ces phénotypes particuliers à l'expression de la VPg dans les plantes.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier sincèrement le Dr. Jean-François Laliberté pour m'avoir accepté comme étudiante à la maîtrise.

Je remercie Simon Léonard et Nicole Daigneault compagnon et compagne de travail avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

Je remercie également tout le personnel de l'Institut et tous les étudiants qui ont collaboré de près ou de loin à ce projet.

Je tiens à remercier ma famille et mes amis pour leur nombreux encouragements tout au long de ce projet et particulièrement à Jean-Marc pour son aide précieuse en infographie et pour son support moral.

BIBLIOGRAPHIE

ALTMANN, M., et H. Trachsel. 1989. "Altered cap recognition activity of initiation factor 4E in the yeast cell cycle division mutant *cdd33*". Nuclec Acids Res. vol 17, p.5923-5931.

BARNETT,.O.W. 1992. Potyvirus Taxonomy, Springer-Verlay, Vienna: dans Methods in Molecular Biology, vol 81: Plant Virology Protocols.

BECHTOLD, N., J. Ellis et G. Pelletier. 1993. "In planta agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult arabidopsis thaliana plants". C.R. Acad. Sci. Paris Sciences de la vie, vol. 316, p.1194 à 1195.

BÉLANGER, H. 1999. "Utilisation de vecteurs viraux pour l'expression dans la plante et l'étude de l'immunogénicité d'un épitope protecteur de la glycoprotéine G du virus respiratoire syncytial". Thèse de doctorat, vol. D 170, Université du Québec INRS-IAF.

BROWNING, K.S. 1996. "The plant translational apparatus". Plant Mol. Biol. vol. 32, p. 107-144.

CAMIRAND, Anne. 1989. Bases des Technologies végétales. Textes p.289, Bio 2900G, Université de Montréal.

CHAPMAN, S., T. Kavanagh, D. Baulcombe. 1992. "Potato X as a vector for gene expression in plants". The plant Journal, vol. 2 (4), p. 549-557.

COFFIN, J.M. 1979. "Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifiying hypothesis". J. Gen. Virol. vol 42, p. 1-26.

DE BENEDETTI, A., S. Joshi-Barve, C. Rinker-Schaeffer, et R.E. Rhoads. 1991. "Expression of antisens RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells result in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of bort eIF-4E and the p220 component of eIF-4F". Mol. Cell. Biol. Vol 11, p 5435-5445.

DONSON, J., C.M. Keamey, M.E. Hilf, et W.O. Dawson. 1991. "Systemic expression of a bacterial gene by tobacco mosaic virus-based vector". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p.7204-7208.

DOUGHERTY, W.G., et B.L. Sembler. 1993. "Expression of virus-encoded proteinase: "Functional and structural similarities with cellular enzymes". Microbiol. Rev., vol. 57, p. 781-822.

DOUGHERTY, W.G., et T.D. Parks. 1991. "Post-Translational processing of the tobacco etch virus 49-KDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains". Virology, vol. 183, p. 449-456.

FEIGENBLUM, D., et R.J. Schneider. 1993. "Modification of eukariotic initiation factor 4F during infection by influenza virus". J. Virol., vol. 67, p. 3027-3033.

FLANEGAN, J.B., G.J. Tobin, M.S. Oberste, B.J. Morasco, D.C. Young, et P.S. Collis. 1990. "Mechanism of poliovirus negative strand RNA synthesis and self-cleavage covalent linkage of VPg to RNA" dans "New Aspects of Positive-strand RNA viruses". (M.A. Brinton et F.X. Heinz, Eds.), p. 50-60. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.

FLYNN, A., et C.G. Proud. 1996. "The role of eIF4 in cell prolifération". Cancer Surv. Vol. 27, p. 293-310.

FLINT, S.J., L.W. Enquist, R.M. Krug, V.R.Racanialo, et A.M. Skalka. 1999. "Virology, Molecular Biology, Pathogenesis and Control". Chapitre 11, p. 395-396.

GALLIE, D.R. 1991. "The cap and poly (A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency". Genes Devel, vol 5, p 2108-2116 dans GALLIE, D.R., "Translational control of cellular and viral mRNAs". Plant Molecular Biology, vol. 32, p 145-158.

GALLIE, D.R. 1996 "Translational control of cellular and viral of mRNAs". Plant Molecular Biology, vol 32, p. 145-158

GINGRAS, A.-C., Y.Svitkin, G.J. Belsham, A. Pause, et N. Sonenber, 1996. "Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and polyovirus". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, p. 5578-5583.

HAGHIGHAT, A., Y. Svitkin, I. Novoa, E. Kuechler, T. Skren et N. Sonenberg. 1996. "The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase". J. Virol., vol. 70, p. 8444-8450.

HERSHEY, J.W. 1991. "Translational control in mammalian cells." Annu. Rev. Biochem, vol 60, p. 717-755.

ISMAIL, I.D., Hamilton, I.D., Robertson. E. et Milner. J.J. 1987. "Movement and intracellular location of Sonchus yellow net virus within infected tobacco". J. Gen. Virol., vol. 68, p. 2429-2438.

JOSHI, R., L., V. Joshi et D. W. Ow. 1990. "BSMV genome mediated expression of a foreigh gene in dicot and monocot plants cells". The EMBO Journal, vol 9, p 2663-2669.

KELLER, K.E., I.E. Johansen, R.R. Martin et R.O. Hampton. 1998. "Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype virulence in *Pisum sativum*". Mol. Plant-Microbe Interact. Vol 11, p. 124-130.

KENNETH, A. FELDMANN, 1991. "T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum". The Plant Journal, vol 1(1), p. 71-82.

KEREKATTE, V., K. Smiley, B. Hu, A. Smith, F. Gelder et A. De Benedetti. 1995. "The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas". Int. J. Cancer, vol. 64, p 27-31.

KOBAYASHI, K., H. Nakayashiki, S. Tsuge, K. Mise et I. Furusawa. 1998. "Accumulation kinetics of viral gene products in cauliflower mosaic virus-infected turnip protoplasts". Microbiol. Immunol. vol 42, p. 65-69.

LAI, M.M.C. 1992. "RNA recombination in animal and plant viruses". Microbiol. Rev. vol. 56, p. 61-79.

LALIBERTÉ, J.F., O. Nicolas, H. Chatel, C. Lazure et R. Morosoli. 1992. "Release of a 22-KDa protein derived from the amino-terminal domain of the 49 KDa NIa of turnip mosaic potyvirus in *Escherichia coli*." Virology, vol. 190, p. 510-514.

LAZARIS-KARATZAS, A., K.S. Montine et N. Sonenberg. 1990. "Malignant transformation by eukariotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5'cap" . Nature (Lond.). Vol. 345, p 344-347.

LEONARD, S., D. Plante, S. Wittmann, N. Daigneault, M.G. Fortin et J.F. Laliberté. 2000. "Complex formation between potyvirus VPg and translation eukariotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity". J. Virol. vol 74, No 17, p 7730-7737.

LODISH, H., D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell. 1995. Biologie Moléculaire de la cellule. De Boeck Universié s.a. 1997 pour la traduction française. Chapitre 4 " Acides nucléiques, code génétique et synthèse des protéines". p. 133.

MÉNARD, R., H. Chatel, R. Dupras, C. Plouffe, et J.-F. Laliberté. 1995. "Purification of turnip mosaic potyvirus viral protein genome-linked proteinase expressed in *Escherichia coli* and development of a quantitative assay for proteoytic activity". Eur. J. Biochem. vol. 229, p. 107-112.

MURASHIGE, T. et F. Skoog. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissu culture". Physiol. Plant vol 15, p. 473-497.

MURPHY, J.F., P.G. Klein, A.G. Hunt, et J.G. Shaw. 1996. "Replacement of the thyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal". Virology vol 220, p. 535-538.

MURPHY, J.F., W. Rychlik, R.E. Rhoads, A.G. Hunty et J.G. Shaw. 1991. " A thyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA". J. Virol. vol. 65, p. 511-513.

NAKAYASHIKI, H., S. Tsuge, K. Kobayashi, T. Okuno et I. Furusawa. 1993. "Reason for the low accumulation level of aphid transmission factor protein in infected leaves with an aphid-non-transmissible cauliflower mosaic virus isolate, CM1841". J. Gen. Virol. vol 74, p. 2469-2472.

NICOLAS, O. et J.F. Laliberté. 1992. "The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA". J. Virol. vol. 73, p. 2785-2793.

NICOLAS, O., S.W. Dunnington, L.F. Gotow, T.P. Pirone et G.M. Hellmann. 1997. "Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco". Virology, vol 237, p 452-459.

OHLMANN, T., V.M. Pain, W. Wood, M. Raw et S.J. Morley. 1997. "The proteolytic cleavage of eukariotic inition factor (eIF)4G is prevented by eIF4E binding protein (PHAS-1; 4E-BP1) in the reticulocyte lysate". EMBOJ. vol 16, p 844-855.

PORTER, A.G. 1993. "Picornavirus non structural protein: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell fonctions". J. Virol. vol 67, p. 6917-6921.

QUADT,R., C.C.Kao, K.S.Browning, R.P.Hershberge et P.Ahlquist. 1993. "Characterisation of a host protein associated with brome mosaic virus RNA dependant RNA polymerase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 90, p.1498-1502.

RIECHMANN, J.L. S. Lain, et J,A. Garcia. 1992. "Highlitghts and prospects of potyvirus biology". J. Gen. Virol. vol 73, p 1-16.

RODRIGUEZ, C.M., M.A. Freire, C. Camilleri et C. Robaglia. 1998. "The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant developpement". Plant J., vol 13, p 465-473. p.

ROSENWALD, E.B., A. Lazaris-Karatzas, N. Sonenberg et E.V. Schmidt. 1993. "Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukariotic initiation factor 4E". Mol. Cell. Biol., vol 13, p. 7358-7363

ROUSSEAU, D., R. Kaspar, I. Rosenwald, L. Gehrke et N. Sonenberg. 1996. "Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmique transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukariotic initiation factor 4E". Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol 93, p 1065-1071.

SAMBROOK, J., E.F. Kritsch et T. Maniatis. 1989. "Molecular cloning: A Laboratory Manuel", 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

SCHOLTHOF, H.B., et K.G. Scholthof. 1996. "Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants". Annu. Rev. of phytopathol., vol. 34, p 299-323.

SHUKLE, D.D., C.M.Ward, et A.A. Brunt. 1994. The potyviridae CAB International, Wallingford, UK 1994 dans Methodes in Molecular Biology, vol. 81: Plant Protocols.

SONENBERG, N. 1994. "Regulation of translation and cell growth by eIF-4E". Biochemie. Vol. 76, p.839-846.

SVITKIN, Y. V., A. Gradi, H. Imataka, S. Morino, et N.Sonenberg. 1999. "Eukariotic initiation factor 4GII (eIF4GII), but not eIF4GI, cleavage correlates with inhibition of host cell protein synthesis after human rhinovirus infection". J. Virol., vol. 73, p. 3467-3472.

WITTMANN, S., 1997. " Etude moléculaire du mécanisme de réplication du virus de la mosaïque du navet". Thèse de doctorat présentée à l'Institut Armand-Frappier, INRS. Vol 029 p.121.

WITTMANN, S., H. Chatel, M. G. Fortin, et J.F. Laliberté. 1997. "Interaction of the Viral Protein Genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukariotic inition factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the two hybrid system" Virology, vol 234, p. 84-92.

ZHANG, Y., D. Feigenblum et R.J. Schneider. 1994. "A late adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis". J. Virol., vol. 68, p. 7040-7050.