Université du Québec

Thèse présentée à
l'Institut Armand-Frappier
comme exigence partielle
du doctorat en virologie et immunologie

par

Hélène Bélanger M.Sc.

Utilisation de vecteurs viraux pour l'expression dans la plante et l'étude de l'immunogénicité d'un épitope protecteur de la glycoproteine G du virus respiratoire syncytial

Août 1999

A mes parents

Table des matières

Table des matières	
Liste des tableaux	V
Liste des figures	V
Liste des abréviations	
Sommaire	
UIIIIIII C	***************************************
Introduction	1
Revue Bibliographique	4
1 Utilisation des plantes pour l'expression de protéines hétérologues	5
1.1 Expression de protéines hétérologues dans la plante à l'aide de plants transgéniques	
1.2 Expression de protéines hétérologues dans la plante à l'aide de vecteurs viraux	
2 Le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV)	
2.1 Organisation génomique	
2.2 Cycle d'infection	
2.2.1 Initiation de l'infection	
2.2.2 Transcription du génome	
2.2.3 Réplication du génome	15
2.2.4 Traduction	16
2.2.5 Formation des particules virales	
2.2.6 Mouvement dans la plante	
2.3 Déterminants symptomatiques	
2.4 Utilisation du CaMV comme vecteur d'expression	
3 Le virus de la mosaïque du tabac (TMV)	
3.1 Organisation génomique	
3.2 Cycle d'infection	
3.2.1 Initiation de l'infection	
3.2.2 Réplication et transcription du génome	
3.2.3 Traduction	
3.2.4 Formation des particules virales	
3.2.4.2 Mécanisme d'encapsidation	
3.2.5 Mouvement dans la plante	
3.2.5.1 Mouvement local	
3.2.5.4 Mouvement longue distance	
3.3 Déterminants symptomatiques	
3.4 Utilisation du TMV comme vecteur d'expression	
4 Le virus respiratoire syncytial (VRS)	
4.1 Protéines du VRS	
4.2 Infection par le VRS	
4.3 Réponse du système immunitaire à l'infection par le VRS	
4.3.1 Réponse humorale	
4.3.2 Redonse a mediadon centiaire	

4.4 Pré	vention de l'infection par le VRS par la vaccination	38
4.4.1	Vaccin inactivé	39
4.4.2	Vaccin atténué	39
4.4.3	Vaccin sous-unitaire	40
4.4.4	Vaccin peptidique	41
Matér	iel et méthodes	43
	hodes de clonage	
	paration de l'ADN	
	Amplification par PCR	
	Analyse de l'ADN en gel d'agarose	
	Digestion enzymatique de l'ADN	
	Préparation des plasmides	
	Réaction de ligation	
	nsformation de bactéries compétentes	
	ection des bactéries recombinantes	
	Sélection bleu/blanc	
	Analyse par digestion enzymatique	
	Criblage par hybridation in situ	
	tégies de clonage	
	nage dans pET21b	
2.2 Clo	nage dans le vecteur CaMV	50
2.2.1	Insertion de séquences codant pour la gpG du VRS dans pCaBB1	50
2.2.2	Fusion de la séquence codant pour l'épitope de protection de la gpG du VRS	51
2.3 Clo	nage dans le vecteur TMV	54
3 Mét	hodes d'analyse des protéines	56
	ctrophorèse en gel de polyacrylamide	
	Préparation et migration des gels	
	Préparation des échantillons	
	oration des protéines fractionnées	
	Coloration au bleu de Coomassie	
	Coloration à l'argent	
	nunodétection des protéines fractionnées en SDS-PAGE	
	Transfert des protéines	
	Immunodétection	
	sage protéique	
	Bradford	
	Densitométrie	
	croscopie électronique	
	Coloration négative	
	Marquage à l'or colloïdal	
_	ression dans la bactérie	
	uction de l'expression dans la souche BL21	
	Induction	
	Analyse des échantillons	
4.2 Pur	ification des corps d'inclusion bactériens	61

5	Expression dans la plante	62
5.1	Plantes	62
5.2	Infection des plantes	62
	5.2.1 Préparation des vecteurs	62
	5.2.1.1 Clones CaMV	
	5.2.1.2 Clones TMV	
	5.2.2 Inoculation des plants	
	5.2.2.2 Infection secondaire	
5.3	Extraction de l'ADN viral	63
5.4	Extraction de l'ARN viral	64
	5.4.1 Analyse par RT-PCR	64
	5.4.1.1 Réaction de transcription inverse	
	5.4.1.2 Amplification du produit de transcription inverse	
5.5	5.4.1.3 Analyse du produit de RT-PCR	
	Purification du TMV	
	Étude de l'immunogénicité des protéines recombinantes	
6.1	•	
	Immunisation	
	ELISA	
	6.3.1 Prélèvement des sérums	
	6.3.2 Préparation de l'antigène ELISA	
	6.3.3 Procédure	
	Test de protection	
	6.4.1 Épreuve virale	
	6.4.2 Evaluation du niveau de protection	09
R	ésultats	71
	Expression de l'épitope G du VRS dans la bactérie	72
1.1		
	Purification de la protéine G762	
	Évaluation du potentiel protecteur des C.I.G762	
	Expression de l'épitope G du VRS dans la plante via le virus de la mosaïque du	15
		72
	ou fleur (CaMV)	
2.1		
	Stabilité des séquences introduites dans le génome du CaMV	
	2.2.1 Stabilité du clone pCaG370h	
	2.2.2 Stabilité du clone pCaG502h	
	2.2.3 Stabilité des clones pCaG666 et pCaG762 Étude de l'origine des instabilités	
	•	
	2.3.1 Séquences des fragments instables Fusion de l'épitope G aux protéines MTII et DHFR	
	2.4.1 Infection des plants avec les clones pCaMTIIépit, pCaDHFRépit et pCaDHFR-G502h	
	2.4.1 Infection des plants avec les clones pcamifilepit, pcabhrrepit et pcabhrre-0502n	
	2.4.2.1 Stabilité du clone pCaMTHépit	81
	2.4.2.2 Stabilité du clone pCaDHFRépit	82
	2.4.2.3 Stabilité du clone pCaDHFR-G502h	82

2.5 Expression dans la plante des protéines de fusion MTIIépit et DHFRépit	83
2.5.1 Immunodétection des protéines recombinantes	83
2.5.2 Purification des corps d'inclusion CaMV	
2.5.3 Évaluation phénotypique de l'expression de la prDHFR recombinante	83
3 Expression de l'épitope G dans la plante via le virus de la mosaïque du tabac	
(TMV)	
3.1 Infectivité des TMV recombinants	85
3.1.1 Infection primaire par les transcrits synthétiques	85
3.1.2 Infection secondaire par les virus recombinants	86
3.2 Expression dans la plante des protéines de capsides recombinantes	87
3.2.2 Expression de la protéine capside recombinante du TMVG762	87
3.2.3 Expression de la protéine de capside recombinante du TMVGNter	
3.2.4 Expression de la protéine de capside recombinante du TMVGLeaky	
3.3 Caractérisation des virus recombinants	
3.3.1 Purification	91
3.3.2.1 Purification du TMVGNter	
3.3.4 Stabilité de l'expression de la capside recombinante du TMVGLeaky	
3.3.3 Niveau de production de la capside recombinante du TMVGLeaky	
3.3.1 Formation des particules virales	
3.3.1.1 Analyse en microscopie électronique du TMVGNter	95
3.3.1.2 Analyse en microscopie électronique du TMVGLeaky	96
4 Étude de l'immunogénicité des TMV recombinants	98
4.1 Évaluation de l'immunogénicité du TMVGNter	
4.2 Évaluation de l'immunogénicité du TMVGLeaky.	99
Discussion	101
1 Expression d'une sous-unité de la gpG du VRS chez E. coli	102
2 Expression via le CaMV	
2.1 Instabilité des séquences introduites au génome du CaMV	
2.2 Expression des protéines de fusion recombinantes par le CaMV	
3 Expression via le TMV	
•	
3.1 Fusion de l'épitope G en position C-terminale de la cpTMV3.2 Fusion de l'épitope G en position N-terminale de la cpTMV	
3.2.3 Production de l'épitope G via la faible terminaison de la synthèse de la cpTMV	
3.2.3.2 LeakyRS	
4 Immunogénicité des cp recombinantes	
Conclusion	119
Remerciements	122
Bibliographie	124

Liste des tableaux

Revue bib	oliographi	que	
	Tableau 1:	Production dans les plantes transgéniques de protéines d'intérêt commercial ou pharmaceutique	8
	Tableau 2:	Expression de protéines hétérologues dans la plante à l'aide de vecteurs viraux	11
	Tableau 3:	Protéines synthétisées par le CaMV	13
	Tableau 4:	Protéines synthétisées par le VRS	34
Matériel e	et méthod	e	
	Tableau 5:	Amorces utilisées pour amplification par PCR	45
	Tableau 6:	Anticorps utilisés pour immunodétection sur membrane de nitrocellulose	58
Résultats			
	Tableau 7:	Évaluation de l'immunogénicité des C.I.G762	73
	Tableau 8:	Caractéristiques des séquences ajoutées au génome du CaMV	79
	Tableau 10:	Immunité humorale des souris immunisées avec le TMVGNter	97
	Tableau11:	Évaluation de la protection des souris immunisées avec le TMVGNter	98
	Tableau 12:	Immunité humorale des souris immunisées avec le TMVGLeaky	99
	Tableau 13:	Évaluation de la protection des souris immunisées avec le TMVGLeaky	99

Liste des figures

Revue bil	bliographi	ique	
	Figure 1:	Représentation schématique du génome du CaMV	13
	Figure 2:	Représentation schématique du génome du TMV	22
	Figure 3:	Organisation génomique du VRS	33
Matériel	et méthod	les	
	Figure 4:	Clonage de la séquence G762 dans pET21b	49
	Figure 5:	Représentation schématique du vecteur CaMV: pCaBB1	50
	Figure 6:	Clonage de différentes régions de la gpG du VRS dans pCaBB	51
	Figure 7:	Fusion de la séquence de l'épitope de la gpG aux séquences DHFR et MTII	52
	Figure 8:	Oligonucléotides utilisés pour les fusions de l'épitope de la gpG	53
	Figure 9:	Fusion des séquences DHFR et G502h	53
	Figure 10:	Plasmides ayant servi au clonage dans le vecteur TMV	54
Résultats			
	Figure 11:	Expression d'une sous-unité de la gpG du VRS chez E. coli	72
	Figure 12:	Régions de la gpG du VRS clonées dans pCaBBI	74
	Figure 13:	Analyse de l'ADN viral extrait des plantes infectées avec les clones pCaG502h et pCaG370h	76
	Figure 14:	Analyse de l'ADN viral extrait des plantes infectées avec les clones pCaG666 et pCaG762	77
	Figure 15:	Séquence des fragments G370 instables	78
	Figure 16:	Analyse de l'ADN viral extrait des plantes infectées avec les clones pCaMTIIépi, pCaDHFRépit et pCaDHFR-G502H	80
	Figure 17:	Analyse de l'expression de la cpTMVGNter	88
	Figure 18:	Analyse de l'expression de la cpTMVGLeaky	89
	Figure 19:	Immunodétection de la cpTMVGLeaky	90
	Figure 20:	Analyse de la stabilité de l'expression de la cpGLeaky	92
	Figure 21:	Évaluation du niveau d'expression de la cpTMV	94
	Figure 22:	Microscopie électronique	96
Discussio	n		
	Figure 23:1	Modèle de recombinaison par choix de copie	104

Liste des abréviations

Ac: anticorps

ACEI: angiotensin-I-converting enzyme

ADCC: lyse des cellules dépendante d'anticorps ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN: acide ribonucléique

ATCC: American type culture collection

BSA: albumine sérique bovine

c.i: corps d'inclusion

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

cp: protéine de capside
DEPC: diéthyl pyrocarbonate
DICT_{50:} dose infectieuse 50%

EDTA: acide éthylène diamine tétra-acétique

gp: glycoprotéine

GPV global programme for vaccines and immunization

hr: heure

Ig: immunoglobuline

IEM: immuno-électromicroscopie

INF: interféron kDa: kiloDalton

kpb: kilo paires de bases

KLH: hémocianine de patelle (keyhole limpet hemocyanin)

ME: microscopie électronique

min: minute
ncs: nucléotides
Ntr: non traduite

ORF: cadre de lecture ouvert (open reading frame)

pb: paire de base p/v: poids/volume

PBS: tampon sodium phosphate

PEG: polyéthylène glycol PM: poids moléculaire rpm: rotation par minute

SDS: dodécyl sulphate de sodium

sg: sous-génomique SVF: sérum de veau foetal Th: T auxiliaire (helper)

U: unité

v/v: volume/volume

VRS: virus respiratoire syncytial WHO: world health organisation

wt: type sauvage

Sommaire

Pour exprimer un épitope protecteur de la gpG du VRS humain dans la plante nous avons utilisé les technologies basées sur l'exploitation de virus comme vecteur d'expression. Nous avons introduit dans le génome du CaMV (en remplacement de son deuxième cadre de lecture) des séquences d'ADN codant pour des régions de l'ectodomaine de la gpG de différentes tailles et incluant les 16 a.a. constituants l'épitope de protection. Quelles que soient leurs tailles, les séquences introduites dans le génome du CaMV ont été délétées suite à l'inoculation des plantes avec les virus recombinants. Par l'analyse des populations virales issues de ces infections nous avons pu montrer que les délétions des séquences codantes de la gpG par le CaMV se faisaient par un mécanisme de recombinaison identifié chez les rétrovirus: la recombinaison par choix de copies. Nous avons aussi identifié les régions spécifiques sur les séquences codantes de la gpG qui favorisaient ce type de recombinaison. Des CaMV recombinants stables ont été obtenus par la suite, en fusionnant la séquence codant pour l'épitope de protection en 3' des gènes codants pour les protéines MTII ou DHFR. Toutefois, aucun produit d'expression de ces gènes de fusion n'a pu être détecté dans les plantes infectées.

Nous avons utilisé le TMV comme système de présentation d'épitopes en fusionnant, selon différentes stratégies, la séquence de l'épitope de protection du VRS au gène codant pour la protéine de capside virale. L'expression stable de capsides recombinantes reconnues par l'anticorps spécifique à l'épitope de protection du VRS a été obtenue lorsque l'épitope était fusionné à la terminaison aminée de la cp du TMV ou à sa terminaison carboxylique en aval d'un codon de faible terminaison de la traduction. Les TMV recombinants ont été utilisés pour l'immunisation de souris afin d'évaluer le potentiel protecteur de l'épitope ainsi exprimé dans la plante.

Introduction

Les travaux présentés dans ce rapport de thèse ont pour but d'évaluer le potentiel que la plante pourrait offrir pour l'expression efficace d'un épitope protecteur du virus respiratoire syncytial (VRS). Le VRS est le principal agent responsable des infections pulmonaires sévères chez les enfants. Malgré l'importance des infections et des dommages causés par ce virus, il n'existe toujours par de vaccin sécuritaire et efficace pour la protection des enfants. L'épitope étudié est constitué des acides aminés 174 à 187 de la glycoprotéine G du VRS et protège les souris contre l'infection par le virus lorsque administré sous forme de peptide synthétique couplé au KLH (Trudel et al., 1991).

L'utilisation des plantes comme système de production à grande échelle de produits biomédicaux a soulevé un intérêt grandissant au cours des dernières années. Tout d'abord, la transformation génétique de la plante a été exploitée pour l'étude moléculaire de la cellule végétale et pour l'amélioration d'espèces ayant une importance économique. Toutefois, l'utilisation des plantes transgéniques comme système de production de masse s'est vu limitée par les faibles quantités de produit synthétisé. Récemment, des vecteurs d'expression transitoire basés sur des génomes viraux ont été utilisés pour l'obtention de niveaux d'expression plus élevés. Aussi, l'emploi de ces vecteurs a mené à une réduction considérable du temps d'expérimentation comparativement à l'élaboration de plantes transgéniques.

Au début des années 80, le virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV), étant constitué d'un génome ADN, était le seul virus de plante dont la caractérisation moléculaire était suffisamment avancée pour permettre son utilisation comme vecteur d'expression. Les plus récents travaux sur l'organisation et la régulation génomique des virus à ARN ont permis l'élaboration de nouvelles stratégies.

Le vecteur basé sur le génome du CaMV a d'abord été utilisé pour tenter l'expression de différentes sous-unités de la gpG incluant cet épitope. À l'aide d'un vecteur basé sur le génome du virus de la mosaïque du tabac (TMV) nous avons exprimé ce même épitope en fusion avec la protéine de capside virale. Les produits d'expression obtenus étaient destinés à être purifiés afin d'être en mesure d'évaluer, dans un modèle animal, l'activité protectrice de l'épitope exprimé dans la plante.

L'étude et le développement de ces types de vecteurs sont essentiels à la mise au point d'un système efficace pour l'expression dans la plante. Notamment, les niveaux de synthèse doivent être maximisés et contrôlés, et les gènes étrangers devront pouvoir être exprimés de façon stable dans les plantes complètes. D'autre part, il sera important que ces vecteurs permettent la synthèse d'une variété de produits pouvant être facilement purifiés et dont l'activité biologique sera conservée. Nos travaux, où l'utilité et le potentiel de vecteurs d'expression pour la plante sont évalués, apporteront une importante contribution à la caractérisation et l'amélioration de ceux-ci.

Revue Bibliographique

1 Utilisation des plantes pour l'expression de protéines hétérologues

L'utilisation des plantes pour la production de vaccins et de polypeptides d'intérêt médical pourrait offrir plusieurs avantages par rapport aux systèmes de cultures cellulaires utilisés présentement. Les plantes sont des organismes complets qui possèdent un système endo-membranaire permettant une maturation complexe des protéines par des processus similaires à ceux retrouvés chez les cellules de mammifères: reconnaissance de signaux (transport, sécrétion, clivage...), repliement des protéines assisté de chaperonines, addition de sucres et de lipides, pour ne citer que quelques exemples.

La production à grande échelle de protéines recombinantes par les systèmes de culture de cellules nécessite, en plus du personnel hautement entraîné, le développement technologique de matériaux fort coûteux tels que les réacteurs, et de grandes quantités de milieux de culture de composition élaborée. Étant donné l'expertise en agriculture très bien développée ainsi que l'existence des machineries agricoles, le temps et les coûts associés à la mise à l'échelle de la production de protéines recombinantes par les plantes se trouveraient grandement diminués (Pen et al., 1992). En assumant que la protéine produite représente 1% du poids sec de la plante, il est estimé qu'à partir d'un hectare de tabac il serait possible d'obtenir 1 500 kg de protéines recombinantes brutes (Simon, 1991). De plus, la production de protéines dans la plante éliminerait les dangers encourus par la présence d'agents pathogènes à risques pour la santé humaine.

En plus d'une diminution marquée des coûts engendrés par la production dans les plantes, la possibilité de pouvoir produire un vaccin dans des plantes comestibles (Arntzen, 1997) apporterait une solution à plusieurs des problèmes auxquels doivent faire face les programmes de vaccination actuels. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 13 millions de décès sur la planète en 1995 étaient reliés à des maladies infectieuses (WHO, 1996). Avec plus de 300 vaccins candidats et les mouvements de population actuels, rendre les ressources disponibles est une priorité pour cet organisme (GPV, 1996a). En effet, le succès des programmes de vaccination est basé non seulement sur l'efficacité du vaccin développé, mais aussi sur l'administration de ce vaccin à la majorité des populations visées. Aujourd'hui il est toujours difficile d'atteindre ce dernier objectif étant donné les problèmes

reliés à la production, la distribution et l'accessibilité des vaccins. Par exemple, depuis son approbation en 1986, le vaccin sous-unitaire contre l'hépatite B produit dans la levure, demeure toujours inaccessible pour la majorité de la population concernée. La construction de fermenteurs pour la production en Chine, en Corée et à Cuba, a rendu ce vaccin un peu plus accessible mais son coût de production actuel demeure toujours au-dessus de un dollar la dose (Fox, 1996). L'établissement d'un système de production de vaccin par les plantes, pourrait se faire pratiquement dans n'importe quel pays, à moindre investissement, avec les ressources présentes sur place. Il serait aussi plus facile d'administrer, via un produit comestible, les doses répétées et les rappels annuels que nécessitent plusieurs vaccins pour l'obtention d'une protection efficace. De plus, l'immunisation par voie orale permettrait de stimuler plus spécifiquement l'immunité au niveau des muqueuses, prévenant ainsi les interactions initiales entre la plupart des agents infectieux et l'hôte (Castro et Arntzen, 1993). Ainsi, le vaccin produit dans la plante deviendrait directement disponible pour les populations visées sans que soient nécessaires le transport et la conservation en chaîne de froid ainsi que le personnel médical et la logistique reliés aux campagnes de vaccination.

Ce mode de production et d'administration de vaccin qui peut sembler idéaliste pourrait devenir réalité d'ici quelques années. Dans les pages qui vont suivre vous seront présentés les principaux développements des biotechnologies végétales qui ont rendu possible la production dans la plante de plusieurs produits recombinants prototypes, démontrant ainsi l'énorme potentiel de ces recherches. Toutefois, beaucoup de travaux restent encore à accomplir pour l'obtention d'un système versatile, permettant l'expression stable à haut niveau de différentes protéines qui conserveront leur activité biologique. Il faudra être en mesure de contrôler et doser les niveaux d'expression et la protéine devra être produite de façon à optimiser son activité. Il faudra aussi s'assurer qu'un tel système de production ne comporte pas de risque pour l'environnement. Ces travaux doivent se faire en combinaison avec les études d'immunologie appliquée, afin d'optimiser la présentation des épitopes et protéines produits dans la plante.

1.1 Expression de protéines hétérologues par les plantes transgéniques

La production de protéines hétérologues dans la plante a vu ses premiers développements au début des années 80, grâce à l'intégration stable de séquences étrangères d'ADN dans le génome de la cellule végétale par l'utilisation d'Agrobacterium tumefaciens

(Hernalsteens et al., 1980; Matzke et Chilton, 1981). À l'aide de gènes de sélection ou de gènes rapporteurs les premiers systèmes de transfert de gènes par le plasmide Ti ont été développés, fournissant ainsi une variété d'outils pour la production de plantes transgéniques via Agrobacterium (Weising et al., 1988)

Aujourd'hui, la transformation génétique de certaines plantes se fait de façon courante et est utilisée pour les études de physiologie et de pathologie végétales ainsi que pour l'analyse moléculaire de la cellule végétale. Du point de vue agronomique, la production de plantes transgéniques a permis l'amélioration des variétés de plantes en conférant la résistance à différents organismes pathogènes ou par transformation phénotypique des produits de la plante (goût, contenu en liquide, contrôle du pourrissement) (Kereiva, 1993).

La première démonstration que la plante peut être utilisée comme système de production de protéines d'intérêt pharmaceutique a été apportée par l'équipe de Hiatt en 1989. Par une approche particulièrement originale, ils ont réussi à produire un anticorps fonctionnel dans les feuilles de tabac. En régénérant des plantes exprimant séparément la chaîne lourde et la chaîne légère de l'anticorps, puis en croisant ces deux plantes transgéniques, ils ont réussi à obtenir une progéniture produisant l'anticorps assemblé. Par la suite, différentes équipes rapportèrent la production d'anticorps et de protéines virales, bactériennes ou humaines à l'aide de plantes transgéniques (Tableau 1).

Ces travaux ont démontré qu'il était possible par la transformation génétique de la plante d'obtenir la production de protéines et d'enzymes actives de différentes origines. Les résultats obtenus plus récemment ont montré que l'injection ou l'ingestion d'antigènes produits dans la plante pouvait mener à une réponse antigénique et/ou immunogénique adéquate chez la souris (Thanavala et al., 1995; Mason et al., 1996). Suite à ces débuts prometteurs pour le développement de vaccins dans la plante, différents systèmes d'expression transitoire par vecteurs viraux ont été développés. Il était à ce moment nécessaire de se doter d'un système plus rapide, versatile et flexible, permettant l'obtention de niveaux d'expression plus élevés que ceux obtenus à l'aide des plantes transgéniques. La vitesse avec laquelle les virus établissent une infection systémique dans la plante, ainsi que les très hauts niveaux de production et d'accumulation des protéines virales, allaient faciliter l'étude et l'optimisation des systèmes d'expression dans la plante.

Tableaux 1: Production dans les plantes transgéniques de protéines d'intérêt commercial ou pharmaceutique

			7777777777777	
Protéine	Plant	Niveaua	Activité observée	Référence
Ac 6D4 Catalytique	Tabac	0,350	Comparable à Ac produit par hybridome	Hiatt et al., 1989
Leu- Enképhaline Neuro-peptide	Arabi- dopsis	?	?	Vandekerchove et al., 1989
Albumine sérique humaine	Patate	0,020	Reconnaissance de peptides signaux humains	Sijmons <i>et al.</i> , 1990
Alpha amylase B. licheniformis	Tabac	0,500	Dégradation de l'amidon	Pen et al., 1992
Antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg)	Tabac	0,007	Propriétés physiques Antigénicité ^b /immunogénicité ^c	Mason <i>et al.</i> , 1992 Thanavala <i>et al.</i> , 1995
Ac sécrétoire contre S. mutans	Tabac	0,050	Comparable à Ac produit par hybridome	Ma et al., 1995
Sous unité B entéro-toxine (LT-B) E. coli	Patate	0,010	Antigénicité /immunogénicité orale et systémique	Tariq et al., 1995
Capside du virus Norwalk (NVCP)	Patate	0,230	Antigénicité orale et systémique	Mason et al., 1996

a) Le niveau d'expression de la protéine produite est indiqué en pourcentage par rapport aux protéines solubles de la plante.

1.2 Expression de protéines hétérologues dans la plante à l'aide de vecteurs viraux

Le développement de vecteurs viraux pour l'expression dans la plante s'est fait parallèlement à la caractérisation et à l'étude de la biologie de différents virus de plante. Étant donné la nature particulière de leur hôte, les connaissances requises pour mener à une première génération de vecteurs d'expression viraux pour la plante n'ont été acquises que récemment.

Les virus de plantes partagent plusieurs caractéristiques avec les virus de mammifères mais ont dû toutefois adopter un certain nombre de stratégies uniques leur permettant

b) Les études d'antigénicité font référence à la capacité de l'antigène à être reconnu par le système immunitaire de la souris.

c) Les études d'immunogénicité font référence à la capacité de l'antigène à induire une réponse immune active et spécifique à l'agent pathogène ciblé.

d'avoir une propagation et une expression hautement efficace au sein de la plante. L'un des principaux obstacles auquel les virus de plantes doivent faire face, est la présence d'une paroi cellulosique entourant la cellule végétale. Ainsi, la pénétration du virus dans la cellule, que l'on croit être indépendante de récepteurs cellulaires, ne peut se faire que suite à l'endommagement de cette paroi. Aussi, la propagation virale d'une cellule à une autre et au travers de tout l'organisme requiert un transport actif qui dépendra de fonctions virales spécifiques.

Plus de 300 virus de plante ont été identifiés à ce jour, mais seulement trois groupes de virus à ADN sont connus: les Caulimovirus, les Badnavirus et les Géminivirus. C'est à l'aide du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), virus type du groupe des Caulimovirus, que la première expression efficace d'une protéine hétérologue dans la plante via un vecteur viral a pu être obtenue par Brisson et coll. en 1984. En utilisant le même vecteur, d'autres équipes ont aussi réussi à obtenir l'expression systémique de protéines actives (Tableau 2). Les Géminivirus, seul groupe de virus de plante à utiliser une ADN polymérase ADN dépendante, ont aussi attiré l'attention comme vecteur d'expression. Le génome de plusieurs membres des Géminivirus a été cloné et il a été démontré que la protéine de capside n'était pas indispensable pour l'activité du virus (Gardiner et al., 1988). Toutefois, l'utilisation de ce virus a été limitée par des problèmes de stabilité, la difficulté de purification et la nécessité d'utiliser l'agro-inoculation pour l'infection des plantes.

La majorité des virus de plante ont un génome constitué d'un ARN simple brin de polarité positive. Puisque ces virus ne contiennent pas d'étape intermédiaire ADN dans leur cycle de réplication, il a fallu attendre le développement des techniques de biologie moléculaire pour leur utilisation comme vecteur d'expression. Le clonage de génomes ARN complets sous forme d'un ADNc capable de produire un ARN infectieux par transcription in vitro, a permis l'étude de l'organisation génomique et des mécanismes d'infection de certains virus.

Les principales stratégies utilisées pour l'expression de protéines hétérologues dans la plante via le vecteur viral sont: 1) le remplacement d'un gène viral par des séquences étrangères, 2) l'insertion de gènes dans des régions inter-cistroniques du génome et 3) la fusion de séquences étrangères avec un gène viral. À l'aide de gènes rapporteurs, ces différentes possibilités ont été étudiées afin de développer un vecteur permettant l'addition de séquences étrangères qui allaient être exprimées à de hauts niveaux, sans interférer avec les fonctions essentielles du virus (Tableau 2). Les vecteurs qui se sont montrés les plus prometteurs sont basés sur les génomes du virus X de la pomme de terre (PVX, membre des Potexvirus), du virus de la mosaïque du pois de vache (CPMV, membre des Comovirus) et le bien connu virus de la mosaïque du tabac (TMV, membre des Tobamovirus).

Afin d'exprimer dans la plante un épitope protecteur du virus respiratoire syncytial humain (VRS), nous avons choisi d'utiliser le vecteur viral plutôt que la production de plantes transgéniques. En plus de: 1) la possibilité d'obtenir des niveaux d'expression plus élevés, 2) la rapidité avec laquelle il est possible d'insérer différentes séquences au sein du génome viral et 3) le court temps nécessaire à la production d'une infection systémique par les virus recombinants, le vecteur viral offre la flexibilité nécessaire pour la mise au point d'un système d'expression dans la plante de vaccins recombinants pour le VRS.

Dans un premier temps le vecteur basé sur le génome du CaMV a été utilisé puisque il était le seul vecteur à avoir fait ses preuves pour l'expression de protéines dans la plante. Suite à la plus récente utilisation des virus à ARN, un vecteur basé sur le génome du TMV a ensuite été étudié. Pour exploiter les avantages qu'apporterait la plante pour l'expression à grande échelle de protéines recombinantes, il est important que les systèmes utilisés soient versatiles et qu'ils puissent s'adapter à différents types d'applications. Ainsi, nos travaux s'inscrivent dans le développement de l'utilisation de la plante comme système d'expression.

Pour pouvoir tirer avantage des stratégies adoptées par les virus de plante pour leur expression et propagation efficace, il est important que la régulation de ces différents mécanismes soit bien caractérisée. Dans les prochaines sections seront exposées les connaissances acquises sur les cycles d'infection des virus choisis pour exprimer l'épitope protecteur du VRS.

Tableau 2: Expression de protéines hétérologues dans la plante à l'aide de vecteurs viraux

Protéine	Vecteur	Niveau	Activité observée	Référence
Dihydrofolate réductase (DHFR) E. coli	CaMV rempla.	0,08	Résistance des plantes aux méthotrexate	Brisson et al., 1984
Metallothioneine (MTII) hamster	CaMV rempla.	0,50	Séquestration du Cadmium dans la plante	Lefebvre et al., 1987
Interféron αD humain (IFN αD)	CaMV rempla.	0,02	Activité antivirale (in vitro)	DeZoeten et al., 1989
α-Trichosanthine Végétal	TMV inser.	2,00	Inhibition des synthèses protéiques (in vitro)	Kumagai et al., 1993
Convertase Angiotensin-I (ACEI)	TMV fusion	0,07	?	Hamamoto et al., 1993
Épitope: FMDV, VP1 HRV14,VP1 HIV-1, gp41	CPMV fusion	?	? ? Antigénicité/immunogénicité chez la souris	Usha et al., 1993 Porta et al., 1994 McLain et al., 1995 et 1996
Épitope:P. vivax	TMV fusion	0,01	Antigénicité	Turpen et al., 1995
Épitope: Influenza HA HIV-1 gp120	TMV fusion	?	?	Sugiyama <i>et al.</i> , 1995
Épitope, zona pellucida murin (ZP3)	TMV fusion	?	Antigénicité chez la souris	Fitchen et al., 1995
Protéine verte fluorescente, A. victoria (GFP)	PVX fusion	?	Émission de fluorescence (in planta)	Santa Cruz et al., 1996
Épitope: HIV-1 gp120 RV 31D	TMV fusion	?	Antigénicité/immunogénicité chez la souris	Yusibov <i>et al.</i> , 1997
Épitope EMV VP2	CPMV fusion	?	Antigénicité/immunogénicité chez le vison	Dalsgaard et al., 1997

CaMV/virus de la mosaïque du chou-fleur. TMV/virus de la mosaïque du tabac. CPMV/virus de la mosaïque du pois de vache. PVX/virus x de la patate. FMDV/virus de la fièvre aphteuse. HRV/rhinovirus humain. HIV/virus de l'immunodéficience humain. RV/virus de la rage. EMV/virus entérique du vison. rempla./remplacement. inser./insertion

2 Le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV)

Le virus de la mosaïque du chou-fleur (virus type des Caulimovirus) est le premier virus de plante constitué d'un génome ADN à avoir été identifié (Shepherd et al., 1968). Les Caulimovirus forment une particule icosahèdrique de 45 à 50 nm de diamètre qui se retrouve généralement à l'intérieur de corps d'inclusion cytoplasmiques. Leur génome est constitué d'un ADN double brin, circulaire, d'environ 8 kpb. Bien que les Caulimovirus aient un large spectre d'hôtes chez les dicotylédones, les problèmes économiques associés à l'infection par ces virus sont peu importants. Toutefois, ce groupe de virus a soulevé beaucoup d'intérêt pour son potentiel en tant que vecteur de transfert de gènes et de modèle d'étude d'expression dans la plante. La publication de la séquence complète du CaMV en 1980 (Franck et al., 1980), constituait à ce moment l'information génétique la plus complète sur le système moléculaire végétal.

Les Caulimovirus font aussi partie d'un groupe appelé Pararétovirus. Les virus de ce groupe se répliquent via une transcriptase inverse (RT) à partir de l'ARN pleine longueur synthétisé par la polymérase de l'hôte. Ils se distinguent des rétrovirus par le fait qu'ils encapsident de l'ADN et que leur transcription se fait à partir de l'ADN sous forme d'épisome. Les seuls autres virus utilisant cette stratégie de réplication sont les Badnavirus et les Hépadnavirus.

2.1 Organisation génomique

Chez le CaMV, l'ADN encapsidé se retrouve sous une forme circulaire relâchée, étant donné la présence de trois discontinuités (Figure 1: d1, d2 et d3) correspondant aux sites d'initiation de la synthèse d'ADN (Richard et al., 1981). Sept cadres de lecture ouverts (ORF) de même orientation ont été identifiés (Figure 1). Les régions codantes sont regroupées par chevauchement ou espacement de quelques nucléotides. Les protéines provenant de la traduction des ORF I à VI ont été détectées dans la cellule infectée (Tableau 3). L'ORF VII est le premier à être traduit. Deux promoteurs ont été localisés: le 35S et le 19S (Covey et al., 1981).

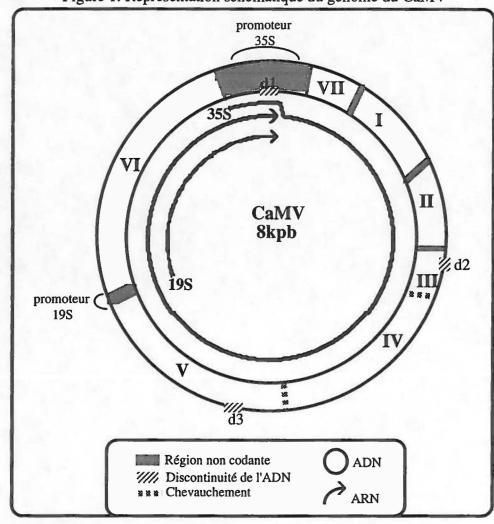


Figure 1: Représentation schématique du génome du CaMV

ORF	PM (kDa)	Rôle	Référence
I	37	Mouvement	Linstead et al., 1988
II	18	Transmission	Armour et al., 1983
Ш	15	Structural	Mesnard et al., 1990
IV	57	Structural	Daubert et al., 1982
V	80	Transcriptase inverse	Tho et al., 1983
VI	66	Trans-activateur de la traduction	Al Ani et al., 1980 Odell et Howell, 1980
VII		Inconnu	

2.2 Cycle d'infection

2.2.1 Initiation de l'infection

Le CaMV est transmis d'un plant à l'autre par des aphides (pucerons de l'ordre des homoptères). L'association du virus avec son vecteur de transmission se fait via la protéine de 18 kDa codée par le gène II (p18) (Woolston et al., 1983). Ce facteur de transmission aurait deux domaines séparés: l'un interagissant avec la particule virale et l'autre avec le stylet de l'insecte (Blanc et al., 1993). La P18 ne se retrouve pas en grande quantité dans la cellule infectée et forme des corps d'inclusion cytoplasmiques cristallins dans lesquels ne se retrouvent que quelques particules virales (Epizona et al., 1991). Les mécanismes par lesquels ces complexes P18-virus sont transmis par les aphides ne sont pas encore connus. Il existe des CaMV variants non-transmissibles par les aphides. Ces variants, dont une portion du gène II est excisé, seraient propagés d'une plante à l'autre par des aphides portant la P18 provenant de plantes infectées par une souche transmissible (Lung et Pirone, 1974).

L'association du CaMV aux aphides via la p18 permet, en plus de la transmission, la pénétration du CaMV dans la cellule au moment où l'insecte se nourrit. Suite à la pénétration des particules virales dans le cytoplasme, le génome est libéré puis transporté au noyau par des mécanismes pas encore caractérisés.

2.2.2 Transcription du génome

Au niveau du noyau, les discontinuités de l'ADN viral sont réparées. À ce moment la molécule d'ADN prend une forme "super-enroulée" consécutive à l'activité de topoisomérases cellulaires (Covey et Hull, 1992). Le mini-chromosome formé par l'association d'histones est alors transcrit par l'ARN polymérase II de la plante (Olszewski et al., 1982). Seulement un des deux brins d'ADN (brin α) est transcrit (Guilfoyle, 1980)

Cette seule étape de multiplication du CaMV semble être régulée uniquement par les facteurs de l'hôte via le promoteur 35S du virus. Ce promoteur, qui dirige la transcription du génome complet du CaMV, a été caractérisé et largement utilisé pour la transformation génétique des plantes. Il dirige une expression constitutive, de haut niveau, dans la plupart des tissus de la plante et est indépendant de facteurs viraux (Odell et al., 1985). Un second promoteur est utilisé pour la synthèse d'un transcrit plus court que le 35S: le 19S. Ce promoteur situé en amont de l'ORF VI, permet la synthèse d'un ARNm sous-génomique qui

est co-terminal avec l'ARN 35S (Covey et Hull, 1981). L'activité du promoteur 19S est plus faible que celle du promoteur 35S (Lawton *et al.*, 1987).

Le transcrit pleine longueur 35S, servira de messager pour la synthèse des protéines virales et de gabarit pour la réplication via la transcriptase inverse virale. Les terminaisons 5' et 3' de ce transcrit sont constituées de séquences identiques de 180 ncs (Guillet et al., 1982). La séquence non-traduite de 600 ncs en amont du premier ORF contient plusieurs structures secondaires et codons AUG (Fütterer et al., 1988). On retrouve aussi au niveau de cette séquence, le site de liaison des amorces initiant la transcription inverse (Turner et Covey, 1984). Le transcrit 19S, possède une courte séquence non traduite de 11 nucléotides à son extrémité 5'. Il sert d'ARNm pour la traduction de la p66 codée par le gène VI, qui est la protéine virale la plus abondante dans la cellule infectée (Odell et Howell, 1980). La présence d'un transcrit sous-génomique couvrant l'ORF V (22S), a été rapportée (Plant et al., 1985). Toutefois, l'existence de celui-ci ainsi que celle du promoteur associé n'a pas encore été démontrée de façon satisfaisante (Rothnie et al., 1994).

Suite à leur synthèse, les ARN 19S et 35S coiffés et polyadénylés sont transportés au cytoplasme pour leur traduction au niveau des corps d'inclusion formés par la p66. C'est aussi au niveau du cytoplasme que l'ARN 35S sera utilisé pour la réplication génomique.

2.2.3 Réplication du génome

La transcriptase inverse (RT) qui effectue la synthèse du premier brin d'ADN (brin a), est codée par l'ORF V. Comme pour les rétrovirus, outre le rôle de synthèse d'ADN dépendante d'ARN (Volovitch et al., 1984), la RT du CaMV aurait des activités ARNaseH (Hull et al., 1986) et protéolytique (Tho et al., 1983). Toutefois, elle ne possède pas d'activité endonucléase caractéristique des rétrovirus (Covey et Hull, 1992). La transcription inverse est amorcée par un tARN^{met} apparié dans la portion 5' (d1, figure 1) de la séquence de tête de l'ARN 35S (Pfeiffer et Hohn, 1983). Après initiation, la RT se déplace jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN puis continue sa synthèse à partir de la terminaison 3' (Turner et Covey, 1984). Ce changement de gabarit peut se faire de façon intra ou -inter moléculaire (Pfeiffer et Hohn, 1983). La terminaison 3' de l'ADN nouvellement synthétisée s'apparierait au niveau des séquences identiques en 3' de l'ARN 35S, suite à la dégradation de l'ARN après sa transcription (Hull et al., 1987). Peu de choses sont encore connues sur l'initiation et l'élongation du brin d'ADN complémentaire. Des séquences d'ARN non-

digérées aux positions d2 et d3, serviraient d'amorces à l'ADN polymérase ADN dépendante de l'hôte (Pfeiffer et Hohn, 1983). L'ADN viral nouvellement synthétisé, peut retourner au noyau pour former de nouveaux complexes de transcription (Hohn et Fütterer, 1991). Dans une étape plus tardive du cycle de multiplication celui-ci sera encapsidé.

2.2.4 Traduction

Une étape essentielle du cycle d'infection du CaMV est le passage de l'ARN 35S de son rôle d'intermédiaire de réplication du génome à son rôle d'ARNm pour l'expression des protéines virales. L'ARN poly-cistronique 35S semble être le seul ARNm potentiel pour la traduction de toutes les protéines virales, sauf pour le gène VI qui est exprimé à partir de l'ARN 19S et possiblement le gène V à partir de l'ARN 22S. La présence de ces deux ARNm sous-génomiques (ARNsg) pourrait contribuer au changement de fonction de l'ARN 35S (Sanfaçon, 1992).

La séquence de tête de l'ARN 35S contient certains éléments rendant difficile le balayage des ribosomes jusqu'au premier cadre de lecture (ORF VII): longueurs, structures secondaires stables, plusieurs codons AUG. Cette séquence non-traduite, qui ne contient pas de sites d'entrée directe des ribosomes et qui n'est pas épissée (Fütterer et al., 1990), serait évitée par un mécanisme (ribosome shunt) décrit par Fütterer (Fütterer et al., 1993). Les structures secondaires de la séquence non-traduite (NTr) adopteraient différentes conformations pouvant permettre soit l'évitement, menant à l'initiation de la traduction, soit le balayage linéaire abortif de la séquence de tête (Hemmings-Mieszczak et al., 1997). Ainsi, les éléments régulateurs de la séquence de tête permettraient de contrôler l'usage de l'ARN 35S en le rendant disponible pour la traduction ou la réplication.

La traduction des ORF en aval de l'ORF VII sur l'ARN poly-cistronique se ferait de façon continue. Aucun élément permettant l'entrée directe des ribosomes ou de signaux recodants n'a été identifié. Le complexe de traduction ayant terminé la lecture de l'ORF VII, demeure compétent pour l'initiation de la traduction de l'ORF I (Rohde *et al.*, 1994). Cette ré-initiation ne peut ce faire qu'en présence de la p66 (Bonneville *et al.*, 1989; Fütterer et Hohn, 1991) et d'un contexte inter-génique favorable (Fütterer et Hohn, 1991). On ne sait pas encore si la traduction des ORF III à V se fait par la ré-initiation ou par un second mécanisme ressemblant à l'évitement de la séquence de tête. La p66 exprimée à partir de l'ARN sous-génomique 19S peut aussi activer sa propre traduction (Driesen *et al.*, 1993).

2.2.5 Formation des particules virales

L'encapsidation du CaMV se fait au sein des corps d'inclusion cytoplasmiques formés par la p66 (Shepherd, 1976). Le processus d'encapsidation serait couplé à la réplication du génome (Mesnard et Carriere, 1995). Les deux sous-unités composant la capside du CaMV sont issues du précurseur de 57 kDa codé par l'ORF IV (Hahn et Shepper, 1982). Suite à son expression la p57 serait phosphorylée puis les portions N et C terminales seraient clivées par la protéase virale pour générer les sous-unités p42 et p37 (Mesnard et Carriere, 1995). Des densitogrammes détaillés (Cheng et al., 1992) ont révélé que les protéines de capside du CaMV sont distribuées en trois couches de densité avec l'ADN génomique situé entre les deux couches internes. La particule virale est composée de 420 sous-unités avec une symétrie T=7. Le virion mature contient en moindre quantité la protéine codée par l'ORF III qui correspondrait à une protéine de gabarit. Cette protéine qui contient des domaines de liaison de l'ADN serait impliquée dans le processus d'encapsidation, possiblement dans une étape de condensation de l'ADN (Mougeot et al., 1993).

2.2.6 Mouvement dans la plante

Dans les cellules infectées par le CaMV, les plasmodèmes (canaux reliant les cellules végétales) sont modifiés par des extensions tubulaires (Linstead et al., 1988). La protéine codée par l'ORF I (p37) se retrouve au niveau de ces extensions tubulaires (Perbal et al., 1993). La présence de virions dans ces structures suggère que la particule virale est ellemême transférée d'une cellule à l'autre via les plasmodèmes modifiés (Rothnie et al., 1994). Toutefois, étant donné les homologies de séquences que partage la p37 avec la protéine de mouvement du TMV (p30) et l'activité de liaison d'acides nucléiques simple brin de la p37 (Citovsky et al., 1991), il serait aussi possible que le complexe ARN-p1 soit transporté de cellule en cellule (Citovsky et al., 1992). Le mouvement longue distance du CaMV via le système vasculaire de la plante se ferait principalement de façon passive au niveau.

2.3 Déterminants symptomatiques

L'infection par le CaMV est principalement limitée aux espèces de la famille des Cruciferae. L'infection virale cause des lésions chlorotiques donnant une apparence marbrée aux jeunes feuilles et l'apparence de mosaïques sur les plus vieilles feuilles (Matthews, 1991). La croissance des nouvelles feuilles est retardée chez les plantes infectées par le CaMV (Matthews, 1991). La présence des corps d'inclusion cytoplasmiques visibles en microscopie électronique, est caractéristique de l'infection par le CaMV (Shepherd et al., 1980). La p66 qui forme ces corps d'inclusion est un des principaux facteurs déterminant la sévérité des symptômes (Daubert et al., 1984) ainsi que du spectre d'hôtes des différents variants CaMV (Schoelz et Shepherd, 1988). Étant donné les fonctions majeures que remplit cette protéine au niveau des différentes étapes de multiplication du virus, il est difficile d'attribuer son rôle spécifique au niveau des manifestations phénotypiques de l'infection par le CaMV.

2.4 Utilisation du CaMV comme vecteur d'expression

Au début des années 80, différents travaux ont ouvert la voie pour l'utilisation du CaMV comme vecteur d'expression dans la plante. Dans un premier temps, il a été démontré que l'ADN viral circulaire ou linéaire extrait des plantes infectées demeurait infectieux lorsque inoculé mécaniquement sur les feuilles de plantes susceptibles (Shepherd et al., 1970). Le génome de différentes souches de CaMV a par la suite été cloné et propagé dans un hôte bactérien (Hohn et al., 1981). La production d'un clone CaMV infectieux fut réalisée en 1980 par deux différentes équipes (Howell et al., 1980; Lebeurier et al., 1980). Dans les deux cas, le CaMV cloné était capable de produire une infection productive lorsque libéré du plasmide par digestion enzymatique avant l'application sur la plante. La progéniture issue de l'infection par le CaMV cloné se retrouvait sous forme circulaire et avait regagné les discontinuités perdues lors du passage dans l'hôte bactérien.

La production de tels clones a permis la caractérisation du génome et l'assignation de ses différentes fonctions. Des analyses mutationnelles (Dixon et al., 1983; Daubert et al., 1983) ont révélés que les cadres de lectures (ORF) I, III et V étaient essentiels pour la réplication et la propagation du CaMV. Les ORF IV et VI pouvaient tolérer des modifications uniquement dans les portions 3'. De courtes séquences pouvaient être ajoutées dans la grande région inter-génique (Howell et al., 1980) alors que l'insertion de séquences entre les cistrons adjacents empêchait la ré-initiation de la traduction au cistron suivant (Hohn et Fütterer, 1992). Puisque la délétion de l'ORF II n'affecte pas le caractère infectieux du CaMV, c'est au niveau de cette région que les tentatives d'insertion de séquences étrangères se sont faites. Les vecteurs utilisés étaient basés sur la souche CaMV CMA-184, un mutant de délétion naturel de l'ORF II décrit par Lung et Pirone (1973). Le

génome de cette souche a été linéarisé au niveau du site Sal I puis inséré dans le plasmide pBR322.

L'équipe de Gronenborn (1981) a d'abord rapporté l'insertion stable dans le CaMV d'un fragment de 65 pb dérivé de la région opératrice du gène *lac* bactérien et d'un fragment de 256 pb provenant du phage ADN λ. Ces deux séquences ont été insérées au niveau du site Xho I situé entre les ORF I et III en remplacement de l'ORF II. Les CaMV recombinants ainsi générés se sont montrés infectieux avec un retard dans l'apparition des symptômes comparativement au CaMV sauvage. Les séquences étrangères étaient toujours présentes après trois passages et étaient perdues après le cinquième passage. L'insertion de plus longues séquences (531 et 1 200 pb) selon la même stratégie n'a pas été tolérée par le CaMV (Gronenborn *et al.*, 1981). Après l'infection initiale, trois différents mutants de délétion de la région insérée de 531 pb ont été récupérés alors que l'insertion de 1 200 pb était complètement excisé. Ainsi, il semblait exister une limite de taille des séquences pouvant être placées en remplacement du second ORF. Cette limite se situant entre 256 et 531 pb serait, selon les auteurs, créée par une contrainte d'encapsidation.

Le remplacement du gène II par la séquence de 234 pb codant pour la dihydrofolate réductase bactérienne (DHFR) a mené à l'expression de l'enzyme conférant une résistance des plantes au méthotrexate (Brisson et al., 1984). La séquence ajoutée est demeurée intacte pour au moins trois passages. Lorsque la même séquence fut insérée dans un contexte où le codon de terminaison de la traduction de l'ORF I était espacé de plus de 9 pb du codon d'initiation de la DHFR, le gène de remplacement fut excisé. Cette instabilité semblait, dans cette situation, être causée par une interférence avec la stratégie d'expression du CaMV.

La séquence codante de 204 pb du gène de la métallothioneine (MTII) du hamster chinois a aussi été exprimée avec efficacité à l'aide du CaMV en remplacement de l'ORF II (Lefebvre *et al.*, 1987). Le gène inséré s'est montré stable pendant au moins trois passages. La MTII avait conservé son activité biologique puisque les feuilles infectées par le CaMV recombinant avait une capacité de liaison du cadmium quatre fois plus élevée que les feuilles infectées avec le plasmide CaMV sauvage.

Pour permettre l'insertion stable de la séquence de 501 pb codant pour l'interféron aD humain (INF α D) le même vecteur de remplacement possédant une délétion additionnelle (ORF VII, Dixon et Hohn, 1984) fut utilisé (DeZoeten *et al.*, 1989). Par cette

stratégie, il a été possible d'obtenir la synthèse dans la plante de l'INF α D ayant une activité biologique dans un système animal. L'infection par le CaMV recombinant s'est montrée moins sévère que l'infection par le virus sauvage. Les plus hauts niveaux d'activité d'INF α D ont été mesurés dans les nouvelles feuilles quatre semaines après l'inoculation et diminuaient ensuite rapidement. Aucun résultat sur la stabilité à long terme de ce CaMV recombinant n'a été rapporté.

3 Le virus de la mosaïque du tabac (TMV)

Étant le premier virus à avoir été reconnu, caractérisé et purifié, le TMV a une très longue histoire expérimentale. Le TMV U1 est le virus type du groupe des Tobamovirus qui regroupe 12 membres. Les virus de ce groupe forment une particule en bâtonnet d'une longueur d'environ 300 nm. Le génome monopartite simple brin de polarité positive est encapsidé par un seul type de protéines. Ces virus sont particulièrement stables et ont un très large spectre d'hôtes.

3.1 Organisation génomique

La séquence complète du génome de la souche U1 a été déterminée en 1982 (Goelet et al., 1982). L'ARN génomique du TMV est constitué de 6 395 ncs et contient quatre ORF (Figure 2). La séquence non-traduite en 5' (5'NTr) de 70 nucléotides est coiffée (Keith et Fraenkel-Conrat, 1975). Celle en 3' (3'NTr) forme trois pseudo-noeuds ainsi qu'une structure en forme d'ARNt. Le premier cadre de lecture qui se termine par un codon de faible terminaison (ambre, UAG) en position 3 420, code pour une protéine de 126 kDa (p126). Le passage des ribosomes au-delà du codon ambre jusqu'au codon d'arrêt en position 4 920, donne naissance à une protéine de 183 kDa (p183). Ces deux protéines font partie du complexe de réplication (Ishikawa et al., 1986). À l'intérieur de ce même ORF se retrouve aussi un codon AUG pouvant potentiellement initier la synthèse d'une protéine de 54 kDa (p54). L'ORF suivant couvre les nucléotides 4 900 à 5 700 codants pour la protéine de mouvement de 30 kDa (p30) (Leonard et Zaitlin, 1982); le dernier ORF (nucléotides 5 700 à 6 200) code pour la protéine de capside (cp) de 17,5 kDa.

3.2 Cycle d'infection

3.2.1 Initiation de l'infection

L'infection par le TMV se fait de façon mécanique au niveau de tissus endommagés. Aucun vecteur de transmission du TMV n'est connu. Ce virus est transmis par contact entre les plantes, notamment pendant les opérations de culture. Étant donné ce mode de transmission peu efficace, le TMV est particulièrement virulent et envahit rapidement la plante complète en s'accumulant à de très hauts niveaux. Suite à l'entrée du virus dans la

cellule, il est possible d'observer la prolifération de membranes au sein du cytoplasme. Ces structures constituées de réticulum endoplasmique, de protéines virales et de tubules sont le lieu de l'expression et de la réplication génomique (Hills et al., 1987). Les virions peuvent aussi se retrouver associés aux chloroplastes ou d'autres organelles cellulaires (Reinero et Beachy, 1986; Schoelz et Zaitlin, 1989). La libération de l'ARN viral se ferait par un désassemblement bi-directionnel des sous-unités de capside à partir des extrémités 5' et 3' du génome (Shaw et al., 1986). Selon le modèle de décapsidation "co-traductionnel", les p126 et p183 seraient synthétisées suite à la liaison des ribosomes à l'extrémité 5' de l'ARN pendant sa décapsidation (Wilson, 1984)

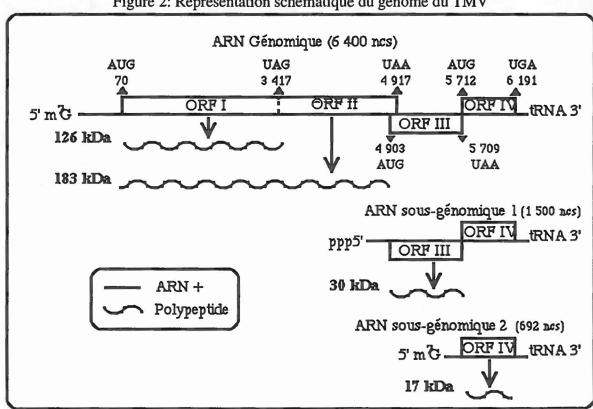


Figure 2: Représentation schématique du génome du TMV

(d'après Matthews, 1991)

3.2.2 Réplication et transcription du génome

La première étape de réplication du TMV consiste en l'expression des p126 et p183, constituants essentiels du complexe de réplication. La portion C-terminale de la p183 contient un domaine caractéristique d'ARN polymérase ARN dépendante. Les portions N et

C-terminales de la p126, qui correspondent aux portions N-terminale et centrale de la p183, contiennent respectivement un domaine d'activité méthyltransférase et d'hélicase.

La réplication du TMV se fait via l'intermédiaire d'un brin d'ARN négatif qui servira de gabarit pour la synthèse des ARN génomiques et sous-génomiques. Les p126/p183 sont impliquées dans la synthèse des ARN des deux polarités dont les niveaux de production sont asymétriques (Ishikawa et al., 1991). La réplication du TMV peut se faire en absence des protéines de mouvement et de capside ainsi que de leurs séquences codantes (Meshi et al., 1987). Les mécanismes de reconnaissance, d'initiation et de synthèse des ARN ainsi que les facteurs cellulaires impliqués ne sont pas encore bien caractérisés. Dans la première phase de l'infection, la majorité des ARN génomiques nouvellement synthétisés serviront de messager pour l'expression des p126 et p183 alors que dans la phase tardive ceux-ci seront rapidement encapsidés (Dawson et Letho, 1990).

En plus de l'ARN pleine longueur, trois ARN sous-génomiques sont individuellement synthétisés à partir de l'ARN négatif (Figure 2). Ces ARN qui servent de messagers pour l'expression des gènes internes, sont co-terminaux en 3' et leur synthèse est initiée en amont du gène à traduire (Maia et al., 1996). L'ARNsg de la protéine de capside contient une séquence de tête de 9 nucléotides riche en résidus AU et porte une coiffe (Dawson et Letho, 1990). Celui de la protéine de mouvement, qui contient aussi la séquence codante de la protéine de capside, a une séquence de tête de 75 ncs se terminant par deux ou trois phosphates (Matthews, 1991). Un ARNsg correspondant à la séquence codante de la p54 a aussi été isolé (Sulzinski et al., 1985). Les promoteurs servant à l'initiation de la synthèse de ces ARNsg ne sont pas encore clairement délimités. La spécificité de chacun des promoteurs semble avoir un effet plus marqué sur la cinétique d'expression des protéines correspondantes plutôt que sur leur niveau d'expression (Dawson et Letho, 1990). Le corps du promoteur de l'ARNsg de la protéine de capside a été localisé au niveau des 100 nucléotides en amont de son ORF (Dawson et Letho, 1990). L'insertion des séquences comprenant cette région en une nouvelle localisation sur le génome mène à la synthèse d'un nouvel ARNsg (Dawson et al., 1989)

3.2.3 Traduction

L'ARN du TMV est un tremplin de traduction particulièrement efficace où la séquence de tête en semble jouer un rôle important. Cette séquence est capable de stimuler la traduction d'ARNm procaryotique et eucaryotique (Gallie et al., 1987a et 1987b). La haute efficacité de cette séquence de tête semblerait nécessaire pour l'initiation de l'infection afin d'assurer la traduction des p126 et p183 à partir des quelques molécules d'ARN initialement introduites dans la cellule. Le niveau de synthèse des p126 et p183 atteint son maximum 16 à 24 heures après le début de l'infection (Watanabe et al., 1984). La fréquence du passage des ribosomes au-delà du codon ambre déterminant le taux de synthèse de la p183 a été estimé dans des systèmes in vitro à environ 10% de celui de la p126 (Siegel et al., 1978; Pelham, 1978; Skuzeski et al., 1990). La régulation de l'expression de la p183 via la suppression de la terminaison de la p126 dépend du contexte de séquence en aval du codon ambre (Bossi, 1983; Skuzeski et al., 1991), de la disponibilité d'ARNt "suppresseur" (Valle et al., 1992) ainsi que de la concentration en ARNm (Joshi et al., 1983).

La synthèse des protéines de mouvement et de capside correspond temporellement avec la production de leurs ARNsg (Dawson, 1983). La protéine de mouvement est produite en faible quantité, de façon transitoire et tôt dans l'infection (Watanabe *et al.*, 1984). La synthèse de la protéine de capside débute elle aussi dans la phase initiale de l'infection et sa synthèse augmente de façon linéaire pour atteindre un taux maximum pendant plus de 24 heures (Dawson et Letho, 1990). Au moment de son pic de synthèse, la protéine de capside occupe jusqu'à 70% des synthèses protéiques cellulaires (Siegel *et al.*, 1978). La présence d'une coiffe en 5' de l'ARNsg de la capside contribuerait au niveau d'expression élevé de cette dernière en stabilisant son ARN et en facilitant l'initiation de sa traduction. Il a aussi été démontré que la proximité des trois pseudo-noeuds de la séquence 3'NTr était un facteur augmentant le niveau d'expression du gène en amont (Takamatsu *et al.*, 1990a). Aucune protéine provenant de la traduction de l'ARNsg de la p54 n'a encore été détectée dans les plantes infectées.

3.2.4 Formation des particules virales

3.2.4.1 Sous-unités de capside

La structure de la capside du TMV, cristallisée sous forme de disque, a été décrite par Champness *et al.* en 1976 à une résolution de 0,5 nm. Les interactions entre les sous-unités ont été étudiées à une résolution de 0,28nm par la même équipe en 1978 (Bloomer *et al.*, 1978). La partie centrale de la protéine de capside est formée par l'empilement compact de

quatres segments d'hélice alpha anti-parallèles. Les extrémités NH₂ et COOH ainsi qu'un feuillet bêta reliant les quatres hélices sont exposés à l'extérieur de la sous-unité. Les terminaisons intérieures des hélices alpha sont jointes en paires par deux boucles. En différentes conditions ioniques et de pH, les sous-unités protéiques de la capside vont interagir pour former différents types d'agrégats. Les interactions latérales entre chaque sous-unités sont de type salin au niveau des portions internes et centrales, et de type hydrophobe entre les portions externes. Les interactions axiales se font entre les portions centrales des sous-unités et sont principalement de nature ionique. Celles-ci seront modifiées lors du passage d'un empilement des sous-unités en forme de disque à un empilement de forme hélicoïdale. À pH neutre et en faible condition ionique, l'agrégation dominante est un double disque sédimentant à 20S. Ce disque s'est montré essentiel pour l'initiation de l'encapsidation (Butler, 1984).

3.2.4.2 Mécanisme d'encapsidation

L'encapsidation du génome du TMV peut se faire *in vitro* par un mécanisme d'autoassemblage (Fraenkel-Conrat et William, 1955). Ce système a fourni un modèle très utilisé pour l'étude des interactions protéines-ARN lors de la formation de complexes biologiques. Aucune méthode n'a encore permis la caractérisation de l'assemblage du TMV *in vivo* mais on suppose qu'elle se fait par les mêmes mécanismes que ceux décrits *in vitro*.

La morphogenèse de la particule du TMV est initiée par l'insertion de l'ARN viral à l'intérieur du disque 20S (Butler, 1984). La séquence localisée 900 nucléotides en amont de la terminaison 3' de l'ARN génomique interagit de façon spécifique avec la base de la boucle interne entre deux sous-unités de capside (Zimmern et Wilson, 1976). L'interaction de cet origine d'assemblage avec le disque 20S cause la translocation de ce dernier en proto-hélice où s'intercalera l'ARN vers la terminaison 5' (Butler, 1984). L'encapsidation du génome viral en direction 5' se poursuivra rapidement, essentiellement par l'addition de disques plutôt que de sous-unités de cp individuelles (Turner et al., 1989). L'encapsidation de la portion d'ARN en aval du signal d'assemblage ne débuterait que lorsque la formation du bâtonnet en 5' serait terminée (Gaddipati et Siegel, 1990). Cette polymérisation en direction 3' est moins rapide, et se ferait principalement à partir d'agrégats (4S) composés de trois sous-unités de capside (Butler, 1984).

La particule virale formée est constituée de 2 130 protéines de capside. L'ARN viral y est intercalé dans une hélice simple composée de 16.33 capsides par tour; trois nucléotides par sous-unité sont associés. Des ARN hétérologues portant le signal d'assemblage peuvent initier la polymérisation des capsides du TMV pour mener à la formation de pseudo-virions (Sleat *et al.*, 1986; Turner *et al.*, 1989). Les particules formées seront d'une longueur proportionnelle à l'ARN encapsidé (Hwang *et al.*, 1994).

3.2.5 Mouvement dans la plante

L'infection du TMV inoculé mécaniquement débute dans les cellules de l'épiderme ou du mésophyle. Le virus se déplace ensuite d'une cellule à l'autre à travers le mésophyle jusqu'à la rencontre de veines inférieures. À ce moment, le virus doit traverser le parenchyme vasculaire pour entrer dans le système vasculaire de la plante. Une fois dans le système vasculaire, le virus se déplace dans le courant de translocation du phloem (Samuel, 1934) vers des organes distants où il doit pouvoir sortir du phloème pour infecter de nouveaux tissus.

3.2.5.1 Mouvement local

Le mouvement du TMV d'une cellule à une autre est dépendant de la protéine de mouvement (p30) codée par le virus (Deom et al., 1987). La p30 agirait avec des facteurs de l'hôte à proximité des plasmodèmes afin d'en augmenter la limite d'exclusion (Wolf et al., 1989). La région de la p30 comprenant les acides aminés 195 à 213 serait essentielle pour sa localisation au niveau de la paroi cellulaire (Berna et al., 1991). La p30 a une forte affinité pour les acides nucléiques simple brin; le site de liaison d'acide nucléique se situerait entre les acides aminés 65 à 86 (Citovsky et al., 1990). L'interaction de la p30 avec l'ARN génomique permettrait le déplacement du TMV d'une cellule à l'autre sous forme de ribonucléo/protéine virale (Dorokhov et al., 1984). Ce mouvement localisé du TMV est indépendant de la synthèse de la protéine de capside et de la formation de particules virales (Saito et al., 1990). La cinétique d'expression de la p30 quant à elle, semble être un facteur déterminant puisqu'un délai dans son expression résulte en un mouvement local défectif (Letho et al., 1990).

3.2.5.2. Mouvement longue distance

Le déplacement du TMV sur de longues distances dans l'organisme via le phloème, se fait par un mécanisme distinct du mouvement localisé de cellules en cellules. La protéine de capside est essentielle pour ce mouvement longue distance du TMV (Takamatsu et al., 1987; Hilf et Dawson, 1993). Celle-ci serait nécessaire pour traverser la frontière entre les tissus et le système vasculaire (Ding et al., 1996). La nature des interactions de la cp avec les facteurs de l'hôte ainsi que les déterminants de la cp impliqués dans le déplacement du TMV vers les organes distants ne sont pas connus. Il semblerait que la formation de particules virales (Saito et al., 1990) ou de complexes ribonucléoprotéiques (Dorokhov et al., 1984) soit requise pour le développement d'une infection systémique.

3.3 Déterminants symptomatiques

Le TMV cause la maladie de la plante en empêchant le fonctionnement et le développement normal des chloroplastes, ce qui résulte en l'apparition d'un patron de mosaïques de verts clair et foncé sur les feuilles infectées et en une réduction de la croissance de la plante. L'interaction de la protéine de capside avec le système de photosynthèse au niveau des thylacoïdes semblerait responsable de la manifestation phénotypique de l'infection par le TMV (Reniero et Beachy, 1989). Des déterminants symptomatiques ont aussi été localisés au niveau de la p126. Celle-ci semblerait interférer avec le développement des chloroplastes (Dawson, 1992).

Les symptômes induits par le TMV dans certaines plantes sont contrôlés par un gène de résistance (N ou N'). Les plantes portant le gène N, sont résistantes à toute les souches de TMV. L'infection de ces plantes sera confinée au point d'entrée du virus causant des lésions nécrotiques locales (réaction d'hypersensibilité). Cette réaction d'hypersensibilité est produite par des réactions séquentielles activées par des facteurs viraux. Les plantes portant le gène N' sont permissives pour certaines souches de TMV alors que les plantes portant les allèles récessives n ou n' permettent la propagation systémique de toutes les souches de TMV. Le déterminant viral associé à la réponse du gène N' se retrouve au niveau de la protéine de capside (Saito et al., 1987). D'autres gènes de résistance au TMV ont été identifiés chez la tomate (Tm-1, Tm-2). La réponse associée à la résistance des plantes homozygotes pour le gène Tm-1 semble être induite par les protéines virales du complexe

de réplication (p126/p183) (Meshi et al., 1988) et la résistance associée au gène Tm-2 serait induite par la protéine de mouvement (Meshi et al., 1989).

3.4 Utilisation du TMV comme vecteur d'expression

En 1986, Dawson et al. rapportèrent la production d'un clone ADN infectieux du TMV de souche U1 et l'équipe de Meshi rapporta la production d'un clone ADN infectieux du TMV L de la tomate (TMV-L). Dans les deux cas, l'ADNc au génome du TMV a été obtenu par réaction de transcription inverse de l'ARN viral extrait de plantes infectées. Suite à la synthèse du brin complémentaire, l'ADN était introduit dans un vecteur de transcription. La présence du promoteur du phage lambda en amont de l'ADN cloné allait permettre la synthèse in vitro d'un ARN correspondant au génome du TMV. Le caractère infectieux des ARN synthétiques était évalué suite à l'application de la réaction de transcription sur les feuilles de plantes susceptibles. Les ARN synthétisés en absence d'analogue de coiffe étaient peu ou pas infectieux. Les symptômes induits par les transcrits synthétisés en présence de coiffe "méthylée" ou non étaient relativement similaires à ceux induits par le virion homologue. La population virale issue de l'infection par les ARN synthétiques était constituée des mêmes séquences que l'ADNc parental.

Le clonage du génome du TMV infectieux sous forme d'ADNc a permis la manipulation de son génome et l'assignation des fonctions virales à des séquences spécifiques. La caractérisation du génome du TMV a rapidement ouvert la voie à son utilisation pratique pour l'expression de gènes hétérologues. Réciproquement, l'utilisation du TMV comme vecteur d'expression a aussi contribué à la caractérisation fonctionnelle de son génome.

La première expression d'un gène étranger dans la plante à l'aide d'un virus à ARN s'est faite par le remplacement de la région codante de la protéine de capside du TMV par le gène CAT (Takamatsu et al., 1987). Ce TMV recombinant a été capable de se répliquer, se déplacer d'une cellule à l'autre et d'exprimer la protéine CAT active. Toutefois, étant donné l'absence de la protéine de capside, l'infection par le virus recombinant s'est limitée aux feuilles inoculées. Les lésions induites par ce dernier étaient plus petites que celles observées suite à l'infection par le TMV sauvage ou par un TMV dont la capside était excisée. Le taux de réplication du virus recombinant ainsi que la synthèse de la protéine CAT étaient grandement diminués par rapport au taux de réplication génomique et au taux

de synthèse des cp du TMV sauvage. La séquence du gène CAT ou l'expression de ce gène, aurait interféré avec la réplication et l'expression du TMV (Takamatsu *et al.*, 1987).

Afin de conserver les fonctions spécifiques du virus, une cassette constituée du gène CAT placé sous le contrôle du promoteur de l'ARNsg de la cp du TMV U1 a été ajoutée au génome complet du TMV U1 (Dawson et al., 1989). Lorsque la cassette était insérée entre le gène de la capside et la terminaison 3'NTr du génome, le virus recombinant se répliquait faiblement et un très faible niveau d'expression du gène CAT était détecté. Par contre, lorsque la cassette était insérée entre le gène codant pour la protéine de mouvement et le gène de la cp, le virus recombinant se répliquait avec efficacité et produisait un ARNsg additionnel menant à l'expression efficace du gène CAT dans les feuilles inoculées. L'apparition de symptômes au niveau des feuilles non-inoculées indiquait la capacité du virus à se déplacer dans le système vasculaire de la plante. Toutefois, la population virale issue de l'infection systémique était principalement constituée du virus sauvage. La duplication du promoteur de l'ARNsg de la cp aurait menée à la délétion précise de la cassette par recombinaison homologue (Dawson et al., 1989).

La stabilité des insertions au niveau du génome du TMV a pu être augmentée en utilisant des séquences de virus apparentées au TMV. Un virus hybride (TB2) constitué des séquences du TMV U1 et du virus "odontoglossom ringspot" (ORSV, Tobamovirus d'orchidée) a été utilisé pour l'expression de la DHFR (238 pb) et de la NPTII (832 pb) (Donson et al., 1991). La séquence codante de la cp et la portion 3' NTr de l'ARN du TMV U1 ont été substituées par le promoteur de l'ARNsg et le gène de la cp ainsi que la séquence 3'NTr de l'ORSV. Les séquences étrangères étaient insérées en amont de la séquence codante de la cp de l'ORSV sous le contrôle du promoteur de l'ARNsg de la cp du TMV U1. Le recombinant DHFR a produit une infection systémique dans la plante. Le gène inséré est demeuré stable au-delà de 40 jours post-inoculation et sur au moins 10 passages. Le gène de la NPTII était faiblement exprimé et fut excisé entre les passages 1 et 3. À l'aide de ce même vecteur, l'alpha-trichosanthine, un inhibiteur de synthèse protéique, a été exprimé de façon stable à de très hauts niveaux (Kumagai et al., 1993). Il a été suggéré que la présence du peptide signal de l'alpha-trichosanthine ait contribué à l'augmentation de son niveau d'expression en ciblant la protéine dans l'espace inter-cellulaire. Il se pourrait aussi que le contexte de séquence entourant le codon d'initiation de l'alpha-trichosanthine ait eu

une influence sur son niveau d'expression (Kumagai et al., 1993). La protéine verte fluorescente (GFP) a aussi été exprimée efficacement à l'aide d'un hybride TMV (Casper et Holt, 1996). Les protéines de capside et terminaison 3' du TMV U1 étaient homologues, et le gène étranger placé sous le contrôle du promoteur de l'ARNsg de la capside du virus de la mosaïque vert pâle de la tomate (TMGMV). L'expression systémique de cette protéine émettant une fluorescence visible sous lumière UV a permis d'observer le mouvement du TMV lors de l'invasion de la plante.

Pour tirer avantage de l'effet de la proximité des trois pseudo-noeuds de la séquence 3'NTr sur l'expression des gènes en amont, l'équipe de Dawson (manuscrit) a développé le vecteur 30bRZ. Ce TMV hybride est constitué du génome de la souche U1, où le promoteur de l'ARNsg de la cp dirigeant l'expression du gène étranger est suivi des séquences 3' NTr homologues; le vecteur se termine par le promoteur de l'ARNsg de la cp, la séquence codante de la cp et la terminaison 3' NTr de la souche TMV U5. Les différentes protéines exprimées à l'aide de cette version, ont montré des niveaux d'expression et une stabilité variables. Récemment, ce vecteur a été utilisé pour exprimer la protéine de capside du virus de la mosaïque de la luzerne (AIMVcp: 850 pb) à laquelle différents épitopes étaient fusionnés à la terminaison NH2 (Yusibov et al., 1997). Une fusion de deux épitopes provenant des glycoprotéine (Drg24: 57 pb) et nucléoprotéine (31D: 63 pb) du virus de la rage ainsi qu'un épitope de la boucle V3 (141 pb) de la gp41 de HIV-1 ont ainsi pu être exprimés de façon stable dans la plante. Les virus recombinants, purifiés à partir des plantes infectées, ont induit chez la souris la production d'anticorps capables de neutraliser le virus spécifique (rage ou HIV) in vitro.

Les fusions de séquences au gène de la cp du TMV ont été utilisées pour l'expression de courts peptides dans la plante. La possibilité d'ajouter des peptides étrangers au niveau des portions NH₂ et COOH qui sont projetés à la surface de la cp, offre un grand attrait pour l'utilisation du TMV comme véhicule de présentation d'épitopes. La fusion d'un court peptide (Leu-Enkephaline, 5 a.a.) à la terminaison carboxylique de la cp a empêché le TMV recombinant de se propager dans la plante complète (Takamatsu *et al.*, 1990b). L'interférence avec la fonction normale de la cp était spécifique de la séquence fusionnée, puisque un TMV codant pour une cp additionné de 7 acides aminés par mutation de son codon de terminaison pouvait produire une infection systémique (Takamatsu *et al.*, 1990b).

L'équipe de Fitchen (1995) a obtenu un niveau d'expression systémique élevé d'un épitope de 12 acides aminés de la protéine 3 du zona pellucida de la souris (ZP3) fusionné à la portion C-terminal de la cp. Dans cette situation, la présence de l'épitope de la pZP3 ainsi que de sa séquence codante n'a pas interféré avec la réplication et la propagation du TMV. L'injection du virus recombinant aux souris a induit la production d'anticorps spécifiques au zona pellucida sans toutefois diminuer la fertilité des souris.

Afin d'éviter l'interférence avec les fonctions de la cp, l'équipe d'Hamamoto (1993) a développé un vecteur TMV dans lequel un codon ambre suivi d'une séquence de 6 ncs ont été insérés en remplacement du codon de terminaison de la protéine de capside. Cette stratégie allait permettre la production d'une cp intacte pour assurer l'encapsidation et la propagation normales du virus, tout en permettant la synthèse, via le contexte de faible terminaison, d'une cp recombinante portant le peptide étranger. La séquence codant pour un peptide de 12 acides aminés (a.a.) de l'enzyme convertase angiotensine I (ACEI) a été insérée directement en aval du contexte de faible terminaison (Hamamoto et al., 1993). Le virus recombinant a été capable de produire une infection systémique étant donné la présence de la cp intacte. La synthèse de la cp portant le peptide ACEI a été détectée dans un rapport allant de un pour 20 à un pour 200 cp sauvage. Des épitopes des virus influenza (8 et 18 a.a.), HIV (13 a.a.) et de P. yoelii (12 a.a.) ont été exprimés dans la plante en utilisant cette même stratégie (Sugiyama et al., 1995; Turpen et al., 1995). Dans tous les cas, les virus recombinants se propagèrent dans toute la plante et les séquences ajoutées étaient conservées. Les symptômes induits par ceux-ci pouvaient varier selon l'épitope exprimé. De 0,8 à 2,0 mg de virus par g de feuilles pouvaient être purifiés à partir des plantes infectées. La proportion de capside recombinante par rapport à la capside intacte était d'environ 1 pour 20.

La boucle du feuillet bêta présente à la surface de la protéine de capside du TMV a aussi été exploitée pour la présentation d'épitopes. Une et deux copies d'un épitope de 4 a.a. de *P. vivax* y ont été introduites (Turpen *et al.*, 1995). La présence des séquences insérées à ce niveau n'a pas empêché le virus de produire une infection systémique. Seules les capsides portant la double copie de l'épitope ont pu être détectées dans les plantes infectées. Aucune étude rapportant la fusion de peptide à la terminaison NH₂ de la protéine de capside du TMV a été publiée.

À l'aide du TMV, il a été possible d'évaluer rapidement le potentiel de différentes stratégies pour obtenir l'expression stable de protéines ou d'épitopes dans la plante. Ces travaux ont montré que l'infidélité de copie attendue par l'ARN polymérase (van Vloten Doting et al., 1985) n'était pas un facteur pouvant affecter de façon considérable l'utilisation du TMV comme vecteur d'expression. Les vecteurs TMV hybrides se sont montrés utiles pour l'insertion de longues séquences alors que les fusions en C-terminal de la cp précédée d'un signal de faible terminaison de la traduction s'est avérée être une stratégie efficace pour l'expression de courts peptides. Toutefois, l'utilisation du promoteur de l'ARNsg de la protéine de capside n'a pas permis l'expression des gènes étrangers à des niveaux aussi élevés qu'attendu. De plus, l'efficacité du TMV à se répliquer, à former des particules virales ou à se déplacer dans la plante est selon la nature des séquences insérées et/ou de la protéine exprimée. De plus, on ne sait pas encore jusqu'à quel point le système de défense de la plante peut reconnaître les peptides étrangers présentés par le TMV. Il est donc nécessaire de déterminer empiriquement les limites et l'utilité de ce système afin de pouvoir contrôler le plus de paramètres possibles.

L'épitope de protection du VRS offre un bon modèle pour caractériser et évaluer les différentes possibilités qu'offre le vecteur viral de plante. En effet, les acides aminés essentiels constituant cet épitope, le repliement *via* les ponts disulfures, ainsi que son activité biologique sont relativement bien caractérisés, facilitant ainsi l'analyse du produit exprimé dans la plante. De plus, étant donné les besoins urgents d'un vaccin pour la prévention de l'infection par le RSV, il est de mise d'étudier les possibilités qu'offrent la plante et le vecteur viral pour la production d'un vaccin efficace et sécuritaire.

4 Le virus respiratoire syncytial (VRS)

Le virus respiratoire syncytial est un pneumovirus, de la famille des *Paramyxoviridae*. Les pneumovirus diffèrent des deux autres genres de cette famille, les paramyxovirus et les morbillivirus, notamment par leur organisation génomique et par l'absence d'activité hémagglutinante et neuraminidase. Outre le VRS humain, on retrouve chez les pneumovirus le VRS bovin et le virus de la pneumonie de la souris. Les VRS humains se divisent en deux principaux sous-groupes antigéniques: A et B. La majorité des différences entre ces deux sous-groupes se situe au niveau de la glycoprotéine (gp) G. À l'intérieur d'un même sous-groupe, 94 à 98% de la séquence en acides aminés de cette dernière sont identiques alors qu'entre les sous-groupes A et B seulement 53 à 56% d'identité est observée (Mufson *et al.*, 1985). On retrouve beaucoup moins de variations entre les autres protéines virales des deux sous-groupes.

Le VRS se présente sous forme de particules filamenteuses de longueur variant entre 150 et 300 nm et de diamètre constant de 95 nm (McIntosh et Chanock, 1990). Le virion est enveloppé et présente à sa surface des projections d'origine virale. La nucléocapside contient une molécule d'ARN linéaire simple brin de polarité négative de 15 222 nucléotides (Figure 3) (Huang et Wertz, 1982). Le génome du VRS code pour dix protéines (Tableau 4) qui sont exprimées à partir des 10 ARNm polyadénylés issus de la transcription de l'ARN génomique. La réplication de ce dernier se fait par l'intermédiaire d'un brin d'ARN positif.

Figure 3: Organisation génomique du VRS

499 528	1 197	907	952	405	918	1 899	957	6 578
NS1NS2	И	P	M	SH	G	F	M2	L

^{*} Les chiffres au-dessus de chaque boîte, représentent le nombre de nucléotides codant pour la protéine correspondante. (Collins et al., 1983, 1984)

4.1 Protéines du VRS

Les protéines non-structurales NS1 et NS2 ne sont pas encore bien caractérisées. La protéine SH (small hydrophobic) se retrouve à la surface des cellules infectées ou associée au virion (McIntosh et Chanock, 1990). Elle s'accumule sous 4 formes: deux formes non glycosylées mais ayant deux sites différents d'initiation de la traduction, et deux formes N-glycosylées (McIntosh et Chanock, 1990).

Tableau 4: Protéines synthétisées par le VRS

Protéine		Moléculaire (kDa) Observée	Localisation	Rôle	
NS1	15,6		Intracellulaire	?	
NS2	14,7		Intracellulaire	?	
N	43,5		Nucléocapside	Structure de la nucléocapside	
P	27,1		Nucléocapside	Polymérase?	
M	28,7		Gabarit	Structure interne de l'enveloppe	
SH	7,5	15, 21 à 30	Surface de la cellule	?	
G	32,6	84 à 90	Surface de l'enveloppe	Attachement au récepteur cellulaire	
F	63,5	68 à 70	Surface de l'enveloppe	Fusion enveloppe/cellule (formation de syncytium)	
M2	22,2		Enveloppe	?	
L	250		Nucléocapside	Polymérase?	

d'après McIntosh et Chanock, 1990

Les protéines constituant la nucléocapside du virion sont: la nucléoprotéine N que l'on retrouve en très grande quantité complexée avec l'ARN génomique; la phosphoprotéine P et la protéine L qui font partie du complexe de réplication et de transcription de l'ARN viral (McIntosh et Chanock, 1990).

Les protéines M et M2 tapissent l'intérieur de l'enveloppe virale. Leur rôle n'est pas encore connu. Les glycoprotéines G et F forment les projections à la surface de l'enveloppe. La glycoprotéine F (gpF) est responsable de la fusion du RSV à la cellule hôte et de la formation de syncytiums (Walsh et Hruska, 1983). Elle est constituée de deux sous-unités issues de son clivage protéolytique après sa synthèse. Ces sous-unités F1

et F2 sont reliées entre elles par des ponts disulfures. La gpG est responsable de l'attachement du virus à son récepteur cellulaire (Levin *et al.*, 1987). Jusqu'à 60% de sa masse moléculaire est attribué à la présence d'oligosaccharides dont la majorité sont Oliés. Le domaine extra-cellulaire de la gpG contient une séquence de 13 acides aminés (résidus 164 à 176) ainsi que 4 résidus cystéines (Cys.-173, 176, 182, 186) qui sont conservés à 100% chez quatre souches de RSV de sous-groupes A et B (A2, A Long, B18537, B8/60) (Sullender *et al.*, 1990).

4.2 Infection par le VRS

Les infections par le VRS humain sont importantes partout à travers le monde (Stott et Taylor, 1985). Des épidémies sont observées annuellement durant les mois d'hiver dans les pays tempérés (Kim et al., 1973) et à la fin de la saison des pluies dans les pays africains (GPV, 1996a). Lors d'une épidémie, des souches appartenant aux deux sousgroupes co-circulent. Un des deux sous-groupes sera prédominant; les souches du sousgroupe A prédominent le plus fréquemment. (Hall et al., 1991). Dans les pays en voie de développement, l'infection par le VRS est souvent associée à une infection bactérienne (S. pneumoniae, H. influenzae; EPI immunisation policy).

Les VRS causent jusqu'à 900 000 décès par année (GPV, 1996a) à travers le monde. Aux États-Unis seulement, il est responsable annuellement de 4 500 décès et de 91 000 hospitalisations. Au Canada, on observe 1% de mortalité chez les enfants hospitalisés pour une infection par le VRS (Wang et al., 1995). En fait, 25% des enfants hospitalisés pour une pneumonie et 50% des enfants hospitalisés pour une bronchiolite sont infectés par le VRS (GPV, 1996b). Le taux de mortalité est plus élevé chez les sujets souffrant de déficiences cardiaques, de maladies pulmonaires ou immunodéprimés (McIntosh et Chanock, 1990).

Chez l'humain, le VRS infecte les voies respiratoires supérieures et inférieures et cause des pathologies semblables à celles causées par d'autres virus respiratoires. Toutefois, les pathologies sévères résultant d'une infection par le VRS sont caractérisées par une réponse inflammatoire particulièrement intense et ne sont observées que chez une cible d'hôte d'âge restreint. Le VRS est hautement contagieux; à peu près chaque individu est

infecté lors de ces deux premières années de vie et sera ré-infecté tout au long de sa vie (Glezen et al., 1986).

La transmission du VRS se fait via les aérosols et par contact avec les individus infectés ou les surfaces souillées. Les portes d'entrées du virus sont préférentiellement les yeux et les voies nasales. La période d'incubation du VRS dure de 4 à 5 jours. Au début de l'infection le virus se réplique au niveau de l'épithélium du nasopharynx (McIntosh et Chanock, 1990). Les signes d'infection au niveau des voies respiratoires inférieures apparaissent un à trois jours après le début de la rhinite. Les mécanismes par lesquels le virus passe des voies respiratoires supérieures aux voies respiratoires inférieures ne sont pas clairement identifiés.

Chez l'adulte, l'infection se limite aux voies respiratoires supérieures et se traduit par un rhume qui dure environ cinq jours. Chez les jeunes enfants, l'infection par le VRS peut causer des bronchites, des bronchiolites ou des pneumonies. Les enfants âgés entre six semaines et six mois (avec un pic d'incidence à l'âge de deux mois) sont les sujets les plus aptes à développer une bronchiolite sérieuse ou une pneumonie (Everard et Milner, 1992). Chez les nouveau-nés de moins de trois semaines, les bronchiolites et pneumonies sont rares, l'infection ne se manifeste que par les symptômes des voies respiratoires supérieures (McIntosh et Chanock, 1990). La bronchiolite peut se voir chez les enfants de plus de six mois mais au-dessus de 18 mois elle n'apparaît que chez les enfants souffrant de troubles respiratoires (McIntosh et Chanock, 1990). Les bronchites demeurent fréquentes chez ce dernier groupe d'âge. Les symptômes de la seconde infection sont similaires à ceux observés lors de la première mais se développent en maladies moins sévères.

4.3 Réponse du système immunitaire à l'infection par le VRS

Chez l'hôte naturel, l'immunité induite par le VRS n'est que partiellement efficace puisqu'un individu peut être ré-infecté tout au long de sa vie. Un certain niveau de protection semble être apporté par l'immunité humorale, alors que l'élimination de l'infection impliquerait plus particulièrement l'immunité à médiation cellulaire. La direction que prendra la maladie vers une pathologie sévère des voies respiratoires inférieures semble être en relation avec le niveau de maturité du système immunitaire de l'hôte, ainsi qu'avec la régulation de la réponse immune induite par le VRS.

4.3.1 Réponse humorale

Les glycoprotéines F et G du VRS seraient les principaux déterminants viraux inducteurs d'une réponse humorale protectrice des voies respiratoires inférieures. Ces deux protéines virales stimulent, chez la souris, la production d'un très haut niveau d'anticorps circulants où la majorité des Ac neutralisants sont dirigés contre la gpF (Olmsted et al., 1986). La vaccination de souris ou de rats de coton avec les gpF ou gpG (purifiées ou recombinantes) ainsi que le transfert passif d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre l'une de ces deux protéines, protège les poumons de ces modèles animaux contre l'infection par le VRS (McIntosh et Chanock, 1990). L'immunisation avec la gpF protège les animaux contre l'infection des voies respiratoires inférieures par les VRS de souches hétérologues, alors que l'immunisation avec la gpG ne permet que la protection contre les VRS de souches homologues (Johnson et al., 1987; Stott et al., 1987).

La protection contre l'infection du système respiratoire inférieur chez l'humain peut se faire mais plus d'une infection est souvent nécessaire pour accomplir ceci (Murphy et al., 1994). Il existe une corrélation entre la protection et la présence d'un titre élevé en anticorps circulants induits (Parrott et al., 1973), administrés passivement (Hemming et al., 1987; Groothius et al., 1993) ou d'origine maternelle (Lamprecht et al., 1976; Glezen et al., 1981). Chez les bébés, la réponse humorale se développe moins rapidement et les titres en anticorps sont moins élevés que chez les enfants plus âgés et l'adulte (Toms et Stott, 1987). Les anticorps développés par les jeunes enfants sont principalement dirigés contre les protéines F et N et dans une plus faible proportion contre la protéine G (Kimman et Westenbrink, 1990). Le pouvoir protecteur des anticorps d'origine maternelle semble être en relation avec le niveau de maturité du système immunitaire de l'enfant. En effet, les anticorps de la mère semblent avoir un effet protecteur chez les enfants nouveau-nés, alors que les maladies sévères sont observées chez les enfants plus âgés malgré la présence d'un titre élevé d'anticorps maternels (Kimman et Westenbrink, 1990)

La protection des voie respiratoires supérieures implique plus particulièrement l'immunité locale. La résistance à l'infection des voies respiratoires supérieures chez l'adulte correspond à la présence d'anticorps neutralisants dans les muqueuses nasales (Mills *et al.*, 1971). Chez les enfants, l'élimination du virus coïncide avec l'apparition d'IgA dans les sécrétions nasales (McIntosh *et al.*, 1979). Toutefois d'autres mécanismes sont impliqués

dans la protection des voies respiratoires supérieures, puisqu'en absence d'IgA sécrétoires les enfants infectés sont capables de se remettre normalement de l'infection par le VRS (McIntosh et al., 1978).

4.3.2 Réponse à médiation cellulaire

L'importance de la réponse immunitaire cellulaire pour l'élimination de l'infection par le VRS est démontrée par le fait que les individus ayant une défectuosité des fonctions cellulaires de l'immunité sont incapables d'éliminer le virus (Fishaut *et al.*, 1980; Hall *et al.*, 1986). Des lymphocytes T ayant une réponse proliférative spécifique au VRS (Stott *et al.*, 1984) et des cellules T cytotoxiques ayant une restriction aux cellules infectées portant le CMH de classe I (Bangham et McMicheal, 1984; Issacs *et al.*, 1987) ont été isolés chez les individus infectés. La déplétion simultanée des cellules T CD8+ et CD4+ à l'aide d'Ac monoclonaux chez des souris infectées par le VRS, conduit à une réplication virale prolongée (Graham *et al.*, 1991). Les fonctions et rôles spécifiques de ces cellules dans l'élimination de l'infection ne sont pas encore connus. Les protéines virales N et F sont les principaux inducteurs de la réponse cellulaire (McIntosh et Chanock, 1990).

Les études chez la souris ont démontré que certaines composantes de la réponse cellulaire jouant un rôle dans la guérison de l'infection sont impliquées dans l'apparition de la maladie sévère causée par le VRS. Par exemple, le transfert individuel de cellules T cytotoxiques CD8+ ou de CD4+ chez des souris athymiques "nude" infectées par le VRS, conduit à l'élimination du virus, mais est aussi associé à de graves pathologies pulmonaires (Cannon et al., 1988). Un équilibre entre les différents types de cellules stimulées serait nécessaire pour assurer une élimination efficace de l'infection sans aggravation de la maladie. En effet, le transfert d'une population mixte de lymphocytes CD8+ et CD4+ de sous-type Th1 cause une exacerbation minimale de la pathologie au niveau des poumons alors que le transfert de CD4+ de sous-type Th2 conduit à une pathologie grave potentiellement fatale (Alwan et al., 1994).

4.4 Prévention de l'infection par le VRS par la vaccination

Aucun vaccin efficace et sécuritaire pouvant prévenir l'infection par le VRS n'est encore disponible. Les seuls traitements utilisés aujourd'hui dans le combat de l'infection par le VRS sont les antiviraux (Ribavirine) et les immunoglobulines spécifiques au VRS

(RespiGam). Malheureusement, ces thérapies sont particulièrement coûteuses et ne sont administrées qu'aux enfants à risque élevé dans les milieux favorisés. C'est pourquoi le vaccin anti-VRS fait partie de la liste de l'Organisation mondiale de la santé des vaccins prioritaires à être développés d'ici l'an 2 000.

4.4.1 Vaccin inactivé

Suite aux succès obtenus au début des années 60 dans la prévention d'infections virales par l'immunisation avec des virus inactivés (influenza, poliomyélite, rage), un vaccin VRS inactivé par traitement à la formaline fut testé chez des enfants. Non seulement ce vaccin n'a pas su diminuer le risque d'infection par le VRS (Kim et al., 1969), mais il a aussi augmenté de façon significative le risque de développer une pathologie grave des voies respiratoires inférieures suivant l'infection naturelle (Kapikian et al., 1969). L'inactivation du VRS par la formaline aurait entraîné la modification ou la destruction d'épitopes importants induisant ainsi une réponse immune différente de celle observée lors de l'infection naturelle (Murphy et al., 1986; Murphy et Walsh, 1988). Des études chez le rat de coton, un modèle animal reproduisant l'exacerbation des pathologies pulmonaires par la vaccination avec le VRS inactivé à la formaline, (Prince et al., 1986) suggèrent que le vaccin inactivé aurait favorisé la production d'anticorps non protecteurs capables de former des complexes immuns conduisant à une pathologie immune (Murphy et al., 1994) ou à une sur-stimulation de populations de cellules T impliquées dans l'aggravation de la maladie (Graham et al., 1993; Waris et al., 1996).

4.4.2 Vaccin atténué

Puisque le vaccin vivant atténué peut induire une réponse immune similaire à celle obtenue lors de l'infection naturelle, les risques d'exacerbation de la maladie par l'administration de ce type de vaccin sont limités (Murphy et al., 1994). Toutefois, la première génération de vaccin VRS atténué constituée de mutants thermo-sensibles ne s'est pas montrée adéquate en essais cliniques. Les vaccins testés étaient soit génétiquement instables, virulents ou peu immunogènes (McIntosh et Chanock, 1990; Murphy et al., 1994). De nouvelles souches triple-mutantes thermo-sensibles plus stables et sécuritaires sont actuellement en essai clinique (Pringle et al., 1993, Crow et al., 1996). Mais puisque l'infection naturelle elle-même ne conduit pas à la protection contre une seconde infection,

il faudra s'attendre à ce que ce type de vaccin nécessite une administration en plusieurs doses avec des rappels annuels pour l'obtention d'une certaine efficacité.

4.4.3 Vaccin sous-unitaire

Les glycoprotéines de surface G et F ont été les principales cibles pour l'élaboration de vaccins VRS sous-unitaires. Celles-ci ont été purifiées à partir de cellules humaines infectées (Walsh et al., 1987), de cellules d'insectes exprimant les protéines du VRS via un vecteur baculovirus (Wathen et al., 1991) et aussi à partir de bactéries recombinantes (Martin-Gallardo et al., 1993). Des recombinants du virus de la vaccine (Olmsted et al., 1986) et adénovirus (Hsu et al., 1992) ont aussi été utilisés pour étudier l'immunogénicité des sous-unités du VRS.

La majorité des études chez les rongeurs ont montré que les protéines F ou G étaient très immunogènes et avaient un très bon potentiel protecteur. Toutefois, selon le modèle animal utilisé, des variations du niveau de protection apporté par la gpG ont été observées; la protection étant plus efficace chez la souris que chez le rat de coton (Olmsted et al., 1986; Stott et al., 1987). De plus, dans certaines études, l'immunisation avec la protéine F a entraîné une augmentation des pathologies pulmonaires (ressemblant à celles observées suite à l'immunisation avec le VRS inactivé à la formaline) lorsque l'animal était soumis à l'épreuve au VRS (Stott et al., 1987; Murphy et al., 1990; Vaux-Peretz et al., 1992; Connors et al., 1992). Toutefois, le rôle de la protéine virale par rapport au rôle des préparations vaccinales dans cette exacerbation n'a pas été clairement identifié (Piedra et al., 1993).

Le potentiel protecteur de certains vaccins sous-unitaires a été évalué chez différentes espèces de singes. De façon générale, les niveaux de protection obtenus chez ces derniers n'étaient pas aussi élevés que ceux observés chez les rongeurs (Murphy *et al.*, 1994).

L'immunisation d'enfants avec la protéine F purifiée a induit une augmentation du titre en anticorps contre le VRS (Tristam et al., 1993). Durant la saison épidémique, un certain niveau de protection a été observé chez les enfants vaccinés mais l'immunité acquise était de courte durée (Tristam et al., 1994). Aucune exacerbation de la maladie ne fut observée. D'autres études évaluant le potentiel protecteur de ce même vaccin chez les enfants ne rapportèrent aucune protection contre l'infection par le VRS (Belsh et al., 1993).

L'utilisation d'adjuvants sécuritaires pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de ce type de vaccins.

4.4.4 Vaccin peptidique

Différentes régions antigéniques ainsi qu'un certain nombre d'épitopes B et T ont été identifiés au niveau des gpF et gpG. L'utilisation, pour l'élaboration d'un vaccin, de sous-unités représentant des déterminants antigéniques majeurs de ces protéines pourrait permettre l'induction d'une réponse immune sélective. De cette façon, il serait possible de stimuler plus spécifiquement et efficacement la réponse protectrice désirée tout en évitant la stimulation des composantes du système immunitaire impliquées dans l'augmentation des pathologies pulmonaires.

En 1991, l'équipe de Trudel a identifié, par immunisation de souris avec des peptides synthétiques couplés au KLH, une région de 14 acides aminés de la gpG capable de protéger les poumons des souris contre l'infection par le VRS. Cet épitope comprenant les acides aminés 174 à 187 de la gpG de la souche Long (G174-187), fait partie d'une région antigénique qui a été identifiée comme étant spécifique de sous-groupe (Akerlind-Stopner et al., 1990). Il a été démontré récemment qu'une substitution du résidu cystéine en position 186 par un résidu sérine était essentielle pour l'activité protectrice du peptide, alors qu'un peptide comprenant les acides aminés 171 à 187 sans substitution était capable d'apporter un degré de protection supérieur (Simard et al., 1997).

L'immunisation de souris avec le peptide G174-187 induit un niveau élevé d'anticorps circulants spécifiques au VRS qui, toutefois, ne sont pas neutralisants (Trudel et al., 1991). Aussi, le transfert passif à des souris de l'anticorps monoclonal non-neutralisant18A2B2 dirigé contre cet épitope, conduit à la protection des poumons des souris contre l'infection par le VRS (Trudel et al., 1991). La protection des poumons de souris par les anticorps dirigés contre le peptide ne semble pas non plus impliquer une activité de lyse cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) (Corbeil, 1997). Les études d'immunisation passive des souris ont souligné le rôle du complément dans la protection des souris par l'Ac. 18A2B2 (Corbeil et al., 1996). Finalement, aucune lésion pulmonaire n'a été observée suite à l'infection avec le virus sauvage chez les souris immunisées avec le peptide G174-187 (Corbeil, 1997).

L'épitope G174-187 est donc un candidat prometteur pour l'élaboration d'un vaccin peptidique efficace et sécuritaire. Toutefois, il sera nécessaire de développer un système qui permettra de produire cet épitope en grande quantité puisque que les peptides de synthèse sont coûteux et souvent nécessitent le couplage à une molécule porteuse ainsi qu'une immunisation accompagnée d'adjuvant. Comme nous l'avons vu plus tôt, la plante pourrait offrir plusieurs avantages pour la production d'un tel peptide. La première étape pouvant mener à l'élaboration d'un vaccin VRS dans la plante consiste donc à établir un système d'expression qui permettra l'obtention de haut niveau de production de l'épitope G174-187, et à évaluer les caractéristiques biologiques de l'épitope ainsi produit. Les travaux présentés dans cette thèse visent donc à étudier le potentiel de biotechnologies en développement pouvant mener à une utilisation pratique des connaissances acquises au cours des années.

Matériel et méthodes

1 Méthodes de clonage

Au cours de ces travaux, la plupart des fragments d'ADN à cloner ont été amplifiés par PCR. Ces séquences d'ADN étaient ensuite introduites par ligation dans le contexte désiré d'un plasmide préalablement préparé pour recevoir ce fragment. Après transformation de bactéries compétentes avec les produits de ligation, les bactéries transformées étaient analysées pour l'identification des clones recombinants.

1.1 Préparation de l'ADN

1.1.1 Amplification par PCR

Les réactions de PCR étaient constituées de 10 à 100 ng d'ADN gabarit, de tampon d'amplification 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 5 mM MgCl₂), de 0,2 mM dNTP, les amorces 5' et 3' dans des concentrations variant entre 0,1 à 1,0 pmol/ µl et 0,025 U/µl de Taq polymérase (BIO/CAN Scientific Inc., Mississauga, On, Can.).

Les oligonucléotides qui ont été utilisés pour amorcer les amplifications sont présentés au Tableau 5. Ceux-ci ont été produits à l'aide d'un synthétiseur automatique d'oligonucléotides (Gene Assembler, Pharmacia) dans les laboratoires du Dr. François Shareck (Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Can.).

Les amplifications se sont faites dans un appareil muni d'un bloc chauffant contrôlé par ordinateur (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus Corp.) selon les paramètres suivants:

cycle 1	3 min	dénaturation	94°C
cycles 2 à 35	1 min	dénaturation	94°C
	1 à 2 min	hybridation	42 à 55°C
	1 min	élongation	72°C
cycle 36	10 min	élongation finale	72°C

Tableau 5: Amorces utilisées pour amplification par PCR

Nom	Séquence (5'-3') ^a	Correspondance ^b	
G762BamH	CCACCAAACggAtCCAATAAT	464-483 (+) GRS	
G502Xho	GATITTCACcTCGAgaTGTTTAACTTT	484-510 (+) GRS	
G370Xho	TTtttCtAtgCtcGagaTgAAtTCA	348-372 (+) GRS	
GHISMut gacgGtacccctaGcgtcgaccTatgatgaTgatgatgatGgggaTccG TAGGCTTGGTGGTGG		593-656 (-) GRS	
CA5	GGAAACAGTGCTTCATCCTC	1246-1265(+) pCaBB1	
G666Sal	TGGTTTAGTcGacTGAGGTTT	647-666 (-) GRS	
G762Sal	TCCTGTcGacTTGTTGGTGAG	742-762 (-) GRS	
MTIISal	GCAGaAGCTtCAgTcGaCCGAAGC	57-80 (-) MTII	
DHFRSal	GTTGcTGcAgTCgAcCGCCGC	214-233 (-) DHFR	
G762TMV5'	ACAACAAgctagCAAttACAACCCAGCAAGCCC	pETG7625'	
G762TMV3'	GCTTAGATTGCaTgcatcttgacTacctcagAAGGTTTCC ATTTGACT	pETG7623'	
TB2 5'Cla	TAATCGATGATGATTCGGAGGCTAC	5657-5683 (+) TMV	
pKNot	AGGCATTAGTGTGTGCACCACC	6226-6245 (-) TMV	

a) Les petits caractères correspondent aux nucléotides qui ont été modifiés par rapport à la séquence ADN du gabarit

1.1.2 Analyse de l'ADN en gel d'agarose

Les échantillons d'ADN étaient analysés par électrophorèse en gel d'agarose. Les gels d'agarose étaient préparés dans un tampon TAE (40 mM Tris-acétate pH 7,8, 2 mM acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA)) où le pourcentage en agarose pouvait varier entre 0,5 et 2,0, selon la taille du fragment à analyser. Le bromure d'éthidium (BET) était ajouté à l'agarose avant sa polymérisation à raison de 0,5 µg/ml. Les échantillons étaient appliqués sur gel en présence du tampon de chargement d'ADN (0,04 % (p/v) bromophénol bleu, 0,04% (p/v) xylène cyanol FF, 5% glycérol (v/v)). L'ADN fractionné était visualisé par exposition du gel à une lumière ultra-violette (trans-illuminateur, Foto UV26, Fotodyne, Inc., Hartland, WI, É-U). L'estimation de la taille des fragments analysés se faisait par comparaison avec un marqueur ADN standard (100 pb ou 1 kb ladder, Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, On, Can.).

b) Position des premier et dernier nucléotides (chiffres) de l'oligonucléotide correspondant au brin positif (+) ou négatif (-) de la séquence servant de gabarit.

1.1.3 Digestion enzymatique de l'ADN

Les digestions enzymatiques d'ADN se sont faites dans les conditions spécifiques à l'enzyme utilisée (concentration de l'enzyme, tampon, température et temps d'incubation étant déterminés par le manufacturier) (Boehringher Mannheim Canada, Laval, Qc, Can.; Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, On, Can.; New England Biolabs., Inc., Beverly, MA, É-U; Pharmacia Canada Inc., Baie d'Urfée, Qc, Can.).

1.1.4 Purification des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN obtenus par PCR ou suite à une digestion enzymatique étaient purifiés à partir d'un gel d'agarose. Après une migration suffisamment longue pour bien isoler la bande d'ADN désirée, l'agarose contenant cette bande était prélevée et l'ADN purifié à l'aide d'une trousse de purification d'ADN (Gene Clean MD, BIO/CAN Scientific Inc., Mississauga, On, Can.).

1.1.5 Préparation des plasmides

Les vecteurs choisis pour recevoir les fragments d'ADN étaient digérés de façon à générer des extrémités compatibles à la ligation avec les extrémités des fragments d'ADN à insérer. Suite à la digestion, le plasmide linéaire était fractionné sur gel d'agarose, prélevé et purifié par Gene Clean.

1.1.6 Réaction de ligation

La liaison entre les terminaisons 5'-phosphate et 3'-hydroxyl du vecteur et de l'insert était catalysée dans la réaction suivante:

- Plasmide linéaire purifié et fragment d'ADN à insérer dans un rapport molaire de 1:3
- 1 unité (U) de ligase (T4 DNA ligase, Pharmacia Canada Inc., Baie d'Urfée, Qc)
- 0,1 M ATP
- Tampon de ligation (10 mM Tris-acetate pH 7,5, 10 mM Mg-acetate, 50 mM K-acetate, Pharmacia Canada Inc., Baie d'Urfée, Qc, Can.)

Dans un volume final de 10 µl, la réaction de ligation était incubée une nuit à 4°C.

1.2 Transformation de bactéries compétentes

L'introduction du produit de ligation dans la souche bactérienne E. coli XL1-Blue (recA1, endA1, gyrA96, hi1, hsdR17, supE44, relA1, lac, F'[proAB+, lacq, lacd M15,

Tn10 (Tet^r)]) compétente se faisait par choc thermique (Sambrook *et al.*, 1989). Les bactéries transformées étaient ensuite étalées à différentes dilutions sur milieu LB solide (1% (p/v) bacto-tryptone, 0,5% (p/v) extrait de levure, 1% (p/v) NaCl, 1,5% (p/v) bacto-agar) contenant 100 μg/ml d'ampicilline (plateau LB/Ampi.), pour la sélection des bactéries transformées avec le plasmide portant le gène de résistance à l'ampicilline. Après une incubation d'une nuit à 37°C, les colonies de bactéries transformées étaient analysées.

1.3 Sélection des bactéries recombinantes

1.3.1 Sélection bleu/blanc

Lorsqu'un clonage était effectué dans un plasmide Bluescript KS (+/-) (pBluescript^{MD} I KS (+), Stratagene, PDI BioScience, Aurora, On., Can.) ou dans un plasmide T/A (pCR 2.1, Invitrogene, Carlsbad, CA, É-U; pGEM-T, Promega, Fisher Scientific, Ltd., Nepean. On, Can.) les bactéries transformées étaient étalées sur un plateau LB/Ampi. contenant 0,5 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) et 40 μg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal). Ceci avait pour but d'activer le système de complémentation entre la β-galactosidase (β-Gal) défective de la bactérie et la portion de cette enzyme codée par le plasmide résultant en la production de colonies bleues en présence du substrat chromogène (X-Gal). Ce système facilitait la sélection des bactéries recombinantes puisque les sites de clonage multiples de ces plasmides se situent à l'intérieur de la séquence β-Gal. Ainsi, les colonies formées de bactéries contenant le plasmide muni d'une insertion demeuraient blanches étant donné l'absence de complémentation.

1.3.2 Analyse par digestion enzymatique

Les colonies de bactéries transformées étaient ensemencées dans 3 ml de milieu LB liquide (LB sans bacto-agar) contenant 100 μg/ml d'ampicilline (LB/Ampi.) et incubées une nuit sous agitation à 37°C. L'ADN plasmidique était ensuite extrait des bactéries par lyse alcaline et précipitation à l'éthanol 95% (Sambrook *et al.*, 1989). La présence du fragment d'ADN inséré au plasmide était ensuite mise en évidence par l'analyse en gel d'agarose de l'ADN plasmidique digéré par des enzymes de restriction spécifiques.

1.3.3 Criblage par hybridation in situ

Dans certains cas, la recherche des bactéries recombinantes a été effectuée par criblage des bactéries transformées, par hybridation d'une sonde ADN marquée à la digoxigenine, complémentaire à une portion du fragment d'ADN inséré. Les colonies de bactéries transformées étaient alors repiquées et numérotées en double sur des Pétris LB/Ampi. Après une croissance d'une nuit à 37°C, les colonies étaient transférées sur une membrane de nylon (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Qc, Can.) et lysées (Sambrook et al., 1989) afin de procéder à l'hybridation de la sonde. Le marquage de la sonde à la digoxigenine, l'hybridation de celle-ci et la détection des clones positifs avec l'anticorps anti-digoxigene conjugué à la peroxydase se sont faits à l'aide d'une trousse suivant les protocoles fournis par le manufacturier (DIG DNA labeling and detection kit nonradioactive, Boehringer Mannheim Canada, Laval, Qc, Can.). Les colonies positives à l'hybridation étaient ensuite analysées par digestions enzymatiques pour la confirmation de la présence de l'insertion d'ADN dans l'orientation désirée.

Lorsque les bactéries recombinantes étaient identifiées, celles-ci étaient ensemencées dans 500 ml de milieu LB pour la production en grande quantité du plasmide recombinant. Celui-ci était extrait des bactéries par lyse alcaline et purifié selon la méthode décrite par Nicolas (1993).

2 Stratégies de clonage

2.1 Clonage dans pET21b

La séquence codant pour les acides aminés 154 à 248 (G762) de la gpG du VRS a été clonée dans le vecteur d'expression bactérien pET21b (Novagen, Madison, WI, É-U) (Figure 4). Le fragment G762 a été amplifié par PCR à partir de l'ADN d'un recombinant du virus de la vaccine contenant la séquence codant pour une portion de la gpG du VRS (pUV1, Simard et al., 1995). Les amorces utilisées pour l'amplification (G762 BamH et G762Sal, Tableau 5), contenaient les sites de restriction permettant l'insertion de la séquence G762 dans pET21 au niveau des sites BamH I et Sal I. Le site BamH I de l'amorce en 5' a été situé de façon à placer le cadre de lecture du fragment codant pour la gpG en phase de lecture avec le codon d'initiation de la traduction du vecteur. Le vecteur pET21b a été utilisé afin de permettre la fusion de six résidus histidine à la terminaison carboxylique de la gpG.

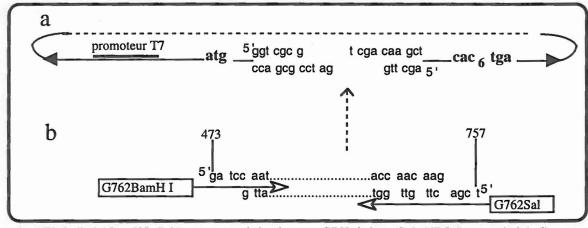


Figure 4: Clonage de la séquence G762 dans pET21b

a) pET21b digéré BamH I-Sal I pour recevoir la séquence G762 de la gpG du VRS. Les extrémités 5' dépassantes générées par la digestion sont indiquées à l'intérieur des flèches () représentant le plasmide.

Les chiffres indiquent la numérotation nucléotidique du cadre de lecture de la gpG du VRS.

/ Paire d'amorces utilisée pour l'amplification.

b) Séquence G762 codant pour les a.a. 168 à 254 de la gpG du VRS amplifiée par PCR, digérée BamH I - Sal I et inserée dans pET21b. Les extrémités 5' dépassantes générées par la digestion sont indiquées au bout des points:(::::::) représentants la séquence de la gpG.

2.2 Clonage dans le vecteur CaMV

Le vecteur CaMV utilisé (pCaBB1, Brisson et al., 1984) pour l'expression dans la plante de différentes sous-unités de la gpG du VRS, est un dérivé du génome de la souche CaMV CMA-184 cloné au niveau du site Sal I dans le plasmide pUC8 (Figure 5). L'ORF II de la souche CMA-184 est absent, à l'exception des cinq premiers codons et du codon d'arrêt de la traduction. Un site Xho I unique est situé directement en amont de ce codon d'arrêt de la traduction.

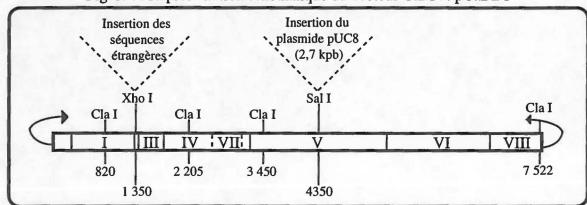


Figure 5: Représentation schématique du vecteur CaMV: pCaBB1

pCaBB1: ____ / génome du CaMV souche CMA-184 cloné dans le phagemide pUC8. Les chiffres romains indiquent la position des cadres de lecture. Les chiffres arabes indiquent la numérotation nucléotidique par rapport à l'origine de réplication du CaMV.

2.2.1 Insertion de séquences codant pour la gpG du VRS dans pCaBB1

Différentes régions de la gpG contenant la séquence codant pour l'épitope de protection du VRS ont été amplifiées par PCR à partir du plasmide pUV1 pour ensuite être insérées dans pCaBB1 (Figure 6). Dans tous ces cas, les amorces utilisées en 5' contenaient le site de restriction Xho I et les amorces en 3' le site de restriction Sal I pour introduire les séquences amplifiées au niveau du site unique Xho I dans pCaBB1. Un codon ATG était ajouté à la séquence des oligonucléotides servant d'amorce en 5' afin de fournir le site d'initiation de la traduction des fragments insérés. Quatre clones CaMV recombinants ont été générés: le clone pCaG502h dont la séquence codant pour la gpG était de 142 pb et se terminait par la séquence codant pour 6 résidus histidine; les clones pCaG666 et pCaG762 dans lesquels des séquences de 163 pb et de 262 pb codant pour la gpG ont été respectivement insérés et finalement le clone pCaG370h dans lequel une séquence de la

gpG de 292 pb a été clonée, celle-ci se terminant avec une séquence codant pour 6 résidus histidine.

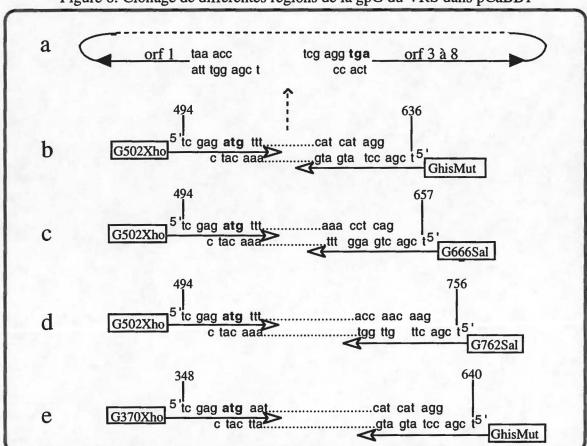


Figure 6: Clonage de différentes régions de la gpG du VRS dans pCaBB1

a) pCaBB1 linéarisé par une digestion Xho I pour recevoir les séquences de la gpG du VRS. Les extrémités 5' dépassantes générées par la digestion sont indiquées à l'intérieur des flèches (représentant le plasmide.

b à e) Séquences de la gpG du VRS amplifiées par PCR, digérées Xho I- Sal I et insérées dans pCaBBI. Les extrémités 5' dépassantes générées par la digestion sont indiquées au bout des points (:::::::) représentant la séquence de la gpG. Les chiffres indiquent la numérotation nucléotidique par rapport au cadre de lecture de la protéine G du VRS. Paire d'amorce utilisée pour l'amplification. b/ pCaG502h, c/ pCaG666, d/ pCaG762, e/pCaG370h

2.2.2 Fusion de la séquence codant pour l'épitope de protection de la gpG du VRS

L'épitope de protection de la gpG du VRS a été fusionné à deux protéines qui avaient déjà été exprimées dans la plante avec succès en utilisant le CaMV: la métallothioneine (MTII) du hamster chinois et la dihydrofolate réductase (DHFR) bactérienne. Pour ce faire, les régions codant pour les MTII et DHFR ont d'abord été amplifiées par PCR en utilisant

une amorce en 5' (CA5, Tableau 5) contenant le codon d'initiation de la traduction et une amorce en 3' (MTIISal ou DHFRSal, Tableau 5) contenant un site de restriction qui permettait de positionner le cadre de lecture de la séquence de fusion dans la phase de lecture du fragment codant pour l'épitope de protection. Les plasmides pCaBB1 contenant la séquence nucléotidique de chacune des protéines (pCaMTII, Lefebvre et al., 1987 et pCaDHFR, Brisson et al., 1984) ont été utilisés pour l'amplification par PCR. Les produits d'amplification (séquences DHFR et MTII) ont été clonés dans un plasmide T/A (pCR 2.1, Invitrogene, Carlsbad, CA, É-U) pour permettre l'insertion des oligonucléotides hybridés codant pour l'épitope de protection (RS1 et RS2, Figure 8) en 3' des séquences DHFR et MTII (Figure 7).

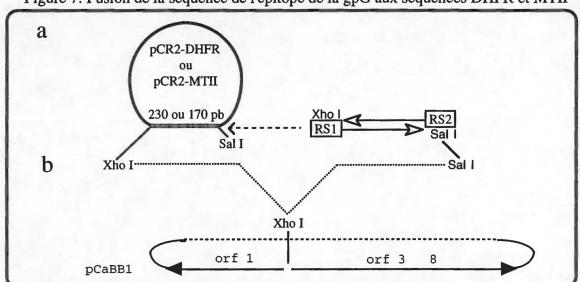


Figure 7: Fusion de la séquence de l'épitope de la gpG aux séquences DHFR et MTII

- a) Insertion des oligonucléotides hybridés RS1 et RS2 codant pour l'épitope de la gpG, au site Sal 1 en 3' de la séquence codante de 230 pb de la prDHFR ou de 170 pb de la prMTII clonés dans pCR2.
- b) Insertion du fragment Xho I Sal I, contenant les séquences fusionnées, dans pCaBB1 linéarisé par une digestion Xho I.

Les oligonucléotides complémentaires codant pour l'épitope G avaient été dessinés de façon à ce que suite à leur hybridation, ils génèrent des extrémités protubérantes compatibles à la ligation avec des extrémités issues d'une digestion avec l'enzyme Sal I ou Xho I (Figure 8). Les séquences fusionnées (DHFRépit et MTIIépit) ont été ensuite excisées du plasmide pCR2.1 par une digestion Xho I - Sal I puis liguées au site Xho I de pCaBB1 (Figure 7) pour générer les clones pCaDHFRépit et pCaMTIIépit

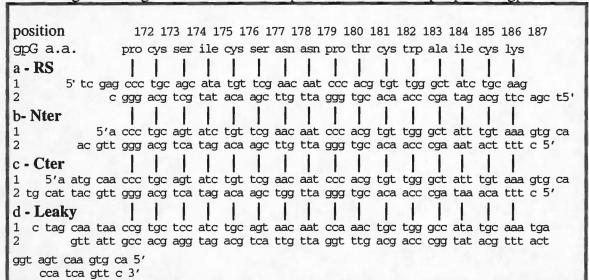


Figure 8: Oligonucléotides utilisées pour les fusions de l'épitope de la gpG

Oligonucléotides complémentaires codant pour l'épitope de protection de la gpG qui ont été hybridés (1 avec 2) et insérés: a) dans pCR2-DHFR et pCR2-MTII digérés Sal I b) dans pBSG235.1 l digéré Pst I c) dans pBSG235.2 digéré Pst I d) dans pBSG219 digéré Avr II - Nsi I

La séquence codant pour la DHFR a aussi été fusionnée à la séquence de 142 pb de la gpG (G502h). Le fragment *Xho* I-Sal I de pCR2-DHFR a été directement inséré au niveau du site *Xho* I en amont de la séquence de la gpG préalablement clonée dans pCaBB1 (pCaG502h, Figure 9).

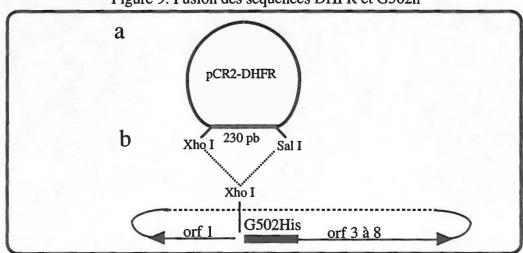


Figure 9: Fusion des séquences DHFR et G502h

- a) Séquence codante de 230 pb de la DHFR amplifiée par PCR et clonée dans pCR2.
- b) Libération de la séquence codant pour la DHFR par une digestion Xho I- Sal I et insertion dans pCaG502h linéarisé par une digestion Xho I.

2.3 Clonage dans le vecteur TMV

Quatre différents clones ont été construits pour exprimer l'épitope de la gpG du VRS en fusion avec les portions N- et C-terminales de la protéine de capside du TMV (cpTMV). Les séquences codant pour l'épitope de protection ont été fusionnées à des séquences codantes de la cpTMV mutées qui étaient clonées dans le plasmide pKS (Figure 10, Turpen et al., 1995). Comme précédemment, des oligonucléotides complémentaires hybridés codant pour l'épitope de la gpG du VRS ont été utilisés (Nter, Cter et Leaky, Figure 8). Ceux-ci ont été insérés dans le site Pst I introduit en 5' (Nter-pBSG235.1) ou en 3' (Cter-pBSG235.2) de la séquence de la cpTMV. La séquence codant pour l'épitope de la gpG a aussi été placée en aval d'un codon ambre qui avait été introduit à la fin du cadre de lecture de la cpTMV (Leaky-pBSG219). Finalement, une plus grande séquence de la gpG du VRS (262 pb) a été fusionnée en 3' du codon ambre de la séquence codante de la cpTMV de pBSG219. Cette région de la gpG, contenant la séquence codant pour l'épitope de protection, avait été amplifiée par PCR à partir du clone pETG762 à l'aide des amorces G762TMV5' et G762TMV3' (Tableau 5).

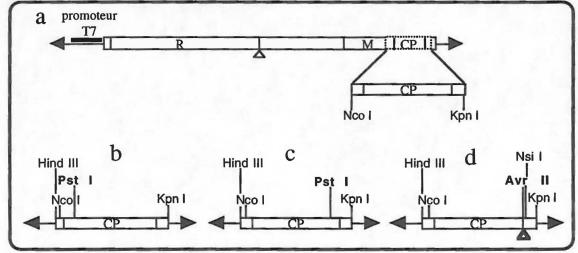


Figure 10: Plasmides ayant servi au clonage dans le vecteur TMV

a) pSNC004: ☐ /ADNc du TMV cloné dans le plasmide pUC19. R/réplicase, M/protéine de mouvement, cp/protéine de capside ▲ / codon ambre

b à d): séquence codant pour la protéine de capside du TMV mutée et clonée dans pKS via les sites Hind III et Kpn I. b/ pBSG235.1, c/ pBSG235.2, d/ pBSG219

Les TMV recombinants ont été reconstitués dans le génome complet du TMV de souche U1 cloné dans le plasmide pUC19 (pSNC004, Figure 10, Chapman University of

Florida, non-publié). Le fragment Nco I - Kpn I de la séquence de cp sauvage du plasmide pSNC004 était remplacé par les fragments Nco I - Kpn I des séquences des cp recombinantes de pBSG (Figure 10). Les clones TMVGNter, TMVGCter, TMVGLeaky et TMVG762 ont été générés suivant cette stratégie.

3 Méthodes d'analyse des protéines

3.1 Electrophorèse en gel de polyacrylamide

3.1.1 Préparation et migration des gels

Les gels de polyacrylamide dénaturants (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) ont été utilisés pour le fractionnement des protéines par électrophorèse. Ceux-ci étaient préparés à l'aide de l'appareil "Mini protean II system" (Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd., Mississauga, On, Can.) tel que décrit par Payment et Trudel (1989). Les gels de séparation étaient constitués de 12% d'acrylamide et les gels de regroupement étaient constitués de 3% d'acrylamide. L'électrophorèse se faisait dans le tampon d'électrophorèse de protéines (25 mM Tris-base, 0,192 M glycine, 0,1% (p/v) dodécyl sulfate de sodium (SDS) à un courant de 25 mA.

3.1.2 Préparation des échantillons

Les échantillons à analyser en gel de polyacrylamide étaient dilués dans le tampon d'échantillon protéines (16 mM Tris-HCl, pH 6,8, 5% (v/v) glycérol, 2% (p/v) SDS, 2% (v/v) 2-\u03b3-mercaptoethanol, 0,01% (p/v) bromophénol bleu) bouillis 5 min à 100°C, mélangés et centrifugés 10 min à 12 000 x g. La détermination de la taille des protéines analysées se faisait par comparaison avec un marqueur de masse moléculaire de protéines (Prestain SDS-PAGE standards, Low Range, Bio-Rad Laboratories Canada, Ltd., Mississauga, On, Can.). Après électrophrèse des échantillons, les protéines étaient soient colorées ou transférées sur une membrane de nitrocellulose pour immunodétection.

3.2 Coloration des protéines fractionnées

3.2.1 Coloration au bleu de Coomassie

Les gels étaient colorés 15 à 30 min dans la solution de coloration (10% (v/v) acide acétique glacial, 45% (v/v) méthanol, 0,5% (p/v) Brillant bleue R250) puis décolorés par trois à quatre rinçages dans la solution décolorante (10% (v/v) acide acétique, 45% (v/v) méthanol).

3.2.2 Coloration à l'argent

Les protéines fractionnées en SDS-PAGE étaient d'abord fixées par une incubation du gel dans la solution de fixation (30% (v/v) éthanol, 10% (v/v) acide acétique glacial) pendant une nuit. Le gel était ensuite rincé et ré-hydraté par deux incubations de 1 hr dans de l'eau tri-distillée-déionisée (H₂O_{tdd}). La coloration des protéines se faisait ensuite dans une solution de 0,1% (p/v) de nitrate d'argent contenant 0,15% (v/v) de formaldéhyde pendant 30 min. Le gel était ensuite rapidement rincé deux fois dans l'H₂O_{tdd} et développé dans une solution de 3% (p/v) Na₂CO₃ contenant 0,3% (v/v) de formaldéhyde. Lorsque le niveau de développement désiré était atteint, la réaction était arrêtée par rinçage du gel dans une solution de 10% (v/v) acide acétique.

3.3 Immunodétection des protéines fractionnées en SDS-PAGE

3.3.1 Transfert des protéines

Les protéine fractionnées en SDS-PAGE étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Bio-Rad Laboratories Canada, Ltd., Mississauga, On, Can.) à l'aide d'un appareil de transfert (Mini trans-blot electrophoretic transfer cell, Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd., Mississauga, Ont., Can). Le transfert se faisait dans un champ électrique de 20 mA pendant 1 hr dans le tampon de transfert (25 mM Tris-base, 0,192 M glycine, 20% (v/v) méthanol).

3.3.2 Immunodétection

Après le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose les sites résiduels de la membrane étaient bloqués par une incubation de 15 min dans la solution bloquante (5% (p/v) lait en poudre dans du TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)). L'anticorps spécifique à la protéine à détecter était ensuite ajouté à la solution bloquante en concentration appropriée (Tableau 6) et incubé 2 hr à température ambiante ou une nuit à 4°C. La membrane était ensuite rincée selon la séquence suivante: 5 et 10 min dans le TBS contenant 0,1% (v/v) de Tween 80 puis 10 et 5 min dans TBS. La membrane était alors incubée 1 hr en présence de l'anti-immunoglobuline G (anti IgG) de souris ou de lapin couplée à la peroxydase de raifort (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, É-U), diluée 1/10 000 dans la solution bloquante. Après le rinçage de la membrane selon la

séquence décrite plus tôt, les complexes antigènes-anticorps étaient révélés par l'ajout d'un substrat chemiluminescent de la peroxydase (Luminol, BM chemiluminescence blotting substrate (POD), Boehringer Mannheim Canada, Laval, Qc,Can.). Le résultat de l'interaction entre l'enzyme et son substrat qui se traduit par une émission de luminescence chimique était capté par une exposition de 5 sec à 5 min sur film à rayon-X (Kodak BioMax Mr, Estman Kodak Company, New Haven, CT, É-U).

Tableau 6: Anticorps utilisés pour immunodétection de protéines sur membrane de nitrocellulose

Anticorps	Origine	Spécificité	Dilution de travail	Source	
18A2B2	souris liquide d'ascite	a.a. 174-187 gpG VRS	1/200	Lab. du Dr Michel Trudel IAF, Laval, Qc, Can.	
Anti-MTII	antisérum de lapin	isoforme 2 métallothionéine de foie de rat	1/1 000	Alpha Gamma Lab. Sierra Madre, CA, É-U	
Anti- cpTMV	antisérum de lapin	cpTMV de souche U1	1/2 000	Biosource Technologies, Inc., Vacaville, CA, É-U	

3.4 Dosage protéique

3.4.1 Bradford

Les concentrations de protéines des différents échantillons, ont été évaluées par la méthode décrite par Bradford en 1976 qui est basée sur la liaison du bleu brillant de Coomassie G-250 au groupement aminé. Les dosages ont été faits à l'aide des réactifs fournis dans une trousse (Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad Laboratories Canada Ltd., Mississauga, Ont., Can.) selon les conditions suggérées par le manufacturier dans un volume de 1 ml ou en micro-puits de 200 µl. L'albumine sérique bovine (BSA) a été utilisée comme standard de concentration protéique.

3.4.2 Densitométrie

L'analyse par densitométrie a été utilisée pour l'évaluation de la concentration de la protéine de la cpTMV présente dans des préparations hétérogènes. Les valeurs densitométriques ont été déterminées pour les signaux bio-luminescents obtenus en immunodétection sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'un Ac spécifique à la cpTMV.

Ces valeurs ont été ensuite converties en concentrations protéiques en utilisant comme standard de concentration la cpTMV purifiée.

3.5 Microscopie électronique

3.5.1 Coloration négative

L'échantillon à analyser était déposé (10 à 50 µl d'une dilution appropriée) sur une grille de cuivre recouverte d'un film de Formvar-carbone. Après 1 à 2 min, la grille était séchée par attouchement sur papier Whatman et 10 µl d'acide phosphotungstique 3% (PTA 3%, pH 6 à 7,4) étaient appliqués sur la grille. Après 30 sec, la grille était asséchée et une seconde imprégnation de 10 sec au PTA 3% était effectuée. La grille sèche était examinée au microscope électronique à transmission (Hitachi, 7 100).

3.5.2 Marquage à l'or colloïdal

Après l'application de l'échantillon sur la grille de cuivre recouverte de Formvarcarbon, celle-ci était rincée sur 4 gouttes de PBS (1X: 2,7 mM KCl, 0,137 M NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) et mise en contact pendant une min avec une solution de 1% d'ovalbumine préparée dans du PBS. La grille était ensuite incubée 2 hr à la température ambiante sur une goutte (50 μl) d'Ac 18A2B2 couplé à l'or (particule de 10 nm, Service de microscopie électronique, IAF, Laval, Qc, Can.) dilué 1/50 dans du PBS. Celle-ci était ensuite rincée deux fois au PBS, deux fois à l'H₂O_{tdd} et séchée par attouchement sur papier Whatman. La grille était finalement imprégnée au PTA 3% tel que décrit plus tôt et examinée au microscope électronique.

4 Expression dans la bactérie

Le plasmide pET21b, développé par la compagnie Novagen pour l'expression de protéines recombinantes dans *E. coli*, a été utilisé pour exprimer une région contenant l'épitope de protection de la protéine G du VRS. Dans le système "pET", l'expression du gène d'intérêt est contrôlée par les signaux de transcription du bactériophage T7. L'expression du gène sera induite en fournissant à la cellule hôte une source de polymérase T7. Donc, après le clonage du gène dans le plasmide pET, celui-ci est transféré dans une souche bactérienne contenant une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur lacUV5. L'expression de la protéine se fera suite à l'induction du promoteur lacUV5 par l'addition d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG).

4.1 Induction de l'expression dans la souche BL21

Pour l'expression d'une région de la gpG de VRS dans *E. coli* le clone pETG762 a été introduit par choc thermique dans la bactérie BL21(DE3, B F-, *dcm*, *ompT*, *hsdS*, (*rB-*, *mB*) *gal*, 1). Les bactéries recombinantes BL21-pETG762 ont été utilisées pour la préparation d'une pré-culture (10 ml LB/Ampi. inoculé avec une colonie, incubé une nuit à 37°C avec agitation) afin de procéder à l'induction de l'expression de la gpG recombinante.

4.1.1 Induction

Pour l'induction, une culture était préparée par inoculation de milieu LB/Ampi. (10 à 500 ml) avec la pré-culture à raison de 1%. Après une incubation d'environ 2 hr à 37°C avec agitation ou jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ (densité optique à 600 nm) de 0,6 à 1,0, l'IPTG était ajouté en concentration finale de 1 mM. La culture était maintenue pendant 3 hr à 37°C avec agitation. Des échantillons de un ml étaient prélevés avant l'ajout de l'IPTG (T0) et à différents temps pendant l'induction.

4.1.2 Analyse des échantillons

Les échantillons prélevés au cours de l'induction centrifugée de 5 min à 12 000 x g. Le culot bactérien était resuspendu dans 100 µl de tampon d'échantillon protéines était déposé sur SDS-PAGE. Les protéines fractionnées étaient colorées au bleu de Coomassie ou transférées sur une membrane de nitrocellulose pour immunodétection.

4.2 Purification des corps d'inclusion bactériens

La protéine sur-exprimée dans *E. coli* peut se retrouver dans la bactérie de façon soluble ou insoluble formant des corps d'inclusion (c.i.). Pour déterminer dans quelle fraction se retrouvait la protéine induite, les corps d'inclusion ont été séparés des protéines solubles de la façon suivante:

Après l'induction, les bactéries qui étaient portées au culot par une centrifugation de 10 min à 2 000 x g, étaient rincées dans 20 ml de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) par 100 ml de culture. Après resuspension, les bactéries étaient centrifugées à nouveau pendant 10 min à 2 000 x g. Le culot bactérien était resuspendu avec 4 ml de tampon de lyse contenant 5 mg/ml de lysozyme et incubé 20 min à la température ambiante. La lyse bactérienne était ensuite complétée par trois cycles de congélation/décongélation (-70°C / 37°C) et l'ADN bactérien était brisé par 6 cycles de 30 sec de sonication (Braunsonic 2 000, Branson, Shelton, CT, É-U) à puissance maximale. Les fractions de matériel soluble et insoluble étaient par la suite séparées par une centrifugation de 20 min à 8 000 x g. Les corps d'inclusion bactériens étaient portés au culot étaient alors lavés par resuspension et centrifugation de 20 min à 8 000 x g dans 4 ml de tampon de lyse contenant 4 M d'urée puis 5,0 ml de PBS pour finalement être resuspendus dans 500 μl de PBS (par 100 ml de culture).

5 Expression dans la plante

5.1 Plantes

Les plantes utilisées au cours de ces travaux étaient *Brassica campestri*s cv. "Just Right" et *Nicotina benthamiana*. La germination et la croissance des plantes se sont faites dans une pièce isolée à une température d'environ 25°C sous un éclairage contrôlé (16 hr de lumière). Les plantes étaient arrosées et fertilisées tous les deux ou trois jours.

5.2 Infection des plantes

5.2.1 Préparation des vecteurs

5.2.1.1 Clones CaMV

Les plasmides CaMV (pCa) étaient digérés par l'enzyme Sal I pour libérer le génome viral de la portion du plasmide pUC19 avant l'inoculation des plantes.

5.2.1.2 Clones TMV

Les clones TMV étaient transcrits *in vitro* pour produire l'ARN infectieux servant à l'inoculation des plantes. Avant la transcription, les plasmides TMV étaient digérés par l'enzyme Kpn I afin de libérer l'extrémité de la séquence du promoteur du phage T7. La réaction de transcription composée de la façon suivante dans un volume final de 25 µl était incubée à 37°C pendant 1 hr:

- 1,5 µg d'ADN linéarisé par digestion Kpn I
- 2,5 µl de tampon de transcription* 10X (400 mMTris-HCL pH 8,0, 150 mM MgCl₂, 50 mM DTT
- 1 μl de mélange NTP contenant 20 mM ATP*, 20 mM GTP*,
 20 mM UTP* et 20 mM CTP*
- 2,5 μl de DTT 0,1 M
- 1 μl de BSA 1 μg/μl
- 2,5 μl d'analogue de coiffe (m⁷G(5')ppp(5')G*) 5 mM
- 2 μl d'inhibiteur d'ARNase* 25 U/ μl
- 1 µl de GTP 5 mM
- 5 μl d'ARN polymérase T7* 10 U/μl

^{*}Pharmacia Canada Inc., Baie d'Urfée, Qc., Can.

Le GTP 5 mM et l'ARN polymérase T7 étaient ajoutés après une incubation de 5 min à 37°C.

5.2.2 Inoculation des plantes

5.2.2.1 Infection primaire

Des plantes âgées entre deux et quatre semaines étaient utilisées pour les infections. Les plus jeunes feuilles (deux à quatre) étaient inoculées. Les feuilles destinées à être inoculées étaient d'abord saupoudrées avec de l'oxyde d'aluminium (280 Grit, MDC Industries, Inc., Philadelphia, PA, É-U). Les réactions de digestion (pour les clones CaMV) et de transcription (pour les clones TMV) étaient diluées 1/2 dans du PBS 0,1X et 20 µl étaient directement déposés sur la feuille puis étendus sur la surface de la feuille avec une légère pression des doigts. Une fois les inoculums séchés, les feuilles étaient rincées avec de l'eau distillée.

5.2.2.2 Infection secondaire

Les infections ont été passées d'une plante à l'autre en inoculant des plantes saines avec un broyât de feuilles provenant de plantes infectées. Les feuilles infectées étaient prélevées et broyées dans un mortier en présence de PBS 0,1X à raison de 1 g de feuille par ml de PBS. Le broyât était appliqué à l'aide des doigts sur les jeunes feuilles de plantes saines préalablement saupoudrées de l'oxyde d'aluminium. Comme pour les infections primaires, lorsque l'inoculum était séché, les feuilles étaient rincées avec de l'eau distillée.

5.3 Extraction de l'ADN viral

L'ADN viral a été extrait et purifié à partir de 1 à 3 g de feuilles infectées par les recombinants CaMV. Le protocole utilisé est une adaptation de la méthode décrite par Gardner et Shepherd en 1980.

Les feuilles prélevées étaient homogénéisées dans 10 μl de tampon d'homogénéisation (0,2 M Tris-HCl pH 7, 20 mM EDTA, 1,5 M urée) à l'aide d'un homogénéisateur (Polytron, PT, tige 12 mm, Brinkmann Instruments, Inc., Westtbury, NY, É-U). L'homogénat était centrifugé 20 min à 8 000 x g et le surnageant obtenu était filtré sur une membrane miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA, É-U) puis ultra-centrifugé 2 hr à 100 000 x g sur un coussin (2 ml) de sucrose 15% préparé dans le tampon

d'homogénéisation. Le culot issu de l'ultracentrifugation était resuspendu pendant une nuit dans le tampon DNAse (0,1 M Tris-HCl pH 7, 2,5 mM MgCl₂). Le culot resuspendu était clarifié par une centrifugation de 2 min à 5 000 x g et l'ADN cellulaire était éliminé de la préparation virale par un traitement à la DNase (500 ng /μl). Après 10 min de digestion à 37°C, la réaction était arrêtée par l'addition d'EDTA en concentration finale de 10 mM. Les protéines étaient ensuite éliminées par une digestion de 15 min à la protéinase K (500 μg/μl) à 65°C en présence de 1% de SDS et extraites par deux traitements au phénol:chloroforme (Sambrook et al., 1989). L'ADN viral était finalement concentré et les sels éliminés par une précipitation à l'éthanol 95% (Sambrook et al., 1989) puis resuspendu dans 50 μl d'H₂O_{tdd}.

5.4 Extraction de l'ARN viral

L'ARN viral a été extrait des feuilles infectées par le TMV à l'aide d'un traitement au TRIzol tel que suggéré par le manufacturier (TRIzol reagent, Gibco BRL, Life technologies, Burlington, On, Can.). L'ARN était extrait à partir d'échantillons de 20 mg de tissus qui étaient congelés à -70°C et broyés dans 1 ml de TRIzol. L'ARN obtenu après la précipitation à l'isopropanol était resuspendu dans 10 µl d'H₂O_{tdd} traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC).

5.4.1 Analyse par RT-PCR

5.4.1.1 Réaction de transcription inverse

La réaction de transcription inverse se faisait à partir de l'ARN extrait des plantes et était initiée à l'aide d'amorces aléatoires de la façon suivante:

L'ARN (5 μl) et les amorces (1 μl pd(N) 6, 80 ng/μl) étaient d'abord incubés 10 min à 25°C dans un volume de 20 μl. Le tampon de transcription (8 μl de 5X, Gibco BRL, Life technologies, Burlington, On, Can.), le DTT (4 μl de 0,1 M) et les dNTP (1 μl d'un mélange contenant 20 mM dATP, 20 mM dCTP,20 mM dTTP,20 mM dGTP) étaient ajoutés à la réaction qui était ensuite incubée à 70°C pendant 5 min. Un μl de transcriptase inverse (SuperScript RNaseH-Reverse Transcriptase, Gibco BRL, Life technologies, Burlington, On, Can.) était ensuite ajouté et la réaction était incubée 1 hr à 42°C.

5.4.1.2 Amplification du produit de transcription inverse

La région d'ADN à analyser était amplifiée par PCR à partir du brin d'ADNc synthétisé par la réaction de transcription inverse. La réaction de PCR constituée des composantes décrites à la section 1.1, se faisait à partir de 20 µl de la réaction de transcription inverse et était initiée à l'aide d'amorces spécifiques (TB25'Cla et pKNot, Tableau 5) bordant la séquence du gène de la cpTMV.

5.4.1.3 Analyse du produit de RT-PCR

Les produits d'amplification ont été analysés en gels de polyacrylamide 5% nondénaturants préparés dans un tampon TBE (89 mM Tris-borate et 2 mM EDTA) (Sambrook et al., 1989). Après l'électrophorèse dans le tampon TBE, le gel était coloré dans une solution de 0,1% de BET et l'ADN amplifié était visualisé à l'aide d'un trans-illuminateur.

La présence des séquences insérées au génome du TMV a été confirmée par le séquençage des produits de PCR clonés dans un plasmide T/A (pGEM-T, Promega, Fisher Scientific, Ltd., Nepean. On, Can.).

5.5 Extraction des protéines totales de plante

Les échantillons permettant l'analyse des protéines extraites des plantes infectées étaient préparés de la façon suivante: 40 mg de feuilles étaient prélevés, placés dans un tube de 1,5 ml et congelés à -70°C. Les feuilles congelées étaient ensuite broyées à l'aide d'un piston puis homogénéisées dans 80 µl de PBS. Le tampon d'échantillon de protéines était ensuite ajouté (20 µl de 5X) à l'homogénat et l'échantillon était bouilli pendant 5 min à 100°C puis mélangé. Après une centrifugation de 5 min à 12 000 x g, 10 à 20 µl du surnageant étaient déposés sur SDS-PAGE pour le fractionnement des protéines. Le gel était ensuite coloré ou utilisé pour le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose et immunodétection.

5.6 Purification du TMV

La purification du TMV à partir des plantes infectées se faisait sur 1 à 6 g de feuilles infectées. Les tissus prélevés étaient homogénéisés dans du PBS contenant 0,1% (v/v) de 2-ß-mercaptoéthanol à raison de 2 ml par g de feuille. Après une première homogénéisation, 1 ml de chloroforme par g de feuille était ajouté et l'échantillon était homogénéisé à

nouveau. La fraction soluble était séparée du matériel insoluble par une centrifugation de 20 min à 6 000 x g. Le surnageant était ensuite filtré sur une membrane miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA, É-U) et 4% (p/v) de polyéthylène-glycol (PEG) ainsi que 0,25 M de NaCl étaient ajoutés. Après une incubation de 2 hr à 4°C avec agitation, le précipité viral était sédimenté par une centrifugation de 20 min à 10 000 x g. Le culot viral était finalement resuspendu pendant une nuit à 4°C dans 50 µl de PBS/g de feuilles.

6 Étude de l'immunogénicité des protéines recombinantes

L'évaluation du potentiel protecteur des différentes préparations de protéines recombinantes contenant l'épitope de protection de la gpG du VRS, a été effectuée chez la souris. L'antigénicité des protéines injectées était déterminée par l'évaluation du titre en anticorps spécifiques au VRS, induit par l'immunisation. L'immunogénicité était évaluée par la capacité de ces mêmes protéines à protéger les poumons des souris contre l'infection par le VRS sauvage.

6.1 Animaux

Les souris BALB/c (H-2^d, Charles River, St-Constant, Qc, Can.) étaient soit des mâles ou des femelles âgés entre 28 et 40 jours. Elles ont été maintenues dans les conditions réglementaires et adéquates pour l'expérimentation animale au sein de l'animalerie de l'Institut Armand-Frappier (Laval, Qc., Can.). Pour chaque antigène évalué, un groupe de cinq souris était utilisé.

6.2 Immunisation

Les antigènes évalués ont été préparés tel que décrit plus tôt (sections 4.2 et 5.6). Trois ou quatre doses, constituées de 100 µl d'antigène et 100 µl d'adjuvant ont été injectées par voie intra-péritonéale à des intervalles de deux semaines. L'adjuvant de Freund complet était utilisé pour la première injection et l'adjuvant de Freund incomplet était utilisé pour les injections subséquentes.

6.3 ELISA

6.3.1 Prélèvement des sérums

Le titre en anticorps dirigé contre le VRS ou le TMV dans les sérums des souris immunisées, était déterminé par ELISA. Les échantillons sanguins analysés étaient prélevés au niveau du plexus rétro-orbital, au quatorzième jour après la dernière immunisation. Les sérums ont été recueillis après une centrifugation des échantillons sanguins à 2 500 x g pendant 15 min.

6.3.2 Préparation de l'antigène ELISA

Le VRS de souche Long (ATCC VR-26, American Type Collection, Rockville, MD, É-U) a été utilisé comme antigène en ELISA. Il a été préparé dans les laboratoires du Dr. Michel Trudel (Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Can.) tel que décrit par Corbeil (1997). Le virus était dilué en concentration de 10 μg/ml dans du PBS (le PBS utilisé pour les tests ELISA ne contenait pas de calcium ni de magnésium) et déposé dans un plateau de 96 puits à raison de 100 μl /puits. Le peptide G174-187 couplé au KLH (Trudel *et al.*, 1991) a aussi été utilisé comme antigène en ELISA. Celui-ci était dilué à 10 μg/ml dans du PBS et 100 μl/puits était déposé pour absorption. Pour la détection des anticorps spécifiques au TMV, le TMV purifié à partir de plantes infectées a été utilisé comme antigène. Celui-ci a été purifié tel que décrit à la section 5.6 et était déposé en plateaux pour absorption à raison de 1 μg/puits.

6.3.3 Procédure

Après l'absorption de l'antigène pendant une nuit à 4°C, les plateaux étaient vidangés, les puits lavés trois fois avec la solution de lavage (PBS contenant 0,05% de Tween 80) et les sites d'absorption résiduels des puits étaient bloqués avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) préparé dans du PBS 1X (100 μl/puits, incubé 1 hr à la température ambiante). La solution bloquante était ensuite vidangée et les sérums des souris immunisées étaient dilués en série dans du PBS contenant 10% de SVF et 0,2 % de Tween-20 à raison de 100 μl/puits. Après une incubation de deux heures à la température ambiante, les puits étaient lavés trois fois et l'anticorps couplé à la peroxydase de raifort dirigé contre les IgG de souris (Sigma, St.-Louis, MO, É-U) était ajouté (100 µl/puits d'une dilution 1/750 dans du PBS, 10% SVF, 0,2 % de Tween-20). Ce dernier était incubé 2 hr à la température ambiante. Après trois lavages des puits, la réaction antigène-anticorps était révélée par l'ajout du substrat de la peroxydase (2 mM O-phénylène diamine, 3 mM H₂O₂) préparé dans un tampon citrate pH 5 (0,05 M acide citrique et 0,1 M Na₂HPO₄). La réaction de révélation était arrêtée par l'addition de 100 µl/puits de HCl 0,1 N et la réaction colorimétrique était mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à faisceaux verticaux à une longueur d'onde de 492 nm.

Le titre en anticorps des sérums était exprimé par la réciproque de la plus haute dilution du sérum où la densité optique lue était supérieure à la moyenne des densités optiques du sérum témoin additionnée de deux fois la valeur de son écart-type.

6.4 Test de protection

6.4.1 Épreuve virale

Deux semaines après la dernière immunisation les souris étaient soumises à une épreuve virale avec le virus sauvage. Les souris étaient inoculées à l'entrée de la voie nasale avec 50 µl de VRS (10^{6.1} DICT₅₀) produit sur cellules HEp-2 infectées (lignée continue de carcinome humain, ATCC CCL-23, American Type Culture Collection, Rockvilles, MD, É-U), (Corbeil, 1996).

6.4.2 Évaluation du niveau de protection

Le niveau de protection apporté par les antigènes évalués était déterminé par leur capacité à induire une diminution du taux de réplication virale dans les poumons des animaux immunisés. Ainsi, cinq jours après l'épreuve virale, les poumons des souris sacrifiées étaient prélevés afin de déterminer le titre du VRS au niveau des tissus pulmonaires. Pour se faire, les tissus prélevés étaient broyés dans le milieu de prélèvement (0,1% (v/v) milieu Hank 199 (Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, On, Can.), 25 mM HEPES, 50µg/ml gentamycine, 0,2% (v/v) fongizone, 30 mM MgCl₂, 0,218 M sucrose) à raison de 10 ml de milieu par g de poumon. Le surnageant des broyâts de poumon, obtenu suite à une centrifugation de 15 min à 6 000 x g, était dilué en série dans le milieu de croissance (47% (v/v) milieu Hank 199, 47% (v/v) MEM Base Earle (Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, On, Can.) 250 mM bicarbonate de sodium, 50 µg/ml gentamycine (Shering, Pointe-Claire, Qc, Can.)). Chaque dilution était ensuite appliquée en quadriplata sur un feuillet de cellules HEp-2 en plateaux de 24 puits (1 à x 10⁴ cellules/puits, mis en culture deux jours avant l'inoculation) à raison de 200 µl/puits. Après un contact de 90 min, 1,5 ml/puits de milieu de croissance contenant 1 % (v/v) SVF était ajouté. La lecture des plateaux était effectuée après 5 et 10 jours d'incubation à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% (v/v) de CO₂. Le nombre de puits infectés pour chacune des dilutions des échantillons était déterminé par la visualisation sous microscope de l'effet cytopathique caractéristique à l'infection par le VRS. Le titre viral au niveau de

chacun des échantillons était calculé par la méthode de Karber (Payment et Trudel, 1989) et exprimé par l'inverse de la dilution de l'échantillon où 50% des puits inoculés étaient infectés (DICT₅₀). La limite inférieure de détection de ce test est d'une DICT₅₀ de 1.70 log₁₀/g de poumon.

1 Expression de l'épitope G du VRS dans la bactérie

Une région de la glycoprotéine G (gpG) du VRS a été exprimée chez *E. coli* dans le but d'immuniser des souris afin de vérifier le potentiel protecteur de l'épitope G lorsque présenté dans ce contexte.

1.1 Expression via pET21b

Le gène codant pour les acides aminés 154 à 248 de la gpG, comprenant l'épitope de protection, a été inséré dans le plasmide pET21b pour générer le clone pETG762. Suite à l'introduction du clone pETG762 dans la souche "E. coli"BL21 (DE3), nous avons procédé à l'induction de l'expression du gène G762. Les conditions d'induction ont d'abord été ajustées sur des volumes de culture de 10 mL par l'analyse en SDS-PAGE des échantillons prélevés à différents temps au cours de l'induction. La Figure 11 présente les résultats obtenus suite à une induction de deux heures à 37°C.

Dans le lysat bactérien prélevé deux heures après l'ajout de l'IPTG, on voit apparaître une protéine (Figure 11: a, puits 2) qui est absente du lysat bactérien prélevé avant l'addition de l'IPTG (Figure 11: a, puits 1). La distance de migration de cette protéine, en comparaison avec les marqueurs de poids moléculaires, correspond à la taille attendue pour la traduction de la séquence de 282 pb de la portion de la protéine G qui a été introduite dans le vecteur d'expression.

Afin de confirmer la présence de l'épitope chez cette protéine sur-exprimée chez E. coli, nous avons procédé au transfert sur membrane de nitrocellulose de ces mêmes protéines fractionnées en SDS-PAGE et effectué une immunodétection à l'aide de l'anticorps monoclonal (AcM) 18A2B2 dirigé contre l'épitope de protection de la gpG. Cette même protéine a été reconnue par l'AcM 18A2B2 (Figure 1: b, puits 2) alors qu'aucune protéine n'a été reconnue dans le lysat bactérien prélevé avant l'induction (Figure 11: b, puits 1). Il s'agissait donc effectivement de la région de la gpG du VRS synthétisée suite à l'induction par l'IPTG.

1.2 Purification de la protéine G762

Pour la purification de la prG762 nous avons, dans un premier temps, vérifié la solubilité de la protéine induite suite à la lyse des bactéries. Une très faible quantité de prG762 était soluble et la majorité se retrouvait parmi les protéines bactériennes insolubles sous forme de corps d'inclusion (c.i.). Ainsi, pour l'immunisation des souris, nous avons purifié les c.i., de la façon décrite dans la section matériel et méthodes. A partir d'un litre de culture, il a été possible d'obtenir jusqu'à 50 mg de c.i.G762 purifiés (Figure 11: a et b, puits 3). Les c.i. purifiés ont été utilisés pour l'immunisation des souris.

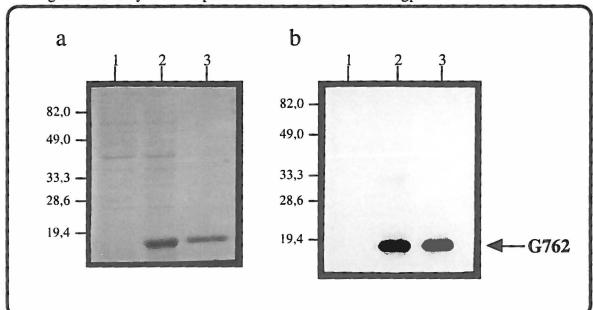


Figure 11: Analyse de l'expression d'une sous-unité de la gpG du VRS chez E. coli

Les échantillons de culture bactérienne ont été prélevés avant l'ajout de l'IPTG (puits 1) et 2 hr après l'ajout de l'IPTG (puits 2). Les lysat bactériens ont été fractionnés en SDS-PAGE puis analysés par coloration au bleu de Coomassie (a) et en immunodétection avec l'AcM 18A2B2(b). Dans les puits 3, 0,2 µL des corps d'inclusion G762 purifiés ont été déposés. Les chiffres à gauche de chacun des gels indiquent la position des marqueurs de poids moléculaire en kDa.

1.3 Évaluation du potentiel protecteur des c.i.G762

Cinq souris ont été immunisées avec trois doses contenant 100 µg de c.i.G762 purifiés. Les souris témoins (5) ont été immunisées avec une préparation de c.i. issue d'une induction sur une culture de bactéries contenant le plasmide pET sans insertion (c.i.pET). Les injections ont été effectuées à des intervalles de deux semaines.

Deux semaines après l'administration de la troisième dose, un titre élevé en anticorps dirigés contre le VRS a été détecté en ELISA dans les sérums des souris immunisées avec les c.i.G762 (Tableau 7). À une dilution de 1/100 des sérums de souris immunisées avec c.i.pET, aucun anticorps contre le VRS n'a été détecté.

Les souris immunisées avec les c.i.G762 ont été protégées de l'infection par le VRS. En effet, cinq jours après l'épreuve avec le VRS Long, aucun titre en VRS n'a été détecté dans les poumons de ces dernières (Tableau 7). Tel qu'attendu, un titre élevé en VRS a été détecté au niveau des poumons des souris témoins immunisées avec les c.i.pET, indiquant que l'épreuve virale avait été efficace et que ces dernières étaient susceptibles à l'infection par le VRS Long.

Tableau 7: Évaluation de l'immunogénicité des c.i.G762

	THE RESERVE OF THE PERSON NAMED IN COLUMN 1997 P.		-	
Immunisation	Titre ELISA ¹	Titre VRS ²		
c.i. pETG762	1/25 600	<1,70		
c.i. pET21b	<1/100	3,82		

¹⁾ Le titre en Ac reconnaissant le VRS est exprimé par la dilution du sérum dont la densité optique est supérieure à la moyenne des densités optiques obtenues pour les sérums témoins additionnée de deux fois la valeur de l'écart type.

Ainsi, l'épitope G du VRS exprimé sous forme de protéine recombinante dans un système bactérien a conservé sa capacité à protéger les souris contre l'infection par le VRS.

²⁾ Le titre viral est la DICT50 exprimée en log10/g de poumon

2 Expression de l'épitope G du VRS dans la plante via le virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV)

Des séquences couvrant différentes régions de la gpG du VRS ont été introduites dans le vecteur CaMV pCaBB1 pour expression dans la plante (Figure 12). Le plus court fragment introduit, G502h, code pour les a.a. 168 à 203 incluant les a.a. 174 à 187 qui forme l'épitope de protection de la gpG. Les autres fragments insérés comprenaient cette même région de la gpG à laquelle étaient ajoutées les séquences codant pour les 44 a.a en amont (G370h) ou les séquences codant pour les 19 a.a. (G666) et 51 a.a. (G762) en aval de l'épitope de protection. Une séquence codant pour six résidus histidine avait été ajoutée en 3' de la séquence G502h et G370h pour l'éventuelle purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel-sépharose.

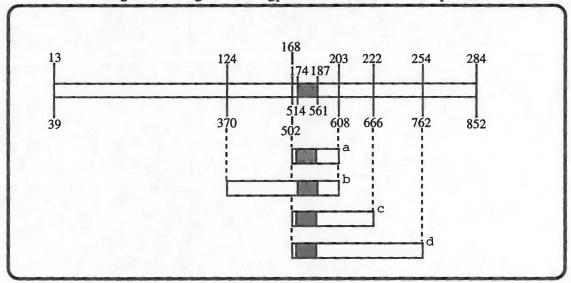


Figure 12: Régions de la gpG du VRS clonées dans pCaBB1

☐ /ADNc de la pG. ☐ /Région codant pour l'épitope de protection. Les chiffres du haut représentent la position des a.a. de la gpG. Les chiffres du bas correspondent à la numérotation nucléotidique par rapport au cadre de lecture de la gpG. a/ G502h, b/ G370h, c/ G666, d/ G762.

Les stratégies utilisées pour l'addition de ces séquences dans le vecteur pCaBB1 ont été décrites dans le chapitre matériel et méthodes. Suite à l'obtention des clones recombinants, nous avons procédé à l'infection des plantes. Pour toutes les expériences, six plantes étaient inoculées pour chaque CaMV recombinant en parallèle avec six autres plantes qui étaient inoculées avec le virus sauvage (pCaBB1 sans insertion).

2.1 Infectivité des CaMV recombinants

Les CaMV recombinants étaient aussi infectieux que le CaMV sauvage puisque plus de 90% des plantes *Brassica campestris* cv. "Just Right" inoculées ont développé des symptômes caractéristiques à l'infection par le CaMV. Sur les feuilles inoculées avec le CaMV sauvage, des régions de mosaïque apparaissaient entre les deuxième et quatrième semaines suivant l'inoculation. Toutefois, chez les plantes infectées avec les CaMV recombinants, ces symptômes locaux apparaissaient avec un léger délai pouvant aller de trois à sept jours en comparaison avec les plantes infectées avec le CaMV sauvage. Dans tous les cas, la présence de symptômes sur les nouvelles feuilles formées démontrait la capacité des virus recombinants à se propager de façon systémique.

2.2 Stabilité des séquences introduites dans le génomes du CaMV

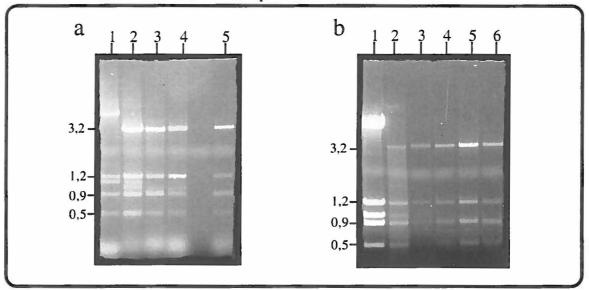
Suite à l'apparition des symptômes, l'ADN viral était extrait des plantes infectées afin de vérifier la stabilité des séquences de la gpG ajoutées au CaMV. L'ADN viral extrait était soumis à une digestion par les enzymes de restriction *Xho* I et *Cla* I, puis fractionné en gel d'agarose en parallèle avec l'ADN plasmidique utilisé pour l'inoculation des plantes ayant été digéré avec les mêmes enzymes de restriction. La digestion *Xho* I- *Cla* I coupe le génome du CaMV en cinq fragments (Figure 5) dont un de 855 pb co-migrant, sur gel d'agarose 1%, avec un fragment de 820 pb. Chez les virus recombinants, le fragment de 855 pb de ce doublet migre moins rapidement puisqu'il contient les séquences ajoutées. Notons que l'ADN plasmidique contient les séquences du plasmide pUC8 et le fragment de 4,0 kpb migre donc moins rapidement.

2.2.1 Stabilité du clone pCaG370h

Pour le clone pCaG370h il est possible de voir avec l'ADN plasmidique le fragment de 1,1 kpb contenant la séquence intacte de 258 pb codant pour la gpG (Figure 13: a, puits 1). L'analyse de l'ADN viral extrait des plantes infectées avec ce clone nous montre que le gène de la gpG ajouté au CaMV a été excisé au cours de l'infection. En effet, le fragment de 1,1 kpb contenant l'insertion était toujours présent 33 jours après l'infection mais n'était pas stoechiométrique avec les autres fragments du génome viral (Figure 13: a, puits 2). De plus, au niveau dans la même extraction, on peut voir apparaître une bande additionnelle de plus

petite taille. À 41 et 54 jours après l'infection (Figure 13: a, puits 3 et 4), le fragment de taille originale n'était plus visible et seulement le fragment tronqué était présent.

Figure 13: Analyse de l'ADN viral extrait des plantes infectée avec les clones pCaG502h et pCaG370h



L'ADN viral extrait des plantes 33, 41, 54 et 61 jours (puits 2, 3, 4 et 5 respectivement) après l'inoculation des plantes avec les clones recombinants pCaG370h (a) et pCaG502h (b) a été digéré avec les enzymes *Xho* I et *Cla* I puis fractionné sur gel d'agarose 1%. L'ADN plasmidique ayant servi à faire les infections respectives (puits 1) et l'ADN extrait des plantes 61 jours après l'inoculation avec le virus sauvage (puits 6) ont été fractionnés en parallèle après digestion *Xho* I et *Cla* I. La taille des fragments digérés évaluée par rapport à la migration des marqueurs de taille moléculaire est indiquée en kpb à gauche

2.2.2 Stabilité du clone pCaG502h

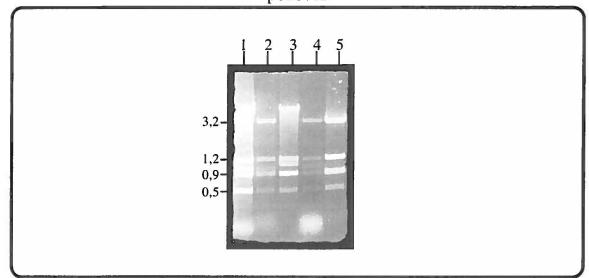
L'analyse de la digestion *Xho* I- *Cla* I de l'ADN extrait 33 jours après l'infection avec le clone pCaG502h met en évidence la sous-représentation, par rapport aux autres fragments du génome viral, de la bande de 970 pb qui contient la séquence de 124 pb de la gpG (Figure 13: b puits 2). L'intensité de cette bande diminue progressivement au cours de l'infection et le patron de digestion observé après 50 jours d'infection devient identique à celui de l'ADN extrait des plantes infectées avec le virus sauvage (Figure 13: b, puits 3 à 6). La plus petite région de la gpG insérée au CaMV a donc été complètement supprimée au cours de l'infection.

2.2.3 Stabilité des clones pCaG666 et pCaG762

L'analyse de l'ADN viral extrait des plantes infectées avec les clones pCaG666 et pCaG762 nous a permis de constater que ces séquences de la gpG étaient elles aussi

instables. En effet, le fragment qui se retrouvait initialement à 1,0 kpb dans pCaG666 (Figure 14: puits 1) était présent en moins grande quantité dans l'ADN viral extrait 40 jours après l'infection avec ce clone (Figure 14: puits 2). Chez l'ADN viral extrait des plantes infectées avec le clone pCaG762, le fragment contenant l'insertion (Figure 14: puits 4) était de plus petite taille que celui à 1,1 kpb se retrouvant dans le plasmide ayant servi à effectuer l'inoculation (Figure 14: puits 3).

Figure 14: Analyse de l'ADN viral extrait des plantes infectées avec les clones pCaG666 et pCaG762



L'ADN viral extrait des plantes 40 jours après l'inoculation avec les clones recombinants pCaG666 (puits 2) et pCaG762 (puits 4) ainsi que l'ADN plasmidique pCaG666 (puits 1) et pCaG762 (puits 3) et l'ADN viral extrait 40 jours après l'infection des plantes avec le virus sauvage (puits 5) ont été fractionnés sur gel d'agarose 1% après digestion avec les enzymes Xho I et Cla I. La taille des fragments digérés évaluée par rapport à la migration des marqueurs de taille moléculaire est indiquée en kpb à gauche.

Notons que dans tous les cas, uniquement les fragments contenant les séquences de la gpG étaient instables puisque tous les autres fragments des génomes viraux extraits des plantes infectées étaient stoechiométriques et migraient à la taille attendue quelque soit le stade d'infection des plantes.

2.3 Étude de l'origine des instabilités

Dans le but de mieux comprendre l'origine des instabilités observées et afin d'être en mesure d'établir une nouvelle stratégie pour l'obtention de clones CaMV stables codant pour l'épitope de protection de la gpG, nous avons procédé au clonage et au séquençage des fragments instables. Les fragments d'ADN de tailles intermédiaires contenant les séquences instables dans l'ADN viral issu de l'infection avec le clone pCaG370h ont été prélevés du

gel d'agarose et purifiés. Ceux-ci ont été clonés dans pKS pour être séquençés. Nous avons tenté de prélever le plus de bandes de différentes tailles afin d'obtenir une plus grande représentation possible des étapes de délétion.

2.3.1 Séquences des fragments instables

Sur neuf clones séquencés, trois populations de délétions ont été identifiées (Figure 15). Un des neuf clones possédait une courte délétion de 49 pb, quatre clones avaient une délétion de 169 pb et quatre autres clones avaient une délétion de 189 pb. Les deux plus grandes délétions incluaient la séquence codant pour l'épitope de protection.

116 134 1-acaacaacaaccaaacac**aaccca**gcaag{accaccaaacaaacccaataatgattttca a-acaacaacaacccaaacac **aaccca**ataatgattttca dél. 49 pb 255 -acaacccaaacacaacccag caagcccactacaa (aagaaaaccaccaccaagcctacggat b-acaacccaaacacaacccag caagcctacggat dél. 169 pb 235 i-aaacctgcaacccacac**agtca**a**ga**ctaaaa{aataccaaacaaaagccaggaaagaaaa c-aaacctgcaacccacaac ag cca gga aagaaaa dél. 189 pb

Figure 15: Séquences des fragments G370h instables

Séquences bordant les délétions de 49 pb (a), 169 pb (b), 189 pb (c). i/ séquences initialement insérées dans pCaBB1. Les chiffres indiquent la numérotation nucléotidique par rapport à la séquence de la gpG insérée. Les séquences répétitives bordant les délétions sont indiquées en caractères gras.

Par l'analyse des séquences des différentes populations de délétion, nous avons constaté que toutes les délétions se situaient dans des régions particulièrement riches en résidus A et C (Figure 15). De plus, les délétions de 49 pb et 169 pb étaient bordées par des séquences répétées directes alors que celles de 189 pb étaient bordées par des séquences partiellement répétitives. Nous pouvons aussi remarquer que les délétions semblaient être initiées dans une région où se retrouvaient quelques résidus G parmi tous les résidus A et C.

La séquence codant pour l'épitope de protection se retrouve dans un contexte de séquences A-C riches. En effet, les séquences en amont et en aval de la séquence codant pour l'épitope sont constituées de plus de 70% de résidus A et C (Tableau 8). Ainsi, si le contexte de séquences A-C riches était responsable des délétions des séquences de la gpG,

nous ne pouvions tenter d'exprimer l'épitope de protection via l'insertion des séquences de la gpG dans le CaMV.

Tableau 8: Caractéristiques des séquences ajoutées au génome du CaMV

Séquence ajoutée aux CaMV	Taille pb	% de résidus:		Nombre de triplets:		a.a de la gpG	Stabilité		
		A	G	T	С	CCC	AAA		
Gépit	53	23	25	25	28	2	0	172 à 187	stable
G502	153	35	17	19	29	3	6	168 à 219	instable
G666	164	46	10	14	30	1	13	168 à 222	instable
G762	252	46	9	12	33	3	16	168 à 234	instable
G370	293	41	13	16	30	7	14	64 à 203	instable
MTII	186	20	30	20	30	3	5	-	stable
DHFR	237	24	28	23	25	3	2	_	stable

2.4 Fusion de l'épitope G aux protéines MTII et DHFR

À la lumière des résultats obtenus par le séquençage des inserts instables, nous avons élaboré deux nouvelles stratégies utilisant les séquences de deux protéines ayant été exprimées avec succès dans les plantes via le CaMV: la MTII et la DHFR.

La première stratégie avait pour but l'obtention de clones CaMV recombinants stables codant pour l'épitope de protection du VRS. Pour ce faire, la séquence de 45 pb codant pour l'épitope de protection a été fusionnée en 3' de la séquence codant pour la MTII et de celle codant la DHFR. Les clones pCaMTIIépit et pCaDHFRépit générés par l'insertion des séquences de fusion dans pCaBB1 ont été utilisés pour l'inoculation des plantes.

Pour la seconde stratégie, nous avons introduit la séquence codant pour la DHFR dans le clone pCaG502h en 5' de la séquence de 124 pb de la gpG déjà présente et qui s'était révélée être instable. Par cette stratégie, nous voulions vérifier si le contexte "A-C riches" au sein de la séquence G502h était effectivement responsable des délétions des séquences ajoutées au génome du CaMV.

2.4.1 Infection des plantes avec les clones pCaMTIIépit, pCaDHFRépit et pCaDHFR-G502h.

Comme précédemment, plus de 90% des inoculations avec les CaMV recombinants ont mené à une infection caractéristique au CaMV. Toutefois, l'apparition des symptômes par rapport à l'infection avec le virus sauvage était retardé et pouvait aller jusqu'à deux semaines.

2.4.2 Stabilité des séquences introduites dans le CaMV

Suite à l'apparition des symptômes, la stabilité des séquences introduites au CaMV a été évaluée. L'ADN viral a été extrait des plantes infectées, digéré avec les enzymes *Xho* I et *Cla* I puis analysé en gel d'agarose 1%.

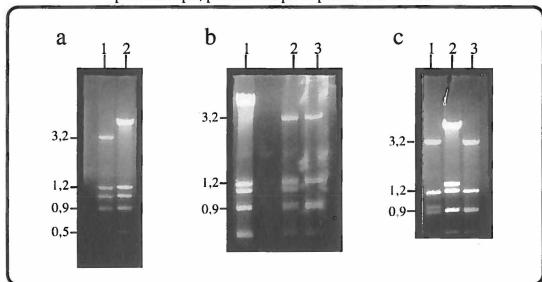


Figure 16: Analyse de l'ADN viral extrait des plantes infectées avec les clones pCaMTIIépit, pCaDHFRépit et pCaDHFR-G502h

L'ADN viral extrait 60 jours après l'inoculation des plantes avec les clones pCaMTIIépit (a, puits 1), pCaDHFRépit (b, puits 2) et pCaDHFR-G502h (c, puits 1) ainsi que l'ADN plasmidique ayant servi à produire les infections respectives (a, puits 2; b, puits 1 et c, puits 2) et l'ADN viral extrait 60 jours après l'infection avec le virus sauvage (c, puits 3) ont été digérés avec les enzymes Xho I et Cla I puis fractionnés sur gel d'agarose 1%. La taille des fragments digérés évaluée par rapport à la migration des marqueurs de taille moléculaire est indiquée en kpb à gauche.

2.4.2.1 Stabilité du clone pCaMTIIépit

Le fragment *Xho* I- *Cla* I contenant la fusion des séquences MTIIépit était d'une taille de 1 kpb dans le plasmide ayant servi à faire l'infection (Figure 16: a, puits 2). Dans l'ADN viral extrait 60 jours après l'infection des plantes avec ce clone, le fragment contenant

l'insertion migrait à la même distance et était représenté de façon stoechiométrique par rapport aux autres fragments du génome viral (Figure 16: a, puits 1).

2.4.2.2 Stabilité du clone pCaDHFRépit

La fusion de l'épitope de la gpG à la pDHFR a aussi été tolérée par le CaMV. En effet, l'analyse de l'ADN extrait 60 jours après l'infection avec le clone pCaDHFRépit a mis en évidence le fragment contenant la fusion des séquences DHFRépit à 1,13 kpb (Figure 16, puits 2), soit à la même distance de migration que le fragment contenant cet insertion dans le plasmide ayant servi à produire l'infection (Figure 16: b, puits 1). De plus, ce fragment semblait se retrouver dans le bon rapport molaire avec les autres fragments du génome viral.

Ainsi, les fusions de la séquence de l'épitope G avec les séquences des MTII et DHFR, introduites dans le vecteur pCaBB1 semblaient être stables. Pour confirmer ces résultats, les fragments Xho I- Cla I, contenant les séquences introduites, provenant des extractions d'ADN viral effectuées 60 jours après l'infection ont été prélevés du gel d'agarose pour être clonés dans pKS et séquencés. Les séquences obtenues pour les deux clones étaient identiques aux séquences initialement insérées dans pCaBB1. Les deux fusions nous ont donc permis l'obtention de clones CaMV stables contenant la séquence codant pour l'épitope de protection.

2.4.2.3 Stabilité du clone pCaDHFR-G502h

La figure 16 (c) présente les résultats obtenus suite à l'infection des plantes avec le clone contenant la fusion de la séquence DHFR avec la séquence G502h. Le fragment contenant les séquences insérées dans le plasmide était de 1,3 kpb (Figure 16: c puits 2). L'analyse de l'ADN viral extrait des plantes 40 jours après l'infection révèle que la taille du fragment contenant les séquences fusionnées est réduite d'environ 300 pb par rapport au même fragment de l'ADN plasmidique ayant servi à l'inoculation des plantes. (Figure 16: c puits 2 et 1).

Ainsi, la présence de la séquence codant pour une portion de la gpG qui a été ajoutée en 3' de la séquence de la DHFR aurait contribué à initier la délétion des séquences insérées.

2.5 Expression dans la plante des protéines de fusion MTIIépit et DHFRépit

Suite à l'obtention de clones CaMV recombinants stables portant la séquence codante de l'épitope de protection du VRS, il était possible de passer à la seconde étape visant à mettre en évidence l'expression des protéines recombinantes.

2.5.1 Immunodétection des protéines recombinantes

Les extraits protéiques effectués des plantes infectées avec les clones pCaMTIIépit et pCaDHFRépit ont été fractionnés en SDS-PAGE puis analysés par immunodétection suite à leur transfert sur membrane de nitrocellulose. Bien que l'analyse par immunodétection mise au point avec l'AcM 18A2B2 permettait la détection de 5 ng de protéines témoin (c.i. G762), aucune protéine recombinante provenant des plantes infectées avec les CaMV recombinant n'a pu être mise en évidence par cette méthode. L'utilisation d'anti-sérums dirigés contre la MTII ou contre la DHFR n'a pas non plus permis de révéler la présence de l'une ou l'autre de ces deux protéines de fusion dans les extractions brutes.

2.5.2 Purification des corps d'inclusion CaMV

L'expression des gènes du CaMV se fait au sein de corps d'inclusion cytoplasmiques formés par la protéine virale codée par le gène VI. Nous avons donc procédé à l'isolement, à la purification et à la concentration de ces corps d'inclusion afin de mettre en évidence par immunodétection la synthèse des protéines recombinantes. Mais une fois de plus, que ce soit avec l'AcM dirigé contre l'épitope de protection ou avec les anti-sérums dirigés contre les protéines de fusion respectives, aucune protéine recombinante n'a pu être détectée au sein des corps d'inclusion purifiés.

2.5.3 Évaluation phénotypique de l'expression de la DHFR recombinante

Nous avons aussi tenté d'évaluer l'expression de la protéine de fusion DHRFépit par la détection du phénotype de résistance au méthotraxate conféré à la plante par l'expression de la DHFR. Pour cette expérience, les plantes infectées avec le clone pCaDHFRépit et les plantes non-infectées ont été vaporisées avec une solution de méthotraxate (50 µg/mL). Dix jours après le contact avec le méthotraxate les feuilles des plantes infectées comme celles des plantes non-infectées portaient de très grandes régions de nécrose et 20 jours après la

vaporisation, les plantes des deux groupes étaient nécrosées et mortes. Ainsi, la portion de la DHFR codée par le CaMV recombinant ne semblait pas être exprimée de façon à pouvoir conférer la résistance des plantes au méthotraxate.

D'aucune manière, nous avons réussi à mettre en évidence l'expression des séquences fusionnées insérées au CaMV suggérant que celles-ci devaient être peu ou pas exprimées.

3 Expression de l'épitope G dans la plante via le virus de la mosaïque du tabac (TMV)

Pour exprimer l'épitope G du VRS dans la plante à l'aide du TMV, différentes fusions ont été faites avec la séquence ADNc de la protéine de capside du TMV. Quatre TMV recombinants ont été générés. Les clones TMVGNter et TMVGCter contenaient la séquence codante de l'épitope de protection de la gpG fusionnée respectivement en 5' et en 3' de la séquence codante de la protéine de capside du TMV(cpTMV). L'infection des plantes avec ces TMV recombinants devait nous permettre d'obtenir la synthèse d'une protéine de capside recombinante de 21 kDa portant l'épitope de protection en position Nterminale (cpGNter) ou en position C-terminale (cpGCter). Pour le clone TMVGLeaky, la séquence codante de l'épitope G a été insérée en 3' de la séquence de la cpTMV mais cette fois-ci en aval d'un contexte de faible terminaison. Ce contexte constitué de la séquence codant pour un codon ambre suivi de la séquence "C A A T T A", devait nous permettre d'obtenir la synthèse de deux types de protéines de capside: la cpTMV de 19 kDa obtenue suite à l'arrêt de la traduction au codon ambre et la cpGLeaky de 21 kDa issue du passage des ribosomes au-delà du codon ambre et portant l'épitope G à sa terminaison carboxylique. Par cette même stratégie, le clone TMVG762 devait permettre d'obtenir en plus de la synthèse de la cpTMV intacte, une protéine de capside de 28 kDa portant les 85 a.a. codés par la séquence de gpG introduite en aval du codon ambre.

Suite à la reconstitution des clones TMV recombinants au niveau du génome complet du TMV dans pSNC004, les transcrits étaient synthétisés pour chacun des clones par réaction de transcription *in vitro*. Les ARN synthétiques ainsi obtenus ont été utilisés pour inoculer les plantes de tabac, *Nicotiana benthamiana*.

3.1 Infectivité des TMV recombinants

3.1.1 Infection primaire par les transcrits synthétiques

Les inoculations des plantes avec les transcrits synthétiques des clones TMVGNter, TMVGLeaky et TMVG762 ont mené à une infection systémique des plantes visible par l'apparition de symptômes sur les nouvelles feuilles non-inoculées. Ainsi, la fusion des séquences de la gpG à la séquence de la protéine de capside chez ces clones n'a pas

interféré avec le caractère infectieux du TMV. L'inoculation des plantes avec le clone TMVGCter a produit une infection des feuilles inoculées. Toutefois, l'infection par ce TMV recombinant ne s'est pas propagée de façon systémique. En effet, les seuls symptômes observés suite à l'inoculation avec ce clone, étaient des régions de chlorose sur les feuilles inoculées. La présence de l'épitope G en positon C-terminale de la capside du TMV a donc interféré avec le mouvement dans la plante de ce virus recombinant.

Les infections primaires avec les ARN synthétiques n'ont servi uniquement qu'à évaluer l'infectivité des TMV recombinants. Suite à l'apparition des symptômes, les feuilles infectées étaient prélevées et conservées à -70°C. La production et la caractérisation des virus recombinants se sont faites à partir d'un plus grand nombre de plantes qui étaient inoculées avec les broyats de feuilles issues de l'infection primaire avec les transcrits synthétiques.

3.1.2 Infection secondaire par les virus recombinants

Dans le but de comparer l'infection des plantes par les TMV recombinants avec celle causée par le virus sauvage, les plantes *Nicotiana benthamiana* ont été inoculées avec les broyats de feuilles issues de l'infection primaire avec les transcrits synthétiques TMVG762, TMVGNter, TMVGLeaky et avec le TMV sauvage. Pour chaque expérience, six plantes étaient inoculées pour chacun des clones étudiés en parallèle avec six plantes inoculées avec le TMV sauvage.

Suite à l'inoculation, toutes les plantes ont développé une infection systémique. Toutefois l'apparition des premiers symptômes, au septième jour après l'inoculation avec le clones TMVGNter, était légèrement retardée par rapport à l'infection avec le virus sauvage où les symptômes locaux commencaient à apparaître dès le cinquième jour. Le retard d'apparition des symptômes locaux chez les plantes infectées avec le clone TMVGLeaky était plus marqué et pouvait aller jusqu'à 10 jours. Les symptômes causés par l'infection avec les TMVGNter et TMVGLeaky étaient moins sévères que ceux produits par le TMV sauvage. Sur les feuilles inoculées avec ce dernier, les premières lésions chlorotiques devenaient rapidement nécrotiques alors que sur les feuilles inoculées avec les virus recombinants, les régions de chlorose demeuraient sans apparition de tissu nécrosé.

Autant chez les plantes infectées avec les virus recombinants qu'avec le virus sauvage, les nouvelles feuilles apparaissant après l'inoculation étaient ondulées démontrant la présence d'une infection systémique des plantes. Chez les plantes infectées avec le virus sauvage, ces nouvelles feuilles étaient plus petites et en moins grand nombre que chez les plantes infectées avec les virus recombinants. La croissance des plantes infectées avec le virus sauvage était ralentie et, après environ 20 jours, tous les tissus étaient nécrosés. Les plantes infectées avec les TMVGNter et TMVGLeaky ont continué à avoir une croissance comparable aux plantes non-infectées mais portaient des feuilles déformées de plus petite taille arborant des mosaïques de chlorose caractéristiques de l'infection initiale par le TMV sauvage. Au fur et à mesure que l'infection avec ces deux TMV recombinants progressait, les feuilles changeaient de forme et devenaient plus allongées; les plantes ont toujours continué à croître et jamais l'infection n'a mené à la mort des plantes. L'infection par le TMVG762 était plus rapide et les symptômes de l'infection par ce clone ressemblaient à ceux causés par le TMV sauvage.

3.2 Expression dans la plante des protéines de capsides recombinantes

La mise en évidence de l'expression des protéines de capside recombinantes s'est faite à partir des plantes *Nicotiana benthamiana* infectées avec les broyâts de feuilles issues de l'infection primaire avec les transcrits synthétiques des TMV recombinants G762, Nter et GLeaky. Plusieurs plantes ont été infectées, à différentes reprises et avec différents broyâts d'infection primaire pour chacun des clones étudiés.

Suite à l'apparition des symptômes d'infection par les TMV recombinants, 40 mg de feuilles infectées étaient prélevés. Les prélèvements se sont faits à différents temps après l'infection. Les tissus prélevés, broyés et homogénéisés étaient analysés en SDS-PAGE 12%. Les protéines fractionnées était soient colorées, soit transférées sur membrane de nitrocellulose pour l'immunodétection.

3.2.2 Expression de la protéine capside recombinante du TMVG762

L'analyse par coloration au bleu de Coomassie des protéines extraites des plants infectés avec le TMVG762 ne nous a pas permis de visualiser de protéine pouvant correspondre à la protéine de capside recombinante portant une région de la gpG VRS. L'immunodétection avec l'AcM 18A2B2 n'a pas non plus révélé de protéines dans ces

mêmes extraits alors que l'immunodétection à l'aide d'un anticorps dirigé contre la cpTMV (anti-cpTMV) n'a mis en évidence que la protéine de capside ayant un patron de migration identique à la cpTMV. Aussi, la séquence G762, n'a pu être amplifiée par RT-PCR à partir de l'ARN viral extrait des plantes infectées avec le TMVG762 (résultat non présenté). Ainsi il semble que la longue séquence codant pour gpG qui avait été fusionnée en 3' du codon ambre de la séquence de la cpTMV ait été rapidement excisé.

3.2.3 Expression de la protéine de capside recombinante du TMVGNter

La Figure 17 présente les résultats obtenus suite à l'analyse des extractions protéiques faites à partir des plantes infectées avec le TMVGNter. Sur le gel coloré au bleu de Coomassie où ont été fractionnés les extraits protéiques bruts, on remarque au niveau de l'extrait provenant des plantes infectées avec le TMVGNter (Figure 17: a, puits 2) la présence d'une protéine très abondante dont la migration était moins rapide que celle de la cpTMV sauvage (Figure 17: a, puits 3). Cette protéine ne se retrouvait pas dans les extraits provenant des plantes non-infectées (Figure 17: a, puits 1). La différence de mobilité apparente de cette protéine par rapport à la cpTMV était consistante avec la présence de l'épitope G fusionné à la capside du TMV.

Afin de confirmer la présence de l'épitope G, nous avons effectué une immunodétection à l'aide de l'AcM 18A2B2 sur les mêmes extractions fractionnées en SDS-PAGE (Figure 17: b). Une protéine dont la distance de migration correspond à la protéine abondante visualisée sur le gel coloré au bleu de Coomassie a été détectée dans l'extraction réalisée à partir des feuilles infectées avec le TMVGNter (Figure 17: b, puits 1). La réaction de l'AcM avec cette protéine semblait être spécifique à la présence de l'épitope G, puisqu'aucune protéine n'a été révélée au niveau des extraits provenant des plantes non-infectées (Figure 17: b, puits 3) et que l'anticorps n'a pas non plus reconnu la cpTMV (Figure 17: b, puits 2). Les protéines migrant moins rapidement qui ont été détectées par l'AcM 18A2B2 correspondraient à des multimères formés par les protéines capsides recombinantes (Figure 17: b, puits 1).

Ainsi, l'infection des plantes avec le virus recombinant TMVGNter a mené à la synthèse d'une capside recombinante portant l'épitope G à sa portion amino-terminale. Celle-ci a été détectée aussi bien dans les feuilles initialement inoculées que dans les plus jeunes feuilles non-inoculées. Le virus recombinant TMVGNter a donc été capable de

produire une infection systémique tout en conservant les séquences de l'épitope ajoutées à son génome.

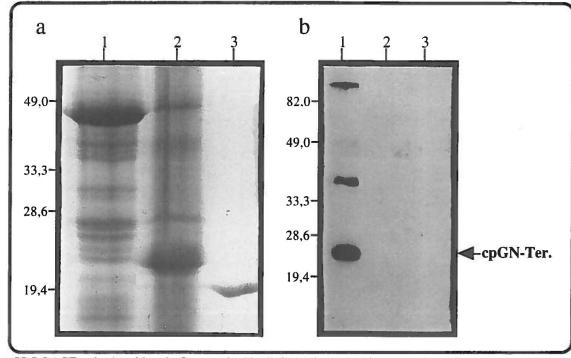


Figure 17: Analyse de l'expression de la cpGNter

a) SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Un dixième des extractions protéiques brutes préparées à partir des plantes non-infectées (puits 1) et infectées avec le TMVGNter (puits 2) a été fractionné en parallèle avec 5 µg de TMV purifié (a, puits 3).

b) Immunodétection faite avec l'AcM 18A2B2. Un dixième des extractions protéiques brutes préparées à partir des plantes infectées avec le TMVGNter (puits 1) et non-infectées (puits 2) a été fractionné en SDS-PAGE en parallèle avec 5 µg de TMV purifié (puits 3) puis transféré sur membrane de nitrocellulose.

Les chiffres à gauche de chacun des gels indiquent la position des marqueurs de poids moléculaire en kDa.

3.2.4 Expression de la protéine de capside recombinante du TMVGLeaky

Sur le gel coloré au bleu de Coomassie présenté à la Figure 18 (a), il est possible de voir au niveau des extractions provenant des plantes infectées avec le TMVGLeaky (puits 2) et avec le TMV sauvage (puits 3), la présence d'une protéine d'environ 19 kDa. Cette protéine correspondait à la capside intacte du TMV puisqu'elle était absente des extractions provenant des plantes non-infectées (Figure 18: a, puits 1).

La synthèse de la protéine de capside recombinante résultant du passage des ribosomes au-delà du codon ambre a été mise en évidence par une analyse en SDS -PAGE des protéines provenant d'une préparation de virus purifié, coloré à l'argent. En effet, lorsque la préparation virale purifiée à partir des plantes infectées avec le TMVGLeaky a

été analysée de cette façon, il a été possible de visualiser une protéine à la distance de migration attendue pour la protéine de capside recombinante (Figure 18: b, puits 1). Étant donné que celle-ci était absente de la purification faite à partir des plantes infectées avec le TMV sauvage (Figure 18: b, puits 2), cette protéine devait correspondre à la cpGLeaky portant l'épitope G.

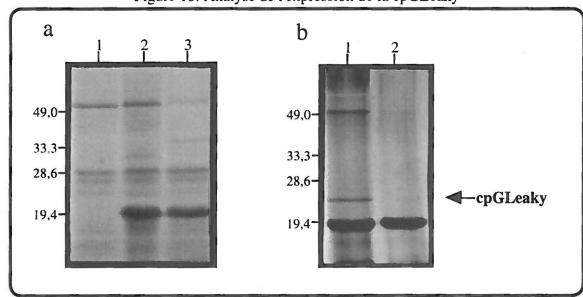


Figure 18: Analyse de l'expression de la cpGLeaky

- a) SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Un dixième des extractions protéiques brutes préparées à partir des plantes non-infectées (puits 1), infectées avec le TMVGLeaky (puits 2) et infectées avec le TMV sauvage (puits 3) ont été fractionnés.
- b) SDS-PAGE coloré à l'argent. 2 μg de virus purifié à partir des plantes infectées avec le TMVGLeaky (puits 1) ou avec le TMV sauvage (puits 2) ont été fractionnés.

Les chiffres à gauche de chacun des gels indiquent la position des marqueurs de poids moléculaire en kDa.

Par une immunodétection avec un anticorps dirigé contre la protéine de capside du TMV, la présence des deux différentes protéines de capside synthétisées par le clone TMVGLeaky a pu être mise en évidence (Figure 19: a, puits 3). La protéine abondante ayant une migration plus rapide, détectée par l'anti-cpTMV, correspond à la cpTMV produite suite à l'arrêt de la traduction au niveau du codon ambre. Cette protéine a aussi été révélée dans les purifications virales faites à partir des plantes infectées avec le TMV sauvage (Figure 19: a, puits 2). La seconde protéine moins abondante et migrant moins rapidement qui a été détectée par le même anticorps, devait correspondre à la cpGLeaky résultant du passage des ribosomes au-delà du codon ambre (Figure 19: a, puits 3). La présence de l'épitope chez cette dernière a été confirmée en immunodétection avec l'AcM

18A2B2. En effet, seule cette protéine a été reconnue par l'AcM dirigé contre l'épitope G (Figure 19: b).

À l'aide de cette stratégie, nous avons réussi à obtenir la synthèse d'une protéine de capside recombinante portant l'épitope de protection de la gpG du VRS à son extrémité C-terminale. Cette capside recombinante a pu être détectée chez toutes les plantes infectées avec le TMVGLeaky aussi bien dans les feuilles inoculées que dans les feuilles infectées de façon systémique.

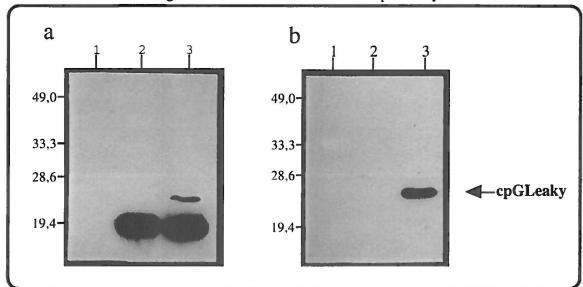


Figure 19: Immunodétection de la cpGLeaky

Immunodétection avec l'anti-cp-TMV (a) et l'AcM 18A2B2 (b). Un dixième des extractions protéiques brutes préparées à partir des plantes non-infectées (puits 1) et 2 µg de virus purifiés à partir des plantes infectées avec le TMV sauvage (puits 2) ou avec le TMVGLeaky (puits 3) ont été fractionnés en SDS-PAGE puis transférés sur membrane de nitrocellulose pour l'immunodétection.

Les chiffres à gauche de chacun des gels indiquent la position des marqueurs de poids moléculaire en kDa.

3.3 Caractérisation des virus recombinants

3.3.1 Purification

Le TMV sauvage peut facilement être purifié à partir d'homogénats de feuilles infectées, par une simple précipitation au PEG-NaCl. Pour leur caractérisation et l'immunisation des souris, nous avons donc cherché à purifier les TMV recombinants par cette méthode.

3.3.2.1 Purification du TMVGNter

Suite à l'homogénéisation dans le PBS des feuilles infectées avec le TMVGNter, la protéine recombinante portant l'épitope en position N-terminale n'a pu être solubilisée. En effet, suite à la centrifugation des homogénats, celle-ci ce retrouvait en très grande concentration dans la fraction insoluble. Cette protéine recombinante est demeurée insoluble suite à un traitement à l'urée 8 M ou à la guanidine-HCl 6 M. Étant donné la nature insoluble de sa capside recombinante, le TMVGNter n'a pu être purifié par la précipitation au PEG-NaCl. Pour l'immunisation des souris nous avons procédé à des lavages des culots au Triton-X100 afin d'éliminer le plus possible les débris cellulaires et matières insolubles.

3.3.2.2 Purification du TMVGLeaky

Le TMVGLeaky était solubilisé suite à l'homogénéisation des feuilles infectées dans le PBS. Ainsi, la purification de ce virus recombinant a pu être réalisée par une précipitation au PEG-NaCl à partir des surnageants des homogénats. Suite à une seule précipitation, les préparations virales étaient relativement pures. Toutefois, il n'a pas été possible de resolubiliser les culots de virus recombinant issus de la précipitation au PEG.

Il est possible de voir dans les purifications effectuées à partir des plantes infectées avec le TMVGLeaky ou avec TMV sauvage, fractionnées en SDS-PAGE et colorées à l'argent (Figure 18, b) que la cpTMV de 19 kDa représente plus de 80% des protéines de la préparation. En comparant avec les extraits bruts colorés au bleu de Coomassie (Figure 18), on remarque que la majorité des protéines végétales ont été éliminées suite à la précipitation au PEG-NaCl.

Le niveau de production virale a été évalué par un dosage en Bradford du virus purifié à partir des plantes infectées avec le TMVGLeaky ou avec le TMV sauvage. À partir de 1 g de feuilles fraîches, il était possible de purifier de 0,5 à 1,0 mg de TMVGLeaky alors que pour la même quantité de tissus, 0,75 à 1,4 mg de TMV sauvage était purifié.

3.3.4 Stabilité de l'expression de la capside recombinante du TMVGLeaky

L'expression de la protéine de capside recombinante TMVGLeaky pouvait être détectée au-delà de 70 jours après l'infection. Lorsque nous avons effectué une cinétique

d'infection avec le TMVGLeaky où les extractions brutes étaient analysées en immunodétection avec l'AcM 18A2B2 (Figure 20: a), une diminution du signal spécifique à la capside recombinante a été observée par rapport au temps post-inoculation.

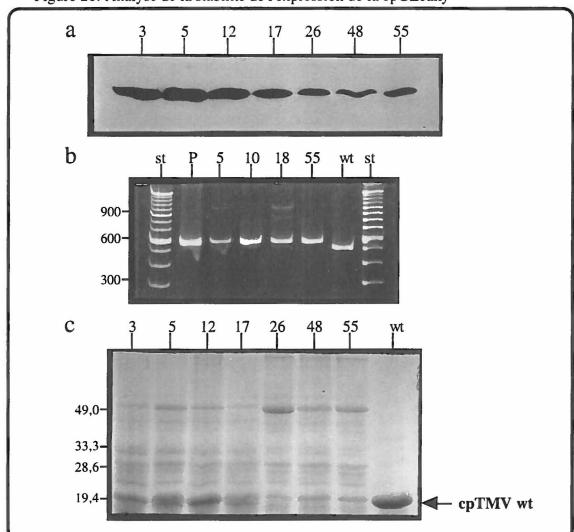


Figure 20: Analyse de la stabilité de l'expression de la cpGLeaky

a)Immunodétection avec l'AcM 18A2B2. Un dixième des extractions protéique brutes préparées à différents temps après l'inoculation des plantes avec le TMVGLeaky (les jours post-inoculation sont indiqués au-dessus de chaque puits) a été fractionné en SDS-PAGE puis transféré sur membrane de nitrocellulose pour l'immunodétection b) Analyse en gel de polyacrylamide coloré au BET. Les produits d'amplification des ADNc synthétisés à partir des ARN viraux extraits à différents temps après l'inoculation des plantes (les jours post-inoculation sont indiqués au-dessus de chaque puits) avec le TMVGLeaky et 30 jours après l'inoculation des plantes avec le TMV sauvage (wt) ont été analysés. Dans le puits p a été déposé le produit d'amplification de l'ADN plasmidique ayant servi pour la transcription *in vitro* du clone TMVGLeaky. c) SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Un dixième des extractions protéique brutes préparées à différents temps après l'inoculation des plantes avec le TMVGLeaky (les jours post-inoculation sont indiqués au-dessus de chaque puits) et 30 jours après l'inoculation des plantes avec le TMV sauvage (wt) a été analysé. Les chiffres à gauche de chacun des gels indiquent la position des marqueurs de taille moléculaire en ph (b) et des marqueurs de poids moléculaire en kDa (c)

Afin de vérifier s'il y avait eu délétion des séquences de l'épitope G, l'ARN viral a été extrait des plantes infectées à différents temps post-inoculation pour amplification par RT-PCR de la séquence codant pour la capside recombinante. Dans tous les échantillons analysés, il a été possible de mettre en évidence le fragment d'ADN contenant la séquence codant pour l'épitope; celui-ci migrant moins rapidement que le fragment correspondant à la séquence codante de la capside du TMV sauvage (Figure 20: b). Ainsi, la baisse du niveau d'expression de la capside recombinante observée ne semblait pas être causée par une instabilité de la séquence de l'épitope G ajouté au génome du TMV. La séquence ADN amplifiée par RT-PCR à partir de l'ARN extrait des plantes 60 jours après l'inoculation avec le TMVGLeaky a été clonée dans un vecteur T/A pour être séquencé. La séquence obtenue était identique à la séquence du plasmide initial utilisé pour produire l'ARN infectieux du TMVGLeaky.

La baisse du niveau d'expression de la capside recombinante semblait correspondre à la diminution du taux de synthèse des protéines de capside plutôt qu'à une diminution du taux de passage des ribosomes au-delà du codon ambre. En effet, l'analyse en SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des extraits bruts préparés à différents temps après l'inoculation, montre que le niveau d'expression de la protéine de capside intacte chez les plantes inoculées avec le TMVGLeaky diminue aussi lorsque l'infection avance dans le temps. Pourtant chez les plantes infectées avec le virus sauvage la protéine de capside représente toujours la majorité des protéines extraites après 30 jours d'infection (Figure 20: c).

3.3.3 Niveau de production de la capside recombinante du TMVGLeaky

La concentration des protéines de capside recombinantes produites suite à l'infection des plantes avec le TMVGLeaky a été estimée arbitrairement par comparaison avec la cpTMV purifiée dosée en Bradford. Le signal obtenu par immunodétection avec l'anticpTMV a été analysé à l'aide d'un densitomètre et les proportions de cpGLeaky ont été déduites à partir de la courbe standard calculée avec les valeurs densitométriques obtenues pour les différentes concentrations de cpTMV.

Un exemple de cette expérience est présenté à la Figure 21 où ont été déposés sur le premier gel (a) de 15 à 120 ng de TMV sauvage purifié et sur le second gel (b) de 100 à 400 ng de TMVGLeaky purifié. La courbe standard tracée avec les valeurs

densitométriques du signal obtenu pour chacune des concentrations de cpTMV, a permis de déterminer que le signal observé au niveau de la capside recombinante de 21 kDa correspondait à 17, 30 et 48 ng lorsque 200, 300 et 400 ng de virus recombinants étaient analysés (Figure 21: b, puits 2, 3 et 4). Ainsi, dans cette préparation de TMVGLeaky, la cpGLeaky se retrouvait dans un rapport d'environ un pour dix cpTMV. Cette expérience a été répétée en utilisant différentes préparations ce qui nous a permis de déterminer que la cpGLeaky représentait entre 6 et 12 % des protéines de capside totales.

a b 1 2 3 4 b 1 2 3 4

Figure 21: Évaluation du niveau d'expression de la cpGLeaky

Immunodétection avec l'anti-cpTMV. 15, 30, 60 et 120 ng de TMV sauvage purifié (a, puits 1, 2, 3 et 4 respectivement) et 100, 200, 300 et 400 ng de TMVGLeaky purifié (b, puits 1, 2, 3 et 4 respectivement) ont été fractionnés en SDS-PAGE puis transférés sur membrane de nitrocellulose pour immunodétection.

L'infection des plantes avec le virus recombinant TMVGLeaky pouvait donc nous permettre d'obtenir à partir de 1 kg de feuilles fraîches de 30 à 120 mg de capside recombinante purifiée portant l'épitope G en sa terminaison carboxylique.

3.3.4 Formation des particules virales

L'analyse en microscopie électronique en coloration négative, allait nous permettre de vérifier si les protéines de capside recombinantes étaient capables de se polymériser pour mener à la formation de particules virales portant à leur surface l'épitope de protection de la gpG.

3.3.4.1 Analyse en microscopie électronique du TMVGNter

Aucune particule virale en forme de bâtonnet caractéristique au TMV n'a été observée dans les extractions de protéines faites à partir des plantes infectées avec le TMVGNter. Ce résultat indique que la présence de l'épitope G en position N-Terminale des protéines de capsides du TMV a interféré avec la polymérisation de celles-ci. Il est

intéressant de noter que malgré l'absence de formation de particules virales, ce virus recombinant a été capable de produire une infection systémique chez *Nicotiana* benthamiana.

3.3.4.2 Analyse en microscopie électronique du TMVGLeaky

L'analyse en coloration négative effectuée sur les extractions provenant des plantes infectées avec le TMVGLeaky nous a permis de visualiser des particules virales en forme de bâtonnets d'une longueur comparable à celles formées par le virus sauvage. La présence des cpGLeaky au niveau de ces particules virales a été mise en évidence par le marquage des particules avec l'AcM 18A2B2 couplé à l'or colloïdal (Figure 22: c et d). En effet, il a été possible d'observer la présence de plusieurs particules d'or associées au virus purifié à partir des plantes infectées avec le TMVGLeaky alors qu'aucune particule d'or associée au virus purifié à partir des plantes infectées avec le TMV sauvage n'a été observée. Ainsi les protéines de capside qui portaient l'épitope G à leur extrémité C-terminale ont été intégrées lors de la formation des particules virales. Nous avions donc réussi à produire un TMV recombinant portant à sa surface plusieurs copies de l'épitope de protection de la gpG du VRS.

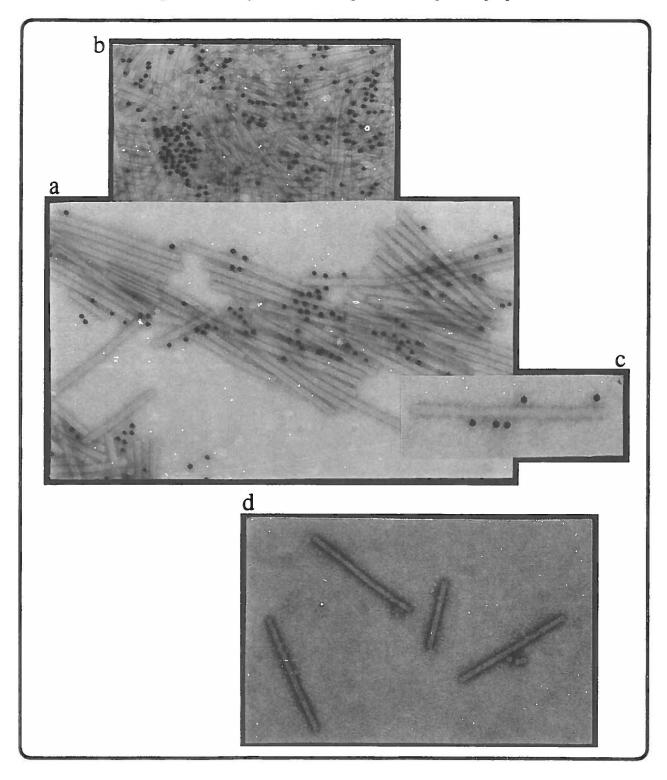


Figure 22: Analyse en microscopie électronique des préparations virales

Les grilles ont été préparées tel que décrit dans la section matériel et méthodes a, b et c/ TMVGLeaky, d/TMV. 50 nm = 0.6 cm

4 Étude de l'immunogénicité des TMV recombinants

L'évaluation de l'immunogénicité des TMV recombinants a été effectuée chez les souris BALB/c. Un groupe de cinq souris était immunisé pour chacun des antigènes évalués. Les immunisations se sont faites par voie intra-péritonéale à raison de quatre doses à deux semaines d'intervalle chacune. Au quinzième jour suivant la dernière immunisation une saignée du plexus rétro-orbital était pratiquée afin de déterminer le taux d'anticorps sérique dirigés contre le VRS. Au seizième jour après la dernière injection, les souris étaient soumises à une épreuve avec le VRS souche Long et cinq jours plus tard les poumons étaient prélevés pour la détermination du titre viral.

4.1 Évaluation de l'immunogénicité du TMVGNter

En plus du groupe de souris immunisées avec les extraits de plantes infectées avec le TMVGNter (Ext. TMVGNter), un groupe témoin a aussi été immunisé avec des extraits provenant de plantes non-infectées (Ext. N.I.). Un troisième groupe a été immunisé avec 100 µL de PBS et finalement un quatrième groupe de souris servant de témoins positifs a été immunisé avec les corps d'inclusion provenant des bactéries sur-exprimant la prG762 (c.i.G762, voir section résultat, 1).

Tableau 10: Immunité humorale des souris immunisées avec le TMVGNter

Immunisation	Titre ELISA ¹		
	VRS ²	TMV ²	
Ext TMVGNter	1/100	1/12 800	
Ext. N.I.	< 1/100	< 1/100	
c.i. G762	>1/12 800	<1/100	
PBS	<1/100	<1/100	

¹ Le titre est exprimé par la dilution de sérum dont la densité optique est supérieure à la moyenne des densités optiques obtenues pour les sérums des souris témoins (immunisées avec les extraits de plantes non infectées) additionnée de deux fois la valeur de l'écart type.

Après cinq immunisations, un très faible titre en anticorps dirigés contre le VRS a été détecté dans les sérums des souris immunisées avec l'Ext. TMVGNter (Tableau 10). Le titre

² Antigène utilisé pour l'enrobage des plateaux

ELISA était de 1/100 lorsque le VRS était utilisé comme antigène alors qu'un titre supérieur à 1/12 800 a été mesuré dans les sérums des souris immunisées avec les c.i.G762. Les souris avaient bien répondu à l'immunisation avec les extraits infectés avec le TMV recombinant puisqu'un titre en anticorps de 1/12 800 a été obtenu en ELISA en utilisant le TMV purifié pour l'enrobage des plateaux.

Les souris immunisées avec l'Ext. TMVGNter n'ont pas été protégées de l'infection par le VRS. En effet, le titre VRS dans les poumons de ces souris qui avaient subi l'épreuve virale cinq jours plus tôt, était en moyenne d'une DICT50 de 2,6 log10/g poumon comparativement aux souris immunisées avec les c.i.G762 où aucun virus n'a été détecté (Tableau11). Toutefois, il semble que l'immunisation avec l'Ext. TMVGNter ait eu un effet sur l'infection par le VRS car chez trois souris, le titre viral était légèrement plus faible que les titres observés chez les souris immunisées avec l'Ext. N.I. et avec le PBS.

Tableau11: Évaluation de la protection des souris immunisées avec le TMVGNter.

Immunisation So		Titre VRS ((DICT ₅₀ / log ₁₀)/g de poumon)			
	Souris	1	2	3	4
Ext TMVGNter		2,70	2,70	2,45	X
Ext. N.I.		2,90	2,95	3,30	X
c.i. G762		<1,70	<1,70	<1,70	<1,70
PBS		3,70	3,70	3,70	3,70

X/ Souris qui n'ont pas survécu à l'épreuve virale

4.2 Évaluation de l'immunogénicité du TMVGLeaky.

Concernant l'immunisation des souris avec le TMVGLeaky, nous n'avons pu détecté qu'un très faible taux d'anticorps sériques spécifiques au VRS et aucun titre en anticorps dirigé contre le peptide G174-187 couplé au KLH (Tableau 12). L'immunisation avec le TMVGLeaky, n'a pas protégé les souris contre l'infection par le VRS. En effet, le titre VRS dans les poumons de ces souris était en moyenne d'une DICT50 de 2,76 log10/g poumon après l'épreuve virale alors que chez les souris immunisées avec les c.i.G762 le titre en VRS était au dessous de la limite de détection du test (Tableau 13).

Tableau 12: Immunité humorale des souris immunisées avec le TMVGLeaky

Immunisation	Titre ELISA ¹	
	VRS ²	peptide 174-187 ²
TMVGLeaky	1/20	<1/10
TMV wt	< 1/10	< 1/10
c.i.G762	>1/10 240	1/1 280
PBS	< 1/10	< 1/10

¹ Le titre est exprimé par la dilution de sérum dont la densité optique est supérieure à la moyenne des densités optiques obtenues pour les sérums des souris témoins (immunisées avec le TMV sauvage) additionnée de deux fois la valeur de l'écart type.

Tableau 13: Évaluation de la protection des souris immunisées avec le TMVGLeaky

Immunisation Souris		Titre VRS ((DICT ₅₀ / log ₁₀)/g de poumon)				
	1	2	3	4	5	
TMVGLeaky		3,42	3.12	2,65	1,88	X
TMV wt		3,11	3,65	2,83	3,08	2,32
c.i.G762		<1,70	<1,70	<1,70	X	X
PBS		1,89	1,86	2,88	2,88	3,4

X/ Souris qui n'ont pas survécu à l'épreuve virale

² Antigène utilisé pour l'enrobage des plateaux

1 Expression d'une sous-unité de la gpG du VRS chez E. coli

Le virus vivant atténué et les protéines virales natives purifiées sont les principales approches qui sont actuellement utilisées pour l'étude et le développement d'un vaccin efficace et sécuritaire contre le VRS. Avant d'évaluer les possibilités qu'offrent la plante pour l'expression de différentes régions de la glycoprotéine G du VRS, nous avons étudié le potentiel protecteur des a.a. 168 à 234 de la gpG exprimés chez E. coli. Des études utilisant des recombinants du virus de la vaccine ont démontré que la région des a.a. 124 à 203 de la gpG constituait le domaine majeur impliqué dans la protection des rongeurs contre l'infection par le VRS (Olmsted et al., 1989, Simard et al., 1995). Ainsi, nous avons voulu vérifier si une différente région de la gpG, non-glycosylée, allait avoir le même potentiel protecteur que la portion 124 à 203 de la gpG exprimée dans les cellules de mammifères. En 1993, une seule étude rapportait l'expression de la gpG du VRS dans un système bactérien (Martin-Gallardo et al., 1993). Après une tentative sans succès où E. coli avait été utilisé, ces auteurs ont réussi à produire la gpG complète du VRS chez Salmonella typhimurium. La gpG recombinante, qui était faiblement exprimée dans ce système, n'a pu être que partiellement purifiée. L'immunisation de rats de coton avec cette dernière a stimulé la production d'Ac neutralisants (Martin-Gallardo et al., 1993) mais aucun résultat concernant la protection de modèle animal par cette protéine recombinante n'a été rapporté.

Nous avons réussi à obtenir, chez *E. coli* à l'aide du système pET, un haut niveau d'expression des a.a. 154 à 240 de la gpG du VRS. Cette sous-unité de la gpG, facilement purifiée sous forme de corps d'inclusion bactériens, était reconnue en immuno détection sur membrane de nitrocellulose par l'AcM 18A2B2. Ainsi, l'épitope formé par les a.a. 174 à 187 avait conservé son intégrité. La taille limitée de la gpG que nous avons exprimée a probablement contribué à l'efficacité de son expression et purification chez *E coli*. L'immunisation des souris avec les corps d'inclusion bactériens constitués des sous-unités de la gpG a induit une protection complète des animaux contre l'infection par le VRS.

Ces résultats démontrent que la glycosylation de cette portion de la gpG ne contribue pas à son immunogénicité et que le domaine majeur de protection de la gpG peut se limiter aux a.a. 170 à 203. Aussi, l'expression chez *E .coli* s'est avérée être un système simple et

efficace pour l'expression et l'étude de l'immunogénicité de la gpG du VRS. Ceci est important si l'on considère qu'il existe peu de précédents concernant la protection efficace de modèle animal par des protéines virales produites dans un système procaryote (Manning et Leong, 1990; Srivastava et al., 1991 et 1995)

Plus récemment d'autres travaux ont rapporté l'expression, dans la bactérie, de sousunités de la gpG du VRS conférant la protection chez les rongeurs (Power et al., 1997, Simard et al., 1997). L'équipe de Power a exprimé les a.a. 130 à 230 de la gpG en fusion avec un domaine de liaison de l'albumine d'une protéine G de streptocoque. Cette protéine de fusion qui a apporté une protection complète contre l'infection par le VRS chez les rongeurs est présentement en évaluation comme vaccin candidat contre le VRS. L'équipe de Simard, a utilisé le système bactérien pour étudier l'importance de la conformation de l'épitope G174-187 sur son potentiel protecteur. Ces travaux portant sur la région des a.a. 124 à 203 ont montré que le contexte entourant l'épitope avait une influence sur son activité de protection, probablement via la modification des ponts di-sulfures entre les résidus cystéines de cet épitope. Il était donc important pour notre étude de constater que dans le contexte constitué des a.a. 154 à 240, le potentiel protecteur de ce même épitope ne semblait pas diminué.

2 Expression via le CaMV

Lorsque nous avons débuté nos travaux ayant pour but d'exprimer l'épitope de protection de la gpG du VRS dans la plante, le CaMV était le seul virus de plante à avoir été utilisé avec succès comme vecteur d'expression (Gronenborn et al., 1981;.Brisson et al., 1984; Lefebvre et al., 1987; DeZoten et al., 1989). Ce virus est constitué d'un génome ADN double brin et la délétion de l'ORF II permettait l'addition stable de longues séquences étrangères. Ce système devait donc nous offrir la flexibilité et la rapidité nécessaires pour évaluer les possibilités qu'offre la plante comme système de production de différentes sous-unités de la gpG du VRS. Les séquences codant pour les régions 124 à 203 ou 168 à 253 de la gpG ont été ajoutées au génome du CaMV. Étant donné que ces deux régions de la gpG sont protectrices lorsque exprimées dans les cellules de mammifère ou dans la bactérie, nous allions donc avoir un élément de comparaison pour l'étude de l'immunogénicité des produits d'expression dans la plante. Les séquences codantes de plus courtes régions de la gpG ont aussi été insérées au génome du CaMV afin d'obtenir une expression plus stable et plus élevée de l'épitope G dans la plante.

2.1 Instabilité des séquences introduites au génome du CaMV

Quèlque soit leur taille, les séquences de la gpG que nous avons introduites dans le génome du CaMV, de façon à ne pas interférer avec la traduction et l'encapsidation du virus, n'ont pas été tolérées. L'analyse des séquences nucléotidiques de différents fragments instables nous a révélé que les délétions de la séquence de la gpG étaient bordées par des séquences répétées directes, caractéristiques de la recombinaison par choix de copie (Coffin, 1979). Les délétions des séquences de la gpG auraient été générées pendant la transcription inverse 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, où la synthèse de l'ADNc aurait pu se poursuivre (Figure 23).

La recombinaison par choix de copie implique principalement les polymérases dépendantes d'ARN (pdARN) (Lai, 1992) et est une source importante de la variabilité génétique des rétrovirus (Anderson *et al.*, 1998). Ce mécanisme de recombinaison a donc 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 caractéristique des pdARN (Lai, 1992). Aussi, des régions d'ARN spécifiques favorisant l'arrêt et la progression des synthèses d'acides nucléiques par différentes pdARN ont été identifiées (Wu et al., 1995; Nagy et al., 1997). Ces sites de pause pouvaient être des séquences homo-polymériques (Klarmann et al., 1993), des séquences riches en résidus A et C (Hubert et al., 1989; Abbotts et al., 1992), g et c (Klarmann et al., 1993), a et u (Nagy et Bujarski, 1997) ou des séquences menant à la formation de structures secondaires (DeStefano et al., 1992; Nagy et al., 1997; Nagy et al., 1998). Aussi, il a été démontré que l'ajout d'un nucléotide non-apparié pouvait entraîner la pause de la RT (Wu et al., 1995; Diaz et DeStephano, 1996; Palaniappan et al., 1996).

2 a il b il c gabarit

2 a il b il c 5,

5'ADNC
A RT

2 a il b il c 5,

ADNC
A RT

4 a il b il c 5,

Figure 23: Modèle de recombinaison par choix de copie

- 1) Pause de la transcriptase inverse au niveau de la région i qui est répétée sur l'ARN gabarit
- 2) Détachement du complexe de réplication
- 3) Association du complexe de réplication via les séquences complémentaires L'i
- 4) Poursuite de la synthèse menant à la production d'un ADNc dont la séquence d est excisée

Chez le CaMV, la génération de nouveaux variants a été attribuée à la recombinaison par choix de copie inter- ou intra moléculaires via les séquences répétées directes situées aux extrémités 5' et 3' de l'ARN 35S (Dixon et al., 1986; Grimsley et al., 1986; Vaden et Melcher, 1990; Gal et al., 1992). Pennington et Melcher (1993) ont démontré que le changement de gabarit de la RT du CaMV pouvait aussi se faire entre des régions homologues internes de l'ARN 35S pour mener à la délétion de séquences interférant avec

les fonctions virales. Ainsi, comme chez les rétrovirus, la recombinaison par choix de copie chez le CaMV pourrait être un mécanisme important pour la génération de diversité et la stabilisation de populations virales face à une pression de sélection. Toutefois, chez le CaMV les mécanismes moléculaires impliqués dans cette recombinaison n'ont pas été étudiés.

Dans notre étude les séquences ajoutées au CaMV ont été excisées sans pression de sélection apparente. Ainsi, l'activité de recombinaison que nous avons observée serait le reflet de la tendance naturelle du complexe de réplication du CaMV à changer de gabarit pendant la transcription inverse. Ce système nous a donc permis d'identifier des caractéristiques de séquences favorables au ralentissement et à la pause de la RT du CaMV. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que les répétitions de résidus A et C aient eu pour effet de ralentir l'activité de synthèse de la RT du CaMV. En effet, les séquences en amont de chacune des délétions que nous avons observées étaient constituées de répétitions de résidus A et C, alors qu'une plus grande représentation de résidus T et G se retrouvait dans les régions où la progression de la RT du CaMV ne semblait pas avoir été affectée (Figure 15). La séquence "CAACCCA" pourrait être un site particulièrement favorable au ralentissement de la RT du CaMV. Ce motif qui se situe en trois positions différentes sur le fragment G370 (positions 22, 56 et 67) est présent quelques nucléotides en amont de chacune des délétions étudiées. Chacune des séquences de la gpG qui a été excisée par le CaMV est caractérisée par un haut contenu en résidus A et C et un nombre élevé de répétitions de 3 résidus A (Tableau 8). Les séquences qui sont restées stables chez le CaMV quant à elles étaient constituées d'une proportion équilibrée de chacun des résidus (Tableau 8).

La délétion de la séquence de la DHFR suite à sa fusion avec la séquence G502 a confirmé le rôle du contexte de séquences spécifiques qui favorise la recombinaison par choix de copie par la RT du CaMV. En effet, lorsque la séquence codant pour la DHFR était ajoutée seule (Brisson et al., 1984) ou en fusion avec la séquence codant pour l'épitope de protection du VRS, celle-ci est demeurée stable au sein du génome du CaMV. Des séquences plus longues que la fusion des séquences DHFRG502 ont aussi été ajoutées de façon stable au CaMV (Gronenborn et al., 1981; DeZoten et al., 1989). Ainsi, l'instabilité de la séquence DHFRG502 serait attribuable au contexte apporté par la séquence de la gpG

fusionnée en 3' de celle de la DHFR. Il a été démontré chez les rétrovirus que les événements de recombinaison par choix de copie n'étaient pas indépendants les uns des autres (Anderson et al., 1998) et que lorsqu'un événement de recombinaison était sélectionné, la probabilité qu'un second se produise était plus élevée (Hu et al., 1997). Ainsi la présence du contexte particulièrement favorable à la recombinaison par choix de copie sur la séquence G502 aurait permis l'initiation des événements de recombinaison entraînant les délétions au niveau du contexte moins favorable de la séquence DHFR. La présence des fragments d'ADN de taille intermédiaire dans l'ADN extrait des plantes infectées supporte cette hypothèse montrant que les délétions complètes sont le résultat de plus d'un événement de recombinaison.

La plus grande délétion de la séquence G370 que nous avons étudiée pourrait illustrer un exemple de recombinaison par choix de copie dans un contexte moins favorable. En amont de cette délétion on remarque la présence de résidus t et g, et les répétitions de séquences bordant cette délétion sont imparfaites. Ainsi, la présence des résidus t et g en amont de la délétion de 189 pb aurait rendu le contexte de pause de la RT moins favorable et, à ce moment, l'introduction de nucléotides non appariés à la matrice aurait pu contribuer au détachement du complexe de réplication.

Après la pause et le détachement du complexe de réplication, la poursuite de la synthèse de l'ADNc dépend de la capacité du complexe à se ré-associer à l'ARN gabarit alternatif. L'extrémité 3' de l'ADNc nouvellement synthétisé serait alors utilisé comme amorce pour la ré-initiation de la synthèse. La présence sur l'ARN de séquences complémentaires à l'extrémité 3' de l'ADNc nouvellement synthétisé faciliterait la ré-association du complexe de réplication mais celles-ci ne sont pas essentielles (Lai, 1992). Il a été démontré que la ré-association pouvait se faire au niveau de séquences complémentaires imparfaites ou en l'absence complète de complémentarité (Lai, 1992). Dans ce cas, la ré-association est dépendante de la présence de structures secondaires (Cascone et al., 1993).

Dans notre étude, les complémentarités de séquences plutôt que la présence de structures secondaires semblent avoir été utilisées pour la poursuite de la synthèse de l'ADNc. En effet, le point de jonction de deux des délétions étudiées était constitué de séquences identiques à la région où la délétion a été initiée (Figure 15). Il semblerait qu'une

homologie de cinq nucléotides ait été suffisante pour permettre au complexe de réplication du CaMV de se ré-associer à son nouveau gabarit.

Il est intéressant de noter, que le contexte de séquence favorisant la recombinaison par choix de copie par la RT du CaMV se situe dans les régions de la gpG qui présentent beaucoup de variations chez le VRS. Le niveau de divergence génétique entre les gpG de différents isolats du VRS est un des plus élevés parmi les produits d'expression de virus à ARN (Garcia et al., 1994). Chez des variants VRS de même sous-groupe, isolés au cours des 30 dernières années (Sullender et al., 1991; Garcia et al., 1994) et chez des VRS mutants d'échappement à la neutralisation (Garcia-Barreno et al., 1990; Rueda et al., 1994), les variations génétiques ont toujours été localisées dans deux régions distinctes du domaine extra-cellulaire de la gpG (a.a. 70 à 160 et 190 à 290). En plus des mutations de ces séquences (dont plus de 50% résultent en un changement en a.a), plusieurs insertions et délétions de nucléotides résultant en un changement de cadre de lecture ont été localisées chez différents variants entre les nucléotides 588 à 700 (Sullender et al., 1991 Cane et al., 1993; Garcia et al., 1994; Garcia-Barreno et al., 1994). Cette grande plasticité de la gpG qui permet la génération de virus fonctionnels pouvant échapper à la pression du système immunitaire de l'hôte a été associé à des séquences spécicifiques favorisant l'introduction d'erreurs par la polymérase du VRS (Cane et al., 1993). Ainsi, comme les travaux de Cane et al., (1993) l'ont suggéré, nos résultats soulignent le fait que les séquences codant pour ces deux régions de l'ectodomaine de la gpG semblent posséder des caractéristiques particulières qui prédisposent aux erreurs de polymérase.

2.2 Expression des protéines de fusion recombinantes par le CaMV

Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'expression de l'une ou l'autre des protéines recombinantes portant l'épitope de protection du VRS codé par les séquences DHFRépit ou MTIIépit ajoutées au génome du CaMV. Ces CaMV recombinants ont produit une infection systémique efficace et l'ADN codant pour les protéines de fusion était intact chez les virus isolés des plantes infectées. L'ARN 35S semblait donc être fonctionnel et la traduction de ce dernier ne semblait pas avoir été altéré. Étant donné le mode de réplication du CaMV par transcription inverse de l'ARN 35S et son mode de traduction continu du même ARN, la production d'un CaMV recombinant stable et infectieux nous indique que les protéines recombinantes devaient être synthétisées. Les séquences

introduites en remplacement du deuxième ORF auraient été exprimées à un faible niveau et/ou dégradées suite à leur synthèse.

Une modulation du niveau d'accumulation du facteur de transmission par les aphides (p18) qui est codé par le deuxième ORF du CaMV a déjà été observée. En effet, certains isolats non-transmissibles par les aphides produisent une p18 qui possède une à trois substitutions d'acides aminés et qui s'accumule à de très faibles niveaux dans la plante (Harker et al., 1987; Woolston et al., 1987). Pour un des ces isolats, ce faible niveau d'accumulation a été attribué à l'instabilité de la protéine suite à sa synthèse plutôt que par un faible niveau d'expression (Nakayashiki et al., 1993). Puisque la modification de quelques acides aminés semble résulter en ce changement de stabilité de la p18, il serait donc possible que la présence de l'épitope G du VRS en position C-terminale de la DHFR ou de la MTII ait été responsable de la dégradation des protéines de fusion.

On ne peut pas exclure la possibilité que les protéines recombinantes aient été produites de façon stable mais à un faible niveau. Il semble exister des mécanismes qui permettent une régulation différentielle des gènes codés par le CaMV (Kobayashi et al., 1998). Aussi, les différentes protéines recombinantes qui ont été exprimées via le CaMV étaient détectées à de très faibles niveaux comparativement à la p18 du CaMV(Brisson, 1984; Lefebvre et al., 1987; DeZoten et al., 1989; Nakayashiki et al., 1993). Il est donc aussi possible que l'expression ou les séquences des gpG recombinantes aient interféré avec la régulation de son expression.

Peu d'autres travaux rapportant l'utilisation du CaMV comme réplicon autosomal pour l'expression de protéines hétérologues dans la plante ont été publiés. Toutefois, d'autres stratégies utilisant le CaMV pour l'introduction de nouveaux gènes dans la plante ont été étudiées. Par exemple, un système de complémentation par co-inoculation de CaMV ayant des délétions qui se recouvrent, a permis l'obtention de mutants pouvant se maintenir de façon stable dans la plante (Hirochika et Hayashi, 1991). Cette approche pourrait permettre l'insertion de plus longues séquences dans le génome du CaMV mais n'a pas encore été exploitée. Il a aussi été possible d'obtenir l'intégration stable du CaMV dans le chromosome de la plante via le T-ADN d'Agrobacterium (agroinoculation) (Grymsley et al., 1986). Cette stratégie a surtout été utilisée comme système rapporteur pour étudier les interactions entre le T-DNA d'Agrobacterium et le génome de la plante.

3 Expression via le TMV

Au début des années 1990, des vecteurs pour expression dans la plante basés sur le génome du TMV ont montré un bon potentiel. Bien qu'il avait été soutenu que les virus à ARN ne pourraient être utilisés comme vecteurs d'expression dû à l'infidélité des polymérases dépendante d'ARN (Van Vloten-Doting et al., 1985), il a été démontré plus récemment que la fréquence d'introduction d'erreurs par la polymérase du TMV était beaucoup moins élevée que prévue et n'allait pas affecter son utilisation comme vecteur d'expression (Kearny et al., 1993). L'expression relativement stable de longues séquences étrangères a été obtenue à l'aide de TMV hybrides. Toutefois, les niveaux de synthèse des protéines étrangères n'étaient pas aussi élevés que ceux attendus. Puisque les séquences codantes de la gpG entourant l'épitope de protection étaient favorables à la recombinaison, nous n'avons pas tenté de les introduire en tant que cadre de lecture additionnel dans le génome du TMV. Nous avons plutôt décidé d'exprimer l'épitope G du VRS en fusion avec la protéine de capside du TMV. La possibilité de produire des particules virales portant à leur surface plusieurs copies de l'épitope du VRS s'avérait être très attrayante.

Dans le but d'obtenir un virus fonctionnel exprimant un haut niveau de cp recombinante dans la plante complète nous avons utilisé différentes stratégies. Les résultats obtenus par d'autres équipes soulignent une certaine sensibilité de la cp du TMV face aux modifications. Il fallait donc évaluer différentes approches pour arriver à exprimer l'épitope G du VRS à l'aide du TMV sans interférer avec les différentes fonctions virales.

3.1 Fusion de l'épitope G en position C-terminale de la cpTMV

La stratégie où l'épitope G a été ajouté à la portion C-terminale (C-ter.) de la cp du TMV ne s'est pas montrée fructueuse. En effet, l'infection par le clone TMVGCter s'est vue restreinte aux feuilles initialement inoculées. Les fonctions de réplication et de mouvement de cellule à cellule de ce virus recombinant ne semblaient pas avoir été altérées puisque les feuilles inoculées présentaient des symptômes de mosaïques chlorotiques. L'absence de symptômes sur les jeunes feuilles non-inoculées nous indiquait que ce virus recombinant était défectif pour des fonctions impliquées dans le déplacement via le système vasculaire de la plante. Les protéines de capside assemblées sous forme de particules virales sont

essentielles au mouvement systémique rapide et efficace du TMV (Saito et al, 1990). Ainsi, la présence de l'épitope G en C-ter de la cp du TMV aurait pu soit: rendre cette protéine instable, interférer avec l'assemblage ou le désassemblage des particules virales ou empêcher les interactions avec les facteurs cellulaires permettant le passage du virus dans le système vasculaire de la plante.

La portion C-ter de la cpTMV est projetée à la surface de la particule virale. Ses dix derniers a.a. sont libres d'interaction inter-ou intramoléculaire (Bloomer et al., 1978). Des changements d'acides aminées entre les résidus 151 et la terminaison carboxylique n'affecte pas la capacité des cp mutantes à s'assembler en particules fonctionnelles alors que des mutations plus en amont de cette portion (a.a 101, 120 et 143) inhibent la formation de particules virales (Saito et al, 1990). Ainsi, étant donné que l'extrémité carboxylique de la cpTMV possède une certaine flexibilité, la présence de l'épitope G entre les résidus 152 et 153 aurait du être toléré. En effet, l'ajout de 13 a.a. entre les résidus 154 et 155 de la cpTMV (Fitchen et al., 1995) ou la fusion de sept a.a. à la terminaison carboxylique de la cpTMV (Takamatsu et al., 1990b), n'ont pas empêché la production de particules virales capables de produire une infection systémique rapide et efficace. L'interférence avec le mouvement systémique du TMVGCter était donc spécifique à la composition en a.a. de l'épitope G. Nos résultats ne permettent pas d'identifier à quelle étape l'épitope a interféré avec le mouvement systémique. Il est possible que cette interférence ait été reliée à la présence des quatre résidus cystéine de l'épitope G. La formation de ponts disulfure intra ou inter cp via ces résidus ou avec des constituants de la cellule hôte auraient pu entraîner la formation de cp, ou d'agrégats non fonctionnels pouvant aussi être rapidement dégradés.

Il était important de constater que l'épitope G n'avait pas induit de réponse d'hypersensibilité chez *Nicotiana benthamiana*. Ce type de réponse de l'hôte avait été observé suite à l'inoculation de *N. tabacum L. cv.* Samsun avec un TMV recombinant où le peptide Leu enképhaline de cinq a.a. avait été fusionné en C-ter de la cp (Takamatsu *et al.*, 1990b). La réponse d'hypersensibilité qui se traduit par l'apparition de lésions de nécrose sur les feuilles inoculées limite l'infection au point d'entrée du virus.

3.2 Fusion de l'épitope G en position N-terminale de la cpTMV

Le virus recombinant TMVGNter a produit une infection systémique et a synthétisé une cp recombinante portant l'épitope G à sa terminaison aminée. Aucun résultat, jusqu'à

présent n'avait rapporté l'expression efficace d'un peptide étranger fusionné en position Nterminale de la cp du TMV. Dans notre étude, les cp recombinantes se sont accumulées à de
hauts niveaux dans les feuilles inoculées et non inoculées. En effet, l'intensité de la
coloration au bleu de Coomassie de la cpGNter, par rapport aux autres protéines de l'extrait
de plante fractionnées en SDS-PAGE, nous montre que celle-ci était exprimée et accumulée
à des niveaux comparables à la cpTMV sauvage (Figure 17 versus Figure 20). Toutefois, le
caractère insoluble de la cpGNter s'est avéré être problématique pour sa purification et
caractérisation.

La synthèse de cp insoluble par des TMV mutants générés par traitement à l'acide nitrique a déjà été observée (Hariharasubramanian et al., 1973). Comme la cpNter, ces cp mutantes ne pouvaient être solubilisées que dans l'acide acétique 67%. Ces travaux ont montré que l'insolubilité de ces cp dépendait de la mutation d'un seul acide aminé résultant en une modification de la charge électrique nette des cp mutantes (Hariharasubramanian et al., 1973). Aussi, il a été démontré que l'acétylation de la terminaison aminée des cpTMV jouait un rôle important dans la polymérisation des particules en forme de bâtonnet. En effet, en absence du groupe acétyle en position N-ter, des cpTMV portant une charge positive additionnelle avaient des propriétés et une cinétique d'assemblage in vitro différentes de celles des cp TMV sauvages dont la terminaison aminée est acétylée (Shire et al., 1990; Hwang et al., 1994). Ainsi, la présence de l'épitope G aurait pu empêcher l'acétylation de la terminaison aminée de la cpNter et/ou engendrer une modification de charge électrique rendant cette cp insoluble et incapable de former des particules en forme de bâtonnet. Le même phénomène a été observé lorsque 13 a.a. d'un épitope de la ZP3 murine avaient été ajoutés à la terminaison carboxylique de la cp TMV (Fitchen et al., 1995).

Le TMVGNter a produit une infection systémique en absence de formation de particules virales. Bien qu'il ait été démontré que la formation de particules virales était essentielle au mouvement longue distance du TMV(Saito et al., 1990), le mouvement systémique de TMV mutants défectifs pour l'assemblage de particules a déjà été observé. Ces TMV mutants, pouvaient atteindre les tissus non-inoculés par déplacement de cellule en cellule dans les tissus vasculaires (Mandahar et Garg, 1990; Ding et al., 1996) ou via le phloème sous forme de complexe "informosome" ribonucléoprotéique (Dorokhov et al.

1984). La rapidité avec laquelle le TMVGNter s'est réparti dans les tissus non-inoculés suggère que ce dernier se serait déplacé par le phloème dans le système vasculaire. En effet, les symptômes d'infection systémique par les TMV défectifs qui se déplacent de cellule en cellule n'apparaissent que 2 à 3 semaines suivant l'inoculation des plantes (Mandahar et Garg, 1990). Chez les plantes inoculées avec le TMVGNter, les symptômes d'infection systémique sont apparus après seulement 7 à 10 jours d'infection. Les cpGNter auraient donc interagi entre elles et avec l'ARN viral pour former des complexes ribonucléoprotéiques capables de se déplacer via le système vasculaire de la plante.

3.3 Production de l'épitope G via la faible terminaison de la synthèse de la cpTMV

Pour éviter l'interférence avec les fonctions de la cp, un vecteur TMV permettant la synthèse de cp intactes en plus des cp recombinantes a été développé (Hamamoto et al., 1993). Le gène de la cp de ce vecteur se termine par un contexte de faible terminaison de la traduction en aval duquel les séquences étrangères sont ajoutées. Puisque la présence de cp intacte devait permettre la formation de particules virales capables de se propager dans la plante complète, la synthèse de cp recombinantes par le passage des ribosomes au-delà du codon ambre ne devait pas interférer avec l'infectivité du virus recombinant. À l'aide de cette stratégie, nous avons tenté d'exprimer la longue séquence G762 codant pour les a.a. 168 à 234 de la gpG ainsi que l'épitope G de 16 a.a. qui lorsque fusionné directement en C-ter de la cpTMV interfère avec le mouvement du virus.

3.3.1 G762

L'inoculation des plantes avec le clone TMVG762Leaky a rapidement mené à l'apparition de symptômes sur les jeunes feuilles non-inoculées. Toutefois, seule la cp intacte a été détectée dans les plantes infectées. L'absence de la séquence G762 de l'ARN viral extrait des plantes infectées confirmait que cette dernière avait été rapidement excisée (résultats non présentés). Ce résultat suggère que la présence de la région G762 en C-ter de la cpG762Leaky aurait causé une pression de sélection négative entraînant la délétion de sa séquence codante. Toutefois, il serait intéressant de vérifier si la délétion de la séquence G762 n'était pas due à son contexte riche en résidus A et C. Si tel était le cas, il serait donc

possible que ce vecteur puisse quand même être utilisé pour l'expression stable de longues séquences en fusion avec la cpTMV.

3.3.1 LeakyRS

Lorsque seule la séquence codante pour l'épitope G a été fusionnée en aval du contexte de faible terminaison du gène de la cp du TMVLeaky, nous avons réussi à obtenir l'expression stable d'une cp recombinante portant à sa terminaison carboxylique l'épitope G de 16 a.a. Le virus recombinant TMVGLeaky a produit une infection systémique un peu retardée par rapport au virus sauvage. Les cp recombinantes issues du passage des ribosomes au-delà du codon ambre ont été détectées autant dans les feuilles inoculées que dans les feuilles non inoculées. Ainsi, la synthèse d'une cp additionnelle portant en C-ter l'épitope G n'avait pas interféré de façon significative avec les fonctions virales.

L'analyse en M.E. nous a démontré que non seulement le TMVGleaky formait des particules en bâtonnet caractéristique au TMV, mais aussi que les cp recombinantes GLeaky avaient été intégrées lors de la formation des particules virales. La même stratégie avait été utilisée avec succès pour exprimer le peptide ACEI (12 a.a., Hamamoto et al., 1993) et deux copies d'un épitope de P. yoelii (12 a.a., Turpen et al., 1995). Dans les deux cas, les virus recombinants s'étaient propagés de façon systémique dans les plantes infectées tout en exprimant les cp recombinantes. Parce que ces dernières étaient présentes dans les préparations de virus purifiées par précipitation au PEG, les auteurs avait conclu que les cp recombinantes faisaient partie des particules virales. Par le marquage à l'or colloïdal des particules TMVGLeaky à l'aide de l'Ac 18A2B2 qui est spécifique à l'épitope G, nous avons pour la première fois démontré de façon directe que les cp recombinantes, issues du passage des ribosomes au-delà du codon ambre, pouvaient interagir in vivo avec les cp intactes et mener à la formation de particules virales. Aussi, l'épitope RS était présenté à la surface du virus.

Cette stratégie s'était donc montrée utile pour contourner les problèmes que nous avions rencontrés par la fusion directe de l'épitope en C-ter de la cpTMV. Toutefois, tel que nous l'avions suggéré plus tôt, la présence des résidus cystéine de l'épitope G semblait favoriser les interactions entre les cp. En effet, les particules formées par le TMVGleaky visualisées en M.E. en présence ou en absence des Ac conjugués à l'or, se retrouvaient toujours regroupées en agrégats comparativement au TMV sauvage dont les particules

étaient réparties individuellement (Figure 22). Aussi, lorsque le TMVGleaky se retrouvait sous forme de culot concentré par précipitation au PEG, il ne pouvait être re-solubilisé contrairement au TMV sauvage qui est entièrement resupendu après sa concentration au PEG-NaCl. Cette particularité du TMVGleaky pourrait conférer un avantage pour l'immunisation contre le RSV puisque les agrégats de particules virales insolubles demeureront plus longtemps au site d'injection (Loor, 1967).

Il a été possible de purifier de 0,5 à 1,0 mg de TMVGLeaky par g de feuilles fraîches. Ces valeurs concordent avec ce qui a été rapporté pour la purification des deux autres virus recombinants leaky où 0,4 mg à 1,5 mg de virus par g de feuilles fraîches était récupéré (Hamamoto et al., 1993; Turpen et al., 1995). Le contexte dans lequel le codon ambre a été placé en terminaison du gène de la cp du TMVLeaky est le même que celui rencontré en terminaison du gène de la p126 du TMV (Hamamoto et al., 1993). Ce contexte est constitué du codon ambre suivi de la séquence CAATTA qui s'était montré important pour la suppression efficace de la terminaison de la traduction de la p126, permettant ainsi la synthèse de la p130 (Skuzeski et al., 1991). Bien que les p126 et p130 du TMV soient détectées dans les plantes infectées, aucun résultat quantitatif sur la fréquence du passage des ribosomes au-delà du codon ambre in vivo n'a été rapporté. La fréquence de faible terminaison induite par ce contexte évaluée dans des systèmes in vitro (réticulocytes de lapin, protoplastes) varie entre 5 et 20% (Pelham, 1978; Skuzeski et al., 1990). Chez les deux autres TMV recombinants leaky, les proportions de cp recombinantes portant le peptide ACEI ou l'épitope P. yoelii avaient été évaluées à partir de ces valeurs théoriques (Hamamoto et al., 1993; Turpen et al., 1995). Selon la proportion de cpGleaky que nous avons évalué par rapport aux cp intactes dans nos préparations virales, la fréquence du passage des ribosomes au delà du codon ambre dans la plante variait entre 6 et 12 %. Nous avons donc démontré que l'efficacité de la suppression de la terminaison de la traduction par ce contexte de faible terminaison se fait in vivo dans les mêmes proportions que ce qui a été observé in vitro.

Ce système nous a permis d'obtenir 30 à 60 µg de cpGleaky portant l'épitope G en sa position C-ter par g de feuilles fraîches. Ce niveau de production est plus faible que celui obtenu par la fusion directe à la cp du TMV (Fitchen *et al.*, 1995). Cependant, cette stratégie est la seule qui nous a permis d'obtenir un TMV recombinant infectieux capable

de se répartir dans tous les tissus de la plante tout en produisant l'épitope G du VRS qui pouvait être facilement purifié.

Les difficultés que nous avons observées furent principalement reliées à la composition en a.a. de l'épitope exprimer. La rigidité et la stabilité des particules en batonnêt formées par le TMV sont majoritairement apportées par les interactions entre les protéines de capside. C'est pourquoi l'addition de résidus cystéine à l'une ou l'autre des terminaisons de cette cp, a pu facilement déstabiliser ces interactions résultant en la production de virus défectifs. L'utilisation de virus dont la stabilité des particules implique plus particulièrement les interactions entre l'ARN génomique et les cp, pourrait permettre une meilleure tolérance aux modifications de surface apportées par l'addition de l'épitope G.

4 Immunogénicité des cp recombinantes

La vaccination des souris BALB/c avec les TMV recombinants portant l'épitope de protection en N-ter ou en C-ter de la cp n'a pas induit d'immunité protectrice contre le VRS. Dû à son insolubilité, le recombinant TMVGNter n'a pu être concentré et purifié pour procéder à l'immunisation des souris. Ainsi, malgré son haut niveau d'expression dans la plante, l'épitope G se retrouvait en faible proportion dans les préparations vaccinales. Le TMVGLeaky a pu être injecté de façon relativement pur, toutefois étant donné la stratégie adoptée, seulement une faible proportion des cp totales injectées présentait l'épitope. Parce que l'épitope G ne constitue pas plus de 10 % des cp recombinantes (16 a.a. versus 158) et que seulement 6 à 12 % des cp totales portent cet épitope, une dose contenant 1 mg de virus TMVGleaky ne devait pas contenir plus de 10 µg d'épitopes. La protection des souris par cet épitope injecté sous forme de peptide synthétique pur couplé au KLH nécessite 3 doses de 50 µg (Trudel *et al.*, 1991). La faible concentration de l'épitope G comparativement aux autres protéines constituant les vaccins est probablement la cause de cette absence de protection.

Une étude où le même épitope de la gpG du VRS a été exprimé par un vecteur bactériophage (fd fuse 5) en fusion avec la protéine de surface p3 montre qu'il semble exister une corrélation entre la concentration et la pureté de l'antigène injecté et l'efficacité de la protection apportée (Bastien et al., 1997). En effet, pour l'obtention d'une protection efficace contre le VRS, des préparations de phages recombinants extrêmement concentrées et purifiées ont du être injectées aux souris en quatre doses (Bastien et al., 1997).

Peu de travaux ont encore rapporté la protection d'animaux contre une infection virale par un vaccin constitué d'épitopes exprimés à la surface d'un virus de plante. L'utilisation du TMVLeaky pour la protection contre la malaria n'a pas donné les résultats escomptés (Turpen, communication personnelle) et aucun résultat sur l'activité enzymatique *in vivo* de l'ACEI produit par ce même vecteur n'a été rapporté. Une des études les plus complètes à ce sujet concerne la vaccination du vison avec un CPMV exprimant à sa surface un épitope du parvovirus de l'entérite du vison (Dalsgaard *et al.*, 1997). L'injection d'une dose de 1 mg de CPMV recombinant purifié a apporté la protection des visons contre l'infection par le

parvovirus alors que la dose de 100 µg n'avait que partiellement protégé contre les manifestations cliniques et n'avait eu aucun effet sur la réplication virale (Dalsgaard *et al.*, 1997).

Puisque nous avons pu observer une faible production d'anticorps contre le VRS dans les sérums des souris immunisées avec les préparations de TMVGNter, nous croyons que l'épitope G peut être présenté de façon efficace et que l'utilisation d'une préparation plus concentrée et mieux purifiée pourrait mener à la protection des souris.

Bien que nous n'ayons pas réussi à obtenir l'expression de sous-unités de la gpG à l'aide du CaMV, nous avons mis en lumière certaines difficultés éprouvées face à l'utilisation de ce vecteur d'expression. Par l'insertion de différentes séquences codantes de la gpG dans le génome du CaMV, nous avons pu démontrer que non seulement la taille des séquences (Gronenborn *et al.*, 1981) ou leur position d'insertion (Brisson *et al.*, 1984; Pietrzak et Hohn, 1985) était déterminante pour leur stabilité, mais qu'additionnellement la composition spécifique de la séquence elle-même pouvait entraîner sa délétion.

Ce système s'est aussi montré particulièrement utile pour l'étude du mécanisme de recombinaison par choix de copie chez le CaMV. En effet, la possibilité d'isoler dans un système *in vivo* des produits de recombinaisons intermédiaires nous a permis de mettre en évidence des séquences spécifiques favorisant la pause et l'arrêt de la RT du CaMV. L'identification de ces séquences impliquées dans des événements de recombinaisons virales est importante pour l'étude de l'évolution des virus ainsi que pour le développement des nombreuses technologies basées sur l'utilisation de génomes viraux.

Les fusions directes de l'épitope G à la cp du TMV ont apporté des contraintes sur l'infection de la plante par les virus recombinants. La portion aminée de la cp du TMV s'est montrée moins sensible aux modifications que la terminaison carboxylique. Malgré l'absence de particule virale et l'insolubilité de cp, nous avons obtenu un haut niveau d'expression de l'épitope dans la plante complète infectée par le TMVNTer. Il serait important de continuer à caractériser ce recombinant pour mieux comprendre le déplacement longue distance du TMV. De plus une méthode de purification ou solubilisation de ce virus ainsi que les travaux concernant sa reconstitution "in vitro" devrait se poursuivre.

Pour contourner les problèmes rencontrés avec les fusions directes, l'utilisation du vecteur TMVLeaky s'est montrée être une bonne stratégie. Toutefois les niveaux d'expression obtenus ne sont pas satisfaisants dans notre situation. Ce vecteur pourra se montrer utile pour l'expression d'enzyme agissant à faible concentration. Aussi, étant donné sa capacité à produire une cp recombinante en faible quantité de façon constante, il pourrait être un outil précieux pour différentes études.

Les vecteurs que nous avons utilisés pour la production de l'épitope G du VRS dans la plante ne se sont pas montrés aussi prometteurs qu'attendus. Depuis le début des années 90,

les résultats concernant la caractérisation moléculaire d'un plus grand nombre de virus de plante ont été publiés. Ces travaux, comme les nôtres, apportent de nouveaux éléments permettant l'amélioration des vecteurs d'expression dans la plante. Par exemple, les virus hybrides devraient permettre d'exploiter les avantages de virus de différents groupes. De même, les sytèmes de complémentation actuellement en développement sont une des voies qui présente le plus de chances de succès.

Bien qu'à l'aide des stratégies disponibles, nous n'ayons pu produire un vaccin efficace, nous avons obtenu des résultats qui permettent de croire que la plante pourrait être utilisée pour la production d'un vaccin contre le VRS. Tout d'abord, nous avons pu constater que l'épitope G ne produisait pas de réaction d'hypersensibilité chez le tabac. De plus, nous avons pu montrer que l'épitope produit dans la plante pouvait être reconnu par l'anticorps monoclonal spécifique et par le système immunitaire de la souris.

Remerciements

Je remercie sincèrement mes directeur et co- directeur de thèse, Dr Jean-François Laliberté et Dr Michel Trudel, qui ont initié ce projet et m'ont permis de poursuivre mes travaux de doctorat au sein de leur laboratoire.

Je désire aussi remercier le Dr Thomas Turpen de la compagnie BioSource technologies pour sa collaboration.

Mes remerciements vont aussi à Mesdames Henriette Chatelle, Francine Nadon et Cecile Séguin ainsi qu'au personnel et étudiants de l'Institut Armand-Frappier qui ont contribué de près ou de loin à cette aventure.

Merci au Dr Sylvie LaBoissière, Dr Elizabeth Memin et Dr Laurence Daheron pour leur contribution à l'avancement de ce rapport.

- ABBOTTS, J., K. BEBENEK, T.A. KUNKEL et S.H. WILSON. 1993. Mechanism of HIV-1 reverse transcriptase: Termination of processive synthesis on a natural DNA template is influenced by the sequence of the template-primer stem. J. Biol. Chem. 268: 10312-10323
- AKERLIND-STOPNER, B., G.UTTER, M.A. MUFSON, C. ORVELL, R.A. LERNER et E.NORBY. 1990. A subgroup-specific antigenic site in the G protein of respiratory syncitial virus forms a disulfide-bonded loop. J. Virol. 64: 5143-5148
- AL ANI, R., P. PFEIFFER, O. WHITECHURCH, A. LESOT, G. LEBEURIER et G. HIRTH. 1980. A virus specified protein produced upon infection of cauliflower mosaic virus. Ann. Virol (Inst. Pasteur) 131E: 33-53
- ALWAN, W.H., W.J. KOZLWSKA et P.J. OPENSHAW. 1994. Distinct types of lung disease caused by functional subsets antiviral T cells. J. Exp. Med. 179: 81-89
- ANDERSON, J.A., R.J.TEUFEL, P.D.YIN et W.S. HU. 1998. Correlated template-switching events during minus-strand DNA syntesis: a mecanism for high negative interference during retroviral recombination. J. Virol. 72: 1186-1194
- ARMOUR, S.L., U. MELCHER, T.P. PIRONE, D.J. LYTLLE et R.C. ESSENBERG. 1983. Helper component for aphid transmission encoded by region II of cauliflower mosaic virus DNA. Virology 129: 25-30
- ARNTZEN, C.J. 1997. High-tech herbal medicine: Plant-based vaccines. Nature Biotechnol. 15: 221-222
- BANGHAM, C.R.M. et A.J. MCMICHAEL. 1986. Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 370-375
- BASTIEN, N., M. TRUDEL et C. SIMARD. 1997. Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus. Virology 234: 118-122
- BELSH, R.B., E.L. ANDERSON et E.E. WALSH. 1993. Immunogenicity of purified F glycoprotein of respiratory syncytial virus: clinical and immune responses to subsquent natural infection in children. J. Inf. Dis. 168: 1024-1029
- BERNA, A., R. GAFNY, S. WOLF, W.J. LUCAS, C.A. HOLT et R.N. BEACHY. 1991. The movement protein: Role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. Virology 182, 682-689
- BLANC, S., M. CERUTTI, M. USMANY, J.M. VLACK et R. HULL. 1993. Biological activity of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor expressed in a heterolous system. Virology 192: 643-650

BLOOMER, A.C., J.N. CHAMPNESS, G. BRICOGNE, R. STADEN et A, KLUG. 1978. Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 A resolution showing the interactions within and between subunits. Nature **276**: 362-368

BONNEVILLE, J. M., H. SANFACON, J. FÜTTERER et T. HOHN. 1989. Posttranscriptional trans-activation in cauliflower mosaic virus. Cell **59**: 1135-1143

BOSSI, L. 1983. Context effects: Translation of UAG codon by suppressor tRNA is affected by the sequence followinf UAG in the message. J. Mol. Biol. 164: 1689-1700

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **78**: 248-254

BRISSON, N., J. PASZKOWSKI, J.R. PENSWICK, B. GRONENBORN, I. POTRYKUS et T. HOHN. 1984. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. Nature 310:511-514

BUTLER, P.J. 1984. The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus. J. Gen. Virol. 65: 253-279

CANE, P., D.A. MATTHEWS et C.R. PRINGLE. 1993. Frequent polymerase errors observed in a restricted area of clones derived from the attachment (G) protein gene of respiratory syncytial virus. J. Virol. 67: 1090-1093

CANNON, M.J., P.J.M. OPENSHAW et B.A. ASKONAS. 1988. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. J. Exp. Med. 168: 1163-1168

CASCONE, P.J., T.F. HAYDAR et A.E. SIMON. 1993. Sequence and structures required for recomination between virus-associated RNAs. Science 260: 801-805

CASPER, S.J. et C.A. HOLT. 1996. Expression of the green fluorescent gene from a tobacco mosaic virus-based vector. Gene 173:69-73

CASTRO, G.A. et J. ARNTZEN. 1993. Immunophysiology of the gut: a research frontier for integrative studies of the common mucosal immune system. Amer. Physiol. Soc. G599

CHAMPNESS, J., A.C. BLOOMER, G. BRICOGNE, P.J.G. BUTLER et A. KLUG. 1976. The structure of the protein disk of tobacco mosaic virus to 5 A resolution. Nature **259**: 20-24

CHENG, T.H., N.H. OLSON et T.S. BAKER. 1992. Cauliflower mosaic virus: A 420 subunit (T=7), multilayer structure. Virology **186**: 655-668

CITOVSKY, V., D. KNORR, G. SCHUSTER et P. ZAMBRYSKI. 1990. The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. Cell 60: 637-647

- CITOVSKY, V., D. KNORR et P. ZAMBRYSKI. 1991. Gene I, potential cell to cell movement locus of cauliflower mosaic virus encodes an RNA-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2476-2480
- CITOVSKY, V., M.L. WONG, L.A. SHAW, B.V.V. PRASAD et P. ZAMBRYSKI. 1992. Visualisation and characterisation of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. Plant Cell 4: 251-264
- COFFIN, J.M. 1979. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifiying hypothesis. J. Gen. Virol. 42: 1-26
- COLLINS, P.L. et G.W. WERTZ. 1983. cDNA cloning and transcriptional maping of nine polyadénylated RNAs encoded by the genome of human respiratory. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3208-3212
- COLLINS, P.L., Y.T. HUANG et G.W. WERTZ. 1984. Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides in the 10 viral genes. J. Virol. 49: 572-578
- CONNORS, M., P.L. COLLINS, C.Y. FIRESTONE, A.V. SOTNIKOV, A. WAITZE, A.R. DAVIS, P.P. HUNG, R.M. CHANOCK et B.R. MURPHY. 1992. Cotton rats previously immunized with a chimeric RSV FG glycoprotein develop enhanced pulmonary pathology when infected with RSV, a phenomenon no encountered following immunization with vaccinia-RSV recombinants or RSV. Vaccine 10: 475-484
- CORBEIL S., C. SEGUIN et M. TRUDEL. 1996. Involvement of the complement system in the protection of mice from challenge with respiratory syncytial virus Long strain following passive immunization with monoclonal antibody 18A2B2. Vaccine 14: 521-525
- CORBEIL, S. 1997. Caractérisation de la réponse immunitaire de la souris vaccinée avec le peptide synthétique G/174-187 représentant un épitope protecteur de la glycoprotéine G du virus respiratoire syncytial. Thèse de doctorat. Institut Armand-Frappier.
- COVEY, S. et R. HULL. 1981. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA. Detection of transcripts, properties and location of gene encoding the virus inclusion body protein. Virology 111: 463-474
- COVEY, S. et R. HULL. 1992. Genetic engineering with double-stranded DNA virus. CRC Press
- COVEY, S., G.P. LOMONOSSOFF et R. HULL. 1981. Characterisation of cauliflower mosaic virus DNA sequences which encode major polyadenylated transcripts. Nucl. Acids Res. 9: 6735-6747
- CROW, E.J., P.T. BUI, C.Y. FIRESTONE, M. CONNORS, W.R. ELKINS, R.M. CHANOCK et B.R. MURPHY. 1996. Live subgroup B respiratory syncytial virus vaccine that are attenuated, genetically stable, and immunogenic in rodents and nonhuman primates. J. Inf. Dis. 419: 829-839

DALSGAARD, K., A. UTTENTHAL, T.D. JONES, F. XU, A. MERRYWEATHER, W.D.O. HAMILTON, J.P.M. LANGEVELD, R. S. BOSHUIZEN, S. KAMSTRUP, G. P. LOMONOSSOFF, C. PORTA, C. VELA, J.I. CASAL, R. H. MELOEN et P.B. RODGERS. 1997. Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. Nautre Bioth. 15: 248-252

DAUBERT, S., R. RICHINS, R.J. SHEPHERD et R.C. GARDNER. 1982. Mapping of the coat protein gene of the cauliflower mosaic virus by its expression in a prokaryotic system. Virology 122: 444-449

DAUBERT, S., R.J. SHEPHERD et R.C. GARDNER. 1983. Insertional mutagenesis of the cauliflower mosaic virus genome. Gene 25: 201-208

DAUBERT, S.D., J. SCHOELZ, D. LI et R.J. SHEPHERD. 1984. Expression of disease symptoms in cauliflower mosaic virus genomic hybrids. J. Mol. Appl. Genet. 2: 537-547

DAWSON, W.O. 1983. Tobacco mosaic virus protein synthesis is correlated with double-strand RNA synthesis and not single-stranded RNA synthesis. Virology 125: 314-323

DAWSON, W.O. 1992. Tobamovirus-plant interaction. Virology 186: 359-367

DAWSON, W.O. et K.M. LETHO. 1990. Regulation of tobamovirus gene expression. Adv. Virus Res. 14; 2157-2169

DAWSON, W.O., D.L. BECK, D.A. KNORR et G.L. GRANTHAM. 1986. cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1832-1836

DAWSON, W.O., D.J. LEWANDOWSKI, M.E. HILF, P. BUBRICK, A.J. RAFFO, J.J. GRANTHAM et P.R. DESJARDINS. 1989. A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. Virology 172: 285-292

DEOM, C.M., M.J. OLIVER et R.N. BEACHY. 1987. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. Science 87: 389-394

DESTEFANO, J.J., L.M. MALLABER, L.R. RODRIGUEZ, P.J. FAY et R.A. BAMBARA. 1992. Requirements for strand transfer between internal regions of heteropolymer templated by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. J. Virol. 66: 6370-6378

DEZOETEN, J., J.R PENSWICK, M.A. HORISBERGER, P. AHL, M. SCHULTZE et T. HOHN. 1989. The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. Virolology 172: 213-222

DIAZ, L. et J.J. DESTEFANO. 1996. Strand transfer is enhanced by mismatched nucleotide at the 3' promer terminus: a possible link between HIV reverse transcriptase fidelity and recombination. Nucleic Acids Res. 24: 3086-3092

DING X., M.H. SHINTAKU, S.A. CARTER et R.S. NELSON. 1996. Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic mutants defective in phloem-dependent movement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11155-11160

DIXON, L.K. et T. HOHN. 1984. Initiation of translation of the cauliflower mosaic virus genome from polycistronic mRNA: Evidence from deletion mutagenesis. EMBO J. 3: 2731-2736

DIXON, L., T. NYFFENGGER, G. DELLEY, J. MARTINEZ-IZQUIERDO et T. HOHN. 1986. Evidence for replicative recombination in cauliflower mosaic virus. Virology 150: 463-468

DIXON, L.K., I, KOENIG et T. HOHN. 1983. Mutagenesis of cauliflower mosaic virus. Gene 25: 189-199

DONSON, J., C.M. KEARNEY, M.E. HILF et W.O. DAWSON. 1991. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7204-7208

DOROKHOV, Y.L., N.M. ALEXANDROVE, N.A. MIROSHNICHENKO et J.G. ATABEKOV. 1984. The informosome-like virus-specific ribonucleoprotein (vRNP) may be involved in the transport of tobacco mosaic virus infection. Virology 137: 127-134

DRIESEN, M., R.M. BENITO-MORENO, T. HOHN et J. FÜTTERER. 1993. Transcription from the CaMV 19S promoter and autocatalysis of translation from CaMV RNA. Virology 195: 203-210

EPIZONA, A.M., V. MEDINA, R. HULL et P.G. MARKHAM. 1991. Cauliflower mosaic virus gene II product forms distinct inclusion bodies in infected plant cells. Virology 185: 337-344

EVERARD, M.L. et A.D. MILNER. 1992. The respiratory syncytial virus and its role in acute bronchiolotis. Eur. J. Pediatr. 151: 638-651

FISHAUT, M., D. TUBERGEN et K. MCINTOSH. 1980. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity. J. Pediatr. 96; 179-186

FITCHEN, J., R. BEACHY et M.B. HEIN. 1995. Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. Vaccine 13: 1052-1057

FOX, J. L. 1996. WHO and UNICEF find vaccin too costly. Nature Biotech. 14: 1532

FRAENKEL-CONRAT, H. et R.C. WILLIAMS. 1955. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 41: 690-698

- FRANCK, A., H. GUILLEY, G. JONARD, K. RICHARDS et L. HIRTH. 1980. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. Cell 21: 285-294
- FÜTTERER, J. et T. HOHN. 1991. Translation of a polycistronic mRNA in the presence of the cauliflower mosaic virus transactivator protein. EMBO J. 10: 3887-3996
- FÜTTERER, J., K. GORDON, J.M. BONNEVILLE, H. SANFAÇON, B. PISAN, J.R. PENSWICK et T. HOHN. 1988. The leading sequence of caulimovirus large RNA can be folded into a large stem-loop structure. Nucl. Acids Res. 16: 8377-8390
- FÜTTERER, J., J.M. BONNEVILLE, K. GORDON, M. DETAPIA, S. KARISSON et T. HOHN. 1990. Positive and negative control of translation by the leader of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA. EMBO J. 9: 1697-1707
- FÜTTERER, J., S. KISS-LASZLO et T. HOHN. 1993. Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA. Cell 73: 789-802
- GADDIPATI, J.P. et A. SIEGEL. 1990. Study of TMV assembly with heterologous RNA containing the origine-of-assembly sequence. Virology 174: 337-344
- GAL, S., B. PISAN, T. HOHN, N. GRISMLEY et B. HOHN. 1992. Agroinfection of transgenic plants leads to viable cauliflower mosaic virus by intermolecular recombination. Virology 187: 525-533
- GALLIE, D.R., D.E. SLEAT, J.W. WATTTS, P.C. TURNER et T.M.A. WILSON. 1987a. The 5' leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. Nucleic Acids Res. 15: 3257-3273
- GALLIE, D.R., D.E. SLEAT, J.W. WATTTS, P.C. TURNER et T.M.A. WILSON. 1987b. A comparaison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. Nucleic Acids Res. 15: 8693-8711
- GARCIA, O., M. MARTIN, J. DOPAZO, J. ARBIZA, S. FRABASILE, J. RUSSI, M. HORTAL, P. PEREZ-BERNA, I. MARTINEZ, B. GARCIA-BARRENO et J.A. MELERO. 1994. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. J. Virol. 68: 5448-5459
- GARCIA-BARRENO, B., A. PORTELA, T. DELGADO, J.A. LOPEZ et J.A. MELERO. 1990. Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus. EMBO J. 9: 4181-4187
- GARCIA-BARRENO, B., T. DELGADO et J.A. MELERO. 1994. Oligo(A) sequences of human respiratory syncytial virus G protein gene: assessment of their genetic stability in frameshift mutants. J. Virol. 685460-5468
- GARDINER, W.E., G. SUNTER, L. BRAND, J.S. ELMER, S.G. ROGERS et D.M. BISSARO. 1988. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: The coat protein is not required for systemic spread of symptom development. EMBO J. 7: 899-904

- GARDNER, R.C. et R.J. SHEPHERD. 1980. A procedure for rapid isolation and analysis of cauliflower mosaic virus. Virology **106**: 159-161
- GLEZEN, W.P., A. PAREDES, J.E. ALLISON, L.H. TABER et A.L. FRANK. 1981. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-incom families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. J. Pediatr. 1981 98: 708-715
- GLEZEN, W.P., L.H. TABER, A.L. FRANK et J.A. KASEL. 1986. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. Am. J. Dis. Child. 140: 543-546
- GPV (Global programme for vaccines and immunization. 1996a. Immunization policy (EPI). http://www.who.org/gpv-document/inprogressfiles/xhy-vrd.htm
- GPV (Global programme for vaccines and immunization. 1996b. Vaccine research and development (VRD. http://www.who.org/gpv-dvacc/service/policy.htm
- GOELET, P., G.P. LOMONOSSOFF, P.J.G. BUTLER, M.E. AKAM, M.J. GAIT et J. KARN. 1982. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5818-5822
- GRAHAM B.S., L.A. BUNTON, P.F. WRIGHT et D.T. KARZON. 1991. Role of T lymphocyte subset in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. J. Clin. Invest. 88: 1026-1033
- GRAHAM B.S., G.S. HENDERSON, Y.W. TANG, X. LU, K.M. NEUZIL et D.G. COLLEY. 1993. Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. J. Immunol. 151: 2032-2040
- GRIMSLEY, N., T. HOHN et B. HOHN. 1986. Recombination in a plant virus: template-switching in cauliflower mosaic virus. EMBO 5: 641-646
- GRONENBORN, B., R.C. GARDNER, S. SCHAEFER et R.J. SHEPHERD. 1981. Propagation of foreign DNA in plants using cauliflower mosaic virus as vector. Nature 294, 773-776
- GROOTHIUS, J.R., E.A.F. SIMOES, M.J. LEVIN. 1993. Prophylaxis with respiratory syncytial virus immune globulin in high risk children. N. Engl. J. Med. 329: 193-206
- GRYMSLEY, N., B. HOHN, T. HOHN et R. WALDEN. 1986 Agroinfection an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3282-3285
- GUILFOYLE, T.J. 1980. Transcription of the cauliflower mosaic virus genome in isolated nuclei from turnip leaves. Virology **107**: 71-80

- GUILLET, H., R.K. DUDLEY, G. JONARDS, E. BALAZS et K.E. RICHARDS. 1982. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences and characterization of transcripts. Cell 30: 763-773
- HAHN, P. et R.J. SHEPPERD. 1982. Evidence for a 58-Kilodalton polypeptide as precursor of the coat protein of cauliflower mosaic virus. EMBO J. 2: 277-282
- HALL, C.B., K.R. POWELL, N.E. MACDONALD, C.L. GALA, M.E. MENEGUS, S.C. SUFFIN et H.J. COHEN. 1986. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. N. ENGL. J. MED. 315: 77-81
- HALL, C.B., C.B. WALSH, C.E. LONG et K.C. SCHNABEL. 1991. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. J. Infect. Dis. 163:, 693-698
- HAMAMOTO, H., Y. SUGLYAMA, N. NAKAGAWA, W. HASHIDA, Y. MATSUNAGA, S. TAKEMOTO, Y. WATANABE et Y. OKADA. 1993. A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. Bio/Tech. 11: 930-932
- HARIHARASUBRAMANIAN, V., R.C. SMITH et M ZAITLIN. 1973. Insoluble coat protein mutants of TMV: Their origin, and characterization of the defective coat proteins. Virology 55: 202-210
- HARKER, C.L., C.J. WOOLSTON, P.G. MARKHAM et A.J. MAULE. 1987. Cauliflower mosaic virus aphid transmission factor protein is expressed in cells infected with some aphid nontransmissible isolates. Virology **160**: 3081-3087
- HEMMING, V.G. W. RODRIGUEZ, H.W. KIM, C.D. BRANDT, R.H. PARROTT, B. BURCH, G.A. PRINCE, P.A. BARON, R.J. FINK et G. REAMAN. 1987. Intravenous immunoglobin treatment of respiratory syncytial virus infections in infants and young children. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1882-1886
- HEMMINGS-MIESZCZAK, M., G. STEGER et T. HOHN. 1997. Alternative structures of the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader: implication for viral expression and replication. J. Mol. Biol. 267: 1075-1088
- HERNALSTEENS, J. P., F. VAVV VLIET, M. BEUCKELEER, A. DEPICKER et G. ENGLER. 1980. The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. Nature **287**: 654-656
- HIATT, A, R. CAFFERKEY et K. BOWDISH. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. Nature 342: 76-78
- HILF, M.E., W.O. DAWSON. 1993. The tobamovirus capsid protein functions as a host-specific determinant of long-distance movement. Virology 193: 106-114
- HILLS, G.J., K.A. PLASKITT, N.D. YOUNG, D.D. DUNIGAN, J.W. WATTS, T.M.A. WILSON et M. ZAITLIN. 1987. Immunogold localisation of the intracellular sites of structural and non-structural tobacco mosaic virus proteins. Virology 161: 488-496

- HIROCHIKA, H. et K. HAYASHI. 1991. A new strategy to improve a cauliflower mosaic virus vector. Gene 105: 239-241
- HOHN T. et J. FÜTTERER. 1991. Pararetroviruses and retroviruses: a comparison of expression strategies. Sem. in Virol. 2: 55-59
- HOHN T. et J. FÜTTERER. 1992. Transcriptional control of gene expression in cauliflower mosaic virus. Curr. Opin. Genet. Dev. 2: 90-96
- HOHN, T., K. RICHARDS et G. LEBEURIER. 1981. Cauliflower mosaic virus on it way to becoming a useful plants vector. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96: 193-236
- HOWELL, S.H., L.L. WALKER et R.K. DUDLEY. 1980. Cloned cauliflower mosaic virus DNA infects turnips (*Brassica rapa*) Science **208**: 1265-1267
- HSU, K.H., M.D. LUBECK, A.R. DAVIS, R.A. BHAT, B.H. SELLING, B.M. BHAT, S. MIZUTANI, B.R. MURPHY, P.L. COLLINS, R.M. CHANOCK et P.P. HUNG. 1992. Immunogenicity of recombinant adenovirus-respiratory syncytial virus vaccines with adenovirus types 4, 5, and 7 vectors in dogs and a chimpanzee. J. Infect. Dis. 166: 769-775
- HU, W.S, E.H. BOWMAN, K.A. DELVILS et V.K. PATHAK. 1997. Homologous recombination occurs in a distinct retroviral subpopulation and exhibits high negative interference. J. Virol. 71: 6028-6036
- HUANG, Y.T. et G.W. WERTZ. 1982. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. J. Virol. 43: 150-157
- HUBERT, H.E., J.M. MCOY, J.S. SEEHRA et C.C. RICHARDSON. 1989. Human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase. J. Biol. Chem. 264: 4669-4678
- HULL, R., J. SALDLER et M. LONGSTAFF. 1986. The sequence of carnation etched ring virus DNA: comparison with cauliflower mosaic virus and retroviruses. EMBO J. 230: 1093-1102
- HULL, R., S.N.COVEY et A.J. MAULE. 1987. Structure and replication of caulimovirus genomes. J. Cell. Sci. Suppl. 7: 213-229
- HWANG, F.J., I.M. ROBERTS et T.M.A. WILSON. 1994. Assembly of tobacco mosaic virus and TMV-like pseudovirus particles in *Escherichia coli*. Arch. Virol. 9: 543-558
- ISHIKAWA, M., T. MESHI, F. MOTOYOSHI, N. TAKAMATSU et Y. OKADA. 1986. *In vitro* mutagenesis of the putative replicase genes of tobacco mosaic virus. Nucl. Acids Res. 14: 8291-8305
- ISHIKAWA, M., T. MESHI, T. OHNO et Y. OKADA. 1991. Specific cessation of minus-strand RNA accumulation at an early stage of tobacco mosaic virus infection. J. Virol. 65: 861-868

- ISSACS, D., C.R.M. BANGHAM et A.J. MCMICHAEL. 1987. Cell-mediated cytoxic response to respiratory syncytial virus in infants with bronchiolitis. Lancet ii: 769-771
- JOHNSON, P.R., R.A. OLMSTED, G.A. PRINCE, B.R. MURPHY, D.W. ALLING, E.E. WALSH et P.L. COLLINS. 1987. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. J. Virol. 61: 3163-3166
- JOSHI, S., C.W.A. PLEIJ, A.L. HAENNI, F. CHAPEVILLE et L. BOSCH. 1983. Properties of the tobacco mosaic virus intermediate length RNA-2 and its translation. Virology 127: 100-111
- KAPIKIAN, A.Z., R.H. MITCHELL, R.M. CHANOCK, R.A. SHVEDOFF et. C.E. STEWART. 1969. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. Am. J. Epidemiol. 89: 2283-2287
- KEARNY, C.M., J. DONSON, G.E. JONES et W.O. DAWSON. 1993. Low level of genetic drift in foreign sequences replicating in an RNA virus in plants. Virology, 192: 11-17
- KEITH, J. et FRAENKEL-CONRAT. 1975. Tobacco mosaic virus RNA carries 5'terminal triphosphorylated guanosine blocked by 5'-linked 7 methylguanosine. FEBS Lett. 57: 31-33
- KEREIVA, P. 1993. Transgenic plants on trial. Nature 363: 580-582
- KIM, H.W., J.G. CANCHOLA, C.D. BRANDT, G. PYLES, R.M. CHANOCK, K. JENSEN et R.H. PARROTT. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. Am J. Epidemiol. 89: 422-434
- KIM, H.W., J.O. ARROBIO, C.D. BRANT, B.C. JEFFRIES, G. PYLES, J.L. REID, R.M. CHANOCK et R.H. PARROTT. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C.I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndrome and temporal distribution of infection. Am. J. Epidem. 98: 216-225
- KIMMAN, T.G. et F. WESTENBRINK. 1990. Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. Arch. Virol. 112: 1-25
- KLARMANN, G.J., C.A. SCAUBER et B.D. PRESTON. 1993. Template-directed pausing of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase during polymerization of HIV-1 sequences in virto. J. Biol. Chem. 268: 9793-9802
- 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. 42:65-69
- KUMAGAI, M.H., T.H. TURPEN, N. WEINZETTL, G. DELLA-CIOPPA, A.M. TURPEN, J. DONSON, M.E. HILF, G.L. GRANTHAM, W.O. DAWSON, T.P. CHOW,

- M. PITATK, et L.K. GRILL. 1993. Rapid, high-level expression of biologically active atrichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 427-430
- LAI, M.M.C. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. Microbiol. Rev. 56: 61-79
- LAMPRECHT, C.L., H.E. KRAUSE et M.A. MUFSON. 1976 Role of maternal antibody in pneumonia and bronchiolitis due to respiratory syncytial virus. J. Infect. Dis. 134: 211-217
- LAWTON, M.A., M.A. TIERNEY, I. NAKAMURA, E. ANDERSON, Y. KOMEDA, P.DUBE, N. HOFFMAN, R.T. FRALEY et R.N. BEACHY. 1987. Expression of a soybean \(\beta\)-conglycinin gene under the control of the caulflower mosaic virus 35S and 19S promoters in transformed petunia tissue. Plant. Mol. Biol. 9: 315-324
- LEAMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- LEBEURIER, G., L. HIRTH, T. HOHN et B. HOHN. 1980. Infectivities of native and cloned DNA of cauliflower mosaic virus. Gene 12: 139-146
- LEFEBVRE, D.D., B.L. MIKI et J.F. LALIBERTÉ. 1987. Mammalian metallothionein functions in plants. Bio/Tech. 5: 1053-1056
- LEONARD, D.A. et M. ZAITLIN. 1982. A temperature-sensitive strain of tobacco mosaic defective in cell-to-cell movement generates an altered viral-coded protein. Virology 117: 416-424
- LETHO, K., G.L. GRANTHAM et W.O. DAWSON. 1990. Insertion of sequences containing coat protein subgenomic RNA promoter and leader in front of the tobacco mosaic virus 30K ORF delays its expression and causes defective cell-to-cell movement. Virology 174: 382-385
- LEVIN, S., R. KLAIBER-FRANCO et PARADISO. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. J. Gen. Virol. 68: 2521-2524
- LINSTEAD, P.J., G.J. HILLS, K.A. PLASKITT, I.G. WILSON, C.L. HARKER et A.J. MAULE. 1988. The subcellular location of the gene 1 product of cauliflower mosaic virus is consistent with a function associated with virus spread. J. Gen. Virol. 69: 1809-1818
- LOOR, F., 1967. Comparative immunogenicities of tobacco mosaic virus, protein subunits and reaggregated protein subunits. Virology 33: 215-219
- LUNG, M.C.Y., T.P. PIRONE. 1973. Studies on the reason for differential transmissibility of cauliflower mosaic virus isolate by aphids. Phytopathol. 63: 910-914

LUNG, M.C.Y., T.P. PIRONE. 1974. Acquisition factor required for aphid transmission of purified cauliflower mosaic virus. Virology 60: 260-264

MA, K.-C., A. HIATT, M. HEIN, N. D. VINE, F. WANG, P. STABILA, C. VAN DOLLEWEERD, K. MOSTOV et T. LEHNER. 1995. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. Science 268: 716-719

MAIA, I.G., K. SERON, A.L. HAENNI et F. BERNARDI. 1996. Gene expression from viral RNA genomes. Plant Mol. Biol. 32: 367-391

MANDAHAR, C.L. et I.D. GARG. 1990. Virus transport in plant. Plantes viruses, Vol. II Pathology, ed. C.L. Mandahar, CRC Press, Boca Raton

MANNING, D.S. et J.C. LEONG. 1990. Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 179: 16-25

MARTIN-GALLARDO, A., E. FLEISCHER, S.A. DOYLE, R. ARUMUGHAM, P.L. COLLINS, S.W. HILDRETH et P.R. PARADISO. 1993. Expression of the G glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus in *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Virol. 74: 453-458

MASON, H.S., D.M. LAM et C.J. ARNTZEN. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Porc. Natl. Acad. Sci. 89: 11745-11749

MASON, H.S., J.M. VALL, J.J. SHI, X. JIANF, M.K. ESTES et C.J. ARNTZEN. 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5335-5340

MATTHEWS, R.E.F. 1991. Plant virology 3rd edition, New York: Academic Press

MATZKE, A.J. M. et M.D. CHILTON. 1981. Site-specific insertion of genes into T-DNA of the *agrobacterium* tumor-inducing plasmid: an approach to genetic engineering of higher plant cells. J. Mol. Appl. Genet. 1: 39-49

MCINTOSH, K. et R.M. CHANOCK. 1990. Respiratory syncytial virus. In: "Virology". Fields, B.N., Knipe, D.M., Chanock, R.M., Hirsch, M.S., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B. (Ed.),. Raven Press Ltd. New York. pp. 1313-1352

MCINTOSH, K., H.B. MASTER, I. ORR, R.K. CHAO et R.M. BARKIN. 1978. The immunological response to infection with respiratory syncytial virus in infants. J Infect. Dis. 138: 24-32

MCINTOSH, K., J. MCQUILLIN et P.S. GARDNER. 1979. Cell-free and cell-bound antibody in nasal secretions from infants with respiratory syncytial virus infection. Infect. Immun. 23: 276-281

MCLAIN, L., C. PORTA, G.P. LOMONOSSOFF, Z. DURRANI et N.J. DIMMOCK. 1995. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies raised to a

- glycoprotein 41 peptide expressed on the surface of a plant virus. AIDS RES. HUM. RETRO. 11: 327-334
- MCLAIN, L., Z. DURRANI, L.A. WISNIEWSKI, C. PORTA, F.P. LOMONOSSOFF et N.J. DIMMOCK. 1996. Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. Vaccine 14: 799-810
- MESHI, T., M. ISHIKAWA, F. MOTOYOSHI, K. SEMBA et Y. OKADA. 1986. *In vitro* transcription of infectious RNAs from full-length cDNA of tobacco mosaic virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5043-5047
- MESHI, T., Y. WATANABE, T. SAITO, A. SUGIMOTO, T. MAEDA et Y. OKADA. 1987. Function of the 30kDa protein of tobacco mosaic virus: Involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. EMBO J. 6: 2557-2563
- MESHI, T., F. MOTOYOSHI, A. ADACHI, Y. WATANABE, N. TAKAMASU et Y. OKADA. 1988. Two concomitant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene, EMBO J. 7: 1575-1581
- MESHI, T., F. MOTOYOSHI, T. MAEDA, S.YOSHIWOKA, Y. WATANABE et Y. OKADA. 1989. Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kd protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. Plant Cell 1: 515-522
- MESNARD, J.M. D. KIRCHHERR, T. WURCH et G. LEBEURIER. 1990. The cauliflower mosaic virus gene III product is a non-sequence-specific DNA binding protein. Virology 176: 622-624
- MESNARD, J.M. et C. CARRIERE. 1995. Comparison of packaging strategy in retroviruses and pararetrovirus. Virology 213: 1-6
- MILLS, J., J.E. VAN KIRK, P.F. WRIGHT et R.M. CHANOCK. 1971. Experimental respiratory syncytial virus infection of adults. Possible mechanisms of resistance to infection and illness. J. Immunol. 107: 123-130
- MOUGEOT, J.L., T.GUIDASCI, T. WURCH, G. LEBEURIER et J.M. MESNARD. 1993. Identification of C-terminal amino acid residues of cauliflower mosaic virus open reading frame III protein responsible for its DNA binding activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1470-1473
- MURPHY B.R. et E.E. WALSH. 1988. Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity. J. Clin. Microbiol. 26: 1595-1597
- MUFSON, M.A., C. ORVELL, B. TAFNAR et E. NORRBY. 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. J. Gen. Virol. 66: 2111-2124

- MURPHY B.R.. G.A. PRINCE, E.E. WALSH, H.W. KIM, R.H. PARROTT, V.G. HEMMING, W.J. RODRIGUEZ et R.M. CHANOCK. 1986. Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein antibody responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine. J. Clin. Microbiol. 24: 197-202
- MURPHY, B.R., A. SOTNIKOV, A. LAWRENCE, S. BANKS, D. ALLING et G. PRINCE. 1990. Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3-6 months after immunization. Vaccine 8: 497-502
- MURPHY, B.R., S.L. HALL, A.B. KULKARNI, J.E. CROWE, P.L. COLLINS, M. CONNORS, T.A. KARRON et R.M. CHANOCK. 1994. An update on approaches to the development of respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccine. Virus Research 32: 13-36
- NAGY, P.D.et A.E. SIMMON. 1997. New insights into the mechanisms of RNA recombination. Virology 235: 1-9
- NAGY, P.D. et BUJARSKI. 1997. Engineering of homologous recombination hotspots with AU-rich sequences in brome mosaic virus. **71**:3799-3810
- NAGY P.D., C. ZHANG et A.E. SIMMON. 1998. Dissecting RNA recombination *in vitro*: role of RNA sequences and the viral replicase. EMBO J 17: 2392-2403
- NAKAYASHIKI, H., S. TSUGE, K. KOBAYASHI, T. OKUNO et I. FURUSAWA. 1993. Reasons 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. 74: 2469-2472
- NICOLAS, O. 1993. Caractérisation moléculaire du virus de la mosaïque du navet. Thèse de doctorat en virologie. Institut Armand-Frappier
- ODELL, J.T. et S.H. HOWELL. 1980. The identification, mapping and characterisation of mRNA for P66, a cauliflower mosaic virus-coded protein. Virology **102**: 349-359
- ODELL, J.T., F. NAGY et N.H. CHUA. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-812
- OLMSTED, R.A., N. ELANGO, G.A. PRINCE, B.R. MURPHY, P.R. JOHNSON, B. MOSS, R.M. CHANOCK et P.L. COLLINS. 1986. Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7462-7466.
- OLMSTED, R.A., MURPHY, P.R., L.A. LAWRENCE, N. ELANGO, B. MOSS et P.L. COLLIN. 1989. Processing, surface expression, and immunogenicity of carboxy-terminally truncated mutants of G protein of human respiratory syncytial J. Virol. 63: 411-420

OLSZEWSKI, N., G. HAGEN et T.J. GUILFOYLE. 1982. A transcriptionally active covalently closed minichromosome of cauliflower mosaic virus DNA isolated from infected turnip leaves. Cell 29: 395-401

PALANIAPPAN, C., M. WISNIEWSKI, W. WU, J. FAY et R.A. BAMBARA. 1996. Misincorporation by HIV-1 reverse transcriptase promotes recombination via strand transfer synthesis. J. Biol. Chem. 271: 22331-22338

PARROTT, R.H., H.W. KIM, J.O. ARROBIO, D.S. HODES, B.R. MURPHY, C.D. BRANT, E. CAMARGO et R.M. CHANOCK. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. Am. J. Epidemiol. 98: 289-300

PAYMENT, P. et M. TRUDEL. 1989. Manuel de techniques virologiques. Presses de l'Univesité du Québec/AUPELF

PELHAM, H.R.B. 1978. Leaky UAG termination codon in tobacco mosaic virus RNA. Nature 272: 469-471

PEN, J., L. MOLENDYK, W.J. QUAX, P.C. SYMONS, A.J.J. VAN OOIJEN, P.J.M. VAN DEN ELZEN, K. RIETVELD et A. HOEKEMA. 1992. Production of active bacillus licheniformis alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. Biotech. 10: 292-296

PENNINGTON, R.E. et U. MELCHER. 1993. In planta of DNA inserts from the large intergenic region of cauliflower mosaic virus DNA. Virology 192: 188-196

PERBAL., M.C., C.L. THOMAS et A.J. MAULE. 1993. Cauliflower mosaic virus gene I product forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. Virology 195: 281-285

PFEIFFER, P. et T. HOHN. 1983. Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: a detailed model and test of some aspects. Cell 33: 781-789

PIEDRA, P.A., P.R. WIDE, W.L. CASTLEMAN, M.W. AMBROSE, A.M. JEWELL, D.J. SPEELMAN et S.W. HILDRETH. 1993. Enhanced pulmonary pathology associated with the use of formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine in cotton rats is not a unique viral phenomenon. Vaccine 11:615-618

PIETRZAK, M. et T. HOHN. 1985. Replication of the cauliflower mosaic virus: role and stability of the cloned d3 discontinuity sequence. Gene 33: 169-179

PLANT, A.L., S.N. COVEY et D. GRIERSON. 1985. Detection of sub genomic mRNA for gene V, the putative reverse transcriptase gene of cauliflower mosaic virus. Nucl. Acids Res. 13: 8305-8321

PORTA, C., V.E. SPALL, J.LOVELANT, J.E. JOHNSON, P.J. BARKER et G.P. LOMONOSSOFF. 1994. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. Virology **202**: 949-955

- POWER, U.F., H. GILQUIN, T. HUSS, A. ROBERT, M. TRUDEL, S. STAHL, M. UHLEN, T. N. NGUYEN et H BINZ. 1997. Induction of protective immunity in rodent by vaccination with a prokaryotilly expressed recombinant fusion protein containing a respiratory virus G protein fragment. Virology 230: 155-166
- PRINCE G.A., A.B. JENSON, V.G. HEMMING, B.R. MURPHY, E.E. WALSH, L. HORSWOOD, et R.M. CHANOCK. 1986. Enhancement of respiratory syncytial virus pulmonary pathology in cotton rats by prior intramuscular inoculation of formalin inactivated virus. J. Virol. 57: 721-728
- PRINGLE, C.R., A.H. FILIPIUK, B.S. ROBINSON, P.J. WATT, P. HIGGINS et D.A.J. TYRRELL. 1993. Immunogenicity and pathogenicity of a triple temperature-sensitive modified respiratory syncytial virus in adult volunteers. Vaccine 11: 473-478
- REINERO, A. et R.N. BEACHY. 1986. Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. Plant Mol. Biol. 6: 291-301
- REINERO, A. et R.N. BEACHY. 1989. Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with tobacco mosaic virus. Plant. Physiol. 89: 111-116
- RICHARD, K.E., H. GUILLET et G. JONARD. 1981. Further characterization of the discontinuities in cauliflower mosaic virus DNA. FEBS Lett. 134:67-70.
- ROHDE W., A. GRAMSTAT, J. SCHIMTZ, E. TACKE et D. PRUFER. 1994. Plant viruses as model systems for the study of non-canonical translation mechanisms in higher plants. J. Gen. Virol. 75: 2141-2149
- ROTHNIE, H.M., Y. CHAPDELAINE et T. HOHN. 1994. Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies. Adv. Virus Res. 44: 1-67
- RUEDA, P., B. GARCIA-BARRENO et J.A. MELLERO. 1994. Loss of conserved cysteine residues in the attachment (G) glycoprotein of two human respiratory syncytial virus escape mutants that contain multiple a-g substitutions (hypermutations). Virology 198: 653-662
- SAITO, T., T. MESHI, N. TAKAMATSU et Y. OKADA. 1987. Coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus encode host response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6074-6077
- SAITO, T., K. YAMANAKA et Y. OKADA. 1990. Long-distance movement and viral assembly of tobacco mosaic virus mutants. Virology, 176: 329-336.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- SAMUEL, G. 1934. The movement of tobacco mosaic virus within the plant. ANN. APPL. BIOL. 21: 23-33

SANFACON, H. 1992. Regulation of mRNA formation in plants: lessons from the cauliflower mosaic virus transcription signals. Can. J. Bot. 70: 885-899

SANTA CRUZ, S., S. CHAPMAN, A.G. ROBERTS, I.M. ROBERTS, D.A.M. PRIOR, et K.J. OPARKA. 1996. Assembly and movement of plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. Proc. Natl. Sci. USA 93: 6286-6290

SCHOELZ, J.E. et R.J. SHEPHERD. 1988. Host range control of cauliflower mosaic virus. Virology **162**: 30-37

SCHOELZ, J.E. et M. ZAITLIN. 1989. Tobacco mosaic virus TNA enters chloroplasts in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 4496-4500

SHAW, J.G., K.A. PLASKITT et T.M.A. WILSON. 1986. Evidence that tobacco mosaic virus particles disassemble cotranslationally *in vivo*. Virology **148**: 247-256

SHEPHERD, R.J. 1976. DNA viruses of higher plants. Adv. Virus Res. 20: 305-339

SHEPHERD, R.J., R.J. WAKEMAN et R.R. ROMANKO. 1968. DNA in cauliflower mosaic virus. Virology 36: 150-152

SHEPHERD, R.J., G.E. BRUENING et R.J. WAKEMAN. 1970. Double-strand DNA from cauliflower mosaic virus. Virology 41: 339-347

SHEPHERD, R.J., R. RICHINS et T.A. SHALLA. 1980. Isolation and properties of the inclusion bodies of cauliflower mosaic virus. Virology 102: 389-400

SHIRE, J.S., P. MCKAY, C.W. LEUNG, G.J. CACHIANES, E. JACKSON et W.I. WOOD. 1990. Preparation and properties of recombinant DNA derived tobacco mosaic virus coat protein. Biochem. 29: 5119-5126

SIEGEL, A., V. HARI et K. KOLACZ. 1978. The effect of tobacco mosaic virus infection on host and virus-specific protein synthesis. Virology 85: 494-503

SIJMONS, P.C., B.M. DEKKER, B. SCHRAMMEIJER, T.C. VERWOERD, P.J.M. VAN DEN ELZEN et A. HOEKEMA. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. Biotech. 8: 217-221

SIMARD, C., F. NADON, C. SEGUIN et M. TRUDEL. 1995. Evidence that the amino acid region 124-203 of glycoprotein G from respiratory syncytial virus (RSV) constitutes a major part of the polypeptide domain that is involved in the protection against RSV infection. Antiviral Res. 28, 303-315

SIMARD, C., F. NADON, C. SEGUIN, T.N. NGUYEN, H. BINZ, J. BASSO, J.F. LALIBERTE et M. TRUDEL. 1997. Subgroup specific protection of mice from respiratory syncytial virus infection with peptides encompassing the amino acid region 174-187 from the G glycoprotein: the role of cysteinyl residues in protection. Vaccine 15: 423-432

- SIMON, A. 1991. "Plant pharmer" transform tobacco to produce proteins. Genet. Engine. Nov/Dec: 54
- SKUZESKI, J.M., L.M. NICHOLS et R.F. GESTELAND. 1990. Analysis of leaky viral translation termination codons *in vivo* by transient of improved B-glucuronidase vectors. Plant Mol. Biol. 15: 65-79
- SKUZESKI, J.M., L.M. NICHOLS, R.F. GESTELAND et J.F. ATKINS. 1991. The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons. J. Mol. Biol. 218: 365-373
- SLEAT, D.E., P.C. TURNER, J.T. FINCH, P.J.G. BUTLER et T.M.A. WILSON. 1986. Packaging of recombinant RNA molecules into pseudovirus particles directed by the origin-of-assembly sequence from tobacco mosaic virus RNA. Virology 155: 299-308
- SRIVASTAVA, A.K., K. MORITA, S. MATSUO, M. TANAKA et A. IGAZASHI. 1991. Japenese encephalitis virus fusion protein with protein A expressed in *Escherichia coli* confers protective immunity in mice. Microbiol. Immunol. 35: 863-870
- SRIVASTAVA, A.K, J.R. PUTNAK, R.L. WARREN et C.H. HOKE. 1995. Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. Vaccine 13: 1251-1258
- STOTT et TAYOLR. 1985 Respiratory syncytial virus. Arch. Virol. 84: 1-52
- STOTT, T., C.R. PULLAN et J. MCQUILLAN. 1984. Cell-mediated immunity in respiratory syncytial virus disease. J. Med. Virol. 13: 105-114
- STOTT, E.J., L.A. BALL, K. ANDERSON, K.K.Y. YOUNG, A.M.Q. KING et G.W. WERTZ. 1987. Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. J. Virol. 61: 3855-3861
- SUGIYAMA, Y., H. HAMAMOTO, S. TAKEMOTO, Y. WATANABE et Y. OKADA. 1995. Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. FEBS Lett.359: 247-250
- SULLENDER, W.M., K. ANDERSON et G.W. WERTZ. 1990. The respiratory syncytial virus subgroup B attachment glycoprotein: analysis of sequence, expression from a recombinant vector, and evaluation as an immunogen against homologous and heterologous subgroup virus challenge. Virology 178: 195-203
- SULLENDER, W.N., M.A. MUFSON, L.J. ANDERSON et G.W. WERTZ. 1991 Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. J. Virol. 65: 5425-5434
- SULZINSKI, M.A., K.A. GABARD, P. PALUKAITIS et M. ZAITLIN. 1985. Replication of tobacco mosaic. VIII. Characterisation of a third subgenomic TMV RNA. Virology 145: 132-140

- TAKAMATSU, N., M. ISHIKAWA, T. MESHI et Y. OLADA. 1987. Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. EMBO J 6: 307-311
- TAKAMATSU, N., Y. WATANABE, T. MESHI et Y. OLADA. 1990a. Mutational analysis of the pseudoknot region in the 3' noncoding region of toabcco mosaic virus TNA. J. Virol. 8: 3686-3693
- TAKAMATSU, N., Y. WATANABE, H. YANAGI, T. MESHI, T. SHIBA et Y. OKADA. 1990b. Production of enkephalin in tobacco protoplasts using tobacco mosaic virus RNA vector. FEBS **269**: 73-76
- TARIQ, A., H.S. MASON, J.D. CLEMENTS et C.J. ARNTZEN. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. Science 268: 714-719
- THANAVALA, Y., Y.F. YANG, P. LYONS, H.S. MASON et C. ARNTZEN. 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3358-3361
- THO, H., H. HAYASHIDA et T. MIJOTA. 1983. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus. Nature 305: 827-829
- TOMS, G.L. et R. STOTT. 1987. Respiratory syncytial virus and the infant immune response. Arch. Dis. Childhood 92 544-546
- TRISTRAM, D.A., R.C. WELLIVER, C.K. MOHAR, D.A. HOGERMAN, S.W. HILDRETH et P. PARADISO. 1993. Immunogenicity and safety of respiratory syncytial virus subunit vaccine in seropositive children 18-38 months old. J. Inf. Dis. 167: 191-195
- TRISTRAM, D.A., R.C. WELLIVER, D.A. HOGERMAN, S.W. HILDRETH et P. PARADISO. 1994. Second-year surveillance of recipients of a respiratory syncytial virus (RSV) F protein subunit vaccine, PFP-1: Evaluation of antibody persistence and possible disease enhancement. Vaccine 12: 551-556
- TRUDEL, M., F. NADON, C. SEGUIN et H BINZ. 1991. Protection of BALB/c mice from respiratory syncytial virus infection by immunization with a synthetic peptide derived from the G glycoprotein. Virology **185**: 749-757
- TURNER, D.R., C.J. McGUIGAN et P.J.G. BUTLER. 1989. Assembly of hybrid RNAs with tobacco mosaic virus coat protein. Evidence for incorporation of disks in 5' elongation along the major RNA tail. J. Mol. Biol. 209: 407-422
- TURNER, D.S. et S.N. COVEY. 1984. A putative primer for the replication of cauliflower mosaic virus by reverse transcription is virion-associated. FEBS Lett. 165: 285-389

TURPEN, T. H., S.J. REINL, Y. CHAROENVIT, S. L. HOFFMAN, V. FALLARME et L.K. GRILL. 1995. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. Bio/Tech. 13: 53-57

USHA, R., J.B. ROHLL, V.E. SPALL, M. SHANKS, A.J. MAULE, J.E. JOHNSON et G.P. LOMONOSSOFF. 1993. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. Virology **197**:366-374

VADEN, V. et U. MELCHER. 1990. Recombination sites in cauliflower mosaic virus DNAs: Implications for mechnisms of recombination. Virology 177: 717726

VALLE, R.P.C., G. DRUGEON, M.D. DEVIGNES-MORCH, A.B. LEGOCKI et A.L. HAENNI. 1992. Codon context effect in virus translational readthrough: A study *in vitro* of the determinants of TMV and Mo-MuLV amber suppression. FEBS **306**: 133-139

VAN VLOTEN-DOTING, L., F.J. BOL et B. CORNELISSEN. 1985. Plant-virus-based vectors for gene transfer will be of limited use because of the high error frequency during viral RNA synthesis. Plant Mol. Biol. 4: 323-326

VANDEKERCKHOVE, J., J. VANDAMME, M. VAN LIJSEBETTENS, J. BOTTERMAN, M. DE BLOCK, M. DECLERCQ, J. LEEMANS, M. VAN MONTAGU et E. KREBBERS. 1989. Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. Bio/Tech. 7: 929-932

VAUX-PERETZ, F., J.M. CHAPSAL et B. MEIGNIER. 1992. Comparison of the ability formalin inactivated respiratory syncytial virus, immunopurified F,G and N proteins and cell lysate to enhance pulmonary changes in Balb/c mice. Vaccine 10:113-118

VOLOVITCH, M., N. MODJTAHEDI, P. YOT et G. BRUN. 1984. RNA-dependent DNA polymerase activity in cauliflower mosaic virus-infected leaves. EMBO J. 3: 309-314

WALSH, E.E. et J. HRUSKA. 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. J. Virol. 47: 171-177

WALSH, E.E., C.B. HALL, M. BRISELLI, M.W. BRANDRISS et J.J. SCHLESINGER. 1987. Immunization with glycoprotein subunits of respiratory syncytial virus to protect cotton rats against viral infection. J. Infect. Dis. 155-1198-1204

WANG, E.E., B.J. LAW et D. STEPHENS. 1995. Pediatric investigators collaborative network on infections in Canada (PINIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. J. Pediatr. 126: 212-219

WARIS M.E., C. TSOU, D.D. ERDMAN, S.R. ZAKI et L.J. ANDERSON. 1996 Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. J. Virol. 70: 2852-2860

WATANABE, Y., Y. EMORI, I. OOSHIKA, T. MESHI, T. OHNO et Y. OKADA. 1984. Synthesis of TMV-specific RNAs and proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: Transient expression of the 30K protein and its mRNA. Virology 133: 18-24

WATHEN, M.W., T.J. KAKUK, R.J. BRIDEAU, E.C. HAUSKNECHT, S.L. COLLE et R.M. ZAYA. 1991. Vaccination of cotton rats with chimeric FG glycoprotein of human respiratory syncytial virus induces minimal pulmonary pathology on challenge. J. Infect. Dies. 163: 477-482

WEISING, K., J. SCHELL et G. KAHL. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications. Annu. Rev. Genet. 22: 421-477

WHO (World Health Organisation). 1996. State of the world's vaccines. http://www.who.ch

WILSON, T.M.A. 1984. Cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus *in vitro*. Virology **137**: 255-265

WOLF, S., C.M. DEOM, R.N. BEACHY et W.J. LUCAS. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. Science 246: 337-379

WOOLSTON, C.J., J. COVEY, J.R. PENSWICK et J.W. DAVIES. 1983. Aphid transmission and a polypeptide are specified by a defined region of the cauliflower mosaic virus gene 2 responsible for aphid transmissibility. Virology 23: 15-23

WOOLSTON, C.J., L.G. CZAPLEWSKI, P.G. MARKHAM, A.S. GOAD, R. HULL et J.W. DAVIES. 1987. Location and sequence of a region of cauliflower mosaic virus gene 2 responsible for aphid transmissibility. Virology **160**: 246-251

WU, E., B.M. BLUMBERG, P.J. FAY et R.A. BAMBARA. 1995. Strand transfer mediated by human immunodeficiency virus reverse transcriptase *in vitro* is promoted by pausing and results in misincorporation. J. Biol. Chem. **270**: 325-332

YUSIBOV, V., A. MODELSKA, K. STEPLEWSKI, M. AGADJANYN, D. WEINER, D.C. HOOPER et H. KOPROWSKI. 1997. Antigens produced in plant by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies and HIV-I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5784-5788

ZIMMERN, D. et T.M.A. WILSON. 1976. Location of the origin for viral reassembly on tobacco mosaic virus RNA and its relation to stable fragment. FEBS Lett. 71: 5818-5822