
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

ANNE CHARBONNEAU

EXPRESSION DE GÈNES DU VIRUS DE LA
MOSAÏQUE DU NAVET DANS *E. COLI*

MAI 1992

À "tutti quanti"

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
SOMMAIRE	viii
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. LES POTYVIRUS	5
2. LES PROTÉINES POTYVIRALES	7
2.1 31 kDa	7
2.2 Le composant d'aide: 60 kDa	7
2.3 45 kDa	8
2.4 L'hélicase	8
2.5 La 6 kDa	8
2.6 La VPg et la protéase NIa	9
2.7 La réplicase (NIb)	10
2.8 La protéine de la capside	11
3. LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU NAVET	12
4. TRANSMISSION ET INFECTION VIRALES	15
5. LES PROTÉASES VIRALES	18
5.1 La protéolyse chez les picornavirus	18
5.2 La protéolyse chez les potyvirus	22
5.3 Les séquences reconnues par la protéase NIa	25
5.4 HC-PRO: seconde protéase potyvirale	27
6. LE SYSTÈME D'EXPRESSION	28
MATÉRIEL ET MÉTHODES	32
1. MILIEUX ET TAMPONS	33

2.	DIGESTION ENZYMATIQUE D'ADN	34
3.	ÉLECTROÉLUTION	34
4.	LIGATION	34
5.	EXTRACTION ET PRÉCIPITATION D'ADN	35
6.	BACTÉRIES COMPÉTENTES	35
7.	TRANSFORMATION BACTÉRIENNE	35
8.	EXTRACTION DES PLASMIDES	36
9.	HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	36
10.	MARQUAGE DE L'ADN AVEC $P\alpha^{32}$	36
11.	EXPRESSION DE GÈNES CLONÉS DANS <i>E. COLI</i>	36
12.	ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE SDS	37
13.	IMMUNODÉTECTION	37
	13.1 Transfert	37
	13.2 Marquage à la protéine A radioiodinée	37
14.	MARQUAGE À LA MÉTHIONINE- $[^{35}\text{S}]$	38
	RÉSULTATS	39
1.	CONSTRUCTION DES PLASMIDES	40
	1.1 Construction du plasmide pAC1	40
	1.2 Construction du plasmide pAC2	43
	1.3 Construction du plasmide pAC3	47
2.	PROTÉINE DE LA CAPSIDE	50
	2.1 Expression du gène de la protéine capsidaire dans <i>E. coli</i>	51
	2.2 Immunodétection de la protéine de la capside	51
3.	ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA PROTÉASE VIRALE NIa PRODUITE PAR LES SOUCHES <i>E. COLI</i> 180 ET 189	53

3.1	Activité protéolytique de la protéase virale NIa en gel de polyacrylamide coloré au bleu de coomassie	55
3.2	Activité protéolytique de la protéase virale NIa montrée par le marquage des protéines à la méthionine-[³⁵ S]	58
3.3	Activité protéolytique montrée par immunodétection ...	62
DISCUSSION		69
1.	EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTÉINE DE LA CAPSIDE DU TuMV DANS <i>E. COLI</i>	70
2.	ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA PROTÉASE VIRALE NIa DU TuMV DANS <i>E. COLI</i>	73
CONCLUSION		82
REMERCIEMENTS		84
TABLEAUX		87
BIBLIOGRAPHIE		92

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	:	Enzymes de restriction utilisées	87
TABLEAU II	:	Souches de bactéries utilisées pour les transformations	88
TABLEAU III	:	Description des souches utilisées pour la construction des plasmides	89
TABLEAU IV	:	Description des souches de bactéries produites	91

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 :	Organisation du génome des potyvirus	6
FIGURE 2 :	a. Particule virale du TuMV	14
	b. ARN du TuMV	14
FIGURE 3 :	La protéolyse chez les picornavirus	19
FIGURE 4 :	La protéolyse chez les potyvirus	21
FIGURE 5 :	Vecteur d'expression pET	31
FIGURE 6 :	Construction du plasmide pAC1	41
FIGURE 7 :	Construction du plasmide pAC2	45
FIGURE 8 :	Construction du plasmide pAC3	48
FIGURE 9 :	Production de la protéine de la capsid du TuMV dans <i>E. coli</i>	52
FIGURE 10:	Immunodétection de la protéine de la capsid	54
FIGURE 11:	Production des polyprotéines de 3.1 Kb (pAC2) et de 5.1 Kb (pAC3) du TuMV dans <i>E. coli</i>	57
FIGURE 12:	Autoradiogramme des protéines du TuMV marquées à la méthionine-[³⁵ S] et produites dans <i>E. coli</i>	60
FIGURE 13:	Immunodétection de protéines du TuMV produites dans <i>E. coli</i>	65

SOMMAIRE

Des ADNc du virus de la mosaïque du navet (TuMV) ont été sous-clonés dans un des vecteurs d'expression pET-11 et exprimés dans la bactérie *Escherichia coli*. Le premier ADNc, sous-cloné dans le vecteur pET-11d, incluait le gène de la protéine de la capsid (plasmide pAC1). Le deuxième ADNc, sous-cloné dans le vecteur pET-11a, incluait les gènes des protéines virales CI, 6K, NIa et NIB (plasmide pAC2). Le troisième, également sous-cloné dans le vecteur pET-11a, portait les gènes du plasmide pAC2 et, en plus, l'extrémité 3' du gène de la NIB et le gène complet de la protéine de la capsid (plasmide pAC3). Les plasmides ont été introduits dans la bactérie BL-21 (DE-3) et les protéines bactériennes ont été analysées pour la production des protéines recombinantes. Ces transformations ont produit trois nouvelles souches numérotées respectivement 164, 180, 189. La souche 164 qui contenait le plasmide codant pour la capsid a été induite et les produits de l'expression ont été électrophorés en gel de polyacrylamide et analysés par coloration du gel au bleu de coomassie et par immunodétection. La protéine majeure observée et représentant 30% des protéines totales de *E. coli* BL-21 (DE-3) correspondait à la protéine de la capsid telle que confirmée par l'immunodétection. Les produits d'expression des souches 180 et 189, portant les ADNc de polyprotéines virales, ont été analysés par coloration des gels de polyacrylamide au bleu de coomassie, par marquage des protéines à la méthionine-[³⁵S] et par immunodétection. Les différents résultats ont montré que la protéase virale incluse dans la polyprotéine produite par les souches 180 et 189 était active dans *E. coli*. Les principaux produits de protéolyse

visibles au bleu de coomassie correspondaient à la protéine CI et au dimère CI-6K provenant de la protéolyse de l'extrémité aminée des deux ADNc. Ces produits étaient aussi détectés par le marquage des protéines à la méthionine-[³⁵S] et leur identité a été confirmée par l'immunodétection effectuée avec les anti-CI du TEV. Les produits de protéolyse de l'extrémité carboxyle des souches 180 et 189 ont été identifiés par immunodétection. La protéine d'environ 21 kDa produite dans la souche 180 et détectée par les anti-NI du TEV correspondrait à la protéase N1b tronquée. La protéine de la capsidite produite dans la souche 189 et détectée par les anti-capsides du TuMV a un poids moléculaire inférieur à la protéine de la capsidite native de 3000. Aucune protéase (N1a) libre n'est détectée indiquant, par ce fait, que la protéase virale coupe les différents sites de la polyprotéine en étant unie à d'autres protéines.

INTRODUCTION

Les interactions plante-virus sont des phénomènes très peu étudiés. On ne sait pas encore quels sont les événements qui conduisent à l'apparition des symptômes et quels sont les gènes de l'hôte qui sont requis pour la réplication virale. Étant donné que les événements précoces de la réplication se produisent rapidement après l'infection des cellules végétales, ceux-ci sont difficilement démontrables. Certaines protéines virales n'ont jamais pu être isolées de plants infectés, même si des gènes viraux codant pour celles-ci ont été identifiés. Il est difficile d'étudier la fonction des différentes protéines virales dans la plante et les protéines isolées de plants infectés sont parfois réfractaires au séquençage de leur extrémité aminée. Il devient donc avantageux de pouvoir les produire individuellement ou associées à quelques-unes d'elles, seulement dans un système d'expression hétérologue comme, par exemple, *E. coli*.

La production de protéines virales dans *Escherichia coli* permet également la production rapide d'anticorps indispensables à la détection des protéines virales produites *in vitro* ou *in vivo*. Elle permet de purifier d'importantes quantités de protéines pour en déterminer leur fonction. L'expression des gènes viraux dans *E. coli* permet aussi d'accomplir des études de mutagénèse en un temps beaucoup plus court que celles pouvant être faites *in vivo*.

De plus, puisque les virus produisent une grande quantité de protéines lors de l'infection, ils sont donc une source potentielle d'éléments génétiques pouvant servir à la construction de vecteurs d'expression chez les plantes.

Nous avons choisi d'exprimer les protéines virales chez *E. coli* à cause de la simplicité technique de l'expression et de l'importante quantité de protéines pouvant être obtenue dans ce système. Enfin, de nombreux travaux antérieurs indiquaient que les protéines produites chez *E. coli* conservaient leur activité biologique, fait important puisque de nombreuses protéines virales sont des enzymes directement impliquées dans la réplication du virus, d'où l'importance de conserver leur activité biologique pour les caractériser.

Les objectifs du travail consistent à produire des protéines du virus de la mosaïque du navet en grande quantité dans un système hétérologue et à vérifier le maintien de leur activité biologique dans un but ultérieur d'étudier le fonctionnement du virus de la mosaïque du navet au niveau moléculaire.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES POTYVIRUS

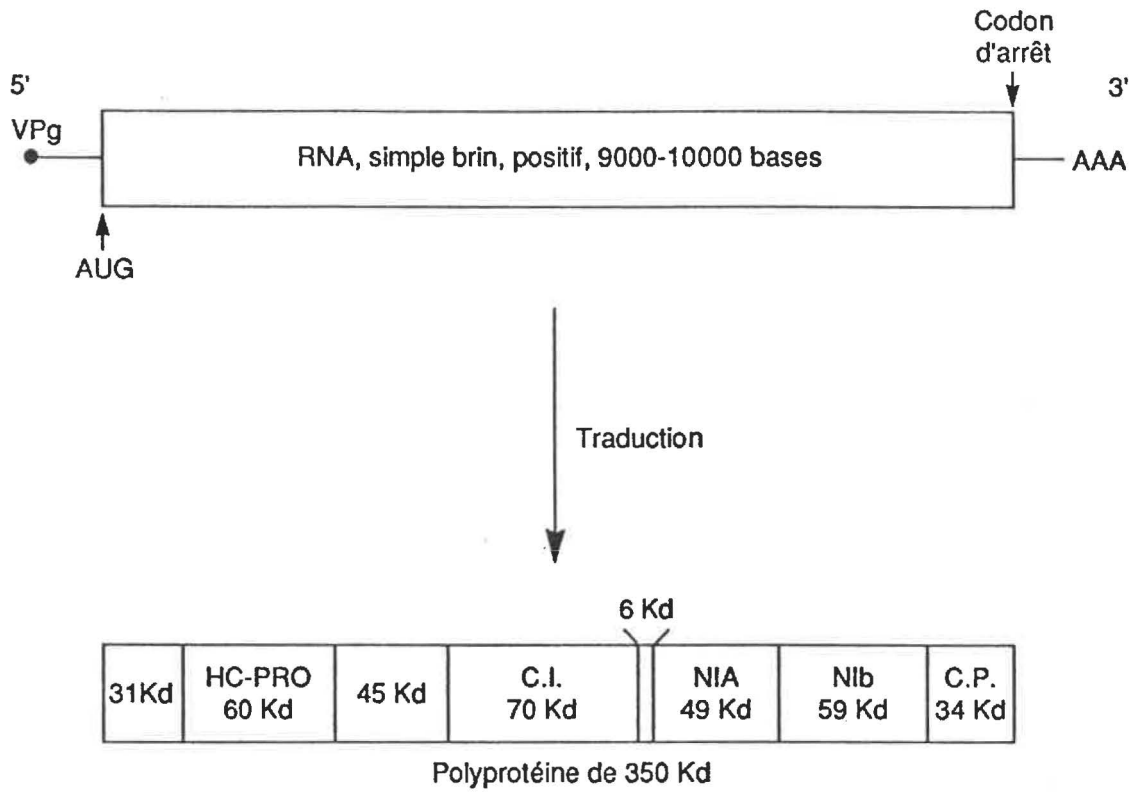
Le groupe des potyvirus est le plus important groupe des virus de plante (Wellink et Van Kammen, 1988). Le nom du groupe a été choisi en fonction du premier virus identifié, le virus Y de la pomme de terre (potato virus Y). La particule virale des potyvirus est de forme filamenteuse et fait entre 680 et 900 nm de longueur (Hollings et Brunt, 1981). Les monomères de la protéine de la capsid s'enchevêtrent de manière hélicoïdale autour de l'ARN génomique, pour engendrer la particule virale composée de 95% de protéine et de 5% d'acides nucléiques (Hollings et Brunt, 1981).

Le génome potyviral est un ARN simple brin positif formé d'environ dix milles nucléotides, d'un poids moléculaire de $3,0 \times 10^6$ daltons. À son extrémité 5' est fixée covalentiellement une protéine, la VPg ("viral protein genome linked"). L'extrémité 5' inclus une région non-codante riche en nucléotides A et U. L'extrémité 3' se termine, elle aussi, par une région non-codante à laquelle se greffe une queue de poly A (Matthews, 1991).

Ce groupe de virus de plante possède une seule stratégie pour l'expression des gènes, la polyprotéine impliquant un cadre unique de lecture de transcription de l'ARN génomique (Matthews, 1991). La traduction de l'ARN positif sur les ribosomes de la cellule hôte donne naissance à une polyprotéine, d'un poids moléculaire moyen de 350,000, de laquelle seront libérées au moins huit protéines

FIGURE 1: Organisation du génome des potyvirus.

Génome des potyvirus



virales par l'action de protéases virales. L'organisation des gènes codant pour ces protéines est représentée à la figure 1.

2. LES PROTÉINES POTYVIRALES

2.1 31 kDa

La protéine de 31 kDa, située à l'extrémité aminée de la polyprotéine, serait responsable du mouvement intercellulaire du virus dans la plante infectée (Déom *et al*, 1987). Cette protéine s'accumulerait dans la paroi cellulaire des plasmodesmes et modifierait l'ouverture de ceux-ci en augmentant leur limite d'exclusion moléculaire (Shmuel *et al*, 1989; Atkins *et al*, 1991).

2.2 Le composant d'aide: 60 kDa

Le gène de cette protéine est localisé à l'extrémité 5' du génome viral, entre la protéine de 31 kDa et celle de 45 kDa. Le composant d'aide (HC-PRO: "Helper component-proteinase") est une protéine nécessaire à la transmission du virus par les pucerons. Elle permet la fixation du virus au puceron lors de l'"acquisition", étape initiale de la prise de nourriture de l'insecte. D'un poids moléculaire d'environ 60 kDa, cette protéine est libérée de la polyprotéine par autocatalyse (Carrington *et al*, 1989b), puisque son extrémité carboxyle porte une activité protéase qui reconnaît les acides aminés gly-gly à la jonction HC-45 kDa (Carrington *et al*, 1989a). Le composant d'aide associé à la protéine de 31 kDa est coupé de celle-ci par l'action d'une autre protéase qui n'a pas encore été identifiée (Carrington *et al*,

1990). Cette protéine s'accumule sous forme d'inclusions cytoplasmiques amorphes dans les cellules végétales infectées par un potyvirus (Matthews, 1991).

2.3 45 kDa

La séquence en acides aminés de la protéine de 45 kDa de quelques potyvirus aurait un certain degré d'homologie avec la protéase 2A présente chez le virus de la polio (Domier *et al*, 1987). On lui attribue une fonction protéase hypothétique bien que cette activité n'ait pas encore été démontrée.

2.4 L'hélicase

Les inclusions cytoplasmiques sont formées de l'agrégation de la protéine virale de 70 kDa, dans le cytoplasme des cellules infectées par les potyvirus. Des portions de la séquence en acides aminés de cette protéine ont le motif des sites de liaisons de nucléosides triphosphates, motifs retrouvés dans les enzymes hélicases impliquées dans le déroulement du duplexe d'acides nucléiques (Lain *et al*, 1989, 1990, 1991).

2.5 La 6 kDa

Cette protéine, située entre l'hélicase et la protéase NIa, n'a pas de fonction déterminée. Il se pourrait qu'elle ait un rôle à jouer dans la régulation virale (J.F. Laliberté, communication personnelle, 1991). Bien que l'ARN viral des potyvirus porte la séquence d'une protéine de 6 kDa et que les sites de coupures soient présents à ses extrémités, cette protéine n'a pas encore été détectée parmi les

protéines virales isolées de plants infectés par le virus du TEV (Carrington *et al*, 1988).

2.6 LaVPg et la protéase NIa

2.6.1 La VPg

À l'extrémité 5' de l'ARN s'attache, de manière covalentielle, une protéine virale, la VPg (viral protein genome-linked). Cette protéine jouerait un rôle important dans l'initiation de la synthèse d'ARN puisqu'elle se retrouve à l'extrémité 5' de chacune des formes d'ARN viral présentes lors de la réplication, la forme ARN simple brin positif, la forme répllicative et la forme intermédiaire de réplication (Kitamura *et al*, 1981). Elle pourrait aussi être impliquée dans la coupure de la forme répllicative de l'ARN (Tobin *et al*, 1989).

De poids moléculaire semblable (22 kDa Plum Pox Virus, 24 kDa Tobacco Etck Virus, 24 kDa TVMV, 21 kDa TuMV), les VPg potyviraux sont issues de l'extrémité aminée de la protéine NIa de 49 kDa (Dougherty et Parks, 1991; Murphy *et al*, 1990; Shahabuddin *et al*, 1988). Le cistron NIa du TuMV a aussi été cloné dans un vecteur d'expression et exprimé dans *E. coli*. À l'immunodétection, le NIa de 49 kDa est présente ainsi qu'une protéine de 21 kDa correspondant indubitablement à la VPg (J.F. Laliberté, communication personnelle, 1991) montrant ainsi que la VPg du TuMV provient aussi de l'extrémité aminée de la NIa.

L'attachement de la VPg à l'ARN viral se ferait entre un acide aminé tyrosine et le phosphate terminal de l'extrémité 5' lors d'une réaction auto-catalytique de transestérification (Tobin *et al*, 1989; Murphy *et al*, 1991). L'analyse des séquences voisinant le résidu tyrosine (position 0) responsable de l'attachement de la VPg, montre que les acides aminés aux positions -4, -2, -1, +1 et +4 sont identiques pour tous les potyvirus. La séquence de la VPg du TuMV a une homologie identique aux autres potyvirus (Olivier Nicolas, communication personnelle, 1991).

2.6.2 LA PROTÉASE NIa

Cette protéine de 49 kDa s'accumule sous formes d'inclusions nucléaires (NIa) dans les cellules de plants infectés. Cette protéine qui a une activité protéolytique, reconnaît cinq sites définis de coupure de la polyprotéine et a la capacité de s'autoexciser de la polyprotéine. Une description détaillée de la protéase NIa est donnée à la section 5.2.

2.7 La réplicase (NIb)

La réplicase virale est une protéine de 59 kDa qui s'accumule dans le noyau sous formes d'inclusions nucléaires (NIb) comme la protéase NIa. Elle est une ARN polymérase ARN dépendante.

2.8 La protéine de la capside

La capside des différents potyvirus est composée d'un seul type de monomères, ayant un poids moléculaire de 30 à 45 kDa, selon le virus. Environ 2,000 monomères de protéine se rassemblent en symétrie hélicoïdale sur une molécule d'ARN. L'extrémité aminée ainsi que les 18 à 20 acides aminés de l'extrémité carboxyle de la protéine de la capside sont orientés à la surface du virion. La séquence en acides aminés de l'extrémité aminée varie énormément d'un potyvirus à l'autre (Allison *et al*, 1985), alors que le reste de la séquence est fortement conservée. Ces parties conservées seraient impliquées dans les interactions protéines-protéines, lors de la polymérisation des monomères et des interactions protéines-ARN lors de la formation des virions (Dougherty *et al*, 1985).

En plus de sa fonction structurale, la protéine de la capside jouerait un rôle dans l'apparition des symptômes, puisque la modification du gène de la protéine de la capside, mutation ponctuelle déterminant la substitution d'un acide aminé, du virus de la mosaïque du tabac empêche l'induction de la réaction d'hypersensibilité. La réaction d'hypersensibilité est une réaction de défense de la plante hôte qui possède le gène N'N' conférant la résistance contre certaines souches virales. Cette réaction produit des nécroses locales qui circonscrivent le virus au site d'infection (Culver et Dawson, 1989; Saito *et al*, 1989).

La partie amino-terminale de la protéine de la capside serait aussi, en partie responsable de la transmissibilité des virus par les pucerons. La protéine de la

capside des souches transmissibles par les pucerons porte un triplet DAG (asp-ala-gly) dans cette partie, alors que celle de souches qui ne sont pas transmissibles porte une substitution à ce triplet. Le triplet DAG a été modifié en asp-ala-glu DAE chez le TVMV, en asp-ala-leu DAL pour le PPV, et en asp-ala-ser DAS chez le TEV. Étant donné que cette partie est exposée à la surface du virion, cette séquence pourrait agir avec le composant d'aide (helper component) pour permettre la transmission du virus par les pucerons (Atreya *et al*, 1990; Jayaram *et al*, 1991).

3. LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU NAVET

Le virus de la mosaïque du navet (TuMV) est un membre de l'important groupe des potyvirus qui comprend le quart des virus de plantes connus jusqu'à maintenant (Matthews, 1991).

La particule virale du TuMV a la forme d'un bâtonnet flexible d'environ 720 nm de longueur et contient un ARN unique, simple brin, d'une longueur approximative de 10,000 nucléotides. Le poids moléculaire de l'ARN a été estimé à 3.5×10^6 d (Hill et Shepherd, 1972). L'ARN est polyadénylé et porte une protéine VPg à son extrémité 5'. L'ARN génomique est traduit en une polyprotéine qui donne naissance à au moins huit produits de traduction après protéolyse (Shields et Wilson, 1987).

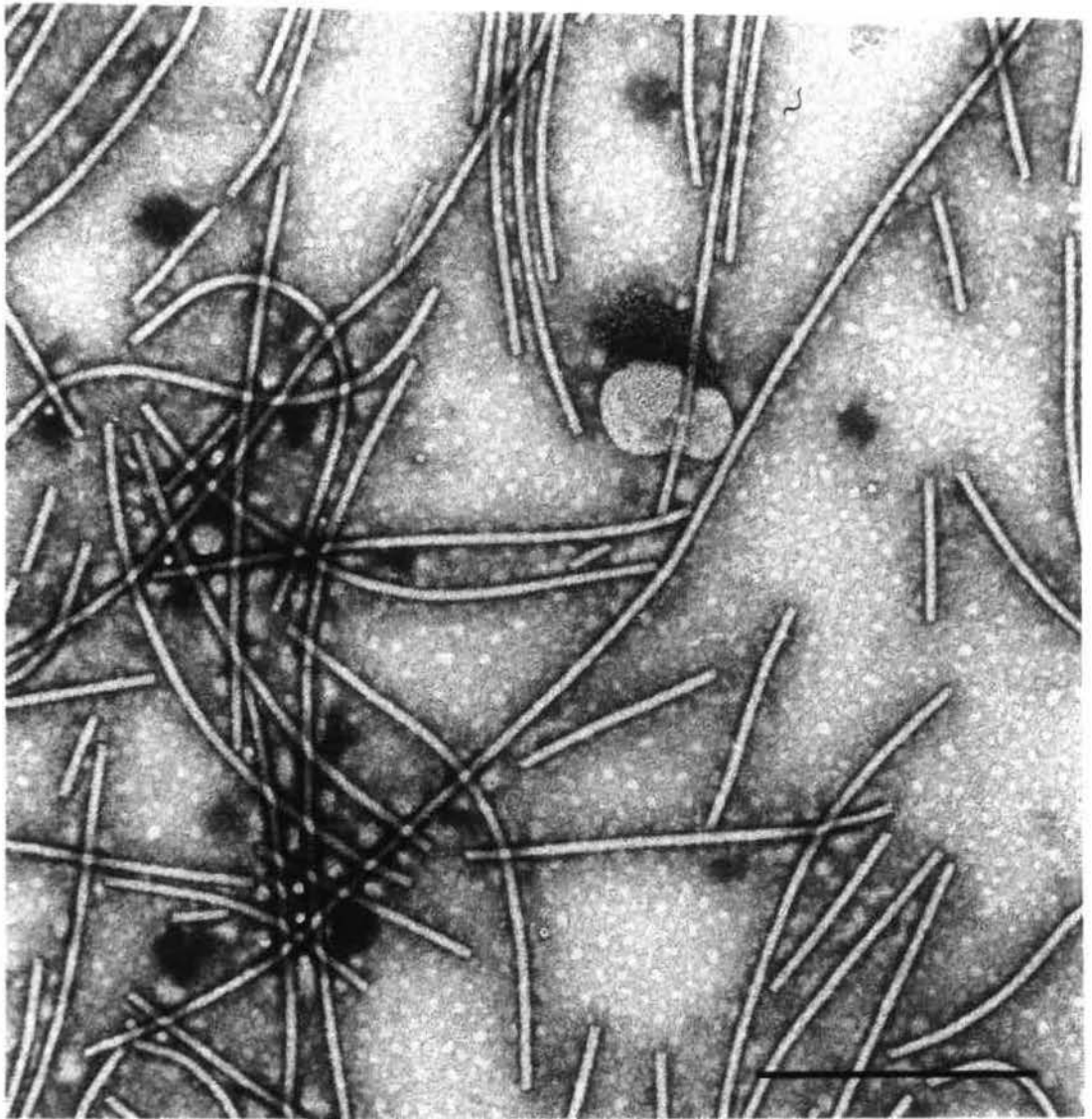
Le TuMV infecte une douzaine de familles de plantes (cucurbitacées, solanacées, chénopodiacées composées, etc.) parmi lesquelles se retrouvent des

plantes d'importance alimentaire ou horticole, tels la courge, la betterave, l'épinard, la laitue et le pétunia. Cependant, la famille des crucifères est la famille la plus affectée par le TuMV, principalement le genre *Brassica* (Tomlinson, 1987) qui inclus les plantes potagères comme le brocoli, le chou, le rutabaga, le chou-fleur, la moutarde et une plante oléagineuse, le colza (Stobbs et Shattuck, 1989). Les plants infectés par le TuMV se reconnaissent au jaunissement et à la déformation de leurs feuilles et par leur rabougrissement. Ils subissent une diminution de leur croissance ainsi qu'une diminution de leur partie comestible (Hollings et Brunt, 1981).

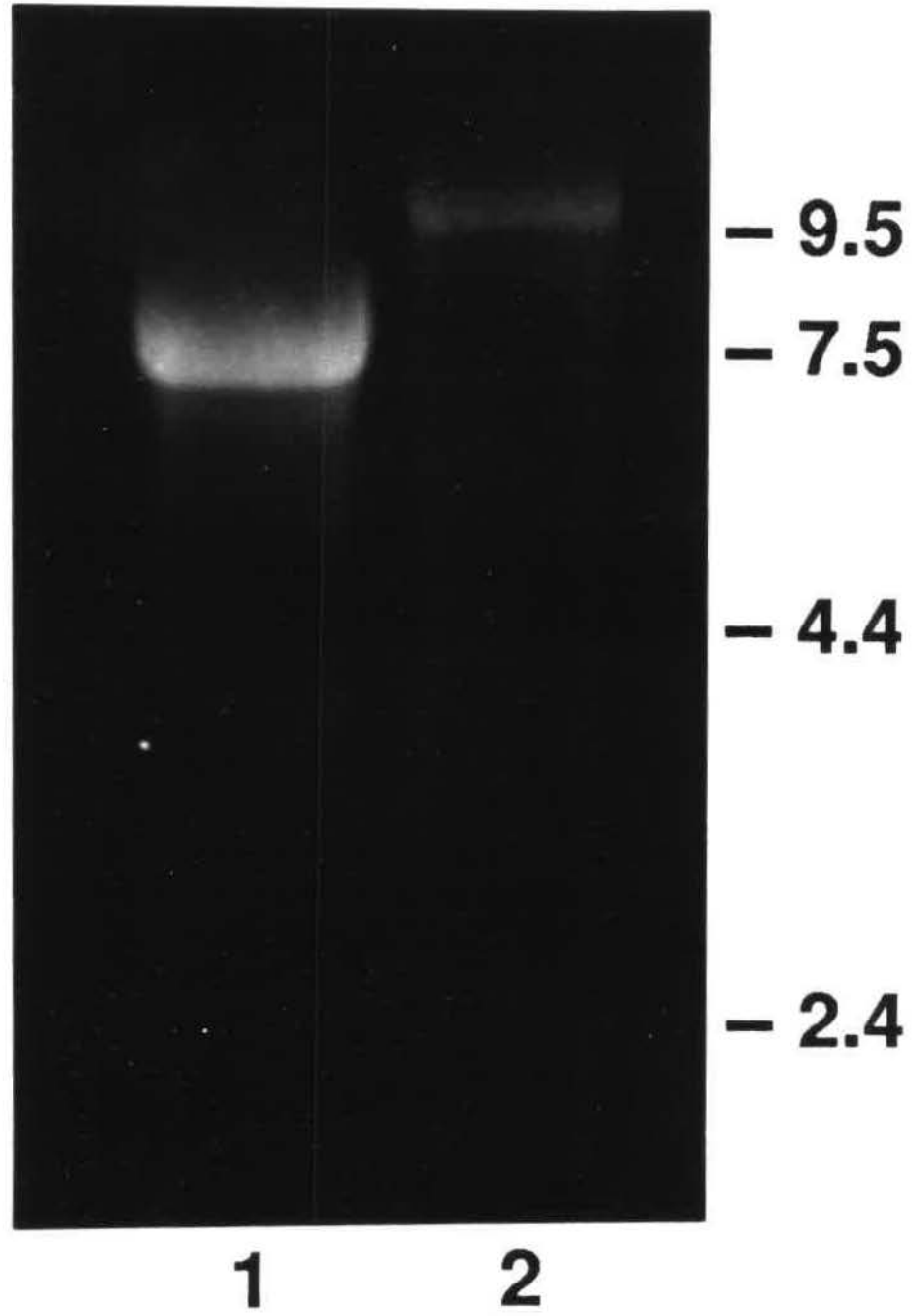
La souche Québec de TuMV utilisée pour les présents travaux provient d'un plant de rutabaga récolté dans la région de L'Assomption. En microscopie électronique, le virus a la forme d'un bâtonnet flexible, caractéristique des potyvirus (Fig. 2a). L'ARN viral a été purifié selon la méthode décrite par Choi *et al.*, (1977) et analysé en gel d'agarose dénaturant. Une seule espèce d'ARN était détectée et celle-ci migrait au-dessus du marqueur d'ARN de 9.5 Kb (Fig. 2b, puits 2). Au moment d'entreprendre le travail, plus de la moitié de l'ARN viral était cloné et séquencé. Le clonage a été fait en utilisant la polymérase *tag* et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) selon un protocole développé par Nicolas et Laliberté (1991). L'ADNc, correspondant à la région non-codante de l'extrémité 3' de l'ARN, a été produit par amplification en utilisant l'amorce polythymidinée. Les ADNc de l'ARN viral, correspondant aux différentes protéines du TuMV, l'ont été par l'utilisation d'amorces d'oligonucléotides spécifiques et dégénérées. La séquence en acides aminés de régions homologues des protéines de cinq potyvirus a servi à la

- FIGURE 2:** Le virus de la mosaïque du navet.
- a) Particule virale du TuMV
 - b) ARN viral du TuMV, puits 2

A



B



détermination de la séquence des amorces. Les différents ADNc, utilisés pour le travail d'expression, ont été produits dans le laboratoire de Jean-François Laliberté, par Olivier Nicolas et Francine Tremblay.

4. TRANSMISSION ET INFECTION VIRALES

Le principal vecteur de transmission des potyvirus sont les pucerons quoique quelques souches peuvent être transmises par des champignons du sol, par des mites ou par la mouche blanche. La spécificité du vecteur est presque inexistante puisqu'environ cinquante espèces connues de pucerons peuvent propager les virus sous certaines conditions, dont 49 espèces parmi 79 testées servent de vecteur de transmission pour le virus de la mosaïque du navet (Hiebert et Dougherty, 1988). Les potyvirus sont transmis de façon non-persistante, les pucerons qui les propagent perdent rapidement leur habileté à infecter des plantes saines, souvent durant les minutes qui suivent la prise du virus lors de l'alimentation (Matthews, 1991).

Lors de la recherche de nourriture, les pucerons acquièrent le virus par l'ingestion de sève de plants contaminés. Le virus s'adsorbe au style, au canal alimentaire et à l'intestin de l'insecte. Le mécanisme d'alimentation comporte une étape au cours de laquelle le contenu du canal alimentaire est régurgité permettant ainsi l'inoculation du virus dans la plante et sa dispersion d'une plante à l'autre (Harris et Batch, 1973).

Les symptômes qui accompagnent l'infection virale deviennent apparents lorsque le virus se multiplie et se propage soit en passant d'une cellule à l'autre à travers les plasmodesmes (fins canaux cytoplasmiques assurant la communication entre les cellules végétales) entraînant une propagation lente du virus, ou en voyageant dans les faisceaux vasculaires habituellement dans le phloème avec les produits de photosynthèse, permettant une dispersion rapide du virus (Zaitlin et Hull, 1987). Les décolorations du feuillage, chlorose ou mosaïque, les perturbations de la croissance et du développement ainsi que la mort du plant sont des symptômes qui trahissent l'infection virale même si, en général, il n'y a pas de corrélation entre le taux de multiplication virale et l'importance des symptômes (van Loon, 1987), puisque le génotype de l'hôte peut modifier l'expression des symptômes indépendamment de la réplication virale (Kuhn *et al*, 1981). Le symptôme mosaïque est le résultat de la perte de chlorophylle. Il est dû à l'alternance de zones foliaires verte pâle ou jaune, infectées par le virus et de zones vertes foncées non infectées. La mosaïque se développe principalement dans les feuilles jeunes (Nilson-Tillgren *et al*, 1969) laissant intactes les feuilles de plus de 1.5 cm. Les malformations des feuilles sont imputables à la différence de croissance qui existe entre les zones pâles infectées et les zones foncées non infectées (van Loon, 1987).

Les symptômes observables de l'infection virale tels la réduction de la croissance, la déformation des tiges, la modification de la couleur des fleurs, le flétrissement, la formation de tumeur, l'avortement des graines sont le reflet des

modifications apportées à la régulation hormonale, régulation qui contrôle la croissance et le développement de la plante (van Loon, 1987).

Outre les symptômes visuels, des modifications cellulaires, caractéristiques du groupe des potyvirus, se produisent lors de l'infection. Elles se manifestent par la formation de corps d'inclusion de formes variées. Tous les potyvirus forment des corps d'inclusions cylindriques dans le cytoplasme des cellules infectées et un nombre restreint forme des corps d'inclusions nucléaires et/ou cytoplasmiques (Hiebert et Dougherty, 1988). Chaque type d'inclusion est le produit de l'agrégation d'une ou de deux protéines virales non-structurales (Graybosch *et al*, 1989).

Les inclusions cylindriques sont formées de l'amoncellement de la protéine virale de 70 kDa, l'hélicase. Ces structures tridimensionnelles apparaissent rapidement, après le début de l'infection virale, dans le cytoplasme des cellules infectées par les potyvirus. L'expression du gène de l'hélicase dans un plant de tabac transgénique n'induit pas la formation de corps d'inclusions cytoplasmiques. La formation de corps cylindriques dépendrait d'une concentration intracellulaire élevée, concentration qui n'est pas atteinte dans les plants transgéniques, ou bien cette formation dépendrait de la présence d'autres gènes viraux (Graybosch *et al*, 1989). Les inclusions nucléaires sont formées de deux protéines virales en quantité équimolaire, la protéase NIa et la réplicase NIb. Bien que les gènes de ces protéines soient présents chez tous les potyvirus, seulement quelques-uns d'entre eux produisent des inclusions nucléaires. Les inclusions cytoplasmiques amorphes sont

formées par l'agrégation d'une protéine impliquée dans la transmission du virus par les insectes, le composant d'aide.

5. LES PROTÉASES VIRALES

Le génome viral des différents groupes de virus à ARN positif (picornavirus, flavivirus et potyvirus) est traduit en une protéine précurseur, celle-ci est formée de l'ensemble des protéines codées par le génome, de laquelle découlera après protéolyse, les protéines virales structurales (capside) et non-structurales (polymérase, hélicase, protéase, etc.). Le déstagement des différentes protéines de la polyprotéine est effectué par des protéases virales qui reconnaissent des séquences d'acides aminés spécifiques situées aux bornes des différents domaines formant la polyprotéine.

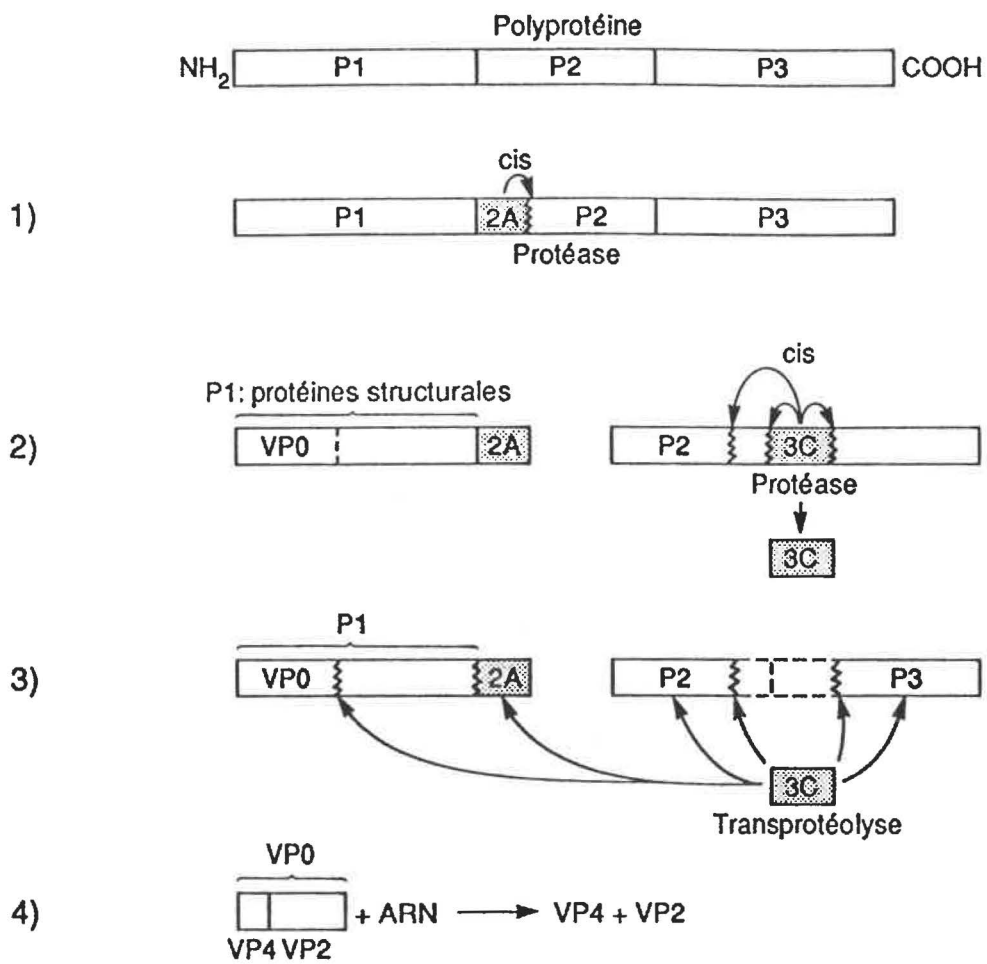
5.1 La protéolyse chez les picornavirus

Le processus protéolytique a été bien étudié pour le groupe des picornavirus, groupe de virus d'animaux qui s'apparente tant par leur organisation, leur expression de gènes et la structure de leurs protéines au groupe des potyvirus (Kraüsslich et Wimmer, 1988). Les différentes études ont montré que les premiers événements de clivage se produisent sur la polyprotéine naissante et sont effectués par la protéase 2A qui coupe la polyprotéine à la jonction P1-P2 (Fig. 3-1). Cette protéolyse, effectuée en cis c'est-à-dire sur la molécule dont fait partie la protéase, libère les sous-unités capsidaires portées par la portion P1 du reste de la polyprotéine. La séparation des protéines structurales des protéines non-structurales constitue la première étape de la protéolyse (Kraüsslich *et al*, 1988).

FIGURE 3: La protéolyse chez les picornavirus.

- 1) Première étape de protéolyse: la protéase 2a libère les protéines structurales de la polyprotéine.
- 2-3) Deuxième étape de protéolyse: la protéase 3c s'autoexcise de la polyprotéine et agit en trans aux différents sites de coupure.
- 4) La VPO est coupée après son association à l'ARN viral.

La protéolyse chez les picornavirus



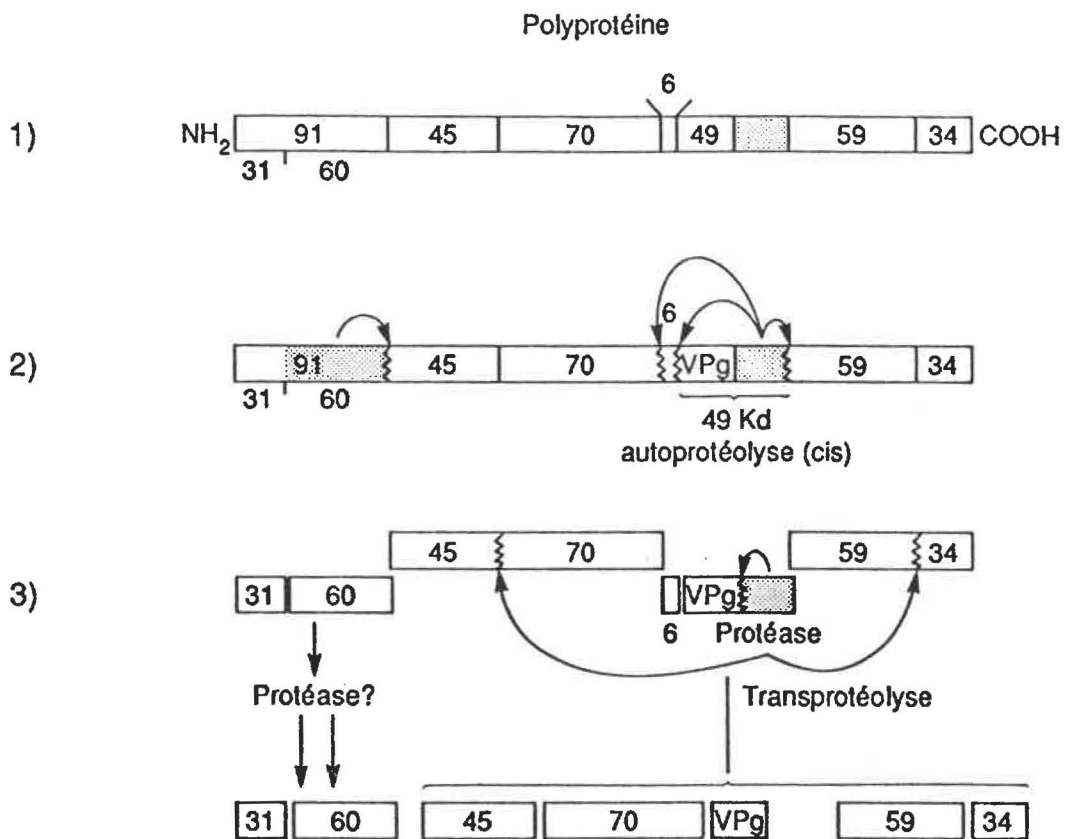
La seconde étape est effectuée par la protéase 3C. Cette enzyme est responsable de la majorité des réactions de protéolyse. Elle agit en cis, coupant la molécule dont elle fait partie à des sites de clivage situés à proximité d'elle, principalement le site de clivage à la jonction P2-P3 (Fig.3-2). Les coupures en trans exécutées par la protéase 3C autoexcisée de la polyprotéine s'effectuent sur les portions P1, P2 et P3 libérées antérieurement et elles séparent les différents domaines formant chacune de ces portions (Fig. 3-3). Les coupures accomplies par la protéase 3C se font principalement aux jonctions Gln-Gly, Gln-Ser et Glu-Ser, bien que les séquences Gln-Ala et Gln-Cys peuvent être reconnues par d'autres protéases de virus du même groupe. Le clivage du peptide VPO (sous-unité capsidaire contenue dans la portion P1) situé à l'extrémité aminée de la polyprotéine constitue la dernière étape du processus protéolytique des picornavirus, lors de la formation des virions et il est concomitant à l'association du peptide à l'ARN viral (Fig. 3-4). Ces protéolyses se manifestent sans l'aide d'une protéase extrinsèque. Elles seraient dues à la portion carboxyle du peptide VPO qui porte l'acide aminé sérine entouré des acides aminés aspartate et arginine, formant ainsi l'arrangement spatial retrouvé dans les protéases de type sérine. L'association du peptide à l'ARN viral aiderait à effectuer la coupure du site VPO puisque l'ARN agirait comme accepteur de protons, rôle dévolu au résidu histidine rencontré dans les protéases et qui est absent dans la VPO (Palmenberg, 1990).

FIGURE 4:

La protéolyse chez les potyvirus.

- 1) Polyprotéine
- 2) Sites coupés en cis par les protéases virales. Protéase HC-PRO = 60, protéase NIa = 49.
- 3) Produits de protéolyse

La protéolyse chez les potyvirus



5.2 La protéolyse chez les potyvirus

Le processus protéolytique de différentes polyprotéines potyvirales (Tobacco Etch Virus, Plum Pox Virus, Potato Virus Y, Tobacco Vein Mottling Virus) a été déterminé grâce à l'expression d'ADNc des potyvirus dans *E. coli* ou par l'expression de transcrits d'ARN viraux dans des lysats de réticulocytes de lapins. Le processus implique une série de coupures en cis et en trans à des sites spécifiques situés le long de la polyprotéine, chaque site étant reconnu et coupé avec une efficacité différente (Fig. 4). Les recherches effectuées sur les protéases potyvirales ont montré qu'au moins deux protéases virales agissaient sur la polyprotéine. La première protéase, la NIa est une protéine qui, *in vivo*, s'accumule dans le noyau des cellules végétales, sous forme cristalline et forme des inclusions nucléaires et, par ce fait, a été nommé NIa. La comparaison de la séquence en acides aminés et la détermination de l'homologie avec d'autres protéases suggèrent que la protéine NIa aurait une activité protéolytique.

Pour démontrer l'activité protéolytique de la protéine codée par le gène NIa et pour déterminer quelle portion de cette protéine était impliquée dans l'activité protéolytique, plusieurs expériences ont été effectuées. Ainsi Hellman *et al*, (1988) ont démontré que la NIa du TVMV avait une activité protéolytique et que le lieu de cette activité se situait dans sa portion carboxy-terminale. La traduction d'ARN viraux du TVMV formés des gènes complets des protéines 42K-CI-6K et de portions grandissantes du gène de la protéase NIa, jusqu'à ce qu'il soit entier, a été accompli. L'analyse des produits de traduction a montré que le gène de la protéine NIa devait

inclure l'extrémité 3' pour que des produits de protéolyse soient observables à l'immunodétection.

Des ADNc du génome du TEV, incluant le cistron complet ou partiel de la protéase NIa ont été transcrits par l'ARN polymérase de SP6 et traduits dans un lysat de réticulocytes de lapin. La protéolyse des polyprotéines est observée lorsque l'extrémité carboxy-terminale de la protéase NIa est présente, confirmant la position du site de protéolyse de l'enzyme (Carrington et Dougherty, 1987b).

Des analyses mutationnelles ont aussi permis de démontrer son activité protéolytique et de déterminer quels acides aminés étaient impliqués dans la protéolyse. Une délétion introduite dans le gène de la NIa du PPV abolit l'activité protéolytique. Cette délétion de 152 pb incluait le résidu cystéine supposément impliqué dans le site actif (Garcia *et al*, 1989). Des mutations dirigées introduites au supposé site catalytique de la NIa du TEV révèlent que les acides aminés His²³⁴, Asp²⁶⁹ et Cys³³⁹ sont essentiels à l'activité protéolytique (Dougherty *et al*, 1989). L'analyse moléculaire de la protéase NIa du virus de la mosaïque du soya a également été faite par mutagenèse dirigée et confirme les résultats décrits plus haut. La modification du résidu Cys³⁴¹ par un résidu Lys abolit l'activité protéolytique de la protéine NIa, indiquant par ce fait son implication dans le site actif (Ghabrial *et al*, 1990).

La protéase NIa serait une protéase du type cystéine et s'apparenterait aux protéases du type sérine. Dans les deux cas, le site actif serait composé de trois acides aminés, l'histidine, l'asparagine et de la sérine ou de la cystéine selon le type de protéase, ce dernier acide aminé jouant le rôle de nucléophile dans la triade catalytique (Bazan et Fletterick, 1988).

D'autres expériences, parallèlement à celles décrites ci-haut, ont été conduites et ont permis d'établir un mode de fonctionnement général de la protéase NIa sans toutefois en élucider précisément la cascade catalytique conduisant à la libération des protéines matures. Globalement, la protéase NIa montre une activité cis (intramoléculaire) et une activité trans (intermoléculaire) comme celles observées pour la protéase 3C des picornavirus. Ainsi, il a été établi que la protéase virale NIa est libérée de la polyprotéine par autocatalyse. Des polyprotéines portant une protéase NIa inactivée par mutagenèse dirigée sont mises en présence de corps d'inclusions nucléaires de TEV (protéase virale isolée de plantes infectées par le virus). La protéase NIa libre n'est pas détectée dans les produits de protéolyse ce qui indique que les sites de coupures bordant la NIa sont reconnus et coupés exclusivement en cis (Carrington et Dougherty, 1987a).

Des mutations au site de coupure NIa-NIb de la polyprotéine de PPV, qui empêchent l'autoprotéolyse de la NIa, n'affectent pas la protéolyse du site de coupure NIb-capside, indiquant que ce site n'a pas besoin de protéase NIa libre pour être protéolysé (Garcia *et al*, 1989). Ce site peut aussi bien être coupé en cis qu'en

trans. Un autre site de coupure semble être coupé préférentiellement en cis par la protéase NIa comme la jonction CI-6K de la polyprotéine de TVMV (Hellman *et al*, 1988). La protéase NIa de PPV extraite de plantes infectées montre une activité trans lorsqu'elle est mise en présence d'une polyprotéine de fusion qui porte une authentique séquence de clivage de la NIa, la jonction NIb-capside (Himmler *et al*, 1990). De même, une activité trans a été démontrée au site NIb-capside de la polyprotéine de PPV produite par un système d'expression dans *E. coli* (Garcia *et al*, 1989, 1990). Les sites de coupure 45K-CI et NIb-capside de la polyprotéine de TEV sont coupés en trans par la protéase NIa mais la vitesse de protéolyse est différente pour ces deux sites. Le site NIb-capside étant coupé cinq fois plus rapidement que l'autre (Dougherty et Parks, 1989). En résumé, la protéase NIa des potyvirus reconnaît les sites de coupure 45K-CI, CI-6K, 6K-NIa, NIa-NIb, NIb-capside. Les sites 6K-NIa et NIa-NIb de même que le site CI-6K seraient préférentiellement coupés en cis. Le site 45K-CI serait coupé en trans alors que le site NIb-capside le serait en cis ou en trans et la vitesse de protéolyse de ce site serait supérieure aux autres sites.

5.3 Les séquences reconnues par la protéase NIa

La protéase virale NIa (49 kDa) coupe la polyprotéine à cinq sites de clivage. Ces sites, situés aux bornes des protéines 45 kDa-CI, CI-6 kDa, 6 kDa-NIa, NIa-NIb et NIb-capside, sont formés d'un heptapeptide. Les acides aminés de l'heptapeptide sont numérotés de -6 à +1, le site de coupure est situé entre les acides aminés -1 et +1. L'analyse des séquences en acides aminés de plusieurs

potyvirus montre que certains acides aminés sont conservés. La séquence consensus du TEV comprend trois acides aminés identiques pour les cinq sites de coupures et qui occupent les positions -6 (Glu), -3 (Tyr) et -1 (Gln), de l'heptapeptide. La position +1 peut être occupée par les acides aminés ser ou gly formant les sites de clivage Gln/Ser ou Gln/Gly (Dougherty *et al*, 1988). Les sites de coupure reconnus par la protéase NIa de TVMV ont des acides aminés identiques aux positions -4 (Val), -2 (Thr, Phe) -1 (Gln). Les acides aminés Ser et Gln peuvent occuper la position +1 créant ainsi les mêmes sites de coupure que le TEV Gln/Gly ou Gln/Ser. Les sites de coupure du PPV montrent une conservation des acides aminés aux positions -6 (Glu, Arg), -4 (Val), -2 (Thr ou His) d'un site à l'autre, même si ces acides aminés diffèrent quelque peu des autres potyvirus (Maiss *et al*, 1989). Ils sont formés de l'acide aminé Gln à la position -1 et soit des acides aminés Ser ou Thr à la position +1. Les sites de coupure du TuMV ont des acides aminés conservés aux positions -4 (Val), -2 (His-Ala) et -1 (Gln-Glu) alors que la position +1 peut être occupée par les acides aminés Ser, Ala ou Thr.

Les acides aminés conservés de l'heptapeptide sont requis pour une reconnaissance optimale du substrat par l'enzyme, dont certains seraient impliqués dans la régulation (Dougherty et Parks, 1989). Les acides aminés non-conservés de l'heptapeptide affecteraient la vitesse de protéolyse de la polyprotéine (Carrington et Dougherty, 1988; Dougherty *et al*, 1989). L'acide aminé occupant la position +1 doit être compatible avec le site de clivage et doit permettre la stabilité de la protéine à son extrémité aminée (Dougherty *et al*, 1989).

La protéase NIa des différents potyvirus montre une spécificité de reconnaissance pour ses séquences mais ne détecte pas les sites de clivage des autres potyvirus même si ceux-ci montrent un certain degré d'homologie (Parks et Dougherty, 1991).

5.4 HC-PRO: seconde protéase potyvirale

Le site de coupure situé entre la protéine de 45 kDa et la protéine de 87 kDa (extrémité aminée de la polyprotéine) n'est pas reconnu par la protéase NIa. Ce site de coupure situé à l'extrémité carboxyle de la protéine de 87 kDa et à l'extrémité aminée de la protéine de 45 kDa est reconnu et coupé par une autre protéase, la HC-PRO (Helper component proteinase). La portion protéolytique de cette protéine, correspondant à un peptide de 20 kDa, se situe à son extrémité carboxy-terminale (Carrington *et al*, 1989a).

L'excision de la protéine de 87 kDa requiert un mécanisme autocatalytique puisqu'aucune protéolyse trans n'a été démontrée jusqu'à maintenant (Carrington *et al*, 1989b). La protéine de 87 kDa est coupée ultérieurement et donne naissance à deux protéines de 31 kDa et de 56 kDa, cette dernière étant la HC-PRO. Cette coupure n'est exercée ni par la protéase HC-PRO ni par la protéase NIa puisque la protéolyse au site de coupure à la jonction des protéines 31 kDa et 56 kDa est observée dans des plants transgéniques qui ne portent pas le gène de la protéase NIa ou qui porte le gène de la HC-PRO muté en son site protéolytique. Le parachèvement de la protéolyse de la protéine de 87 kDa impliquerait une troisième protéase virale, dont l'activité serait modulée par un facteur de l'hôte ou nécessiterait

carrément la présence d'une enzyme de l'hôte puisque les produits de protéolyse sont presque absents ou inexistantes lorsque l'expression de la polyprotéine est effectuée *in vitro* dans un lysat de réticulocytes (Carrington *et al*, 1990).

6. LE SYSTÈME D'EXPRESSION

Pour produire les protéines du TuMV et pour étudier la protéolyse effectuée par la protéase NIa du TuMV, les ADNc correspondant à certains gènes viraux du TuMV ont été clonés dans le vecteur d'expression pET (expression avec l'ARN T7 polymérase, figure 5) et ont été exprimés dans *E. coli*.

L'efficacité du système d'expression pET est déterminé par les caractéristiques de l'enzyme ARN polymérase du bactériophage T7: forte activité, sélectivité élevée pour ses promoteurs et pour ses signaux de terminaison. Dans ce système, les bactéries utilisées (BL21(DE3) ou HMS174 (DE3)) ont intégré en leur chromosome bactérien, le bactériophage DE3 portant le gène lac I, le promoteur lac UV5, le début du gène lac et le gène de l'ARN polymérase du bactériophage T7. La production d'ARN polymérase de T7 est dépendante de la présence d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), inducteur gratuit qui n'est pas métabolisé par la bactérie.

D'autre part, les vecteurs d'expression pET portent le promoteur de l'ARN polymérase de T7, introduit dans le site Bam HI du plasmide pBR322. La séquence promotrice est suivie des signaux d'initiation de la traduction (la séquence Shine-

Dalgarno) du gène de la protéine 10 de T7 et ses onze premiers codons. Une série de trois vecteurs a été construit de manière à placer le site de clonage Bam HI en phase avec le codon d'initiation du gène 10 dans trois cadres différents de lecture. La traduction de ces trois vecteurs, pET-11a-b-c, produit une protéine de fusion composée des onze acides aminés de la protéine 10 en plus d'un résidu arginine et de la protéine étrangère. Le gène possédant son ATG de départ peut être introduit au vecteur pET-11d dans le site de restriction NcoI. Dans ce cas, la protéine produite ne contient aucun acide aminé supplémentaire. Pour que l'expression du gène étranger soit complètement assujéti à l'inducteur, la séquence de l'opérateur lac a a été placé en aval du promoteur T7. La séquence du promoteur et celle du répresseur sont insérées, en sens opposé, en amont du promoteur T7. Celles-ci produisent une quantité suffisante de répresseur pour occuper le site opérateur lac du plasmide à multiples copies de même que le site opérateur lac, placé sur le chromosome bactérien en amont du gène de l'ARN polymérase de T7. En absence d'inducteur cette double répression réduit au minimum le niveau d'expression basale du gène étranger. Les vecteurs portent le gène de résistance à l'ampicilline de même que le signal de terminaison de la transcription du phage T7.

Après l'ajout d'IPTG, au milieu de culture, la répression exercée au site opérateur est levée. L'ARN polymérase de *E. coli* transcrit le gène de l'ARN polymérase de T7. Après traduction, l'enzyme ARN polymérase de T7 se fixe à son promoteur et transcrit le gène étranger. Cet enzyme traduit si activement et sélectivement le gène placé en aval de son promoteur, qu'elle effectue la majorité

de la transcription de la cellule et la protéine recombinante peut constituer 50% des protéines totales de la cellule, en conditions optimales (Studier *et al*, 1990).

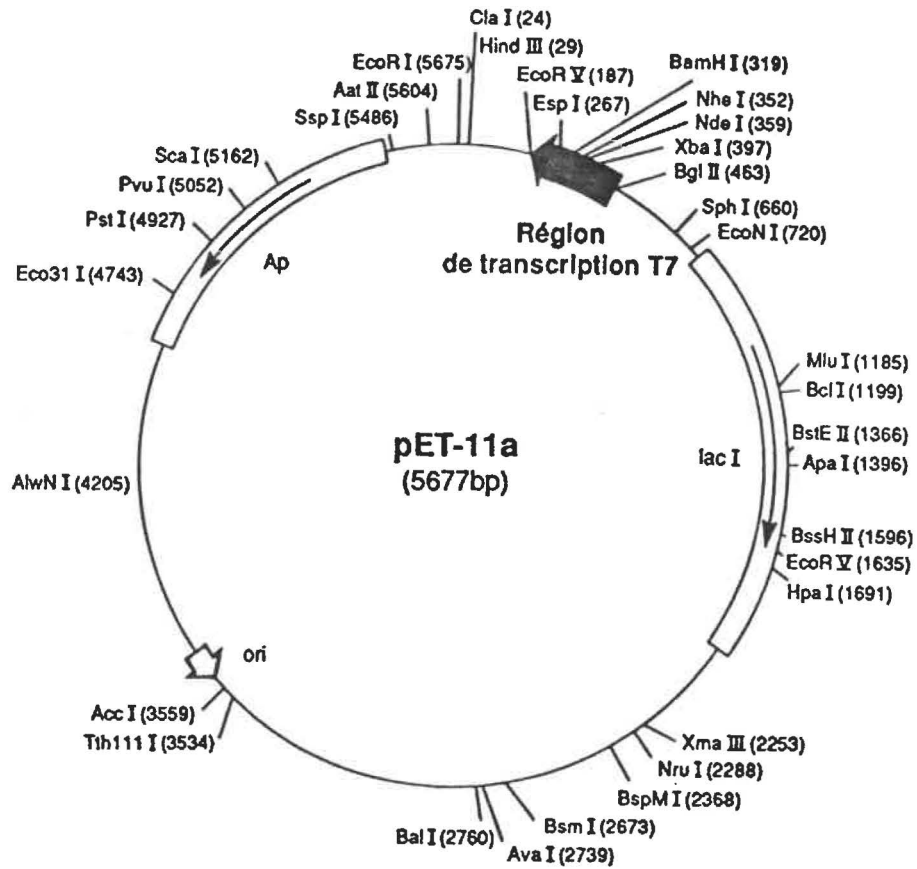
FIGURE 5:

Vecteur d'expression pET.

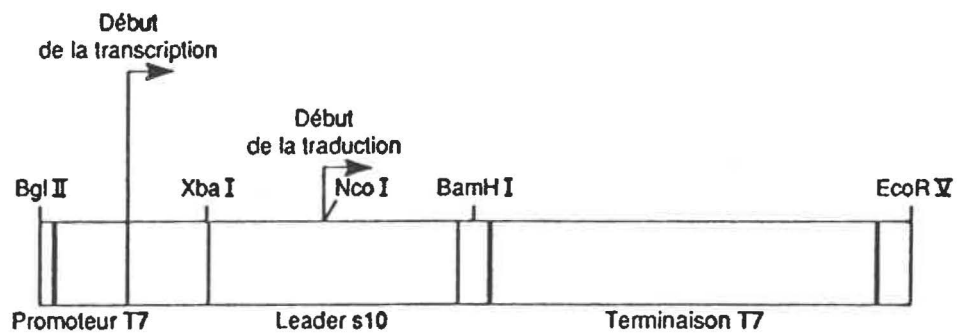
- a) Carte de restriction du vecteur.
- b) Région de transcription du vecteur. Le site NdeI est occupé par un site NcoI dans le vecteur pET-11d.

Vecteur d'expression pET

a)



b)



MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MILIEUX ET TAMPONS

Milieu LB liquide
par litre
10 g bacto-tryptone
5 g bacto-yeast extract
10 g NaCl
Le pH est ajusté à 7

LB liquide, ampicilline (LBa')
100 µg/ml d'ampicilline

LB agar (LBa)

LB agar, ampicilline (LBaa')

15 g/l de bacto agar ajoutés au milieu liquide

15 g/l de bacto-agar
100 µg/ml d'ampicilline

Milieu SOB

par litre
20 g bacto-tryptone
5 g bacto-yeast extract
0.5 g NaCl
10 ml d'une solution de KCl 250 mM sont ajoutés
Le pH est ajusté à 7.0 avec du NaOH 5N
5 ml d'une solution stérile de MgCl₂ 2M sont ajoutés

Milieu minimal M9

par litre
200 ml sels M9 5X
20 ml glucose 20%

Sels M9 5X

par litre
64 g Na₂ HPO₄ • 7H₂O
15 g KH₂PO₄
2,5 g NaCl
5,0 g NH₄Cl

Tampon KGB 10X

glutamate de potassium 1M
Tris-acetate pH 7.5 250 mM
acétate de magnésium 100 mM
albumine de sérum bovin 100 µg/ml
(Fragtion V; Sigma)
β-mercaptoéthanol 5 mM

Tampon TAE (Tris-acetate) 1X

Tris-acetate .04M
EDTA .001M

Tampon de saturation

par litre
Tris base 6.055 g
NaCl 8.760 g
albumine BSA 3%
Le pH est ajusté à 7.5 avec HCl

Tampon de lavage

par litre
Tris base 6.055 g
NaCl 8.760 g
triton X-100 0.5%
Le pH est ajusté à 7.5 avec HCl

Tampon de transfert
pour 3 litres
Tris base 9.06 g
glycine 43.26 g
méthanol 600 ml

Tampon ancreur 1X SDS
Tris-HCl 50 mM (pH 6.8)
dithiothréitol 100 mM
SDS 2% (qualité électro-
phorèse)
bleu de bromophénol 0.1%
glycérol 10%

2. DIGESTION ENZYMATIQUE D'ADN

L'ADN est digéré avec des enzymes de restriction provenant de Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec). La digestion s'effectue durant une heure, au moins, à une concentration de tampon KGB ("potassium glutamate buffer") qui permet une activité maximale de l'enzyme. La concentration de tampon et l'activité correspondante sont déterminées et compilées pour chaque enzyme dans Sambrook *et al*, 1989 (Tableau I, page 87).

3. ÉLECTROÉLUTION

Après électrophorèse, les bandes d'ADN sont découpées du gel d'agarose. L'ADN est électroélué avec l'appareil Electro-Eluter model 422 de Bio-Rad, en suivant les spécifications du manufacturier.

4. LIGATION

Des quantités équimolaires de fragment d'ADN et de plasmide linéarisé sont mélangées lorsque l'insertion est dirigée. Les fragments d'ADN et les plasmides linéarisés sont mélangés dans un rapport molaire de 4:1 lorsque les extrémités sont compatibles.

Les ligations sont faites avec l'enzyme T4 ADN ligase et le tampon de ligation fournis par le manufacturier (BRL), selon la méthode de ligation décrite dans Sambrook *et al*, 1989. Les ligations s'effectuent à 16°C durant 16 heures.

5. EXTRACTION ET PRÉCIPITATION D'ADN

Les méthodes d'extraction et de précipitation d'ADN sont décrites dans Maniatis *et al*, (1982).

6. BACTÉRIES COMPÉTENTES

La souche de *E. coli* (HB-101 ou XL1 ou BL21 (DE3)) (tableau II, page 88) est étalée sur milieu LBa. Après une croissance d'une nuit, quelques colonies sont prélevées et cultivées dans le milieu SOB à 37°C jusqu'à l'atteinte d'une D.O. de 0.4 à 600 nm. Les bactéries compétentes sont préparées selon la méthode décrite dans Sambrook *et al*, 1989.

7. TRANSFORMATION BACTÉRIENNE

Les bactéries compétentes sont transformées avec 2 µl de la réaction de ligation selon la méthode décrite dans Sambrook *et al*, 1989. Elles sont étalées sur milieu LBaa'.

8. EXTRACTION DES PLASMIDES

Les colonies sont repiquées dans 10 ml de LBA' et cultivées durant 16 heures. L'extraction des plasmides est faite selon la méthode de la lyse alcaline de Sambrook *et al*, 1989.

9. HYBRIDATION *IN SITU*

Les colonies transformantes sont repiquées sur LBaa'. Après une nuit de croissance, les colonies sont transférées sur filtre de nitrocellulose. La lyse des bactéries et fixation de l'ADN au filtre de nitrocellulose s'effectue selon la méthode 1 décrite dans Sambrook *et al*, 1989. La méthode d'hybridation utilisée est décrite dans Maniatis *et al*, 1982.

10. MARQUAGE DE L'ADN AVEC $P\alpha^{32}$

Le fragment d'ADN électroélué est marqué au dCTP α^{32} P avec l'oligolabelling KIT produit par Pharmacia LKB Biotechnology, en suivant le protocole fourni par le manufacturier.

11. EXPRESSION DE GÈNES CLONÉS DANS *E. COLI*

La méthode utilisée pour l'expression des gènes dans *E. coli* est décrite dans Sambrook *et al*, 1989. Le milieu de culture NZCYM a été remplacé par le milieu LB.

Les souches 160, 164, 189 ou 190 sont cultivées dans le milieu LBa' jusqu'à l'atteinte d'une D.O. de 0.6 à 600 nm. Avant induction, un aliquot de 1 ml est prélevé, centrifugé et le culot est dissout dans 100 μ l de tampon ancreur SDS 1X. 1mM d'IPTG est ajouté à la culture. Des aliquots de 1 ml sont prélevés 30, 60, 120, 180 minutes après l'induction et préparés tel que décrit ci-dessus. Les aliquots sont chauffés durant 3 minutes dans l'eau bouillante et conservés à -20°C pour analyse.

12. ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE SDS

Les protéines produites dans *E. coli* sont analysées en gel de polyacrylamide. La méthode utilisée est décrite dans Sambrook *et al*, 1989. La concentration du gel est choisie selon les poids moléculaires des protéines à analyser. L'appareil Protean II ou le Mini-protean II cell de Bio-Rad est utilisé pour la séparation des protéines.

13. IMMUNODÉTECTION

13.1 Transfert

Les protéines séparées en gel de polyacrylamide sont transférées sur papier de nitrocellulose avec l'appareil trans-blot cell de Bio-Rad en utilisant un voltage de 60 V (200 mA) durant 3 heures.

13.2 Marquage à la protéine A radioiodinée

La membrane de nitrocellulose est trempée dans la solution de saturation durant 1 heure. Les anticorps sont ajoutés à la solution et incubés une nuit avec

agitation. La membrane est lavée trois fois durant 10 minutes avec le tampon de lavage. 1 μ l de protéine A radioiodinée est ajoutée au tampon de saturation. L'incubation se fait durant 2 heures à la température ambiante. Elle est suivie de trois lavages de 10 minutes avec le tampon de lavage. Le papier de nitrocellulose est séché et exposé sur film Kodak XAR-5.

14. MARQUAGE À LA MÉTHIONINE-[³⁵S]

Les souches 160, 164, 180, 189 ou 190 sont cultivées dans du milieu LBa' jusqu'à l'atteinte d'une D.O. de 0.3 à 600 nm. 200 μ l de culture sont centrifugés et lavés dans 1 ml de milieu M9. Les cellules sont resuspendues dans 1 ml de milieu M9, 0.5% glucose et 1 mM d'IPTG est ajouté. Trente minutes plus tard, 200 μ g/ml de rifampicine sont ajoutés à la culture. Un marquage de 10 min est fait avec 10 μ Ci/ml de méthionine-[³⁵S], 60 minutes suivant l'ajout de l'IPTG. Les bactéries sont centrifugées, lavées dans 1 ml de milieu M9. Le culot de bactéries est dissout dans 0.1 vol de tampon ancreur 1X SDS et analysé en gel de polyacrylamide. Le gel est séché et exposé sur film Kodak XAR-5.

RÉSULTATS

1. CONSTRUCTION DES PLASMIDES

1.1 Construction du plasmide pAC1

Le plasmide pTuM 860 (Tableau III, page 89) est composé du gène de la protéine de la capsid du TuMV (Fig. 6a-b) inséré dans le site Pst I du vecteur pUC 9. Les sites de restriction Nco I et BamH I localisés respectivement en 5' et 3' du gène de la capsid ont été introduits par mutagénèse dirigée. Le site Nco I CCATGG comporte un codon ATG correspondant au signal d'initiation de la synthèse protéique. Le plasmide pTuM 860 est digéré avec les enzymes Nco I et BamH I. Après électrophorèse en gel d'agarose de 1.0%, préparé dans du tampon TAE, la bande de 860 pb correspondant au gène de la protéine de la capsid est électroéluée. Le plasmide pET-11d (Studier *et al*, 1990) est digéré avec les enzymes Nco I et BamH I, extrait au phénol:chloroforme (1:1) et précipité.

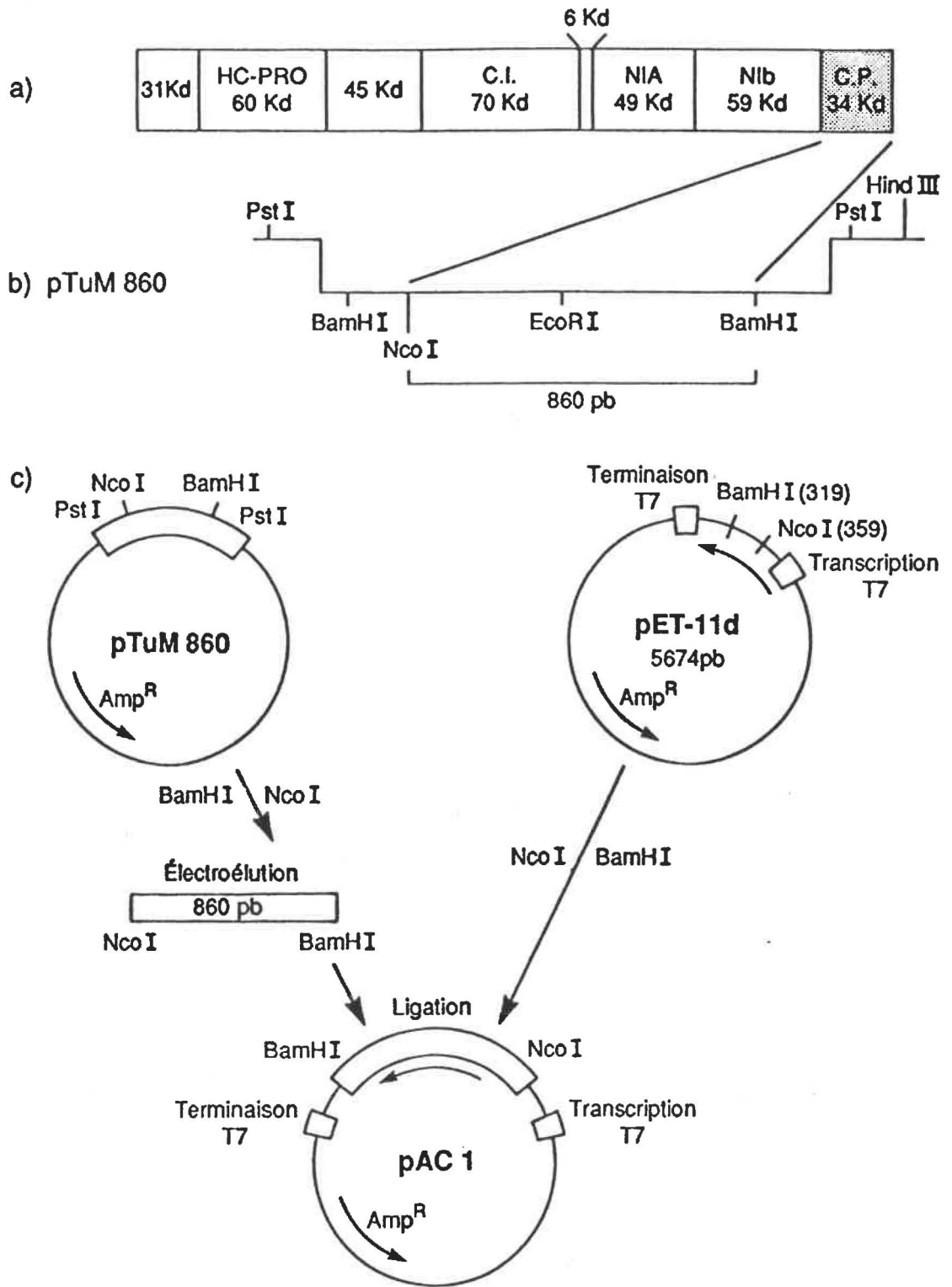
Le plasmide pET-11d est choisi car il comporte un site Nco I en aval de la séquence promotrice du bactériophage T7. L'insertion du gène reconstitue le site Nco I et conserve le codon ATG à partir duquel se fera l'initiation de la synthèse protéique.

L'insertion dans le plasmide est dirigée et puisque les extrémités du vecteur ou du fragment d'ADN ne peuvent s'apparier entre elles, car elles ne sont pas complémentaires, alors des quantités équimolaires de plasmide et du fragment codant pour la protéine de la capsid sont mélangées pour "ligature". Les bactéries

FIGURE 6:**Construction du plasmide pAC1.**

- a) Carte illustrant la polyprotéine du TuMV. La partie ombragée représente la protéine dont l'ADNc a été sous-cloné dans le vecteur pET-11d.
- b) Carte de restriction du plasmide pTuM 860.
- c) Étapes de travail conduisant à la production du plasmide pAC1.

Construction du plasmide pAC 1



compétentes *E. coli* HB-101 sont transformées avec 2 μ l de la réaction de ligation. L'insertion dirigée ne comportant pas beaucoup d'événements différents de ligation, on estime qu'un pourcentage élevé de transformants sont des recombinants. Des minipréparations de plasmides permettent donc l'identification rapide des transformants.

Sept transformants ont été analysés. Une digestion, avec les enzymes Nco I et BamH I des plasmides extraits des transformants, est faite. Après séparation de l'ADN digéré en gel d'agarose 1.0%, trois d'entre eux montraient une bande qui migrerait au niveau du gène de la protéine de la capsid (860 pb) provenant d'une digestion Nco I et BamH I du plasmide pTuM 860 (témoin positif de l'insert). Une autre bande était visible et migrerait au niveau du vecteur pET-11d linéarisé (témoin positif du vecteur).

Un de ces trois plasmides recombinants, formé du gène de la protéine de la capsid et du vecteur pET-11d a été choisi et nommé pAC1 (Fig. 6c). Ce plasmide a une région de transcription composée du promoteur du bactériophage de T7, suivie des séquences de l'opérateur *lac* et de Shine Dalgarno (séquence se pairant à l'ARN ribosomale), suit le site Nco I dans lequel l'extrémité 5' du gène de la protéine de la capsid est introduite. À l'extrémité 3' du gène, le codon de terminaison TGA du gène précède le site BamH I et est suivi de la séquence du terminateur de T7. Ce gène produit une protéine identique à celle *in vivo*, à l'exception d'une méthionine supplémentaire à l'extrémité aminée.

La souche BL-21 (DE3), qui possède une copie du gène de l'ARN polymérase de T7 intégrée dans son chromosome et sous le contrôle du promoteur lacUV5, transcrit tout gène placé dans un plasmide d'expression en aval du promoteur de l'ARN polymérase de T7, après induction avec l'IPTG. Cette souche est transformée avec le plasmide pAC1 extrait par minipréparation. Une vérification de la présence du plasmide pAC1 dans la bactérie BL-21 (DE3) est faite en digérant les plasmides extraits des transformants avec les enzymes Nco I et BamH I. Ainsi, s'il n'y a pas production de protéines, on remettra en question la construction plasmidique plutôt que la présence du plasmide dans la bactérie. Un clone analysé est nommé BL-21 (DE3) pAC1 et numéroté souche 164. Cette souche est conservée pour l'analyse de l'expression du gène cloné.

1.2 Construction du plasmide pAC2

Le plasmide pTuM 3.3 (Tableau III, page 89) porte un fragment d'ADNc de 3.3 Kb du TuMV et code pour une portion de la polyprotéine virale (CI, 6K, NIa, NIb tronqué) (Fig. 7a-b). Ce clone a été choisi parce que son ADNc code pour les gènes de la protéase virale et, en plus, pour d'autres protéines virales situées de part et d'autre de cette protéase (CI-6K à l'extrémité aminée et NIb tronquée à l'extrémité carboxyle). Ce clone d'ADNc devrait produire après traduction une polyprotéine de 116 kDa possédant trois sites potentiels de clivage (CI-6K, 6K-NIa, NIa-NIb) qui permettront de mettre en évidence l'activité de la protéase virale dans *E. coli*. Comme l'extrémité 5' de ce clone est identique à celle du clone pTuM 4.5

Kb utilisé pour la construction du plasmide pAC3 (voir section 1.3), le sous-clonage de ce fragment vérifierait le choix du vecteur (pET-11a), c'est-à-dire qu'il permettrait l'expression en phase de la protéine de fusion (les 11 premiers codons du gène 10 du bactériophage T7) et des gènes viraux insérés dans le site BamH I du plasmide d'expression pET-11a.

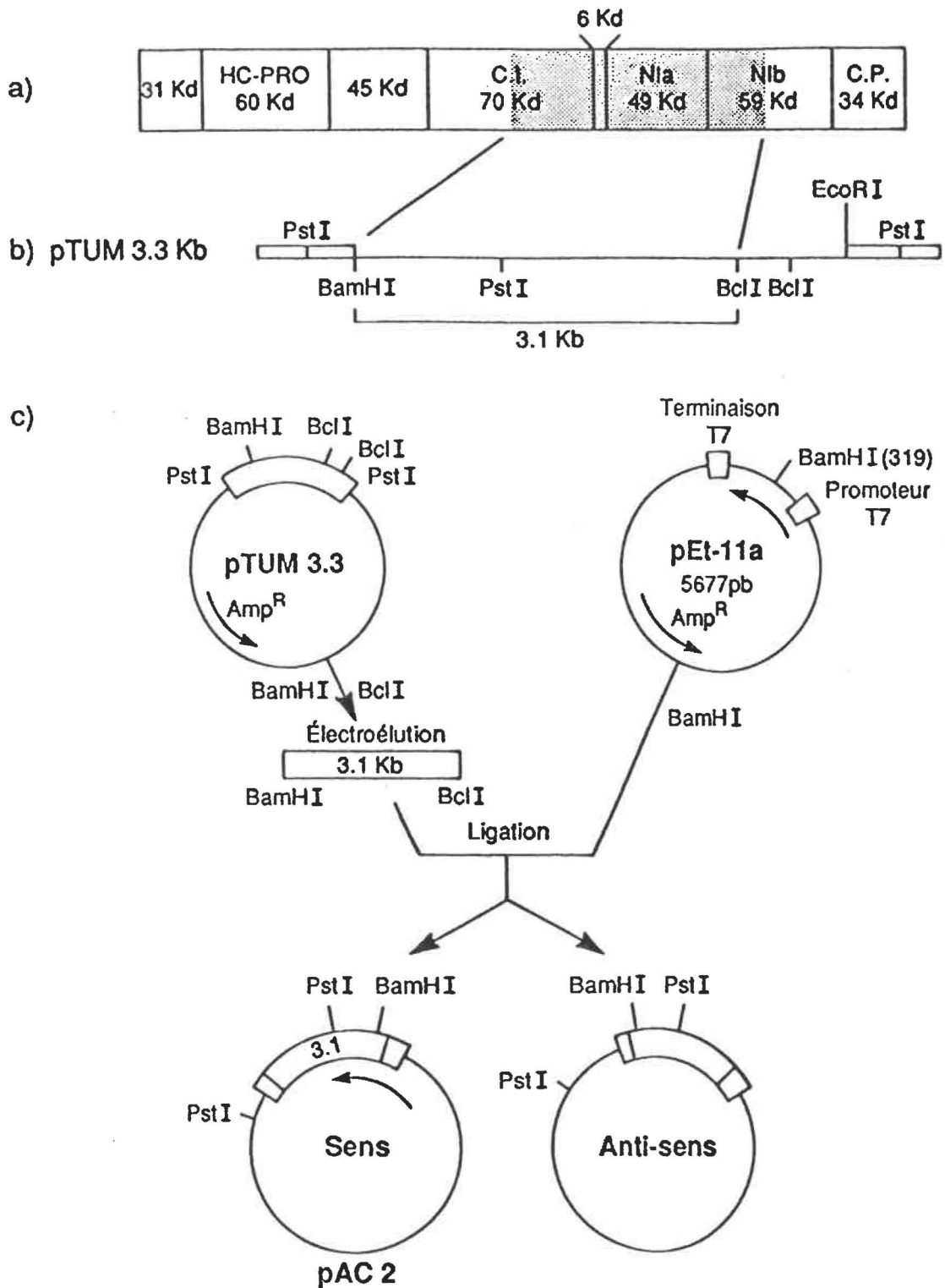
La plasmide pTuM 3.3 (Fig. 7c) est digéré avec les enzymes BamH I (GGATCC) et Bcl I (TGATCA). Les extrémités cohésives produites par l'enzyme Bcl I sont compatibles avec celles générées par l'enzyme BamH I, cependant les sites BamH I ou Bcl I ne sont pas reconstitués après ligation (TGATCA). Un fragment de 3.1 Kb est électroélué et inséré au vecteur pET-11a linéarisé avec l'enzyme BamH I. Des 3 vecteurs disponibles (pET-11a-b-c) ayant le site BamH I à l'extrémité 3' de la protéine de fusion, seul le vecteur pET-11a permettait l'insertion du fragment de 3.1 Kb dans le bon cadre de lecture car le site BamH I de ce vecteur est situé sur deux codons complets, comme le site BamH I de l'ADNc.

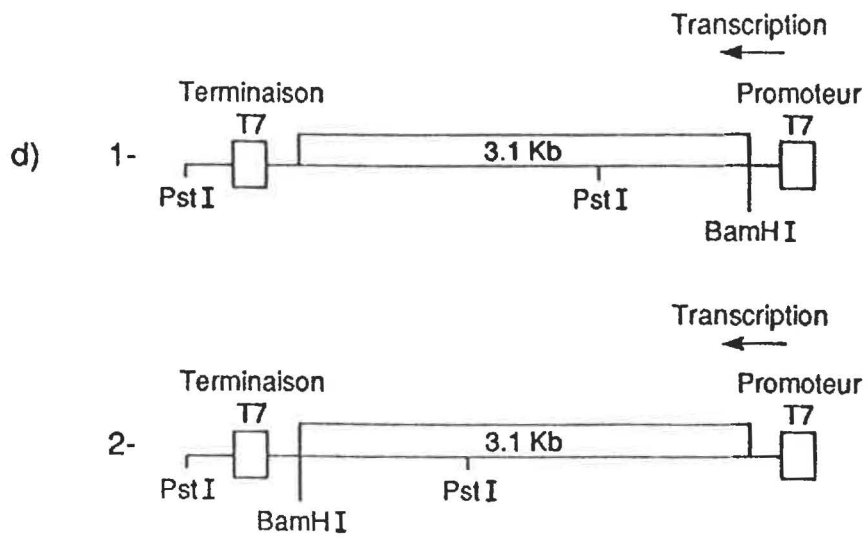
Le fragment de 3.1 Kb et le vecteur pET-11a sont mélangés dans un rapport molaire de 4:1 pour ligation. Les extrémités cohésives compatibles du fragment de 3.1 Kb et du vecteur peuvent se paier, ceci diminue donc l'efficacité de l'insertion du fragment. En augmentant le nombre de molécules de fragment de 3.1 Kb, on favorise leur insertion au vecteur. Toutefois le pourcentage de transformants recombinants reste faible.

FIGURE 7:**Construction du plasmide pAC2.**

- a) Carte illustrant la polyprotéine du TuMV. La partie ombragée représente les protéines dont l'ADNc a été sous-cloné dans le vecteur pET-11a.
- b) Carte de restriction du plasmide pTuM 3.3.
- c) Étapes de travail conduisant à la production du plasmide pAC2.
- d) 1- insertion sens 2- insertion anti-sens.

Construction du plasmide pAC 2





Les clones transformants sont repiqués de manière ordonnée sur milieu LBaa' et sont analysés par hybridation *in situ*. Le fragment d'ADN de 3.1 Kb électroélué et marqué au dCTP $\alpha^{32}\text{P}$ a servi de sonde pour détecter les recombinants (pET-11a - 3.1 Kb). Des trois cents clones repiqués, 2 colonies ont donné un signal positif à l'autoradiogramme. À suivi la détermination de l'orientation du fragment de 3.1 Kb. Puisque l'insertion n'est pas dirigée, le fragment peut en effet se placer en direction sens ou anti-sens. La digestion, avec des enzymes choisies des plasmides recombinants, donnera un patron différent selon le sens de l'insertion. Ont été choisies, l'enzyme Pst I, car il n'y a qu'un seul site sur le vecteur pET-11a et sur le fragment 3.1 Kb, et l'enzyme BamH I. Des fragments d'ADN de 1100 pb (Pst I-BamH I), de 3066 pb (Pst I-Pst I) et de 4608 pb (BamH I-Pst I) étaient visibles sur gel d'agarose lorsque le gène était orienté correctement (Fig. 7d). Le plasmide pTuM 3.3, digéré avec les enzymes Pst I et BamH I, est utilisé comme témoin puisque le fragment de 1100 pb correspond au fragment Pst I-BamH I de l'insert orienté correctement. Le vecteur pET-11a est digéré avec BamH I et Pst I pour identifier les fragments correspondants au plasmide. Un plasmide recombinant formé du gène de 3100 pb orienté correctement dans le vecteur pET-11a a été choisi et nommé pAC2. Ce plasmide est introduit dans la bactérie BL-21 (DE3). La souche, numérotée 180, est conservée pour l'analyse de l'activité de la protéase.

1.3 Construction du plasmide pAC3

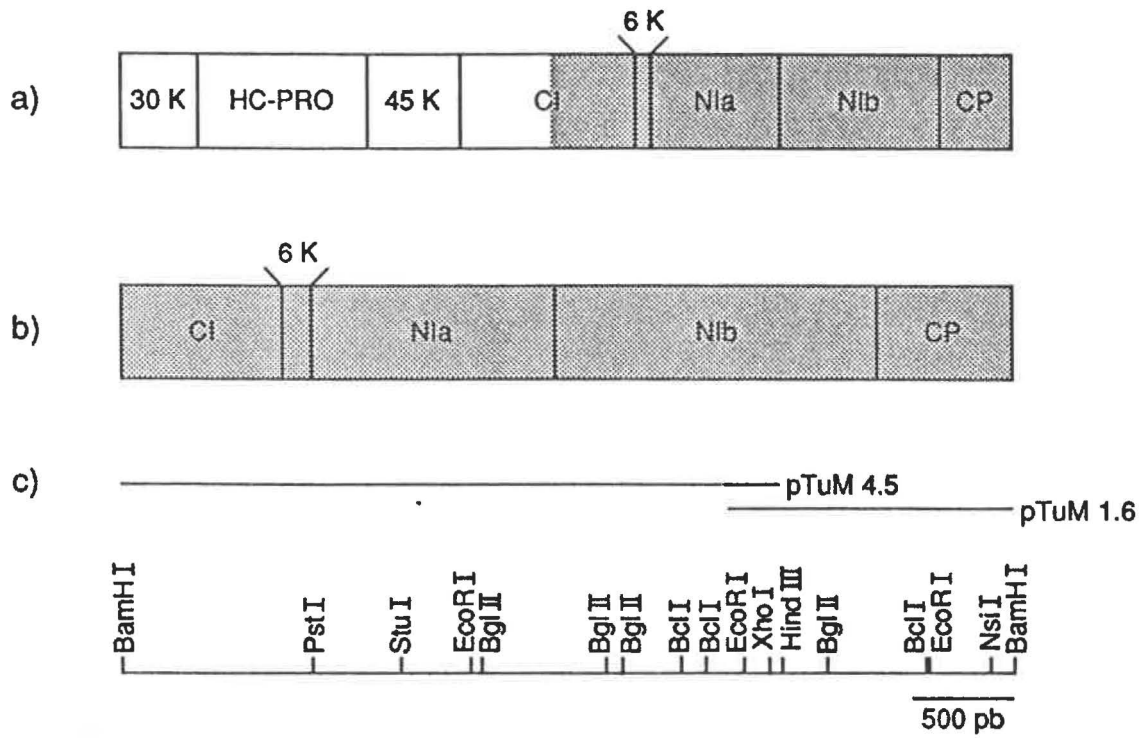
Les plasmides des souches 151 et 169 (Tableau III, page 90) ont servi à construire le plasmide pAC3. Le plasmide de la souche 169, pTuM 1.6, est formé du vecteur pBluescript SK et d'un ADNc du TuMV de 1.6 Kb qui code pour la protéine de la capsid (extrémité 3' du génome viral) et pour une portion de l'enzyme ARN polymérase ARN-dépendante (extrémité 5' du génome viral) (Fig. 8a, b, c). L'ADNc est inséré dans le site Eco RI du vecteur pBluescript SK. Le plasmide de la souche 151, pTuM 4.5, est formé du vecteur pUC 9 et d'un ADNc codant pour une portion de la protéine CI, la 6K, la protéase NIa (49K), la polymérase NIb (59K) et pour une portion de la protéine capsidaire du virus (Fig. 8a, b, c). L'ADNc est inséré dans le site Pst I. Dans le but de bâtir le clone d'ADNc de 5.1 Kb (Fig. 8d), qui sera formé de la réunion des portions d'ADNc BamH I-Hind III de pTuM 4.5 et Hind III-Pst I de pTuM 1.6, les deux plasmides sont digérés avec les enzymes Sal I et Hind III. Le fragment d'ADN de 3660 pb provenant du plasmide pTuM 4.5 digéré et séparé par électrophorèse en gel d'agarose, est électroélué. Le plasmide pTuM 1.6 Kb digéré, extrait au phénol:chloroforme et précipité à l'éthanol, est "ligué" au fragment de 3660 pb. Le résultat de ligation attendu est le plasmide pBluescript SK portant l'ADNc de 5.1 Kb pouvant être excisé du vecteur par une digestion avec l'enzyme BamH I.

Les bactéries *E. coli* XL-1 sont transformées avec la réaction de ligation. Ici, la souche XL-1 remplace la souche HB-101 car celle-ci produit une endonucléase A

FIGURE 8:**Construction du plasmide pAC3**

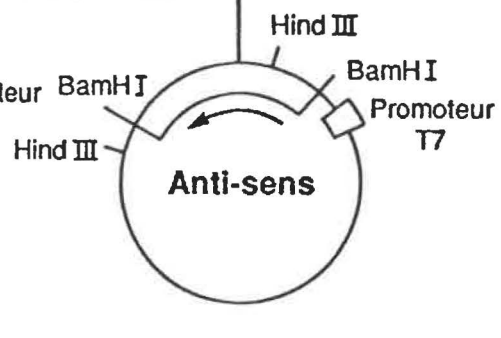
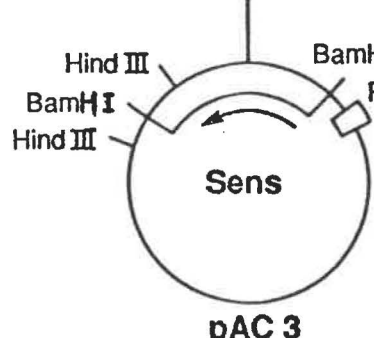
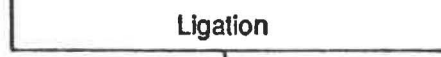
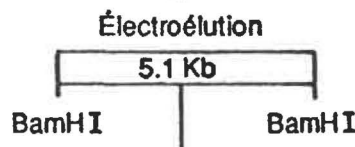
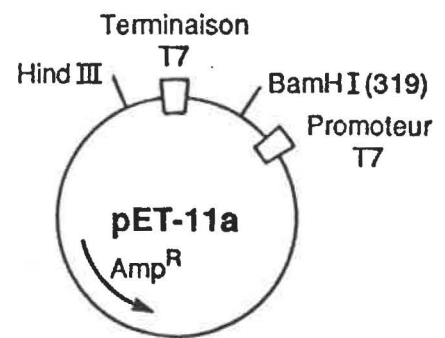
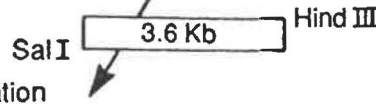
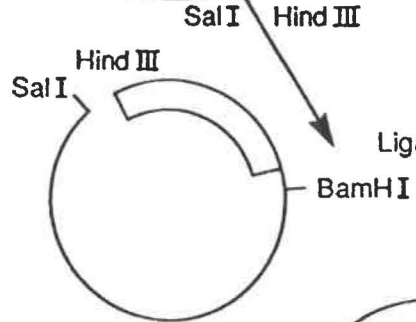
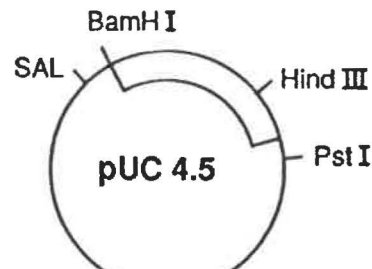
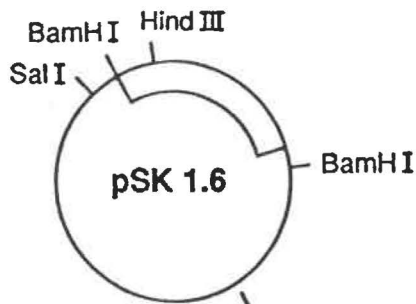
- a) Carte illustrant la polyprotéine du TuMV. La partie ombragée représente les protéines dont l'ADNc a été sous-cloné dans le vecteur pET-11a.
- b) Protéines de TuMV codées par l'ADNc de 5.1 Kb.
- c) Carte de restriction des plasmides pTuM 1.6 et pTuM 4.5.
- d) Étapes de travail conduisant à la production du plasmide pAC3.
- e) 1- insertion sens 2- insertion anti-sens.

Construction du plasmide pAC 3

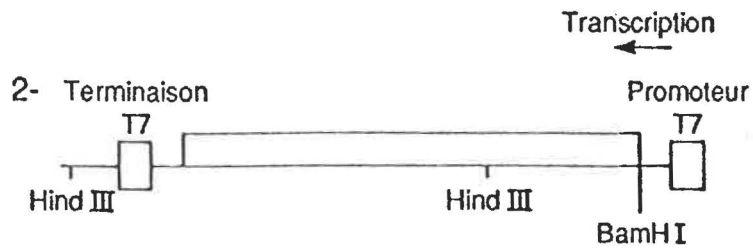
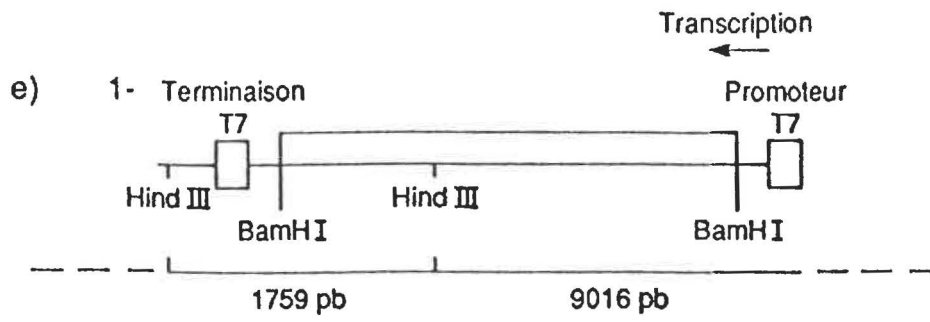


d) pTuM 1.6

pTuM 4.5



pAC 3



(Sambrook *et al.*, 1989) qui, si elle n'est pas inactivée, dégrade le plasmide lors de la digestion avec des enzymes de restriction. Cette dégradation a été observée à maintes reprises lors de minipréparation de plasmides.

Six cents clones ont été repiqués sur milieu LBaa' et préparés pour l'hybridation *in situ*. Le criblage des transformants est fait avec un fragment de 3.1 Kb marqué au dCTP $\alpha^{32}\text{P}$, correspondant à l'extrémité 5' du fragment de 3660 pb. La souche 169 contenant le plasmide pTuM 1.6 sert de témoin négatif pour l'hybridation *in situ*. Des six cents clones criblés, deux ont donné un signal positif et montraient une bande d'ADN au niveau du marqueur de 5000 pb (gène de 5.1 Kb) et une sous le marqueur de 3000 pb (vecteur pBluescript SK) lorsque digérés avec l'enzyme BamH I. La souche recombinante XL-1 (pSK-5.1) a été conservée et numérotée 185.

La deuxième étape de la construction du plasmide pAC3 consiste à introduire le fragment de 5.1 Kb produit dans la bactérie XL-1, dans le vecteur d'expression pET-11a. Le choix du vecteur est le même que pour celui du plasmide pAC2 car l'extrémité 5' du gène est identique à celui introduit dans le plasmide pAC2. Le plasmide pSK5.1 est digéré avec l'enzyme BamH I. Après séparation en gel d'agarose 1.0%, le fragment de 5.1 Kb est électroélué et inséré au vecteur pET-11a (linéarisé avec l'enzyme BamH I) par ligation. Les bactéries XL-1 sont transformées avec 2 μl de la réaction de ligation. La technique d'hybridation *in situ* est utilisée pour dépister les recombinants.

La sonde utilisée est identique à celle qui a servi à la détection du plasmide pSK 5.1. Des mille trois cents clones repiqués, quinze ont donné un signal sur l'autoradiogramme. Les clones recombinants sont digérés avec l'enzyme Hind III pour déterminer l'orientation du fragment de 5.1 Kb. Le nombre de paires de bases entre le site Hind III du vecteur et celui du fragment est de 1759 (289 provenant du vecteur et 1470 du fragment) lorsque le gène est orienté correctement (extrémité 5' du gène dans le site BamH I qui suit les 11 premiers codons du gène 10 du bactériophage T7). L'autre fragment composé de la quasi totalité du vecteur et de l'extrémité 5' du gène est de 9016 pb (Fig. 8e). Un clone montrant ces 2 bandes en gel d'agarose a été choisi et nommé pAC3. Il est formé du vecteur pET-11a et d'un fragment de 5.1 Kb d'ADNc du TuMV. Le plasmide pAC3 produit dans la bactérie XL-1 a servi à transformer la souche BL-21 (DE3). La souche 189 (BL-21 DE3-pET-11a-5.1 Kb) a été conservée pour l'analyse de l'expression des gènes clonés.

2. PROTÉINE DE LA CAPSIDE

Après le sous-clonage du gène de la protéine de la capsid, il fallait démontrer que cette protéine pouvait être exprimée par le système d'expression choisi. L'induction pour l'expression a été faite et les protéines totales furent analysées en gel de polyacrylamide. Des anticorps anti-capsid, étant disponibles au laboratoire, une immunodétection a suivi l'expression et a confirmé que la protéine majeure produite après induction était la protéine capsidique de TuMV.

2.1 Expression du gène de la protéine capsidaire dans *E. coli*

Les souches 164, comportant le gène de la protéine de la capsidite, et 166 (vecteur pET-11d) sont induites avec l'IPTG. Les protéines totales de chaque souche sont préparées pour l'électrophorèse. Des aliquots de 15 μ l sont déposés en gel de polyacrylamide (12%) en présence de SDS et électrophorés. Le patron protéinique révélé par la coloration du gel au bleu de coomassie (Fig. 9) montre un profil identique pour les souches 164 et 166, à l'exception d'une bande qui est apparue trente minutes après induction de la souche 166 (puits 2 à 5). Cette bande migre au niveau du témoin positif qui est la protéine capsidaire de TuMV purifiée avec un poids moléculaire de 34 000 (Fig. 9, puits 11). La synthèse de la protéine de la capsidite augmente durant deux heures après l'induction et plafonne par la suite. Une lecture faite sur vidéo-densitomètre (model 620 de BioRad) a indiqué que la protéine de la capsidite correspondait à 30% des protéines totales de *E. coli*.

2.2 Immunodétection de la protéine de la capsidite

Dans le but de montrer que la protéine formant 30% des protéines totales produites par la souche 164 était bien la protéine de la capsidite de TuMV, une immunodétection a été réalisée avec des anticorps anti-capsidite de TuMV. Ces anticorps ont été produits par injection de virus purifié à des lapins au laboratoire du Dr Ramesh Sinha d'Agriculture Canada à Ottawa.

FIGURE 9: Production de la protéine de la capsidite du TuMV dans *E. coli*.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide 12% des protéines produites dans *E. coli* et colorées au bleu de coomassie.

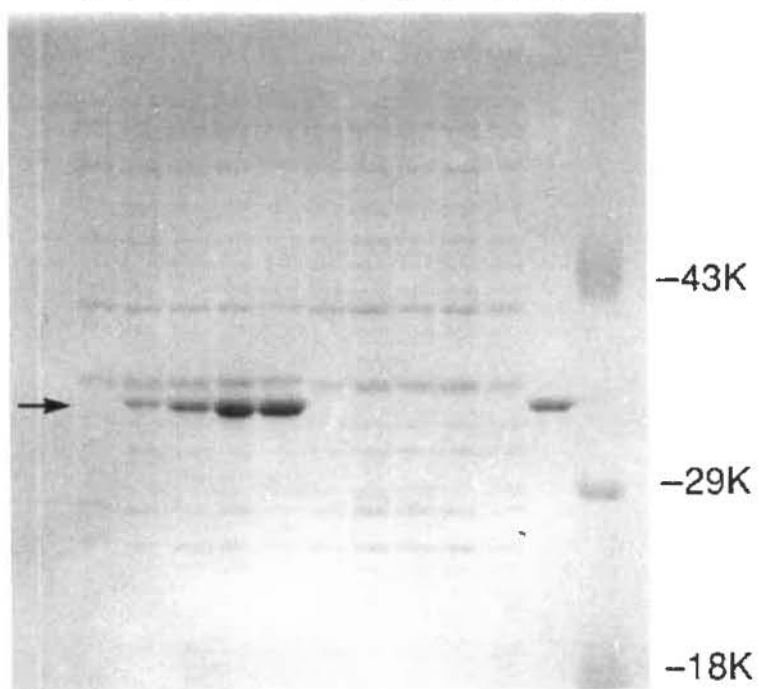
puits 1 à 5 plasmide pAC1;

puits 6 à 10, vecteur pET-11d. 0 min (1 et 6), 30 min (2 et 7), 60 min (3 et 8), 120 min (4 et 9), 180 min (5 et 10) après induction à l'IPTG;

puits 11 protéine capsidaire du TuMV.

Les chiffres, à droite, indiquent la migration des marqueurs de poids moléculaire.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Les protéines, provenant d'aliqots prélevés au temps 0 et 180 minutes des souches 164 et 166 induites, sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide 12%. Les protéines d'un des deux gels sont colorées au bleu de coomassie (Fig. 10a) et celles du second sont transférées sur membrane de nitrocellulose pour l'immunodétection. La membrane de nitrocellulose saturée est incubée avec les anticorps anti-capside (dilution 1/1000). Les anticorps se fixent à la région antigénique de la protéine de la capsid par le jeu des forces hydrophobes, ioniques et de Van der Waals. La détection du complexe immun est faite avec la protéine-A radioiodinée qui se lie fortement à la région Fc des anticorps (le site effecteur). La protéine de la capsid est révélée lors de l'autoradiographie de la membrane de nitrocellulose. L'autodiogramme (Fig. 10b) montre clairement la détection de la protéine de la capsid (puits 2). Une certaine protéolyse de la protéine capsidaire est détectée et mise en évidence par la présence de plusieurs bandes de moindre intensité et de poids moléculaire inférieur à la protéine capsidaire (Fig. 10b, puits 2).

3. ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA PROTÉASE VIRALE NI_a PRODUITE PAR LES SOUCHES *E. COLI* 180 ET 189

Les plasmides des souches 180 et 189 portent un ADNc qui code pour des polyprotéines de 116 kDa et de 185 kDa respectivement. La protéase virale NI_a est présente dans ces deux polyprotéines. Si cette protéase conserve son activité biologique dans *E. coli*, elle devrait reconnaître les sites de clivages bornant chaque protéine de la polyprotéine et les libérer de celle-ci. L'extrémité aminée de la

FIGURE 10: Immunodétection de la protéine de la capsid.

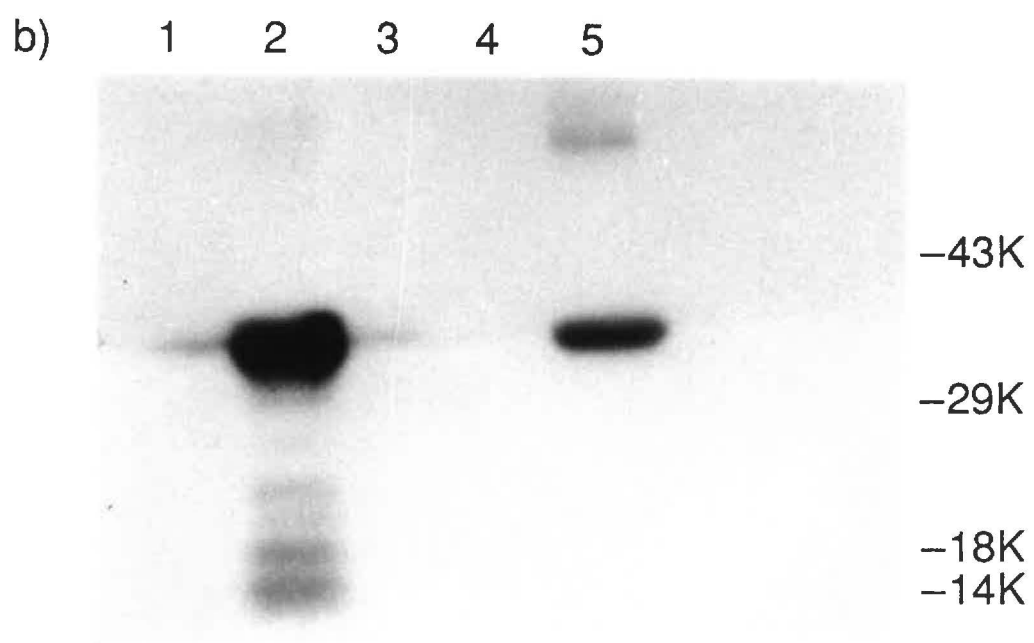
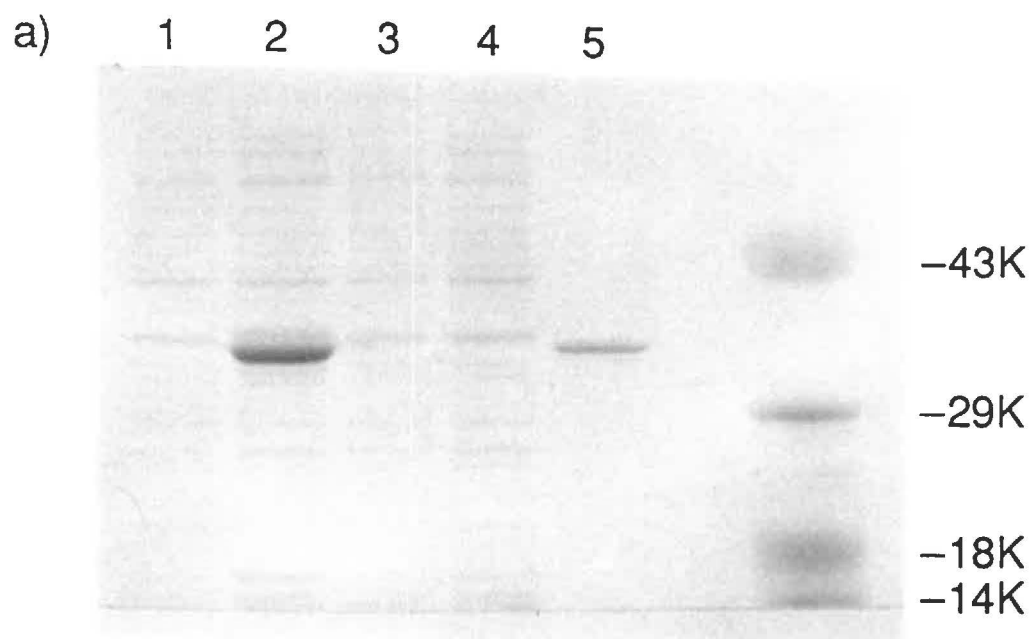
- a) Electrophorèse en gel de polyacrylamide 12%.
- b) Immunodétection de la protéine de la capsid avec les anticorps anti-capsid du TuMV après transfert sur membrane de nitrocellulose, des échantillons montrés en a.

puits 1 et 2, plasmide pAC1, 0 et 180 min après induction;

puits 3 et 4, pET-11d, 0 et 180 min après induction;

puits 5, protéine capsidaire de TuMV.

Les chiffres, placés à droite, indiquent la migration des marqueurs de poids moléculaire.



polyprotéine de la souche 189 est identique à celle produite par la souche 180. Cette portion inclus les protéines CI, 6K et NIa. On devrait retrouver sur gel de polyacrylamide des bandes identiques aux deux souches, soit la CI de 37 kDa, la CI-6K de 43 kDa et la NIa de 49 kDa. De plus, la souche 180 devrait montrer une bande à 21 kDa correspondant au poids moléculaire de la NIb tronquée, située à l'extrémité carboxyle de la polyprotéine. Pour ce qui est de la souche 189, on devrait voir en gel de polyacrylamide deux nouvelles protéines, la NIb complète de 59 kDa et la protéine de la capsidite de 34 kDa. Les techniques usuelles d'analyse de protéines, gel de polyacrylamide coloré au bleu de coomassie, marquage à la méthionine-[³⁵S], immunodétection, ont été utilisées pour détecter la présence de ces protéines, démontrant ainsi l'activité protéolytique de la protéase virale produite dans *E. coli*.

3.1 Activité protéolytique de la protéase virale NIa en gel de polyacrylamide coloré au bleu de coomassie

Les souches 178, 180, 189 sont induites et les aliquots de culture sont prélevés et préparés tel que décrit à la section 1.2.10 de la section méthode. Quarante μ l de chaque aliquots sont déposés en gel de polyacrylamide 8%, en présence de SDS. Après électrophorèse, la révélation des protéines est faite par la coloration du gel au bleu de coomassie.

L'analyse des gels se fait en comparant le patron électrophorétique des protéines obtenues à partir des souches 180 et 189 avec le patron obtenu pour la

souche 178 (vecteur seul). Les protéines visibles en gel et produites par les souches 180 et 189 et absentes dans la souche 178 correspondent à la polyprotéine virale recombinante codée par les clones d'ADNc pAC2 et pAC3. La polyprotéine étant constituée, en partie de la protéase virale NIa, des bandes de moindre poids moléculaire devraient également apparaître si l'activité de la protéase virale recombinante est conservée.

Les protéines totales produites par la souche 180 sont montrées à la figure 11a. Une protéine de poids moléculaire de 116 kDa correspondant à la taille prédite de l'insert dans le vecteur d'expression est visible 30 minutes après l'induction (puits 4). Une protéine migrant au niveau du poids moléculaire de 43 kDa apparaît une heure après l'induction (puits 6) et correspondrait à la taille prédite pour le dimère CI-6K excisé de la polyprotéine par la protéase NIa. Une autre protéine située sous le marqueur de 43 kDa apparaît aussi une heure après l'induction et correspondrait à la taille prédite pour la protéine CI qui a un poids moléculaire de 37 kDa. Une protéine présente dans la souche 180 et se situant sous le marqueur de poids moléculaire de 29 kDa, apparaît une heure après l'induction (puits 6) et est très abondante trois heures après induction (puits 10). Cette protéine aurait le poids moléculaire prédit de la polymérase tronquée (NIb) qui est de 21 kDa.

Le profil des protéines produites par la souche 189 (Fig. 11b) diffère quelque peu du profil de la souche 180. La polyprotéine complète est de 185 kDa et est faiblement visible au-dessus du marqueur de 97 kDa (puits 10). Les protéines de

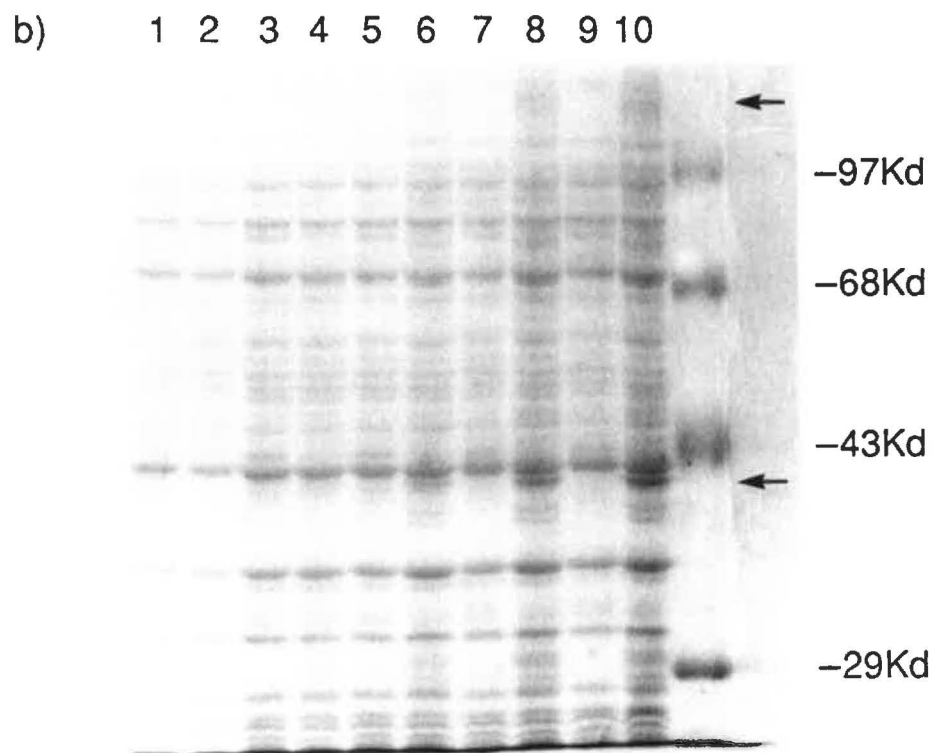
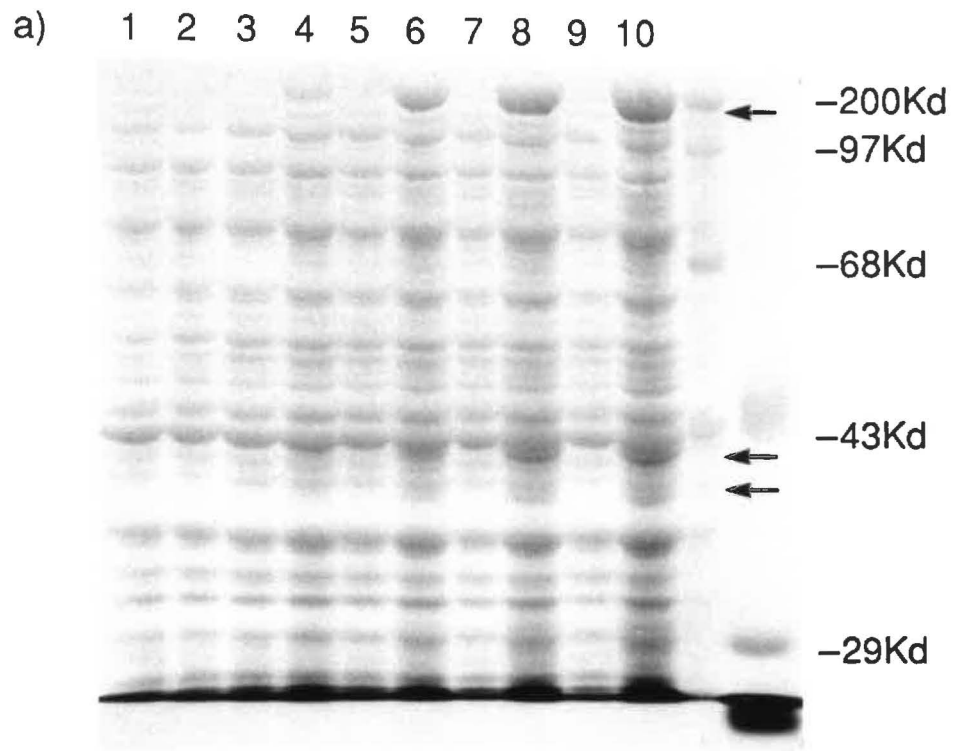
FIGURE 11: Production des polyprotéines de 3.1 Kb (pAC2) et de 5.1 Kb (pAC3) du TuMV dans *E. coli*.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide de 8% des protéines produites dans *E. coli* contenant le plasmide pAC2 ou pAC3.

puits 1-3-5-7-9, vecteur pET-11a, fig. a et b;

puits 2-4-6-8-10 fig. a= plasmide pAC2, fig. b= plasmide pAC3.

0 min (1 et 2), 30 min (3 et 4) 60 min (5 et 6), 120 min (7 et 8) et 180 min (9 et 10) après induction.



43 kDa et 37 kDa sont présentes également. Une nouvelle bande, située au-dessus du marqueur moléculaire de 29 kDa, est visible 1 heure après induction (puits 6). L'immunodétection confirmera l'identité de cette protéine. Le gel en polyacrylamide montre qu'une certaine activité protéolytique de la polyprotéine s'effectue puisque de nouvelles protéines apparaissent, exclusivement dans les souches 180 et 189, au fur de l'induction et qu'elles correspondent aux poids moléculaires prédits par la séquence en acides aminés. Cependant cette protéolyse est partielle car des protéines de poids moléculaire de 49 kDa et de 59 kDa (NIa et NIb) ne sont pas observées.

3.2 Activité protéolytique de la protéase virale NIa montrée par le marquage des protéines à la méthionine-[³⁵S]

L'analyse des protéines électrophorées en gel de polyacrylamide et colorées au bleu de coomassie a montré que la protéase virale NIa avait une certaine activité protéolytique. Puisque le bleu de coomassie colore toutes les protéines, des protéines virales protéolysées peuvent être masquées par les protéines bactériennes, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. Un radiomarquage des protéines a été fait en utilisant la méthionine-[³⁵S] pour faciliter la détection des protéines protéolysées. L'efficacité du système d'expression utilisé fait en sorte que la méthionine marquée est incorporée majoritairement dans les protéines recombinantes, facilitant ainsi leur détection.

Les souches bactériennes 164, 180, 189 et 190 sont cultivées dans le milieu LBa' et marquées selon la méthode décrite à la section 1.14. Les aliquots sont analysés en gel de polyacrylamide de 8% et de 12%. 15 μ l de chaque aliquot sont déposés en gel de polyacrylamide. Après électrophorèse, le gel est séché et l'empreinte du marquage est révélé sur film Kodak KAR-5.

La figure 12a présente l'autoradiogramme de protéines marquées à la méthionine-[³⁵S] et électrophorées en gel de polyacrylamide de 8%. Les puits 1-3-5-7 montrent le marquage de protéines après l'ajout de l'IPTG (inducteur gratuit). Les puits 2-4-6-8 montrent les protéines marquées produites par les souches non-induites. On remarque que l'incorporation de méthionine-[³⁵S] dans les protéines se fait presque exclusivement dans les protéines recombinantes produites par les souches après induction (Fig. 12a, 1-3-5). L'incorporation de méthionine-[³⁵S] dans les protéines de l'hôte est très réduite car la souche 190 portant le vecteur seul (Fig. 12a, 7) montre, après induction, qu'une bande fortement marquée. Le niveau d'expression basal, c'est-à-dire l'expression observée sans induction, des gènes codés par les plasmides est minimal car aucune protéine recombinante n'est présente lorsque les souches ne sont pas induites avec l'IPTG (puits 2-4). Une exception est observée cependant, car la souche 164, avec ou sans induction, montre des protéines identiques (puits 5 et 6), la protéine de la capsid étant fortement exprimée dans les deux cas. La production d'une faible quantité d'ARN polymérase de T7 peut expliquer ce fait. Les principales protéines marquées à la méthionine-[³⁵S] sont pour la souche 180 (Fig. 12a, puits 1), la bande correspondant à la polyprotéine complète

FIGURE 12: Autoradiogramme des protéines du TuMV marquées à la méthionine-[³⁵S] et produites dans *E. coli*.

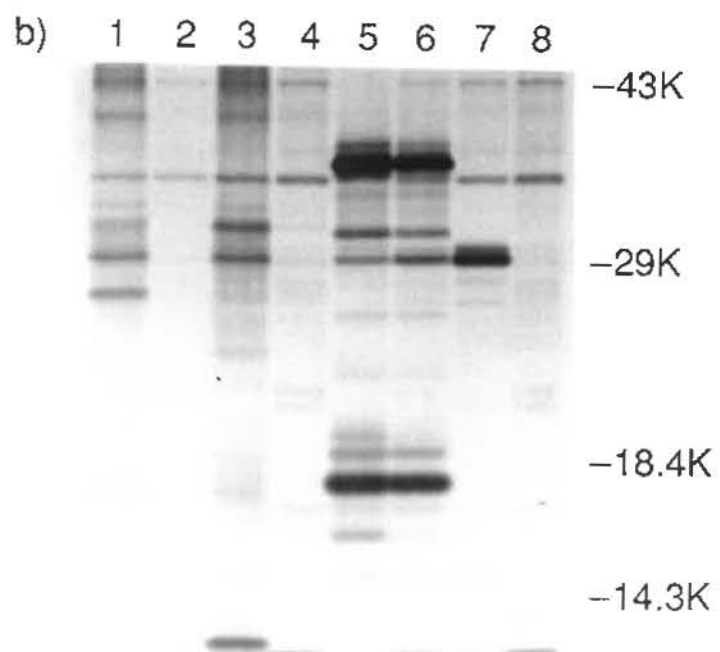
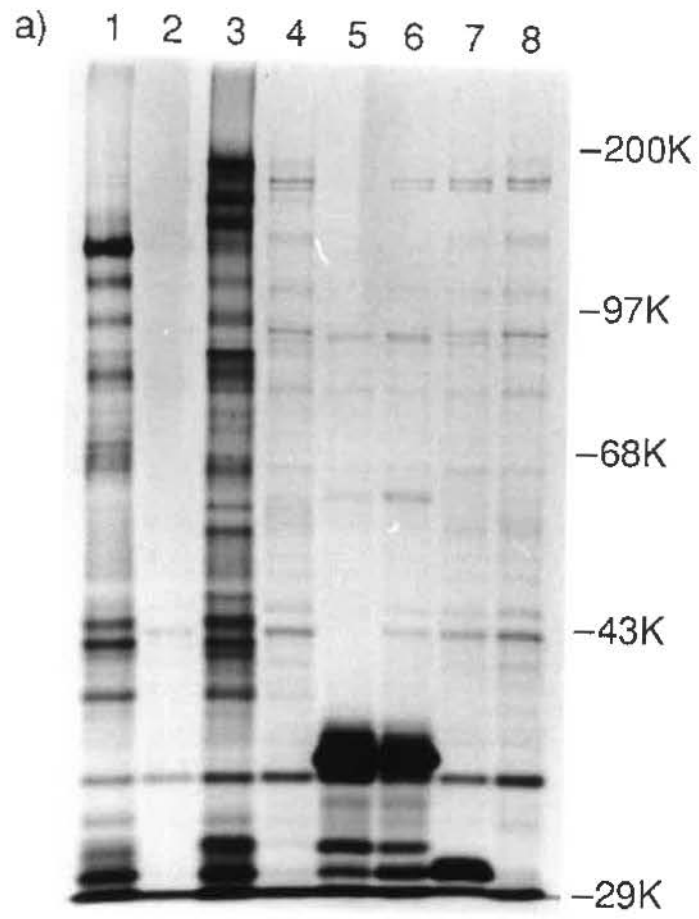
a) gel de polyacrylamide de 8%

b) gel de polyacrylamide de 12%

puits 1-3-5-7 plasmides pAC2, pAC3, pAC1 et pET-11a induits;

puits 2-4-6-8 plasmides pAC2, pAC3, pAC1 et pET-11a non-induits.

Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués à la droite des figures.



(116 kDa) deux bandes situées au niveau du marqueur de 43 kDa, dont l'une d'elle, serait formée des protéines CI et 6K et une bande de poids moléculaire de 37 kDa formée par la protéine CI. La présence de nombreuses bandes parasites qui n'ont pas un poids moléculaire correspondant aux protéines virales serait dûe à une protéolyse non spécifique effectuée par des protéases bactériennes.

La souche 189 (le plasmide pAC3) (Fig. 12a, puits 3) montre des protéines fortement marquées et de haut poids moléculaire (>140 kDa) dont une est de la taille de la polyprotéine complète (185 kDa). Les deux autres bandes situées entre les marqueurs de 97 kDa et de 200 kDa sont des polyprotéines partiellement coupées. Les bandes correspondant aux protéines CI-6K (43 kDa) et CI (37 kDa) sont aussi fortement marquées dans ce plasmide. Étant donné que l'extrémité 5' de l'ADNc introduit dans le vecteur pET-11a est la même pour les souches 180 et 189, il est normal d'observer les protéines CI-6K et CI dans les deux souches.

La souche 164 (Fig. 12a, puits 5) montre en gel de polyacrylamide de 8% une protéine fortement marquée qui correspondrait à la protéine capsidaire, la seule protéine recombinante codée par l'ADNc du plasmide pAC1.

Le gel de polyacrylamide de 12% (Fig. 12b) permet de séparer les protéines marquées de faible poids moléculaire. Des protéines, pour lesquelles il n'y avait aucune résolution en gel de 8%, sont bien séparées. Ainsi, on peut voir, pour la souche 180 (Fig 12b, puits 1) une protéine située sous le marqueur de 29 kDa et qui

correspondrait à la taille prédite de la polymérase (N1b) tronquée qui est de 21 kDa. Cette protéine ne se retrouve pas dans la souche 189 car l'ADNc de la polymérase est complet dans cette souche et devrait produire une polymérase de 59 kDa. La souche 189 montre une protéine située au-dessus du marqueur de poids moléculaire de 29 kDa. Cette protéine correspondrait à la protéine de la capsidite amputée de quelques 3 kDa. La souche 164 (Fig. 12b, puits 5) montre deux nouvelles bandes (~30 kDa et ~18 kDa). Ces bandes correspondraient à des protéines de la capsidite protéolysées.

Le marquage à la méthionine-[³⁵S] montre bien l'expression des polyprotéines des souches 180 et 189, de même qu'une protéolyse partielle de ces polyprotéines. Cependant, on ne peut voir de bandes qui correspondraient aux poids moléculaires de la protéase N1a (49 kDa) pour les souches 180 et 189 et de la polymérase N1b (59 kDa) pour la souche 189. La protéolyse des polyprotéines ne semble se produire efficacement qu'aux extrémités aminée et carboxyle puisqu'on n'observe que les protéines CI et CI-6K (extrémité aminée) et la protéine de la capsidite (extrémité carboxyle) libérées de la polyprotéine.

3.3 Activité protéolytique montrée par immunodétection

L'analyse des gels des protéines colorées au bleu de coomassie produites par les souches 180 et 189 et des autoradiogrammes des électrophorèses des protéines marquées à la méthionine-[³⁵S] ont montré qu'une protéolyse des polyprotéines se produisait après synthèse puisqu'on observait des protéines dont le poids moléculaire

correspondait à la taille prédite par la séquence d'ADN (protéines CI, 6K, NIB tronquée). Dans le but de démontrer que ces protéines étaient réellement les protéines virales, des immunodétections ont été exécutées. Des anticorps anti-capsides du virus de TuMV furent utilisés pour détecter la production et/ou la protéolyse de la protéine de la capsid de la souche 189. Des anticorps anti-NI (NIa-NIb) et anti-CI de TEV, provenant du laboratoire de M.W.G. Dougherty furent utilisés pour la détection des protéines NIa, NIb et CI produites par les souches 180 et 189. La souche 164 a servi de témoin positif pour l'immunodétection de la protéine de la capsid alors que la souche 166 portant le vecteur seul montrait s'il y avait reconnaissance de protéines de *E. coli*.

Les souches 164, 180, 189 et 190 ont été induites. Les aliquots récoltés 180 min après induction ont été préparés et 20 μ l de chacun sont déposés en gel de polyacrylamide de 10%. Trois gels sont préparés de manière identique. Les protéines électrophorées sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Ces membranes sont incubées séparément avec les anticorps anti-capsides de TuMV, les anticorps anti (NIa-NIb) de TEV et les anticorps anti-CI de TEV.

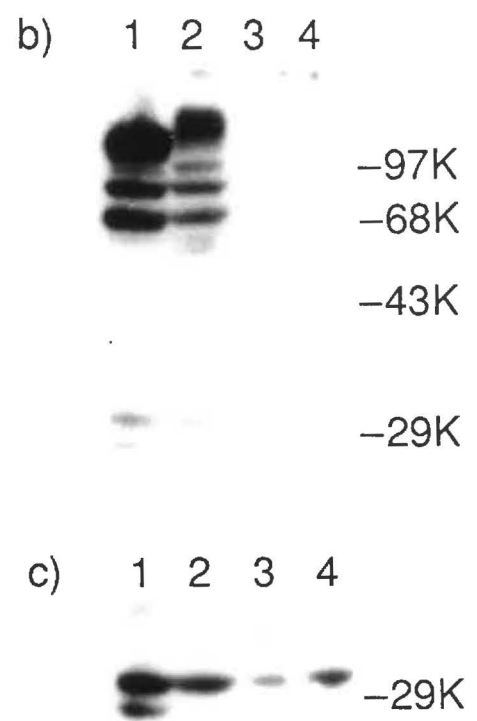
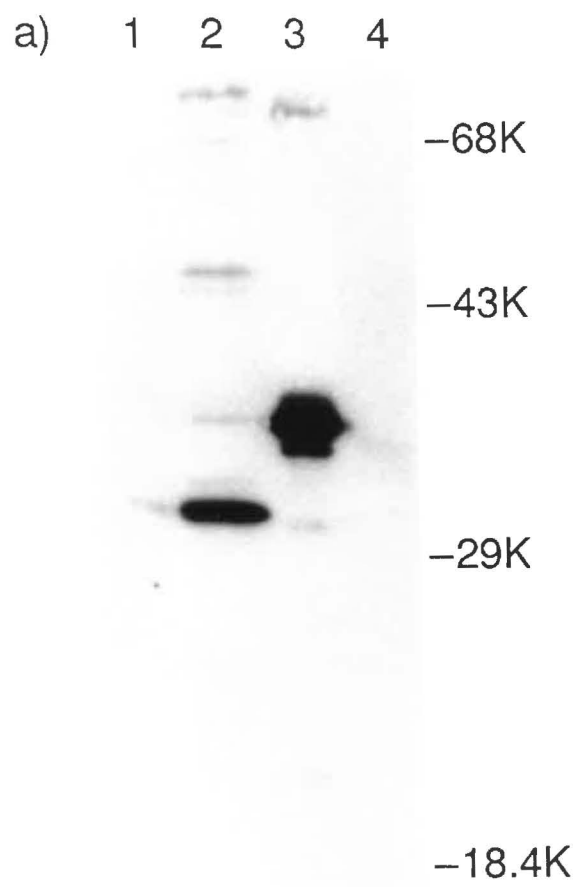
La figure 13a montre l'autoradiogramme de l'immunodétection faite avec les anticorps anti-capsides de TuMV. Comme attendu, la protéine de la capsid n'est pas détectée dans la souche 180 puisqu'elle ne porte pas l'ADNc de la protéine de la capsid de TuMV (Fig. 13a, puits 1). La protéine de la capsid est détectée dans la souche 189 (Fig. 13a, puits 2). Des protéines dont le poids moléculaire est

supérieur à la protéine de la capsid (environ 70 kDa et 45 kDa) réagissant faiblement avec les anticorps anti-capsides. Ces polyprotéines incluraient l'extrémité carboxyle de la polyprotéine, correspondant à la protéine de la capsid. Un faible signal est observé ayant un poids moléculaire identique à la protéine de la capsid produite par la souche 164. Ceci suppose que la protéine capsid "native" est produite en très faible quantité par la souche 189. La majorité des protéines de la capsid produites par la souche 189 a un poids moléculaire inférieur à la protéine native produite par la souche 164 (puits 3) qui est de 34 kDa puisqu'un signal de très forte intensité correspondant à une protéine d'environ 31 kDa est observable. Il se peut que la traduction ou la transcription de la protéine de la capsid ne se poursuit pas jusqu'à l'extrémité 3' du gène, produisant ainsi une protéine de la capsid écourtée à son extrémité carboxyle, ou bien il existerait un site de clivage reconnu par la protéase virale libérant une protéine amputée de quelques 3 kDa.

Le signal détecté au puits 3 correspond à la protéine de la capsid, d'un poids moléculaire de 34 kDa produite par la souche 164 qui porte l'ADNc de la protéine de la capsid de TuMV. Elle sert de témoin positif pour l'immunodétection. Aucun signal n'est observé, au puits 4, pour les protéines produites par la souche 166 puisqu'elle ne porte aucun gène viral, elle sert de témoin négatif. L'absence de signal montre que le sérum duquel provient les anticorps anticapsides ne contient pas d'anticorps anti *E. coli*.

FIGURE 13: Immunodétection de protéines du TuMV produites dans *E. coli*

- a) Anticorps anticapside
- b) Anticorps anti-NI de TEV
- c) Surexposition de la région du marqueur de 29 K du gel représentée en b.
 - 1- souche 180
 - 2- souche 189
 - 3- souche 164
 - 4- souche 190



L'immunodétection des NIa et NIb a été faite avec des anticorps de TEV. Puisque ce virus est un membre du groupe des potyvirus comme le TuMV et que l'homologie au niveau des protéines est de 52% (NIa 50.2% et NIb 54.2%, Allison *et al*, 1985), il était plausible de penser que l'usage des anticorps anti-NI de TEV devait permettre la détection des protéines virales de TuMV. L'autoradiogramme de l'immunodétection faite avec les anticorps anti-NI de TEV montre que les protéines NIa et NIb sont produites par les souches 180 et 189 (Fig. 13b, puits 1 et 2). Ces protéines font partie de polyprotéines dont le poids moléculaire est égal ou supérieur à 68 000. Une surexposition de la membrane permet la détection de la protéine NIb tronquée (Fig. 13c, puits 1) produite par la souche 180 qui aurait un poids moléculaire prédit par la séquence en acides aminés de 21 000. Cette immunodétection met en évidence la reconnaissance des protéines NIa et NIb du TuMV produites dans *E. coli* par les anticorps anti-NI de TEV. Ces protéines font partie de polyprotéines complètes ou partiellement protéolysées. L'absence de signaux de poids moléculaire correspondant à celui de la NIa (49 kDa) et à celui de la NIb (59 kDa) montre que ces deux protéines ne sont pas excisées de la polyprotéine à l'exception de la NIb tronquée produite par la souche 180.

La protéine de la capsid virale produite majoritairement et les protéines bactériennes synthétisées par la souche 164 (Fig. 13b, puits 3) ne sont pas reconnues par les anticorps anti-NI de TEV. Il en est de même pour les protéines produites par la souche 190 (Fig. 13b, puits 4) portant le vecteur d'expression seul.

FIGURE 13: Immunodétection de protéines du TuMV produites dans *E. coli*.

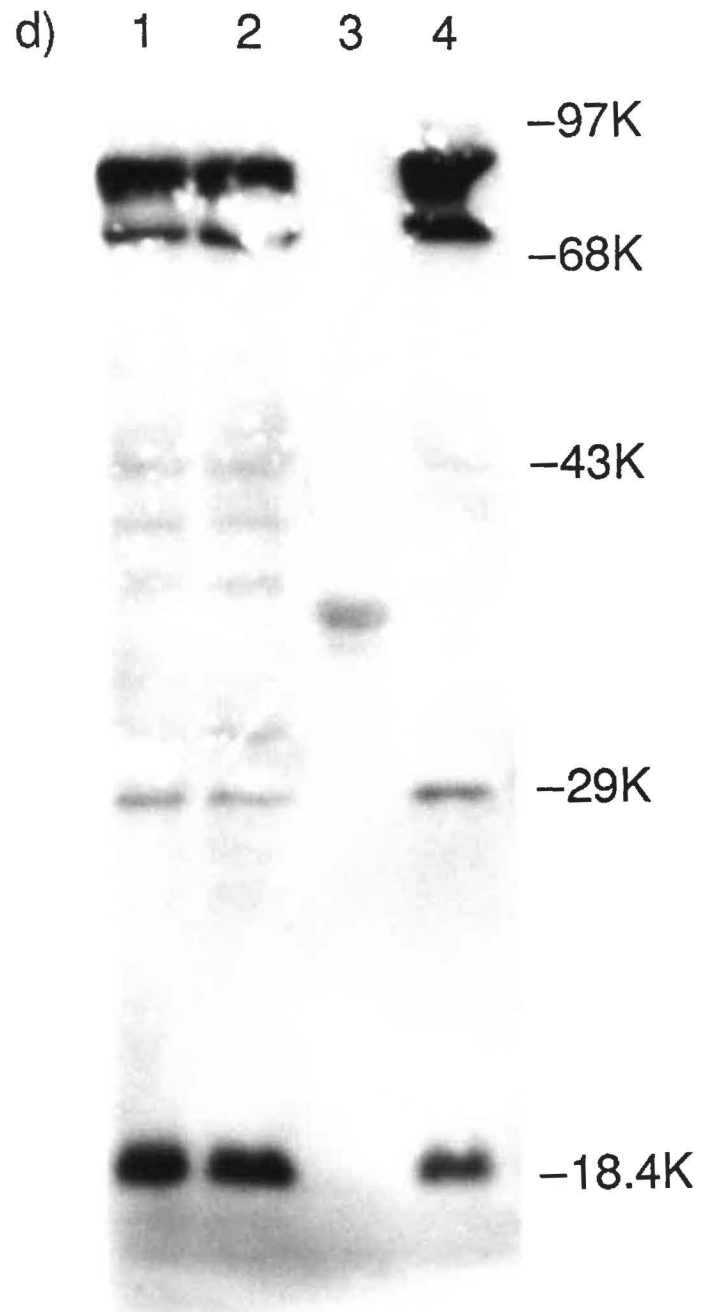
d) Anticorps anti-CI de TEV

puits 1 = pAC2;

puits 2 = pAC3;

puits 3 = pAC1;

puits 4 = pET-11a.



L'immunodétection de la protéine CI est montrée à la figure 13d. Les anticorps anti-CI de TEV réagissent faiblement avec trois protéines produites par les souches 180 et 189 (Fig. 13d, puits 1 et 2) qui ont un poids moléculaire se situant entre 37 000 et 43 000. Ces protéines seraient la CI de 37 kDa et le dimère CI-6K de 43 kDa codés par l'ADNc porté dans les plasmides des deux souches. La protéine de poids intermédiaire (environ 40 000) serait composée en partie par la protéine CI puisqu'elle est reconnue par les anticorps anti-CI de TEV. Cependant, le sérum anti-CI contient des anticorps anticapsides qui reconnaissent la protéine capsidaire produite par la souche 189 (Fig. 13d, puits 2) d'un poids moléculaire de 31 kDa et celle produite par la souche 164 (Fig. 13d, puits 3) de 34 kDa. La faible reconnaissance de la protéine CI de TuMV produite dans *E. coli* par les anticorps de TEV peut s'expliquer par l'absence des 33 kDa de l'extrémité aminée de la protéine CI.

DISCUSSION

Dans le but de produire de grandes quantités de protéines virales pour en étudier leurs fonctions ce qui, ultérieurement, conduira à l'élucidation de la protéolyse, de la réplication et de la régulation virales, des gènes du TuMV ont été clonés et exprimés dans *E. coli*.

1. **EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTÉINE DE LA CAPSIDE DU TuMV
DANS *E. COLI***

La protéine de la capsid e a été la première protéine du virus de la mosaïque du navet produite dans *E. coli* avec le système d'expression pET. Le gène de la protéine de la capsid e sous-cloné dans le vecteur pET-11-d a été exprimé dans *E. coli*. La quantité de protéines produites équivalait à 30% des protéines totales de *E. coli*, trois heures après l'induction à l'IPTG. L'immunodétection faite avec des anticorps anti capsid e de TuMV confirmait que la protéine la plus abondante correspondait à la capsid e du TuMV. Le système d'expression pET permet une importante production de protéine recombinante et cette protéine devient facilement identifiable par la coloration du gel au bleu de coomassie. Ces résultats laissaient entrevoir la possibilité d'identifier facilement les autres protéines virales pouvant être clonées même si aucun anticorps spécifique était disponible au moment de l'expression des autres gènes du TuMV. Il était aussi plausible de prévoir la production rapide d'anticorps anti-TuMV, par l'obtention de grandes quantités de protéines virales, sous forme de corps d'inclusion, facilement purifiables.

Les protéines recombinantes produites en très grande quantité dans *E. coli* s'accumulent principalement sous forme de corps d'inclusion (Marston *et al*, 1984; Yasueda *et al*, 1990). Il en est de même pour la protéine de la capsid de TuMV, produite dans *E. coli*, tel que démontré par des essais de purification (données non publiées). Cette accumulation, sous forme de corps d'inclusion, peut, dans certains cas, (à la condition que la fonction biologique puisse être restaurée) faciliter la purification de la protéine recombinante, puisqu'il est possible de la sédimenter en une seule étape de centrifugation. Ainsi, l'analyse des protéines, après la centrifugation du lysat de bactéries, montrait que dans le culot, la protéine majeure était la capsid. Les protéines bactériennes solubles, pour la plupart, se retrouvaient dans le surnageant. Malheureusement, les tests d'activité biologique effectués (polymérisation de la capsid) se sont avérés négatifs. Il se peut que la renaturation de la protéine, qui suit sa solubilisation à l'urée, ne se fasse pas correctement ce qui empêcherait la polymérisation des monomères de la capsid lors de la dialyse à pH acide. Donc, le niveau accentué de l'expression de la protéine recombinante favorise son accumulation sous forme de corps d'inclusion ce qui semble nuire au maintien de son activité biologique puisqu'elle nécessite une étape de solubilisation à l'urée. Il faudrait donc favoriser la production de la protéine recombinante sous forme soluble. L'expression de protéines recombinantes faite à la température ambiante pourrait supposément empêcher leur accumulation sous forme de corps d'inclusion comme l'a démontré Bowden *et al* (1991).

Des différentes protéines de la capside de virus de plantes exprimées dans *E. coli*, virus de la mosaïque de la fève jaune (Hammond et Hammond, 1989), virus de la mosaïque du zucchini jaune (Gal-on *et al*, 1990), virus de la mosaïque du soya (Eggenberger *et al*, 1989), virus de la mosaïque du tabac (Shire *et al*, 1990), l'estimation de la quantité de protéines recombinantes produites n'a été effectuée que pour le virus de la mosaïque du tabac. La quantité de protéines produites atteignait 3% des protéines totales de *E. coli*, soit dix fois moins que la quantité de protéines de TuMV produites. Dans tous les cas, le système d'expression différait de celui utilisé pour le TuMV et de la protéolyse partielle des protéines de la capside était observée, protéolyse attribuable aux protéases bactériennes. Ces protéines de la capside ont un poids moléculaire inférieur à la protéine native. Le système d'expression pET a été utilisé pour la production d'enzyme thymidylate synthase dans *E. coli* (Zhang *et al*, 1989). Des taux de protéines recombinantes atteignant 5 à 10% des protéines totales de *E. coli* ont été obtenus. D'autre part, un système d'expression basé sur l'utilisation du promoteur tryptophane, enrichi de séquences Shine-Dalgarno placé en duo, en amont du gène, conduit à la production d'une importante quantité d'interleukine-6 humaine, soit 20% des protéines totales de *E. coli* (Yasueda, 1990). En aucun cas, la production atteinte n'égale celle obtenue pour la capside du TuMV. Le système pET s'avère être un système d'expression efficace puisqu'il permet une production importante de protéines recombinantes. Cependant, il faut établir les conditions optimales d'expression, conditions qui permettront l'accumulation de la protéine recombinante soluble pour favoriser le maintien de son activité biologique.

2. ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA PROTÉASE VIRALE NIa DU TuMV DANS E. COLI

L'expression du génome viral des potyvirus se fait par l'intermédiaire d'une polyprotéine qui inclut toutes les protéines et enzymes nécessaires à la réplication du virus dans les cellules végétales. Une suite d'événements protéolytiques, impliquant prioritairement la protéase NIa, à un moindre degré la protéase HC-PRO et possiblement une troisième protéase, conduit à la libération des protéines actives. Ces événements se produisent à des sites de coupure formés d'acides aminés spécifiques, certains étant préférentiellement coupés en cis et d'autres en trans par les protéases virales. Cependant, l'étude de la protéolyse virale dans la plante comporte certaines difficultés, car il est impossible de suivre les étapes initiales de la protéolyse et nécessite des étapes supplémentaires de purification. L'utilisation de la bactérie *E. coli* est une alternative pour démontrer les événements de protéolyse effectués par la protéase NIa de TuMV et pour établir le modèle de protéolyse existant chez ce virus. L'emploi de la traduction *in vitro* dans un lysat de réticulocytes de lapin a été écarté puisque la région 5' non-codante du virus n'avait pas encore été clonée et qu'aucun des ADNc utilisés ne possédait son ATG de départ. Alors, des ADNc du TuMV ont été introduits dans le vecteur d'expression pET-11, vecteur permettant un niveau élevé d'expression de protéines recombinantes dans *E. coli* (Studier *et al*, 1990) et confirmé par nos travaux effectués sur la protéine de la capsid.

Les plasmides des souches 180 et 189 portent des ADNc viraux qui incluent la région codante complète de la protéase N1a. L'ADNc de la souche 180 porte 3 sites de clivage potentiels de la protéase N1a alors que la souche 189 en comporte 4, dont 3 identiques à la souche 180. Pour démontrer si la protéase N1a pouvait couper ces sites, les souches 180 et 189 ont été induites et les protéines totales ont été analysées en gel de polyacrylamide coloré au bleu de coomassie, marquées à la méthionine- ^{35}S et immunodétectées.

La première méthode d'analyse montre que la polyprotéine est coupée dans *E. coli* puisque des protéines de poids inférieur à la polyprotéine complète apparaissent. Ces protéines ne sont pas observées dans la souche 178, souche qui porte exclusivement le vecteur d'expression. On note cependant que la polyprotéine de la souche 189 est à peine discernable alors que celle de la souche 180 demeure majoritairement sous forme polyprotéinique, suggérant une protéolyse plus complète pour une des deux constructions. La présence de protéines de poids moléculaire s'approchant aux poids moléculaires prédits par la séquence d'acides aminés laissent présager que ces produits de protéolyse seraient libérés de la polyprotéine par la protéase N1a. En regardant plus attentivement le patron protéinique, on observe la présence de deux protéines à 43 kDa et 37 kDa communes aux deux souches. Ces protéines proviendraient vraisemblablement de la traduction de l'extrémité 5' de l'ADNc viral, cette portion se retrouvant également dans les deux souches. Fort possiblement ces protéines représenteraient la CI (37 kDa) et le dimère CI-6K (43 kDa). On remarque également une protéine migrant sous le marqueur de

29 kDa et produite exclusivement par la souche 180. Cette protéine correspondrait à la polymérase tronquée. Cette protéine ne devait pas en effet être observée dans la souche 189, car l'ADNc code pour la polymérase complète d'un poids moléculaire de 59,000. Bien que la protéolyse soit mise en évidence, ce ne sont pas tous les produits de protéolyse attendus qui sont identifiables sur gel. Ces produits sont, soit absents ou bien ils sont masqués par les protéines bactériennes également colorées au bleu de coomassie comme les protéines recombinantes. Le marquage des protéines à la méthionine-[³⁵S] permet de contourner ce problème puisque les protéines recombinantes incorporent majoritairement la méthionine marquée. L'affinité de l'ARN polymérase de T7 pour son promoteur est cinq fois plus grande que celle de l'ARN polymérase de *E. coli* pour le sien, ce qui fait en sorte que la quantité d'ARN recombinant produit est de cinq fois supérieur à l'ARN de *E. coli*. De plus, la rifampicine utilisée, lors du marquage, inhibe l'ARN polymérase de *E. coli* et non celle de T7 ce qui réduit davantage la production d'ARN messager de l'hôte. Le système ribosomal se trouve ainsi saturé d'ARN recombinant ce qui explique la forte incorporation de méthionine-[³⁵S] dans les protéines recombinantes.

L'autoradiogramme montre un patron protéinique complexe duquel se démarquent des protéines fortement marquées. Les polyprotéines complètes sont très apparentes de même que des protéines de haut poids (140 kDa et plus pour la souche 189) ayant subies une protéolyse partielle et qui n'étaient pas visibles au bleu de coomassie. La similarité du patron protéinique pour les souches 180 et 189 est manifeste pour les protéines de faible poids moléculaire. Les deux protéines

identifiées de 43 kDa (CI-6K) et 37 kDa (CI) sont présentes dans les deux souches comme en gel coloré au bleu de coomassie, alors qu'une nouvelle protéine de 41 kDa apparaît, bien que sa nature soit inconnue. De même, la protéine migrant au-dessous du marqueur de 29 kDa qui avait été révélée au bleu de coomassie se retrouve marquée à la méthionine-[³⁵S]. On note également la présence d'une protéine de 31 kDa fortement marquée pour la souche 189. Cette protéine pourrait être la capsidie bien que son poids moléculaire devrait être de 34,000. Son identité sera ultérieurement confirmée par l'immunodétection faite avec l'antisérum anti-protéine de la capsidie.

D'autres protéines sont marquées mais leur identification est difficile puisqu'elles peuvent être le résultat de protéolyse non-spécifique ou bien d'initiation interne survenant lors de la traduction, celle-ci se produisant lorsque des séquences d'ARN miment la séquence de Shine-Dalgarno. Un marquage des protéines à la méthionine-[³⁵S] effectué à la température ambiante pourrait probablement diminuer la protéolyse non-spécifique. Récemment, il a été démontré au laboratoire (résultats non publiés) que des produits de dégradation étaient détectés lorsque l'expression des protéines se produisait à 37°C. Ces produits étaient absents lorsque l'expression s'effectuait à la température ambiante.

Le marquage à la méthionine n'ayant pas donné les résultats escomptés, des immunodétections ont été exécutées afin d'identifier de façon non-équivoque la nature des protéines recombinantes.

L'immunodétection effectuée avec les anti-NI de TEV confirme que la protéine de 21 kDa, produite par la souche 180, correspond à la polymérase virale puisqu'elle réagit aux anti-NI. Aucune protéine de poids moléculaire correspondant à la NIa (49 kDa) ou à la NIIb (58 kDa) n'est, par contre, détectée ce qui indique que la jonction NIa-NIIb serait difficilement coupée dans *E. coli*. Ces protéines font partie de polyprotéines de poids moléculaires variés et supérieurs à 66 kDa. L'immuno-détection faite avec les anti-capsides montrent que la protéolyse à la jonction NIIb-capside est très efficace quoique la protéine libérée soit de poids moléculaire inférieur (31 kDa) à la protéine de la capsid native ce qui explique l'absence de protéine de 34 kDa sur l'autoradiogramme. Une terminaison précoce de la transcription de l'ADNc ou lors de la traduction peut expliquer ce fait. Il se peut également qu'une mutation ait introduit un site de coupure à l'une des extrémités du gène de la protéine de la capsid créant ainsi une amputation de la protéine de la capsid. Il est tout de même curieux que la protéine de la capsid ait un poids moléculaire inférieur lorsqu'elle est produite en association avec d'autres protéines virales alors qu'elle a une taille identique à la particule virale lorsqu'elle est produite seule.

Les trois protéines réagissant aux anti-CI de TEV font partie de la triade visible au bleu de coomassie et sur autoradiogramme de 37, 41 et 43 kDa. L'immunodétection confirme donc l'identité de ces trois protéines. Elles sont codées par l'extrémité 5' de l'ADNc et sont formées en tout ou en partie de la protéine CI. Même si le signal observé est faible, il montre que les produits de protéolyse

provenant de l'extrémité aminée de la polyprotéine sont identiques pour les souches 180 et 189. Ces protéines devraient être libérées de la polyprotéine par la protéase NIa puisque deux d'entre elles ont le poids moléculaire déterminé par la séquence en acides aminés (37 kDa et de 43 kDa). Bien que sa nature exacte ne soit pas, comme la protéine de 41 kDa, formée en partie par la CI et d'une portion de la 6K, ceci pouvant être confirmé par une immunodétection faite avec des anticorps anti-6K. Le niveau de protéolyse des sites CI-6K et 6K-NIa effectué par la protéase NIa ne peut être évalué en se basant sur l'intensité du signal émis lors de l'immunodétection. Étant donné que ces protéines sont très visibles au bleu de coomassie et sur autoradiogramme, la faiblesse du signal serait due au manque d'affinité des anticorps anti-CI de TEV pour la protéine CI de TuMV. Même si l'antisérum reconnaît plus d'une protéine (la CI et la protéine capsidaire) et que les signaux émis par la protéine CI et la protéine capsidaire sont d'intensité comparable, on peut conclure sur l'identité des trois signaux observés pour les souches 180 et 189. Ces trois protéines seraient formées en tout ou en partie de la protéine CI, car la souche 180 ne porte pas l'ADNc de la protéine capsidaire ce qui exclut la reconnaissance de ces protéines par l'anticorps anticapside présent dans le sérum. Comme ces signaux sont observés également dans les souches 180 et 189, ils proviennent d'une portion d'ADNc identique aux deux souches l'extrémité 5' du gène viral.

Les résultats provenant des techniques d'analyses utilisées permettent de dégager quelques faits importants concernant la protéolyse de la polyprotéine effectuée par la protéase NIa de TuMV dans *E. coli*. Premièrement, les principaux

produits de protéolyse identifiés proviennent des extrémités des polyprotéines. La coupure des sites CI-6K, 6K-NIa et NIa-NIb de la souche 180 et la coupure des sites CI-6K, 6K-NIa et NIb capsidale de la souche 189 conduisent à la libération de ces produits.

Deuxièmement, la protéase de TuMV ne s'autoexciserait pas de la polyprotéine comme le fait celle de TEV (Carrington *et al*, 1987a) puisqu'aucune protéase (NIa 49 kDa) libre n'est détectée. Normalement, l'autoexcision exige des coupures en cis, aux sites 6K-NIa et NIa-NIb. Il a été démontré que les sites 6K-NIa, NIa-NIb et le CI-6K étaient coupés en cis chez le TEV (Carrington *et al*, 1988) et que ces sites étaient réfractaires à la transprotéolyse. S'il en est de même pour le TuMV, le site 6K-NIa du TuMV serait coupé en cis ainsi que le site NIa-NIb. Cependant, la coupure d'un des deux sites en cis, semble exclure la coupure de l'autre site, également en cis, ce qui expliquerait l'absence de NIa libre. L'autoexcision de la NIa exigerait une présentation particulière du site de coupure au centre actif de la protéase, présentation qui différerait de celle nécessaire à la transprotéolyse (Carrington *et Dougherty*, 1987a). Cette présentation ne pourrait être obtenue après la coupure d'un des deux sites. La coupure du site NIa-NIb, qui normalement conduit à la libération de la NIa, serait influencée par la longueur de la portion carboxyle de la polyprotéine puisque la NIb est coupée dans la construction 3.1 et ne l'est pas dans la construction 5.1 dans laquelle se retrouve la protéine de la capsidale. L'autoprotéolyse de la NIa est observée chez les potyvirus TEV, PPV et TVMV mais serait absente chez le TuMV. La protéase NIa du TuMV subirait une

protéolyse partielle et ferait partie de protéines de haut poids moléculaire. La présence de NIa assemblée à d'autres protéines semble refléter ce qui se passe *in vivo* puisque d'importantes quantités de NIa-NIb ont été détectées parmi les protéines extraites de feuilles infectées par le PPV (Martin *et al*, 1990), montrant ainsi que l'autoprotéolyse est partielle. La protéase conserve son activité même si elle fait partie de polyprotéines de longueurs variées. La présence de portions de polyprotéines adjacentes à la protéase serait, dans certain cas, essentielle à son activité tel que démontré pour la protéase du virus de la polio (Carrington *et Dougherty*, 1988).

Pour ce qui est du site NIb-capside, il est coupé avec efficacité chez le TEV et le PPV et semble l'être également chez le TuMV. Étant donné que toutes les protéines sont produites en quantité équimolaire et que deux mille monomères de protéines de la capsidie sont nécessaires à l'encapsidation de l'ARN viral, une partie de la régulation des protéines serait post-traductionnelle et impliquerait des différences dans la vitesse de protéolyse des différents sites de coupure de la polyprotéine et en particulier le site NIb-capside. Les protéines non-structurales quant à elles s'accumulent *in vivo* sous formes d'inclusions nucléaires et cytoplasmiques, rapidement après leur synthèse (Baunock *et al*, 1991).

Les premiers événements de protéolyse se produisent en *cis*, la protéase agissant à ses bordures (6K-NIa et NIa-NIb) et aussi au site CI-6K. Dans ce cas-ci, l'absence de NIa libre laisse croire que seulement un des sites serait coupé en *cis*.

Les autres coupures effectuées par transprotéolyse, le seraient par une protéase liée à une ou à des protéines de la polyprotéine.

La présence d'importantes quantités de polyprotéines complètes laisse sous-entendre que les protéines s'accumuleraient dans les corps d'inclusions. Bowden *et al* (1991) ont montré qu'un taux élevé de synthèse protéique favorise l'agrégation des protéines et leur accumulation en corps d'inclusion dans la bactérie hôte. Sous cette forme, les protéines sont insolubles donc inactives, ce qui peut expliquer la protéolyse partielle observée. Une température d'incubation moins élevée et l'absence de sucres métabolisables diminueraient la formation de corps d'inclusion dans la bactérie hôte. Finalement, dans le but de différencier les produits issus de la protéolyse non-spécifique (protéase bactérienne) des produits issus de la protéolyse spécifique (protéase virale) l'expression d'un plasmide portant l'ADN de 5.1 Kb dont la protéase aura été inactivée par mutagenèse dirigée est essentielle. De plus, les produits de l'expression de l'ADN de 5.1 Kb incluant la protéase mutée mis en présence de protéase active (produite *in vitro*) détermineraient les produits issus de transprotéolyse. Ces informations permettraient, alors, de mieux établir les événements protéolytiques conduisant à la formation de protéines matures. Cependant, même si les étapes de la protéolyse peuvent être mises à jour dans un système *in vitro*, on ne peut affirmer qu'il en est ainsi *in vivo*.

CONCLUSION

Les objectifs du travail étaient de vérifier si des protéines du virus de la mosaïque du navet pouvaient être produites en grande quantité dans *E. coli* et si elles conserveraient leur activité biologique.

Le système hétérologue utilisé permet la production de grande quantité de protéines virales (protéine de la capsid, polyprotéines de 116 et 185 kDa). La grosseur de la protéine ne semble pas, en effet, être un facteur limitant l'expression, puisque des protéines de haut poids moléculaire ont été obtenues.

L'activité biologique de la protéine de la capsid produite dans *E. coli* n'a pu être démontrée lors des essais de polymérisation. L'absence d'activité serait imputable aux étapes de solubilisation de la protéine nécessitée par son accumulation sous forme de corps d'inclusion dans la bactérie hôte.

La présence des protéines CI, CI-6K, NIb et de la capsid confirme le maintien de l'activité biologique de la protéase virale NIa dans *E. coli*. La protéase ne s'autoprotéolyse pas complètement de la polyprotéine. Elle est active même lorsqu'elle est liée à des polyprotéines de poids moléculaires variés.

REMERCIEMENTS

Sincères et incommensurables remerciements à mon directeur de recherche, le docteur Jean-François Laliberté.

Je remercie aussi, MM. Rolf Morosoli et Serge Durand pour les quelques 40 cm² de membranes de nitrocellulose qu'ils m'ont gentiment donnés..., M. Olivier Nicolas, M. Guy McSween pour l'aide qu'il m'a apporté, ma soeur Sylvie qui a lu, avec patience, l'avant dernière version de ce mémoire et ma mère Cécile qui, en voulant investir dans mon avenir, a aimablement défrayé les coûts de ce mémoire.

Et je remercie globalement tous ceux et celles, étudiants(es), professeurs (es), techniciens(nes), professionnels(les) qui ont su m'encourager, m'aider, me "supporter" et avec lesquels(les) je me suis bien amusée, au cours de ces deux longues et fructueuses années.

TABLEAUX

TABLEAU I
ENZYMES DE RESTRICTION UTILISÉES

<u>Enzyme</u>	<u>Conc. tampon KGB</u>	<u>T°</u>
Bam HI	.5X, 1X	37°C
Bcl I	1X	50°C
Hind III	.5X, 1X, 1.5X, 2X	37°C
Nco I	1X, 1.5X	37°C
Pst I	.5X, 1X, 1.5X, 2X	37°C
Sal I	1.5X, 2X	37°C

TABLEAU II**SOUCHES DE BACTÉRIES UTILISÉES POUR LES TRANSFORMATIONS**

BL21(DE3): hsdS gal λ clts857ind1sam7nin5 lacUV5-T7 gene 1

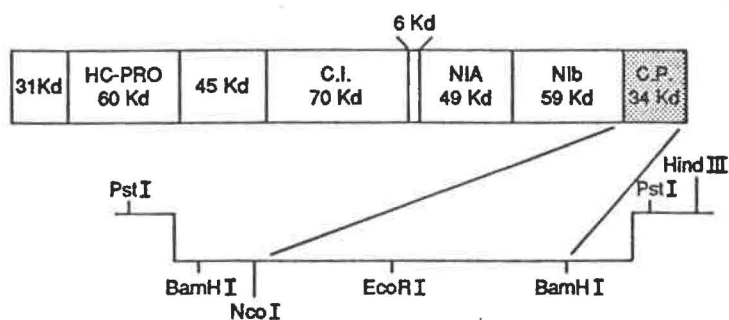
Le gène de l'ARN polymérase de T7, porté par le bactériophage λ DE3, est intégré dans le chromosome de BL21.

HB-101 : sup E44 hsdS20 (r_b, m_b)recA13 ara-14
proA2 lac Y1 gal K2 rps L20 xyl-5 mtl-1

XL1-Blue : sup E44 hsdR17 recA1 end AI gyr A46 thi
rel A1 lac⁻
F[proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15 Tn10(tet^r)]

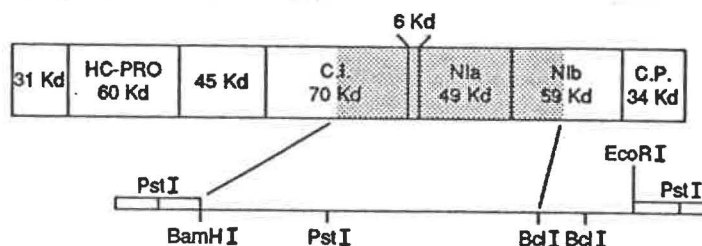
TABLEAU III
DESCRIPTION DES SOUCHES UTILISÉES POUR LA CONSTRUCTION
DES PLASMIDES

Souche 105 (pTuM 860 pb): ADNc de la protéine de la capsid du TuMV cloné dans le site Pst I du vecteur pUC 9, queuté d GTP (Francine Tremblay, 9-2-90).



Carte de restriction et protéine codée par l'ADNc de 860 pb

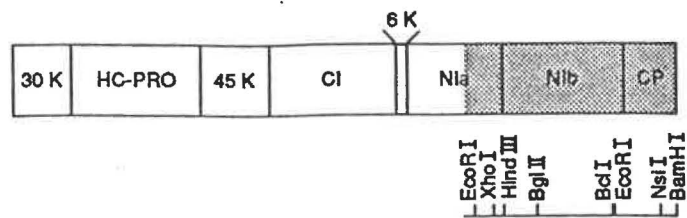
Souche 114 (pTuM 3.3): ADNc de 3300 pb du TuMV queuté avec dCTP et introduit dans le vecteur pUC 9 queuté en dGTP (Olivier Nicolas, 30-3-90).



Carte de restriction et protéines codées par l'ADN de 3.3 Kb

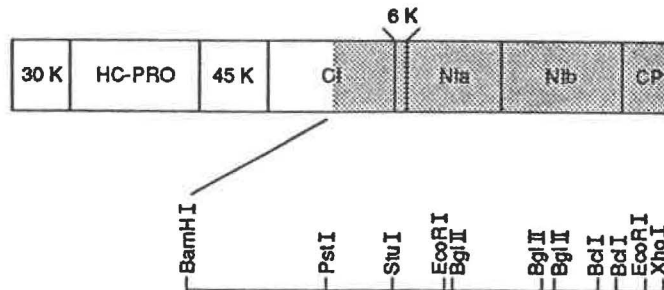
TABLEAU III (suite)**DESCRIPTION DES SOUCHES UTILISÉES POUR LA CONSTRUCTION
DES PLASMIDES**

Souche 169 pTuM 1.6: ADNc de 1600 pb du TuMV inséré au plasmide SK dans le site Eco RI (Olivier Nicolas, 13-10-90).



Carte de restriction et protéines codées par l'ADNc de 1.6 Kb

Souche 151 pTuM 4.5: ADNc de 4500 pb du TuMV inséré au plasmide pUC 9 dans les sites Sal I et Pst I (Olivier Nicolas, 01-08-90).



Carte de restriction et protéines codées par l'ADNc de 4.5 Kb

TABLEAU IV
DESCRIPTION DES SOUCHES DE BACTÉRIES PRODUITES

Souche 164 BL21(DE3) pET-11d-capside (plasmide pAC1)

Souche 166 BL21(DE3) pET-11d

Souche 178 BL21(DE3) pET-11a

Souche 180 BL21(DE3) pET-11a-3.1 Kb (plasmide pAC2)

Souche 185 XL-I SK-5.1 Kb

Souche 187 XL-I pET-11a-5.1 Kb

Souche 189 BL21(DE3) pET-11a-5.1 Kb (plasmide pAC3)

BIBLIOGRAPHIE

- ALLISON, R.F., W.G. DOUGHERTY, T.P. PARKS, L. WILLIS et R.E. JOHNSTON. 1985. Biochemical analysis of the capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino-acids are located on the virions surface. *Virology* 147: 309-316.
- ATKINS, D., R. HULL, B. WELLS, K. ROBERTS, P. MOORE et R.N. BEACHY. 1991. The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* 72: 209-11.
- ATREYA, C.D., B. RACCAH et T.P. PIRONE. 1990. A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* 178: 161-165.
- BAUNOCH, D.A., P. DAS, M.E. BROWNING et V. HARI. 1991. A temporal study of the expression of the capsid, cytoplasmic inclusion and nuclear inclusion proteins of tobacco etch potyvirus in infected plants. *J. Gen. Virol.* 72: 487-492.
- BAZAN, J.F. et R.J. FLETTERICK. 1988. Viral cysteine proteases are homologous to the thrypsin-like family of serine proteases: Structural and fonctional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7872-7877.
- BOWDEN, A.G., A.M. PAREDES et G. GEORGIU. 1991. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 9: 725-730.
- CARRINGTON, J.C., S.M. CARY et W.G. DOUGHERTY. 1988. Mutational analysis of tobacco etch virus polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of polyproteins containing the 49-kilodalton proteinase. *J. Virol.* 62: 2313-2320.
- CARRINGTON, J.C., S.M. CARY, T.D. PARKS et W.G. DOUGHERTY. 1989a. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J.* 8: 365-370.
- CARRINGTON, J.C. et W.G. DOUGHERTY. 1987a. Processing of tobacco etch virus 49k protease requires autoproteolysis. *Virology* 160: 355-362.
- CARRINGTON, J.C. et W.G. DOUGHERTY. 1987b. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *J. Virol.* 61: 2540-2548.
- CARRINGTON, J.C. et W.G. DOUGHERTY. 1988. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3391-3395.
- CARRINGTON, J.C., D.D. FREED et T.C. SANDERS. 1989b. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *J. Virol.* 63: 4459-4463.

- CARRINGTON, J.C., D.D. FREED et C.S. OH. 1990. Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *EMBO J.* **9**: 1347-53.
- CHOI, J.K., T. MAEDA et S. WAKIMOTO. 1977. An improved method for purification of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* **43**: 440-448.
- CULVER, J.N. et W.O. DAWSON. 1989. Tobacco mosaic coat protein: an elicitor of the hypersensitive reaction but not required for the development of mosaic symptoms in *Nicotiana sylvestris*. *Virology* **173**: 755-758.
- DEOM, M.C., J.O. MELVIN et R.N. BEACHY. 1987. The 30 kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* **237**: 389-394.
- DOMIER, L., J.G. SHAM et R.E. RHOADS. 1987. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna, como and caulimoviral proteins. *Virology* **158**: 20-27.
- DOUGHERTY, W.G., L. WILLIS et W.E. JOHNSTON. 1985. Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology* **144**: 66-72.
- DOUGHERTY, W.G., J.C. CARRINGTON, S.M. CARY et T.D. PARKS. 1988. Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. *EMBO J.* **7**: 1281-1287.
- DOUGHERTY, W.G., S.M. CARY et T.D. PARKS. 1989. Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology* **171**: 356-364.
- DOUGHERTY, W.G., T.D. PARKS, S.M. CARY, J.F. BAZAN et R.J. FLETTERICK. 1989. Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-KDa proteinase. *Virology* **172**: 302-310.
- DOUGHERTY, W.G. et T.D. PARKS. 1989. Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays. *Virology* **172**: 145-155.
- DOUGHERTY, W.G. et T.D. PARKS. 1991. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-KDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* **183**: 449-456.
- EGGENBERGER, A.L., D.M. STARK et R.N. BEACHY. 1989. The nucleotide sequence of a soybean mosaic virus coat protein-coding region and its expression in *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and tobacco callus. *J. Gen. Virol.* **70**: 1853-1860.

GAL-ON, A., Y. ANTIGNUS, A. ROSNER et B. RACCAH. 1990. Nucleotide sequence of the zucchini yellow mosaic virus capsid-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* 87: 273-277.

GARCIA, J.A., J.L. RIECHMANN et S. LAIN. 1989. Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NIa-like protein in *Escherichia coli*. *Virology* 170: 362-369.

GARCIA, J.A., S. LAIN, M.T. CERVERA, J.L. RIECHMANN et M.T. MARTIN. 1990. Mutational analysis of plum pox potyvirus polyprotein processing by the NIa protease in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* 71: 2773-2779.

GHABRIAL, S.A., H.A. SMITH, T.D. PARKS et W.G. DOUGHERTY. 1990. Molecular genetic analyses of the soybean mosaic virus NIa proteinase. *J. Gen. Virol.* 71: 1921-1927.

GRAYBOSCH, R., G.M. HELLMANN, J.G. SHAW, R.E. RHOADS et A.G. HUNT. 1989. Expression of a potyvirus non-structural protein in transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 425-432.

HAMMOND, J. et R.W. HAMMOND. 1989. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the bean yellow mosaic virus coat protein gene. *J. Gen. Virol.* 70: 1961-1974.

HARRIS, K.F. et J.E. BATCH. 1973. Regurgitation by *Myzus persicae* during membrane feeding. Its likely fonction in transmission of nonpersistent plant viruses. *Am. Entomol. Soc. Am.* 66: 793-796.

HELLMANN, G.M., J.G. SHAW et R.E. RHOADS. 1988. *In vitro* analysis of tobacco vein mottling virus NIa cistron: evidence for a virus-encoded protease. *Virology* 163: 554-562.

HIEBERT, E. et G.W. DOUGHERTY. 1988. "Organisation and expression of the viral genomes.", dans Milne, G.R. (ed.): *The plant virus*, volume 4. New-York et London: Plenum Press: 159-177.

HILL, H.J. et R.J. SHEPHERD. 1972. Biochemical properties of turnip mosaic virus. *Virology* 47: 807-816.

HIMMLER, G., S. FRANK, H. STEINKELLNER, F. RUKER, D. MATTAVOVICH et H.W. KATINGER. 1990. Detection of the trans activity of the plum pox virus NIa-like protease in infected plants. *J. Gen. Virol.* 71: 1623-1625.

HOLLINGS, M. et A.A. BRUNT. 1981. "Potyvirus", dans Kurstak, E. (ed.): *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. Amsterdam, New-york et Oxford: Elsevier/North-Holland Biomedical Press: 731-807.

JAYARAM, C., J.H. HILL et W.A. MILLER. 1991. Nucleotide sequences of the coat protein genes of two aphid-transmissible strains of soybean mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 72: 1001-1003.

KITAMURA, N., B.L. SEMLER, P.G. ROTHBERG, G.R. LARSEN, C.J. ADLER, A.J. DORNER, E.A. EMINE, R. HANECÁK, J.J. LEE, S. VAN DER WERF, C.W. ANDERSON et E. WINNER. 1981. Primary structure, gene organisation and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 291: 547-553.

KRAUSSLICH, H.G. et E. WIMMER. 1988. Viral proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 701-754.

KUHN, C.W., S.D. WYATT et B.B. BRANTLEY. 1981. Genetic control of symptoms, movement and virus accumulation in cowpea plants infected with cowpea chlorotic mottle virus. *Phytopathology* 71: 1310-1315.

LAIN, S., M.T. MARTIN, J.L. RIECHMANN et J.A. GARCIA. 1991. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J. Virol.* 65: 1-6.

LAIN, S., J.L. RIECHMANN, M.T. MARTIN et J.A. GARCIA. 1989. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene* 82: 357-362.

LAIN, S., J.L. RIECHMANN et J.A. GARCIA. 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucl. Acid. R.* 18: 7003-7006.

LALIBERTE, J.F. Communication personnelle, 1992.

MAISS, E., U. TIMPE, A. BRISKE, W. JELKMANN, R. CASPER, G. HIMMLER, D. MATTANOVICH et H.W. KATINGER. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *J. Gen. Virol.* 70: 513-524.

MANIATIS, T., E.F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

MARSTON, F.A.O., P.A. LOWE, T.M. DOEL, J.M. SCHOEMAKER, S. WHITE et S. ANGAL. 1984. Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 2: 800-804.

MARTIN, M.T., O.D. LOPEZ, S. LAIN et J.A. GARCIA. 1990. Determination of polyprotein processing sites by amino terminal sequencing of nonstructural proteins encoded by plum pox potyvirus. *Virus Res.* 15: 97-106.

- MATTHEWS, R.E.F. 1991. Plant virology, third edition. Academic Press, Inc. Santiago, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
- MURPHY, J.F., R.E. RHOADS, A.G. HUNT et J.G. SHAW. 1990. The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49 KDa proteinase or the N-terminal 24 KDa part of the proteinase. *Virology* 178: 285-288.
- MURPHY, J.F., W. RYCHLIK, R.E. RHOADS, A.G. HUNT et J.G. SHAW. 1991. A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA. *J. Virol.* 65: 511-513.
- NICOLAS, O. Communication personnelle, 1991.
- NICOLAS, O. et J.F. LALIBERTÉ. 1991. The use of PCR for cloning of large CDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. *J. Virol. Methods* 32: 57-66.
- NILSSON-TILGREN, T., L. KOLEHMAINEN-SEVEUS et D.V. WETTSTEIN. 1969. Studies on the biosynthesis of TMV. I. A system approaching a synchronized virus synthesis in a tobacco leaf. *Mol. Gen. Genet.* 104: 124-141.
- PALMENBERG, A.C. 1990. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Ann. Rev. Microbiol.* 44: 603-623.
- PARKS, T.D. et W.G. DOUGHERTY. 1991. Substrate recognition by the NIa proteinase of two potyviruses involves multiple domains: characterization using genetically engineered hybrid proteinase molecules. *Virology* 182: 17-27.
- SAITO, T., K. YAMANAKA, Y. WATANABE, N. TAKAMATSU, T. MESHII et Y. OKADA. 1989. Mutational analysis of the coat protein gene of tobacco mosaic virus in relation to hypersensitive response in tobacco plants with the N' gene. *Virology* 173: 11-20.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS 1989. Molecular cloning, a laboratory manual second edition. New-York: Cold spring Harbor Laboratory Press.
- SHAHABUDDIN, M., J.G. SHAW et R.E. RHOADS. 1988. Mapping of the tobacco vein mottling virus VPg cistron. *Virology* 163: 635-637.
- SHIELDS, S.A. et T.M.A. WILLSON. 1987. Cell-free translation of turnip mosaic virus RNA. *J. Gen. Virol.* 68: 169-180.
- SHIRE, S.J., P. MCKAY, D.W. LEUNG, G.J. CACHIANES, E. JACKSON, W.I. WOOD, K. RAGHAVENDRA, L. KHAIRALLAH et T.M. SCHUSTER. 1990. Preparation and properties of recombinant DNA derived tobacco mosaic virus coat protein. *Biochemistry* 29: 5119-5126.

- SHMUEL, W., C.M. DEOM, R.N. BEACHY et W.J. LUCAS. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246: 377-379.
- STOBBS, L.W. et I. SHATTUCK. 1989. Turnip mosaic virus strains in Southern Ontario, Canada. *Plant disease* 73: 208-212.
- STUDIER, F.W., A.H. ROSENBERG, J.J. DUNN et J.W. DUBENDORFF. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.
- TOBIN, J.G., D.C. YOUNG et J.B. FLANEGAN. 1989. Self-catalyzed linkage of poliovirus terminal protein VPg to poliovirus RNA. *Cell* 59: 511-519.
- TOMLINSON, J.A. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* 110: 661-681.
- van LOON, L.C. 1987. Disease induction by plant viruses. *Adv. Virus Res.* 33: 205-255.
- WELLINK, J. et A. VAN KAMMEN. 1988. Proteases involved in the processing of viral polyproteins. Brief Review. *Arch. Virol.* 98: 1-26.
- YASUEDA, H. 1990. High-level direct expression of semi-synthetic human interleukin-6 in *Escherichia coli* and production of n-terminus met-free product. *Biotechnology* 8: 1036-1039.
- ZAITLAIN, M. et R. ET HULL. 1987. Plant virus host interactions. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 291-315.
- ZHANG, H.C., R.J. CISNEROS, R.B. DUNLAP et L.F. JOHNSON. 1989. Efficient synthesis of mouse thymidylate synthase in *Escherichia coli*. *Gene* 84: 487-491.

