



**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE**

**PRÉSENTÉ À**

**L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA  
MAÎTRISE EN VIROLOGIE-IMMUNOLOGIE**

**PAR**

**YOUSOUF SOUMOUNOU**

**INTERACTIONS MOLÉCULAIRES ENTRE LA  
PROTÉINE P1 ET L'ARN DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU  
NAVET (TuMV).**

**DÉCEMBRE 1994**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>ix</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>4</b>
<b>1. LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU NAVET (TuMV).....</b>	<b>5</b>
1. 1. GÉNÉRALITÉS.....	5
1. 2. GÉNOME DU TuMV.....	7
1. 3. PROTÉINES DU TuMV .....	11
<b>2. MOUVEMENT DES VIRUS DE PLANTES.....</b>	<b>16</b>
2. 1. INTRODUCTION .....	16
2. 2. LES PLASMODESMES.....	17
2. 2. 1. Structure .....	17
2. 2. 2. Formation et distribution .....	20
2. 2. 3. Fonctions physiologiques.....	20
2. 3. TYPES DE MOUVEMENT .....	22
2. 3. 1. Mouvement à distance .....	22
2. 3. 2. Mouvement de cellule à cellule.....	23
2. 3. 2. 1. Protéines de mouvement local.....	24
2. 3. 2. 2. Interactions Protéines de mouvement- acides nucléiques .....	27
2. 3. 2. 3. Interactions Protéines de mouvement-plasmodesme.....	29
2. 4. MODÈLES DE MOUVEMENT LOCAL DES VIRUS DE PLANTE...	31
2. 4. 1. Modèle de Citovsky et al .....	31
2. 4. 2. Modèle de Deom et al .....	35
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>38</b>
<b>1. BACTÉRIES ET VECTEURS .....</b>	<b>39</b>

1. 1. SOUCHES D'ESCHERICHIA COLI.....	39
1. 2. VECTEUR PLASMIDIQUE.....	39
<b>2. MILIEUX DE CULTURE, TAMPONS, SOLUTIONS.....</b>	<b>39</b>
2. 1. MILIEUX DE CULTURE DES BACTÉRIES.....	41
2. 2. ANTIBIOTIQUE.....	41
2. 3. TAMPONS ET SOLUTIONS.....	42
<b>3. CONSTRUCTION DE PLASMIDES RECOMBINANTS.....</b>	<b>45</b>
3. 1. OLIGONUCLÉOTIDES.....	45
3. 2. AMPLIFICATION PAR LA RÉACTION DE LA POLYMERISATION EN CHAÎNE.....	45
3. 3. DIGESTION ENZYMATIQUE D'ADN.....	47
3. 4. ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE.....	48
3. 5. PURIFICATION DES FRAGMENTS D'ADN APRÈS DIGESTION PAR LES ENZYMES.....	48
3. 6. LIGATION DE FRAGMENTS D'ADN.....	49
3. 7. TRANSFORMATION DE CELLULES BACTÉRIENNES.....	49
3. 8. SÉLECTION DES COLONIES RECOMBINANTES PAR HYBRIDA- TION IN SITU.....	50
3. 9. MINIPRÉPARATION D'ADN PLASMIDIQUE.....	51
3. 10. IDENTIFICATION DES PLASMIDES RECOMBINANT.....	52
3. 11. PRODUCTION À GRANDE ÉCHELLE DE PLASMIDES.....	52
3. 12. ANALYSE DE SÉQUENCE D'ADN.....	54
<b>4. EXPRESSION DE GÈNES CLONÉS DANS E. COLI BL21 (DE3).....</b>	<b>54</b>
4. 1. INDUCTION DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR L'IPTG.....	54
4. 2. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE PROTÉINES PAR SDS-PAGE.....	55
<b>5. PRODUCTION MASSIVE DE PROTÉINE P1 DANS E. COLI.....</b>	<b>55</b>
5. 1. INDUCTION DE L'EXPRESSION ET EXTRACTION DES CORPS D'INCLUSION.....	55
5. 2. PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ.....	57

5. 2. 1. Préparation de la résine NI-NTA.....	57
5. 2. 2. Étape de purification .....	57
5. 2. 3. Analyse de la qualité de la purification.....	58
5. 3. DIALYSE DE LA PROTÉINE PURIFIÉE .....	59
5. 4. DOSAGE DE LA PROTÉINE PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD MODIFIÉE.....	59
6. PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI-P1 ET IMMUNODÉTEC- TION.....	60
6. 1. IMMUNISATION DES LAPINS.....	60
6. 2. ADSORPTION D'ANTISÉRUM SUR LYSAT D'E. COLI.....	62
6. 2. 1. Préparation du lysat d'E. coli.....	62
6. 2. 2. Adsorption d'antisérum sur lysat bactérien .....	62
6. 3. IMMUNODÉTECTION.....	63
6. 3. 1. Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	63
6. 3. 2. Immunodétection enzymatique .....	63
7. PRODUCTION DE FRAGMENTS D'ARN SYNTHÉTIQUE .....	64
7. 1. TRANSCRIPTION IN VITRO.....	64
7. 2. GEL DÉNATURANT D'AGAROSE POUR ARN .....	65
8. ESSAIS DE LIAISON PROTÉINE-ACIDES NUCLÉIQUES.....	66
8. 1. GEL DE RETARDEMENT.....	66
8.2. LIAISON CROISÉE ENTRE LA P1 ET L'ARN PAR LA LUMIÈRE UV .....	67
8. 3. RÉTENTION DES COMPLEXES P1-ACIDES NUCLÉIQUES SUR FILTRE .....	67
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>69</b>
1. CONSTRUCTION DE PLASMIDES RECOMBINANTS.....	70
2. EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTÉINE P1.....	74

<b>3. RENATURATION DE LA PROTÉINE P1.....</b>	<b>78</b>
<b>4. OBTENTION DE SÉRUM DIRIGÉ CONTRE LA P1.....</b>	<b>79</b>
<b>5. ESSAIS DE LIAISON DE LA P1 AUX ACIDES NUCLÉIQUES .....</b>	<b>82</b>
5. 1. LA PROTÉINE P1 LIE L'ARN SIMPLE BRIN DU TuMV .....	82
5. 2. LA LIAISON EST SPÉCIFIQUE À LA P1.....	88
5. 3. LES COMPLEXES P1-ARN SONT STABLES DANS LES SELS.....	93
5. 4. LA P1 PEUT LIER D'AUTRES TYPES D'ACIDES NUCLÉIQUES ..	100
<b>6. IDENTIFICATION D'UN DOMAINE POTENTIEL DE LIAISON À L'ARN SUR LA PROTÉINE P1.....</b>	<b>103</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>106</b>
1. EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTÉINE P1 DU TuMV DANS E. COLI .....	107
2. ACTIVITÉS DE LIAISON DE LA PROTÉINE P1 AUX ACIDES NUCLÉIQUES.....	110
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>117</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>120</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>122</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>135</b>
ANNEXE 1.....	136
ANNEXE 2.....	137
ANNEXE 3.....	138

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>2-ME</b>	: bêta-mercaptoéthanol
<b>3'-NC</b>	: région 3' non-codante
<b>5'-NC</b>	: région 5' non-codante
<b>6K1</b>	: protéine 1 de 6 kDa
<b>6K2</b>	: protéine 2 de 6 kDa
<b>A</b>	: adénine
<b>AIMV</b>	: « <i>alfalfa mosaic virus</i> »
<b>AMPc</b>	: adénosine monophosphate cyclique
<b>Ampi</b>	: ampicilline
<b>Bet</b>	: bromure d'éthidium
<b>BSA</b>	: « <i>bovine serum albumin</i> » (albumine sérique bovine)
<b>C</b>	: cytosine
<b>CaMV</b>	: « <i>cauliflower mosaic virus</i> » (virus de la mosaïque du chou-fleur)
<b>CCMV</b>	: « <i>cowpea chlorotic mottle virus</i> »
<b>CI</b>	: « <i>cylindrical inclusion</i> » (corps d'inclusion cylindriques)
<b>Ci</b>	: curie
<b>CP</b>	: « <i>capsid protein</i> » (protéine de la capside)
<b>CPMV</b>	: « <i>cowpea mosaic virus</i> »
<b>db</b>	: double brins
<b>DAB</b>	: 3, 3'- Diaminobenzidine Tétrahydrochloride
<b>DEPC</b>	: diéthyl pyrocarbonate
<b>D.O</b>	: densité optique
<b>DNase</b>	: désoxyribonucléase
<b>DTT</b>	: dithiotreitol
<b>E</b>	: acide glutamique
<b>EDTA</b>	: éthylène diamine tétra-acétique
<b>F</b>	: phénylalanine
<b>G</b>	: guanine
<b>H</b>	: histidine
<b>HC</b>	: « <i>helper component</i> » (protéine auxiliaire)
<b>HC-Pro</b>	: protéine HC à activité protéasique
<b>His</b>	: histidine
<b>IPTG</b>	: isopropyl thio galactopyranoside
<b>K</b>	: lysine
<b>kDa</b>	: kilo dalton
<b>KGB</b>	: tampon potassium-glutamate
<b>L</b>	: leucine
<b>LB</b>	: milieu Luria-Bertani
<b>MD</b>	: marque déposée
<b>M</b>	: méthionine
<b>N</b>	: asparagine

<b>N1a-Pro</b>	: protéine N1a à activité protéase
<b>N1b</b>	: « <i>nuclear inclusion b</i> » (corps d'inclusion nucléaires b)
<b>NTBM</b>	: « <i>nucleoside triphosphate binding motif</i> »
<b>P1</b>	: protéine P1 de TuMV
<b>P3</b>	: protéine P3 de TuMV
<b>pb</b>	: paire de bases
<b>PCR</b>	: « <i>polymerase chain reaction</i> » (réaction de la polymérisation en chaîne)
<b>PEG</b>	: polyéthylène glycol
<b>PM</b>	: poids moléculaire
<b>Pol</b>	: polymérase
<b>PPV</b>	: « <i>plum pox virus</i> »
<b>Pro</b>	: protéase
<b>PVY</b>	: « <i>potato virus Y</i> » (virus Y de la pomme de terre)
<b>Q</b>	: glutamine
<b>R</b>	: arginine
<b>RCMV</b>	: « <i>red clover mottle comovirus</i> »
<b>RCNMV</b>	: « <i>red clover necrotic mosaic virus</i> »
<b>RNase</b>	: ribonucléase
<b>S</b>	: sérine
<b>sb</b>	: simple brin
<b>SDS</b>	: sodium-dodécyl-sulfate
<b>SDS-PAGE</b>	: « <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> » (électrophorèse en gel de polyacrilamide en présence de SDS)
<b>SSC</b>	: sodium sodium citrate
<b>T</b>	: thymine
<b>Taq</b>	: « <i>Thermus aquaticus</i> »
<b>TE</b>	: tampon Tris-EDTA
<b>TEV</b>	: « <i>tobacco etch virus</i> »
<b>TuMV</b>	: « <i>turnip mosaic virus</i> » (virus de la mosaïque du navet)
<b>TMV</b>	: « <i>tobacco mosaic virus</i> » (virus de la mosaïque du tabac)
<b>TVMV</b>	: « <i>tobacco vein mottling virus</i> »
<b>V</b>	: valine
<b>U</b>	: uracile
<b>UV</b>	: ultra-violet
<b>V</b>	: volume
<b>VPg</b>	: « <i>viral protein genome</i> »

## LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE 1</b>	Organisation génomique du TuMV et traduction en polyprotéine.....	10
<b>FIGURE 2:</b>	Clivage de la polyprotéine du TuMV. ....	15
<b>FIGURE 3:</b>	Structure simplifiée du plasmodesme.....	19
<b>FIGURE 4:</b>	Modèle de Citovsky <i>et al.</i> .....	33
<b>FIGURE 5:</b>	Modèle de Deom <i>et al.</i> .....	37
<b>FIGURE 6:</b>	Vecteur d'expression pET-21d .....	40
<b>FIGURE 7:</b>	Construction du plasmide recombinant pET-P1. ....	73
<b>FIGURE 8:</b>	Expression et purification de la protéine P1. ....	77
<b>FIGURE 9:</b>	Immunobuvardage avec un antiserum dirigé contre la protéine P1. ....	81
<b>FIGURE 10:</b>	Gel de retardement de la liaison de la P1 à l'ARN.....	85
<b>FIGURE 11</b>	Gel de retardement de la liaison de la protéine P1 à l'ARN transcrit du plasmide pTZ5' .....	86
<b>FIGURE 12:</b>	Spécificité de la liaison de la protéine P1 avec l'ARN. Gel de retardement avec la BSA.....	89
<b>FIGURE 13:</b>	Spécificité de la liaison de la protéine P1 avec l'ARN.....	91
<b>FIGURE 14:</b>	Spécificité de la liaison de la protéine P1 avec l'ARN.	94
<b>FIGURE 15</b>	Effet des concentrations de NaCl sur la liaison de la protéine P1 à l'ARN. Gel de retardement.....	95

- FIGURE 16:** Effet des concentrations de NaCl sur la liaison de la protéine P1 à l'ARN. Graphique.....97
- FIGURE 17:** Effet des concentrations de KCl sur la liaison de la protéine P1 avec l'ARN. Gel de retardement.....99
- FIGURE 18:** Compétition de différents acides nucléiques pour la liaison à la P1 évaluée par rétention sur filtre.....102
- FIGURE 19:** Domaine potentiel de liaison de la P1, homologies de séquences avec d'autres protéines riches en arginine liant l'ARN.....105

## SOMMAIRE

Depuis ces dernières années, l'on assume que la propagation des virus de cellule à cellule, dans les plantes infectées, est un processus actif se faisant par le passage du génome viral ou du virion à travers les voies naturelles intercellulaires que constituent les plasmodesmes. L'on estime également que ce passage, via les canaux du plasmodesme, serait facilité grâce à la participation active de protéines spécifiques codées par le virus et appelées *protéines de mouvement*. Cependant, les mécanismes par lesquels ces protéines opèrent ne sont pas encore élucidés.

Une implication hypothétique de la protéine P1, située à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine des potyvirus, dans le mouvement de cellule à cellule, est de plus en plus évoquée. Ce rôle prépondérant de la P1 dans le mouvement local suppose qu'elle pourrait interagir directement avec l'ARN viral pour former un complexe ribonucléoprotéique transportable.

Dans le but d'une caractérisation moléculaire de la protéine P1 du virus de la mosaïque du navet (TuMV), et afin d'évaluer sa capacité à lier les acides nucléiques *in vitro*, nous avons décidé de l'exprimer dans *Escherichia coli*. Pour ce faire, nous avons amplifié le gène de la P1 par la technique de la polymérisation en chaîne (PCR) utilisant l'ADN polymérase de la bactérie *Thermus aquaticus* (*Taq DNA polymerase*). Le gène amplifié a ensuite été cloné dans un vecteur d'expression pET-21d, et ceci nous a permis d'obtenir un plasmide recombinant appelé pET-P1. Ce plasmide recombinant a ensuite été introduit dans *E. coli* BL-21(DE3), et l'expression de la P1 recombinante a été induite et analysée par séparation électrophorétique des protéines bactériennes en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Les bactéries BL-21(DE3) transformées et exprimant la P1 ont été numérotées souche 408. La P1 a été surexprimée dans la souche 408, purifiée par chromatographie d'affinité sur résine au nickel dans des conditions dénaturantes, et ensuite renaturée par dialyse contre de l'eau. Des expériences de gel de retardement ont démontré que la P1 était capable de lier une sonde ARN radiomarquée de manière coopérative. Nous avons fait des essais de liaison-croisée par la lumière UV («*UV light cross-linking*») afin de nous assurer que les liaisons observées n'étaient pas dues à des artefacts expérimentaux ou à des contaminants de *E. coli*. La liaison P1-ARN était spécifique puisque les complexes formés étaient stables dans des concentrations relativement élevées de sels (NaCl et KCl). Au cours de tests de compétition, nous avons pu déterminer que la P1 avait la capacité de lier les acides nucléiques simple brin ADN et ARN, avec une affinité similaire et en apparence d'une manière séquence-indépendante, mais pas l'ADN bicaténaire.

La P1 de TuMV possède la caractéristique particulière de lier l'ARN double brin avec une affinité similaire à celle des acides nucléiques simple brin.

Nous avons identifié dans la P1 un domaine très riche en acides aminés basiques, compris entre les résidus 150 et 168, qui possède un potentiel d'interactions avec les acides nucléiques; et ce domaine présente beaucoup d'homologies avec certaines protéines virales capables de lier l'ARN. Ce domaine pourrait être impliqué dans les interactions P1-ARN.

L'abondante expression de la P1 dans la souche 408, nous a également permis de produire des anticorps polyclonaux anti-P1 chez des lapins. La spécificité de l'anticorps a été déterminé par immunobuvardage. Cet anticorps anti-P1 devra servir ultérieurement à la détection et à la localisation intracellulaire de la protéine dans les cellules de plantes infectées par TuMV.

## INTRODUCTION

Les virus de plante en général, et les potyvirus en particulier, causent d'importantes infections dans de nombreuses espèces végétales d'intérêt économique, ornemental et vivrier. Cependant, les interactions virus-hôtes sont très peu connues. On sait que les virus de plante doivent avoir développé des stratégies leur permettant d'infecter les cellules végétales, car la paroi épaisse qui entoure ces dernières empêche l'entrée des virus par les mécanismes de fusion ou d'endocytose via récepteurs cellulaires phénomènes connus pour les virus d'animaux. La propagation d'un virus d'une cellule initialement infectée à une cellule saine voisine, demeure un phénomène très obscur.

L'élucidation des phénomènes biologiques qui aboutissent à l'infection par les virus de plante est d'autant plus difficile que très peu de protéines virales ont été détectées dans les cellules infectées. Pour élucider les fonctions de ces protéines, ne serait-ce qu'*in vitro*, il devient presque obligatoire de les produire en quantités relativement élevées dans un système d'expression hétérologue.

Le virus de la mosaïque du navet (TuMV) est un agent phytopathogène très important de par le large éventail de son spectre d'hôtes, qui au Québec et au Canada couvre des espèces végétales de grande valeur alimentaire. Comme les autres membres du vaste groupe des potyvirus, auquel il appartient, le génome du TuMV est traduit en une polyprotéine dont l'extrémité N-terminale, appelée protéine P1 serait, selon notre hypothèse, une *protéine de mouvement*. Une caractéristique essentielle d'une telle protéine est sa capacité à lier l'ARN génomique du virus. Afin de vérifier cette fonction hypothétique

de la protéine P1, et pour la détecter ultérieurement *in vivo*, les objectifs suivants ont été assignés à ce travail de maîtrise:

- Produire une protéine P1 recombinante chez *Escherichia coli*;
- Montrer que cette protéine est capable de lier l'ARN viral *in vitro*;
- Produire un anticorps polyclonal contre la protéine recombinante produite.

L'utilisation d'*E. coli*, pour produire des protéines virales, présente un double avantage: celui, d'une part, d'obtenir de grandes quantités de protéine recombinante facile à purifier, dont on peut ensuite étudier les fonctions biologiques, et celui, d'autre part, de pouvoir produire assez rapidement des anticorps permettant la détection des protéines *in vitro* et *in vivo*. La démonstration de la capacité de la P1 à lier tout ou partie de l'ARN viral constitue une étape primordiale vers l'élucidation de son rôle dans le *mouvement intercellulaire* du TuMV. Cette liaison est une étape nécessaire, mais non suffisante, de sa participation au *mouvement* ou *transport* du virus entre cellules voisines.

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU NAVET (TuMV)

### 1.1. GÉNÉRALITÉS

Le virus de la mosaïque du navet (TuMV) appartient au vaste groupe des potyvirus, qui comprend au moins 180 membres classifiés jusqu'à ce jour (Ward et Shukla, 1991).

Le groupe des potyvirus [dénommé selon son membre type, le virus Y de la pomme de terre (PVY)] est considéré comme le groupe le plus important des virus de plante (Wellink et *al.*, 1988). Les potyvirus sont des virus phytopathogènes qui causent des pertes économiques importantes dans les cultures vivrières, pastorales, horticulturales et ornementales (Ward et Shukla, 1991) ; ils affectent, dans une large mesure, les cultures de crucifères (Shattuck et *al.*, 1989). Un fait commun à tous les potyvirus est l'induction de corps d'inclusions cylindriques de forme enroulée dans le cytoplasme des cellules infectées (Edwardson, 1974). Ces corps d'inclusions cylindriques [cylindrical inclusion (CI) bodies] sont formés de protéine virale, et constituent le plus important critère phénotypique de l'appartenance d'un virus au groupe des potyvirus (Milne, 1988 ; Ward et Shukla, 1991).

Le virion potyviral a la forme d'un bâtonnet flexible mesurant 680 à 900 nm de long sur 11 à 15 nm de large. Ce virion est formé d'environ 2000 copies de la protéine de la capsid (CP) entourant le génome viral (Dougherty et Carrington, 1988). Le génome potyviral est composé d'une molécule d'ARN simple brin à polarité positive d'environ 10 kilobases (kb), liée de façon

covalente à une VPg (virus-encoded protein) à son extrémité 5' et possédant une queue polyadénylée à l'extrémité 3' (Dougherty et carrington, 1988). L'ARN potyviral est un messenger comportant un seul cadre ouvert de lecture [*opened reading frame* (ORF)] qui est traduit sur les ribosomes cellulaires pour générer une seule polyprotéine d'une masse moléculaire moyenne de 350 000. La polyprotéine est clivée co- ou post-traductionnellement en au moins, huit protéines matures par les protéases virales (Dougherty et Carrington, 1988).

L'organisation génomique et la stratégie d'expression des potyvirus est très semblable (voire identique) à celles des comovirus, des népovirus (autres virus de plante) et des picornavirus. Ainsi, il a été proposé que ces trois groupes de virus de plantes (potyvirus, comovirus, népovirus) aient une origine évolutive commune avec les picornavirus, et sont alors classés dans le "super-groupe des picornavirus" (Golbach, 1986).

Les génomes de nombreux membres du groupe des potyvirus ont été entièrement séquencés à ce jour ; il s'agit du tobacco etch virus (TEV ; Allison *et al.*, 1986), du potato virus Y (PVY ; Robaglia *et al.*, 1989), du plum pox virus (PPV ; Lain *et al.*, 1989 ; Maiss *et al.*, 1989 ; Teycheney *et al.*, 1989) et du virus de la mosaïque du navet (TuMV, Nicolas *et al.*, 1992).

La particule virale du TuMV, observée au microscope électronique, a la forme d'un bâtonnet flexible d'une longueur moyenne de 720 nm et d'un diamètre moyen de 14 nm (Edwarson et Christie, 1986).

Le TuMV est un virus largement répandu sur presque tous les continents (Smith, 1972). Tandis que plusieurs potyvirus possèdent un éventail restreint

d'hôtes susceptibles, le TuMV infecte des plantes appartenant à plus de 140 genres dans 39 familles et cause plus particulièrement des pertes économiques énormes dans les cultures de crucifères (espèces les plus sensibles au TuMV ; Shattuck *et al.*, 1989). Parmi les crucifères, le genre Brassica ; comprenant des plantes potagères comme le chou, le rutabaga, le brocoli, le chou-fleur ; semble être le plus affecté par le TuMV (Tomlinson, 1987). Le TuMV infecte également *Arabidopsis thaliana*, qui pourrait servir de modèle valable pour l'étude des interactions hôtes- virus (Nicolas *et al.* , 1992).

Le TuMV est transmis par 89 espèces de pucerons classés dans 27 genres (Edwardson et Christie, 1986). Le virus ne persiste pas chez le puceron, il reste viable dans l'appareil digestif de cet insecte de quelques minutes à quelques heures après sa succion par ce dernier (Stobbs *et al.*, 1987). Le puceron est donc capable de transmettre l'agent infectieux au cours d'une courte période seulement.

Le TuMV provoque chez les hôtes sensibles des infections locales ou systémiques. Le type d'infection causé dépend surtout de la sensibilité de l'hôte. Dans les infections systémiques, on observe surtout des symptômes de mosaïques entraînant une importante déformation de la feuille infectée et une baisse de la croissance de la plante. Comme pour les autres potyvirus, l'infection par le TuMV induit la formation de corps d'inclusions cylindriques dans le cytoplasme des cellules infectées.

## 1. 2. GÉNOME DU TuMV.

Le génome du TuMV est composé d'une seule molécule d'ARN simple brin de polarité positive (figure 1). Aucun ARN sous-génomique n'a été détecté dans les cellules de plante infectées. Le génome viral contient 9830 nucléotides et possède un poids moléculaire estimé à  $3.5 \times 10^6$  daltons (Hill et Shepherd, 1972). L'ARN du TuMV est lié de manière covalente à une protéine virale, la VPg à son extrémité 5', il est polyadénylé en 3' et se compose de trois parties essentielles : une région codante de 9489 bases, une séquence 5' non codante (5'NTR) comprenant 129 nt, une séquence 3' non codante (3'NTR) (Nicolas, 1993). La région 5'NTR, précédant le premier AUG d'initiation, est très riche en résidus adénine et uracile. Elle a une structure secondaire théorique caractérisée par une boucle en épingle à cheveux («hairpin loop»), qui a une énergie libre estimée à -69.9 KJ/mol. La séquence 3'NTR, qui succède le codon de terminaison, possède 209 bases riches en A et U (Nicolas, 1993).

La région 5'NTR de l'ARN génomique du TuMV, à l'instar de son homologue du TEV (Carrington *et al.*, 1990), possède la capacité d'augmenter la traduction d'un messenger placé à son extrémité 3' d'une manière coiffe-indépendante (Basso *et al.*, 1994). Le rôle exact de cette région 5'NTR n'est pas encore clairement établi *in vivo*.

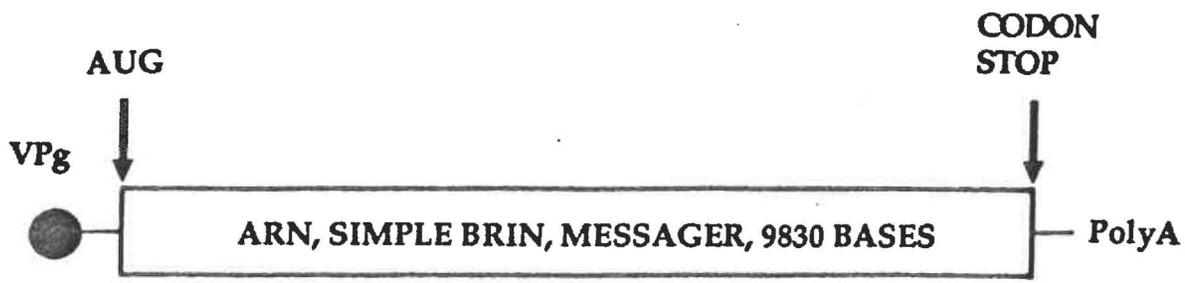
Les fonctions biologiques assignées à la région 3' NTR du TuMV ne sont pas encore connues. Cependant, il a été démontré que des mutations dans la séquence 3'NTR du TVMV affectaient la pathologie causée par ce virus (Rodriguez-Cerezo *et al.*, 1991). Comme pour les potyvirus, la stratégie de répllication du TuMV est très mal connue. On peut cependant émettre

l'hypothèse que l'ARN viral coderait pour des facteurs spécifiques impliqués dans le processus de réplication. Par homologie avec les picornavirus, des protéines virales comme la CI, la NIb et la VPg seraient intimement impliquées dans les mécanismes de polymérisation du génome.

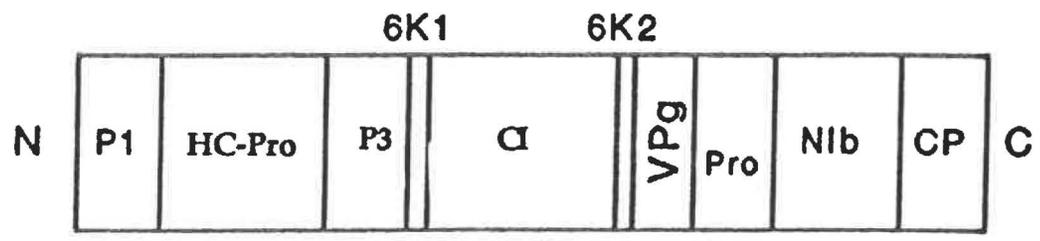
Le génome du TuMV s'exprime par la traduction de son ARN messager en une seule polyprotéine d'environ 358 kDa (Nicolas, 1993) qui est clivée en protéines plus petites par des protéases virales (figure 2). Cette stratégie d'expression du TuMV serait identique à celle utilisée par les potyvirus en général (Carrington *et al.*, 1989 ; Riechmann *et al.*, 1992).

**FIGURE 1: Organisation génomique du TuMV et traduction en polyprotéine.**

Le génome du TuMV est formé d'un ARN simple brin à polarité positive comportant un seul cadre ouvert de lecture (représenté par un rectangle). Cet ARN porte une VPg (en cercle noir), un site d'initiation de la traduction (AUG), un codon d'arrêt (codon stop) et une queue polyadénylée (polyA). La traduction de cet ARN messenger génère une polyprotéine d'environ 350 kDa comprenant, entre ses extrémités N- et C-terminales: les protéines P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg-Pro, NIb et CP.



TRADUCTION



POLYPROTÉINE D'ENVIRON 350 kDa

### 1.3. PROTÉINES DU TuMV.

Comme précédemment décrit, le génome du TuMV code pour une longue polyprotéine qui comporte au moins neuf sites de clivage protéolytique. Ces sites sont reconnus par trois protéases virales dont les activités catalytiques en cis ou en trans, génèrent huit à dix protéines matures (figure 2). Très peu des protéines majeures du TuMV ont été détectées *in vivo*, quelques unes ont cependant été produites dans des systèmes d'expression hétérologue. Ci-dessous, suit une description sommaire des principales protéines connues du TuMV.

La P1 représente la première protéine située à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine du TuMV. Cette protéine possède 362 acides aminés avec un poids moléculaire estimé à 40100 daltons (Nicolas et Laliberté, 1992). La P1 est fortement basique car elle possède un point isoélectrique de 10.3, une charge positive nette de 38 et renferme environ 20% d'acides aminés basiques. Sur le plan biologique, la P1 serait douée d'une activité protéolytique et agirait en cis pour libérer son extrémité C-terminale du reste de la polyprotéine virale. Quoique cette activité ait déjà été démontrée pour la P1 de TEV (Verchot *et al.*, 1991) *in vitro*, elle n'est que hypothétique pour la P1 de TuMV. Dans les plantes infectées, la P1 serait responsable du *mouvement* ou *transport intercellulaire* du virus (Deom *et al.*, 1987).

HC-Pro ou "*Helper-Component Proteinase*" est la seconde protéine du TuMV. Elle pourrait s'appeler protéine auxiliaire ou composant d'aide. C'est une protéine d'environ 60kDa, qui serait nécessaire à la transmission du virus par les pucerons. HC-Pro posséderait une activité protéolytique, s'exerçant en

cis sur la jonction HC-Pro-P3, qui la libère de la polyprotéine virale (Carrington *et al.*, 1989). La séquence de clivage de HC-Pro de TuMV serait K-H-Y-R-V-G-G, présente aux positions 815-821 de la polyprotéine (Nicolas et Laliberté, 1992).

La P3 de TuMV est une protéine d'environ 350 acides aminés avec un PM de 40 kDa. Cette protéine est très mal connue, elle posséderait une activité protéolytique non encore caractérisée. Son rôle biologique demeure totalement inconnu.

Dans les cellules infectées par le virus, les corps d'inclusions cytoplasmiques induits seraient formés d'aggrégats de la protéine CI. Chez le TuMV, cette protéine est située entre les protéines 6k1 et 6k2. Elle a déjà été clonée et exprimée chez *E. coli*, elle a une masse molaire de 70 000. Elle renferme des motifs de liaison aux nucléosides triphosphates (NTBM: nucleoside triphosphate-binding motif) et serait donc associée à une activité hélicasique impliquée dans la réplication de l'ARN viral (Miller et Purcell, 1990).

Entre la CI et la P3 d'une part, et entre la CI et la NIa d'autre part, se trouvent respectivement les protéines 6k1 et 6k2 dans la polyprotéine du TuMV. Ce sont deux petits polypeptides d'environ 6kDa dont les existences sont déduites de la présence de sites de clivage fonctionnels de la protéase NIa. Chez le TuMV, les protéines 6k non pas encore été détectées ni *in vitro*, ni *in vivo*, on sait très peu sur leurs fonctions biologiques. Cependant, il a été démontré récemment que la 6k2 de TEV était localisée au niveau de la

membrane cellulaire et qu'elle était impliquée dans la réplication virale (Restrepo-Hartwig et Carrington, 1994).

La VPg-Pro, d'une masse molaire d'environ 49 kDa, formerait des corps d'inclusions nucléaires dans les cellules infectées par le virus. C'est une protéine multifonctionnelle dont le domaine N-terminal serait la VPg de 22 kDa et le domaine C-terminal serait une protéase de 27 kDa. Récemment, il a été démontré que la libération de la VPg de la Protéase ou Pro de TuMV pouvait avoir lieu lorsque cette dernière était exprimée dans *E. coli* (Laliberté *et al.*, 1992). Comme pour les autres potyvirus, la VPg serait attachée de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ARN viral où elle jouerait un rôle clé dans l'initiation de la réplication du génome viral. Sept sites potentiels de clivage par la protéase NIa ont été identifiés sur la polyprotéine, ils seraient composés d'une séquence de sept heptapeptides (Nicolas et Laliberté, 1992). La protéine NIa jouerait un rôle capital dans le cycle infectieux viral.

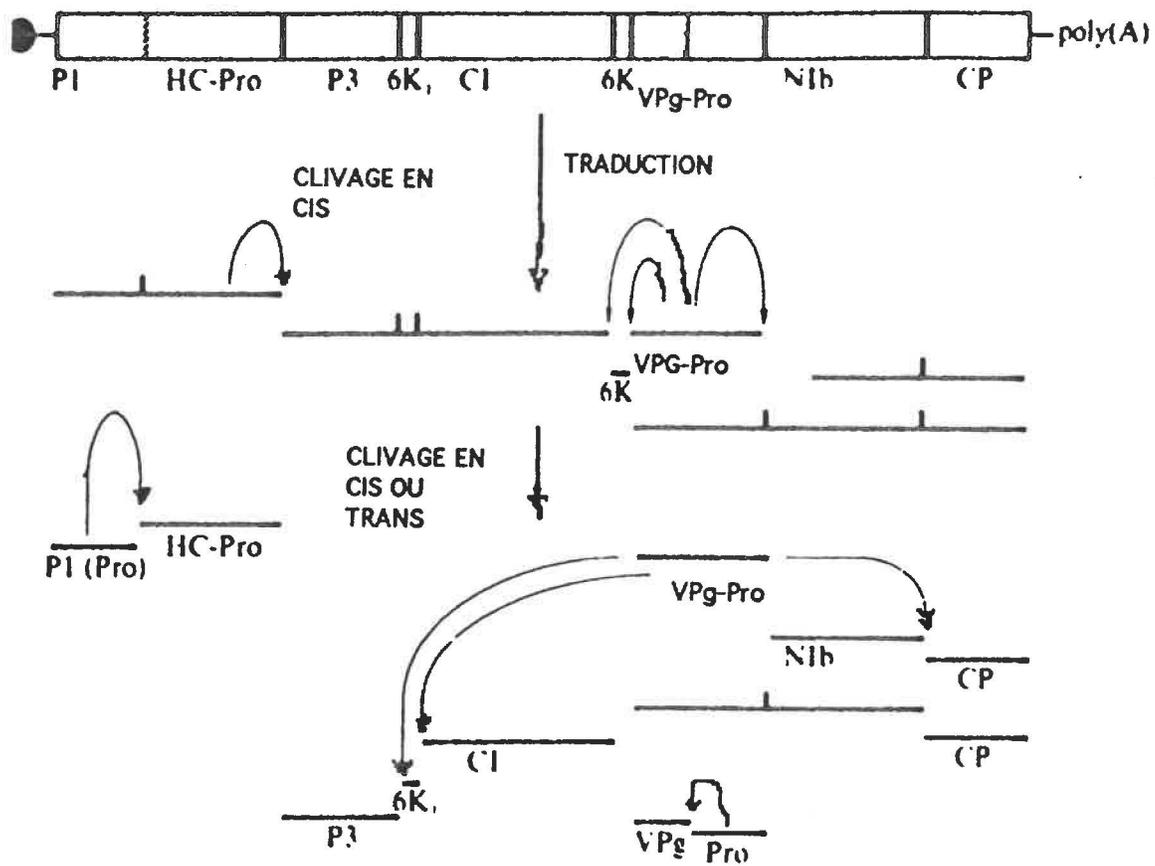
La NIb de TuMV serait une protéine de 59 kDa composée de 518 acides aminés, elle est comprise entre les protéines Pro et CP sur la polyprotéine (Nicolas et Laliberté, 1992). Elle contient le motif GDD qui en ferait une réplécase ou ARN polymérase ARN dépendante (Dougherty et Carrington, 1988).

La protéine de la capsid (CP) du TuMV a déjà été caractérisée (Temblay *et al.*, 1990). Elle est située à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine virale. Son gène comprend 864 pb, et code pour une protéine de 288 acides aminés avec une masse de 34 kDa. Dans le virion mature, l'ARN génomique est encapsidé

dans plusieurs copies de la CP, qui peut alors être détectée dans les cellules infectées par TuMV.

**FIGURE 2** Clivage protéolytique de la polyprotéine du TuMV

Le génome du TuMV portant à ses extrémités 5' la VPg (cercle noir) et 3' une queue polyadénylée (polyA) est traduit en une polyprotéine. Une cascade d'évènements protéolytiques (co ou post-traductionnels) se produit aboutissant à la formation des différentes protéines matures du virus. Les protéines P1, HC-Pro, et la Protéase (Pro) produiraient l'essentiel de ces clivages par des réactions en cis ou en trans.



## 2. MOUVEMENT DES VIRUS DE PLANTES

### 2.1. INTRODUCTION

Les virus de plantes sont initialement introduits dans les cellules hôtes à la faveur de dommages mécaniques ou biologiques (par l'intermédiaire de vecteurs, généralement des insectes ou des vers) causés à l'intégrité de la paroi cellulaire et de la membrane plasmique. Après la pénétration dans la cellule hôte, les virus se répliquent et les nouveaux virions devraient être capables de se propager aux cellules saines adjacentes, pour engendrer une infection systémique. Or les cellules végétales sont entourées de parois cellulaires très épaisses qui constituent des barrières infranchissables qui ne permettent pas l'entrée des virus de plantes ni par fusion de membrane ni par endocytose via récepteurs, les deux mécanismes généralement utilisés pour la pénétration des virus d'animaux. Il est généralement admis que les virus de plantes contournent la barrière de la paroi cellulaire en tirant avantage de l'existence de canaux naturels intercellulaires : les plasmodesmes. Les mécanismes par lesquels ces virus passent à travers les plasmodesmes sont encore obscurs.

Les mouvements des virus de plantes à travers leurs hôtes sont des processus actifs (HULL, 1989), contrairement au concept de transmission passive qui était d'antan admis. L'élucidation, au niveau moléculaire de ces processus, devrait trouver des réponses à certaines questions fondamentales : comment se fait la régulation de la perméabilité des plasmodesmes ? Quels sont les formes de mouvement de virus à travers ces canaux ?

Des évidences de plus en plus croissantes de l'implication de protéines virales spécifiques (appelées *protéines de mouvement*) dans les mouvements de virus de plante, s'accroissent depuis quelques années déjà (DEOM *et al.* 1992; HULL, 1989; ATABEKOV *et al.*, 1984).

## 2. 2. LES PLASMODESMES

Les plasmodesmes sont des connections cytoplasmiques entre les cellules végétales adjacentes, constituant des analogues structuraux et fonctionnels des jonctions de type gap existantes entre les cellules animales, ils créent un continuum intercellulaire: le symplasma (Robards *et al.* 1990). Bien que les plasmodesmes furent décrits pour la première fois par Tangl (1879) il y a plus d'un siècle, c'est seulement au cours des deux décades passées que les recherches ont fourni assez d'informations sur la structure et les fonctions de ces interconnexions cellulaires. Les plasmodesmes n'ont pas encore été isolés ou caractérisés biochimiquement, les modèles structuraux disponibles proviennent d'observations de micrographies électroniques.

### 2. 2. 1. Structure

La structure plasmodesmatale basique est un canal de 28 nm de diamètre aligné avec la membrane plasmique. Un fin brin du réticulum endoplasmique modifié, le desmotubule, va d'une cellule à l'autre à travers le centre de ce canal. Un fait presque universel des plasmodesmes est la région du collet qui

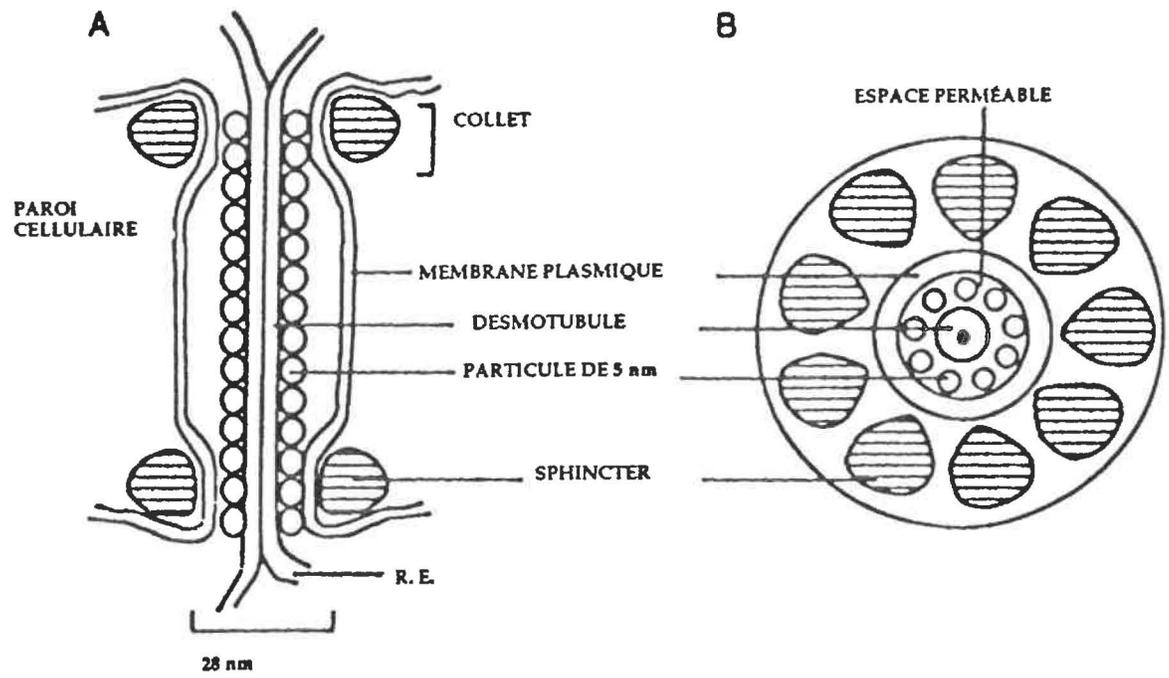
est un rétrécissement du canal plasmodesmatal à ses extrémités. A ces endroits, un anneau de larges particules se trouve juste sous la membrane plasmique (Robards, 1975 ; Robards *et al.*, 1990). Cette structure annulaire externe fonctionnerait comme un sphincter impliqué dans la régulation de la perméabilité du plasmodesme (Olsen, 1979). Une coupe transversale du canal plasmodesmatal révèle neuf sous-unités de particules, chacune ayant un diamètre d'environ 5 nm, entourant le desmotubule. La figure 3 montre une structure simplifiée du plasmodesme. Tandis que le desmotubule et les particules de 5 nm sont imperméables, les transports intercellulaires se produisent à travers les espaces, les intervalles de 1.5-3.0 nm, entre les sous-unités.

**FIGURE 3:** Structure simplifiée du plasmodesme.

A: Coupe longitudinale.

B: Coupe transversale.

(Adaptée de Robards et Lucas, 1990).



### 2. 2. 2. Formation et distribution

Il a longtemps été admis que la plupart des plasmodesmes sont formés par la prise au piège de brins du réticulum endoplasmique dans la plaque cellulaire en développement (Porter *et al.*, 1960). Hepler (1982) a apporté, par une étude détaillée en microscopie électronique, une confirmation de la formation du plasmodesme à partir du réticulum endoplasmique.

Les plasmodesmes se retrouvent entre les cellules jeunes et vivantes de toutes les plantes supérieures (Robards *et al.*, 1990). Leurs fréquences de distribution sont largement variables et se situent entre 0.1-10.0/ $\mu\text{m}^2$ . Ils sont particulièrement fréquents dans les parois des cellules qui conduisent aux sites de sécrétion intense tel que les glandes sécrétrices de nectar ; dans ces cellules, il peut y avoir 15 plasmodesmes ou plus au micromètre carré de paroi, alors qu'il y en a souvent moins d'un par micromètre carré dans d'autres parois (Alberts *et al.*, 1989). La fréquence de la distribution des plasmodesmes semble très variable d'une partie de la plante à l'autre. Cette fréquence semble, par ailleurs, plus faible dans les cellules de la racine comparativement aux glandes sécrétrices (Robards *et al.*, 1990).

### 2.2.3 Fonctions physiologiques.

Malgré l'existence de nombreuses données sur l'ultrastructure et la perméabilité des canaux plasmodesmataux, on connaît très peu sur leur

physiologie, et beaucoup moins sur la biochimie de leurs sous-unités protéiques.

Dans les conditions physiologiques normales, les plasmodesmes permettent le mouvement de molécules (solutés d'ions, de glucides, d'hormones etc) d'une cellule à l'autre. Il existe des preuves solides du rôle des plasmodesmes dans la communication intercellulaire. La preuve la plus directe du transport (ou mouvement) intercellulaire par l'intermédiaire des plasmodesmes est fournie par des expériences d'injection intracellulaire de colorants ou d'impulsions de courant électrique (Gunning *et al.*, 1983 ; Baron-Epel *et al.* 1988). Les estimations des limites d'exclusion des espaces perméables dans les plasmodesmes (évaluées par l'usage de colorants fluorescents) ont permis de fixer à 700-800 daltons la limite supérieure de la taille d'une molécule pour qu'elle soit transportée d'une cellule à l'autre. Cette limite correspond à un rayon Stokes de 0.7-1.0nm (Terry *et al.*, 1987 ; Baron-Epel *et al.*, 1988), qui est très proche des limites d'exclusion observées pour les jonctions de type gap (Simpson *et al.*, 1977). De nombreuses observations suggèrent que le transport par l'intermédiaire des plasmodesmes est soumis à une régulation complexe. Ainsi, les expériences avec des colorants montrent qu'ils peuvent même être des barrières au déplacement de matériaux de faible poids moléculaire entre certains systèmes tissulaires, malgré la présence de liaisons entre plasmodesmes apparemment normales (Alberts *et al.*, 1989). Les mécanismes de régulation qui limitent la communication à travers les plasmodesmes ne sont pas compris, bien qu'il existe quelques preuves de l'inhibition du transport, via les canaux plasmodesmataux, par les ions  $Ca^{2+}$  et les phosphoinositides (Baron-Epel *et al.*, 1988 ; Tucker, 1988). Les facteurs qui contrôlent les mouvements des métabolites et autres molécules à travers les

plasmodesmes réduisent tous le flux de passage, aucun facteur de la plante ne semble posséder la capacité d'augmenter la perméabilité plasmodesmatale (Citovsky *et al.*, 1991). Par contre, certains virus de végétaux peuvent élargir leurs plasmodesmes afin d'utiliser cette voie pour passer d'une cellule à l'autre ; et causer ainsi une infection locale ou systémique (Zaitlin *et al.*, 1987).

### **2. 3. TYPES DE MOUVEMENT.**

Après pénétration et réplication dans une cellule, les virus de plante se multiplient et les nouveaux virions se propagent aux cellules saines voisines. Ce mouvement des virions dans l'hôte est un processus dynamique qui peut être théoriquement divisé en deux phases plus ou moins distinctes. La première phase est caractérisée par une propagation du virus de cellule à cellule, c'est le mouvement de courte distance ou mouvement local. La seconde phase est la propagation du virus d'un tissu infecté, comme les feuilles par exemple, aux autres tissus via le système vasculaire. C'est le mouvement de type longue distance. On retrouve ces deux formes de mouvement chez plusieurs virus, notamment chez ceux causant des mosaïques. D'autres virus peuvent être limités au tissu vasculaire, habituellement le phloème, où ils sont introduits par leurs vecteurs (Hull, 1989).

#### **2. 3. 1. Mouvement à distance.**

Contrairement au mouvement local, très peu d'attention a été porté à la propagation à distance des virus dans les plantes infectées. L'étude de la propagation systémique du CCMV dans la luzerne, par exposition à des températures variables suivie d'observations microscopiques de fines coupes colorées par la technique d'immunodétection à l'or colloïdal, révèle la présence précoce d'antigènes viraux dans le phloème et leur propagation tardive dans les cellules mésophylles (van Lent, 1988). Des mutants du TMV ayant des insertions ou des délétions dans le gène de CP sont défectifs, à des degrés variables, dans le mouvement rapide à longue distance (Dawson *et al.*, 1988). Ces expériences suggèrent que la protéine de la capsid joue un rôle prépondérant dans la propagation à distance des virus de végétaux. Toutefois, elles soulèvent également la question de savoir si les phénotypes observés sont dus à un manque d'assemblage des virions ou plutôt à l'absence d'une CP fonctionnelle. Des études utilisant des mutants thermosensibles du TMV (Jockush, 1966) et les essais de complémentation entre des mutants de TMV et de RCMV (Malysenko *et al.*, 1988) ont permis d'évaluer le rôle de la CP dans le mouvement des virus.

Le transport des particules virales (ou d'autres structures virales) pourrait être un mouvement passif à travers le système vasculaire végétal. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le mouvement des virions du phloème (ou du xylème) vers d'autres tissus demeurent toujours non élucidés.

### **2. 3. 2. Mouvement de cellule à cellule.**

### 2. 3. 2. 1. Protéines de mouvement local.

Il y a une trentaine d'années, l'on assumait que la propagation des virus de plante se faisait par une diffusion passive à travers les plasmodesmes jusqu'aux cellules saines environnantes. Par ailleurs, la limite d'exclusion des canaux du plasmodesme (0.7-1.0nm) est très en dessous de la taille d'une particule virale (10-80nm) ou même celle d'un acide nucléique viral enroulé (10nm) (Gibbs, 1976). Mais depuis le début des années 1980, des évidences expérimentales suggèrent que le mouvement des virus de plante, d'une cellule à l'autre, est un processus actif facilité par des protéines dites de mouvement.

De nombreuses tentatives ont été faites pour identifier les protéines de mouvement de plusieurs virus de plante (Atabekov *et al.*, 1984 ; 1990 ; Hull, 1989, Maule, 1991). L'analyse récente des séquences en acides aminés des protéines de mouvement d'un grand nombre de groupes de virus de plante a révélé des relations significatives entre membres de différents groupes taxonomiques et une origine évolutive commune pour ces protéines (Melcher 1990 ; Koonin, 1991).

La plupart des données, impliquant une protéine virale spécifique dans le mouvement intercellulaire, proviennent d'études faites sur le mouvement local du TMV. La particule virale du TMV a une forme cylindrique filamenteuse flexible contenant un génome à ARN simple brin à polarité positive (Bloomer *et al.*, 1986). La réplication de l'ARN du TMV a lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte via des ARN intermédiaires partiellement double brin (Palikaïtis *et al.*, 1986). L'ARN messager du TMV code pour

plusieurs protéines dont la CP (une protéine structurale) et au moins trois protéines non structurales [P126, P183 et P30 (dénommées en fonction de leurs masses molaires)] (Goelet *et al.*, 1982).

Les protéines P126 et P183 seraient les sous-unités de la réplicase virale (Palikaitis et Zaitlin, 1986). Plusieurs évidences évoquent le rôle capital de la P30 dans le mouvement de cellule à cellule du TMV. De nombreux mutants thermosensibles du TMV (nommés LS1, NI 2519 et II27), défectifs dans la propagation de cellule à cellule, possèdent une protéine P30 altérée (Jockush, 1968 ; Peters et Murphy, 1975 ; Nishiguchi *et al.*, 1978). Des transcripts infectieux du TMV, portant des mutations dans le gène de la P30, produisent des phénotypes restreints dans le mouvement local (Meshi *et al.*, 1987). En plus, des plants de tabac transgéniques pour la P30 complètent le mouvement local de virus mutants thermosensibles de TMV (LS1) à la température restrictive (Deom *et al.* 1987) et celui de mutants ayant une P30 défective (Deom *et al.* 1991 ; Holt et Beachy 1991). Des analyses immunocytologiques de plantes infectées par le TMV ont permis de localiser la P30 dans les plasmodesmes, suggérant une interaction potentielle entre cette protéine et ces structures intercellulaires (Tomenius *et al.*, 1987).

Des évidences expérimentales suggèrent que le TMV et le CPMV (un comovirus) utilisent deux mécanismes différents pour propager leurs progénitures d'une cellule infectée à une saine. Le CPMV a une structure icosahédrique avec un diamètre de 28 nm. Le génome viral consiste en deux molécules d'ARN simple brin à polarité positive (ARN M et B). L'ARN B code pour les protéines nécessaires pour les fonctions de réplication. L'ARN M code

pour deux protéines, ayant respectivement 58 kDa et 48 kDa, à partir de cadres de lecture qui se chevauchent ; il code également pour deux protéines de la capsid. Des études de mutagenèse ont permis de démontrer que les protéines de 58 kDa et 48 kDa étaient essentielles pour le mouvement intercellulaire des virions (Wellink et van Kammen 1989). Les protéines de la capsid de CPMV sont également requises pour le mouvement local, contrairement au TMV (Deom *et al.*, 1992).

Contrairement au TMV le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV, un caulimovirus) est un virus à ADN bicaténaire dont le cycle de vie est très apparenté à ceux des hépadnavirus et des rétrovirus ; le CaMV se réplique par transcription et transcription inverse (Hull et Covey, 1985 ; Shepherd 1989). Le virion du CaMV contient un ADN bicaténaire, qui est transporté dans le noyau après infection de la cellule hôte. Contrairement au rétrovirus, l'ADN viral n'est pas obligatoirement intégré dans le génome de l'hôte ; il est transcrit par l'ARN polymérase II cellulaire en un ARN 35S (qui sert de messenger polycistronique pour la traduction des protéines virales et de matrice pour la transcription inverse) et un ARN 19S (sous génomique) (Odell et Howell, 1980 ; Guilley *et al.*, 1982 ; Hull et Covey, 1985 ; Shepherd, 1989). Le génome du CaMV contient plusieurs cadres ouverts de lecture codant pour 7 à 8 protéines virales. La protéine du premier cadre ouvert de lecture (ou protéine du gène I) est présumée intervenir dans le mouvement de cellule à cellule du virus. L'analyse génétique de mutants du CaMV a permis de déterminer que la protéine du gène I était un facteur génétique déterminant dans la propagation locale de ces virus (Stratford et Covey 1989). Par ailleurs, des études immunocytologiques de plantes infectées par le CaMV ont révélé que la

protéine du gène I était localisée dans la paroi cellulaire (Albrecht *et al.*, 1988) et plus spécifiquement dans les plasmodesmes (Linstead *et al.*, 1988). L'implication de la protéine du gène I dans le mouvement de cellule à cellule du virus est également appuyée par l'homologie significative en acides aminés entre cette protéine et la P30 du TMV (Melcher, 1990). Atabekov et Taliansky (1990) ont même suggéré que la protéine du gène I de CaMV et la P30 de TMV appartenaient à un même groupe fonctionnel de protéines de mouvement.

### 2. 3. 2. 2. Interactions Protéines de Mouvement-Acides nucléiques.

Jusqu'à une date récente, on assumait que la transmission virale entre les cellules hôtes se produisait soit sous forme d'acides nucléiques libres, soit sous forme de virions matures. Les rôles des protéines de mouvement dans ce processus étaient présumément limités aux interactions avec les plasmodesmes engendrant leur élargissement pour faciliter le passage des particules virales (Citovsky et Zambryski, 1991). Plusieurs études récentes faites avec des protéines virales (supposées être des protéines de mouvement) produites et purifiées dans des systèmes d'expression hétérologues, *E. coli* et *S. cerevisiae*, ont démontré leurs capacités à lier des acides nucléiques *in vitro*. Ainsi, la P30 de TMV (Citovsky *et al.*, 1991), la protéine de mouvement de AlMV (Schoumacher *et al.*, 1992), la protéine de mouvement de RCNMV (Osman *et al.*, 1992) et la P1 de TVMV (Brantley *et al.*, 1993) ont été identifiés comme des protéines capables de lier les acides nucléiques. Les liaisons se faisaient de manière coopérative, sans une spécificité notoire pour la séquence nucléotidique. Quoique similaire aux protéines liant l'ADN simple brin

(«single stranded DNA binding proteins (SSBS)») la P30 de TMV se distingue par son affinité égale pour les molécules d'ADN ou d'ARN monocaténares (Citovsky *et al.*, 1990). Contrairement à la P30, la SSB de *E. coli* et la protéine du gène 32 du phage T4 présentent dix fois plus d'affinité de liaison pour l'ADN simple brin que pour l'ARN (Chase et Williams, 1986).

Citovsky *et al.* (1992) suggèrent que la liaison de la P30 à l'ARN viral transformerait ce dernier en une forme transférable à travers les canaux du plasmodesme. Les molécules libres d'acides nucléiques existent sous formes de structures irrégulières superenroulées. La liaison de SSBS entraîne un déroulement et un étirement de ces molécules, les amenant dans des formes régulières de complexes ribonucléoprotéiques (Chase et Williams, 1986). De plus, la protéine VirE2 d'*Agrobacterium*, qui est présumée faciliter le transfert de l'ADN-T dans les plantes infectées, lie l'ADN monocaténaire en donnant naissance à de fins et longs complexes protéine-ADN dont les diamètres sont inférieurs à 2 nm (Citovsky *et al.*, 1989).

Il semblerait que le CPMV, contrairement au TMV et au CaMV, se déplace d'une cellule à l'autre dans un tissu infecté via des structures tubulaires formés dans les plasmodesmes soit sous forme de virion ou sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (van Lent *et al.*, 1991). Les protéines virales 58K et 48K seraient impliquées dans la formation de ces structures. La protéine 58K pourrait modifier les plasmodesmes avant la formation des tubules par la protéine 48K ou en prévenant l'obstruction par le dépôt de callose avant le passage des particules virales dans les cellules voisines ; mais seule la protéine

de 48K semble être le seul composant protéique des structures tubulaires (Wellink *et al.*, 1993)

Le fait que les protéines de mouvement de plusieurs virus, appartenant à différents groupes taxonomiques et génomiques (TMV, CaMV, RCNMV) lient les acides nucléiques simple brin de manière coopérative suggère que les génomes viraux traversent les plasmodesmes sous forme de complexes acides nucléiques-protéine de mouvement (Citovsky et Zambriski, 1991). De ce point de vue, il serait très significatif que tous les virus de plante connus qui se déplacent de cellule à cellule possèdent un génome à simple brin (ADN ou ARN monocaténaire) ou se répliquent via un ARN simple brin intermédiaire (caulimo- et badnavirus) (Atabekov et Taliansky, 1990 ; Citovsky *et al.*, 1990).

### 2. 3. 2. 3. Interactions Protéines de Mouvement-Plasmodesme.

Deux modèles ont été proposés pour l'interaction des protéines de mouvement viral et les cellules hôtes : (i) la suppression des systèmes de défense de la cellule végétale, et (ii) l'élargissement des canaux des plasmodesmes (Atabekov et Dorokov, 1984).

Des études récentes employant des plantes transgéniques pour la P30 de TMV, sont consistantes avec le second modèle. Wolf *et al.* (1989) ont mesuré la perméabilité des plasmodesmes dans les plantes normales et dans les plants transgéniques par microinjections de marqueurs fluorescents de différentes tailles à l'aide de liposomes. Cette étude a permis de montrer que la limite d'exclusion (radian Stokes) des plasmodesmes des plants transgéniques

exprimant la P30 de TMV était de 3 à 4 fois supérieure (2.4-3.1nm) à celle des plants normaux (0.73nm). D'autres études des interactions potentielles entre la P30 et les plasmodesmes, employant les techniques d'immunolocalisation par microscopie électronique, ont montré que cette protéine était accumulée dans les plasmodesmes des plantes infectées par TMV (Tomenius *et al.*, 1987) et des plantes transgéniques (Deom *et al.*, 1990, Atkins *et al.*, 1991). Une analyse poussée indique que la P30 est localisée dans les plasmodesmes des feuilles plus âgées ou moyennement âgées, tandis que dans les feuilles plus jeunes, cette protéine est plus présente dans les fractions membranaires plutôt que dans les parois cellulaires et ou les plasmodesmes (Fenczik *et al.*, 1991).

Les protéines, présumément responsables du mouvement de plusieurs virus, ont été déjà localisées dans les parois cellulaires ou plus précisément dans les plasmodesmes. Ce fut le cas pour la protéine du gène I de CaMV (Linstead *et al.*, 1988), la protéine de mouvement du RCNMV (Osman *et al.* 1991), la protéine 48 k de CPMV (Wellink *et al.*, 1993).

Par des expériences de mutagenèse, portant sur la P30 de TMV, faites sur des plantes transgéniques (Wolf *et al.*, 1991) ou non transgéniques (Berna *et al.*, 1991) ont permis d'identifier deux domaines potentielles d'interactions avec les plasmodesmes sur cette protéine : (i) un domaine permettant le ciblage et la localisation de la P30 aux plasmodesmes, (ii) un second domaine qui interagissait avec les structures plasmodesmatales pour modifier leur limite d'exclusion.

Toutes les données présentement disponibles indiquent que les protéines de mouvement virales se localisent spécifiquement aux plasmodesmes et interagissent avec eux. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires facilitant ces interactions sont inconnus. La nature exacte des évènements consécutifs à la localisation des protéines virales de mouvement aux plasmodesmes et qui conduit à l'augmentation de leur perméabilité est également peu connue. Toutefois, par analogie avec les jonctions cellulaires de type gap, il est possible que la phosphorylation soit impliquée dans la régulation de ce processus (Citovsky et Zambrisky, 1991). Par exemple, une protéine kinase dépendante d'AMPc augmenterait la perméabilité des jonctions de type gap, tandis que qu'une protéine tyrosine kinase c-src la réduirait (Loewenstein, 1987).

## 2. 4. MODÈLES DE MOUVEMENT LOCAL DES VIRUS DE PLANTE.

L'accumulation de plus en plus croissante d'évidences ultra-structurales, biochimiques et génétiques, de l'implication d'une protéine virale dans le mouvement des virus dans les plantes infectées, a amené certains chercheurs à faire des ébauches de modèles de propagation intercellulaire. Parmi les nombreux modèles théoriques du mouvement local des virus de plante, nous en avons retenu deux ; celui de Citovsky *et al.* (1991) et celui de Deom *et al.* (1992), parce qu'ils sont les plus complets et les plus récents.

### 2. 4. 1. Modèle de Citovsky *et al.* (1991).

Le processus de mouvement local ou de cellule à cellule des acides nucléiques des virus de plante peut être divisé en quatre étapes majeures (figure 4).

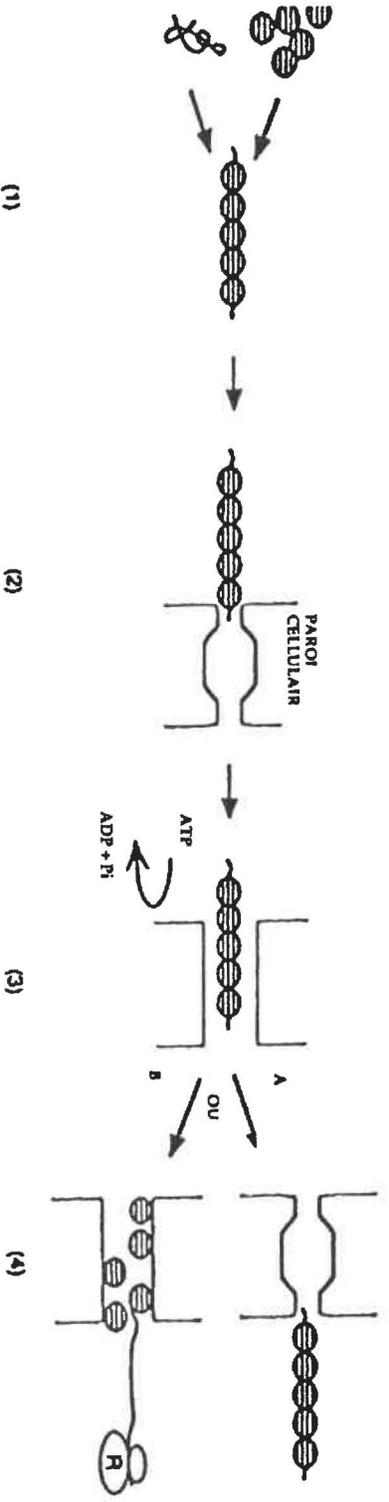
La première étape consiste en *la formation du complexe protéine-acide nucléique*. Après sa synthèse, la protéine de mouvement viral lie l'acide nucléique viral simple brin de manière coopérative pour faciliter son transfert. Une telle liaison résulte en la formation de complexes protéine-acide nucléique longs, fins et dépliés. Une conformation de l'acide nucléique viral, compétente pour le mouvement de cellule à cellule, est ensuite stabilisée. Fonctionnellement, cette étape ressemble à la liaison de précurseurs de protéines par les chaperons moléculaires.

Les chaperons sont impliqués dans l'assemblage de complexes protéiques, aussi bien que dans leurs mouvements à travers les membranes biologiques. De ce point de vue, il est intrigant de noter une nécessité similaire de dépliage pour le mouvement des protéines et celui des acides nucléiques. En fait, il existe des évidences d'une évolution convergente des deux processus ; les homologies de séquences en acides aminés entre la hsp90, une protéine dite «chaperone-like» et les protéines de mouvement de certains virus de plante, ont été rapportées (Koonin *et al.*, 1991).

La seconde étape du mouvement est *le ciblage spécifique des complexes protéine- acide nucléique aux plasmodesmes*. Cette étape est potentiellement facilitée par une séquence d'acides aminés, même si celle-ci est encore mal

**FIGURE 4: Modèle de Citovsky *et al.***

1. Formation du complexe de mouvement entre la protéine et l'acide nucléique simple brin.
2. Ciblage du complexe de mouvement au plasmodesme.
3. Augmentation de la perméabilité plasmodesmatale par la protéine de mouvement.
4. Translocation à travers le canal du plasmodesme.



définie, qui fonctionnerait comme un signal de localisation aux plasmodesmes. Dans le complexe de mouvement, un grand nombre de molécules de protéine sont coopérativement liées à la molécule d'acide nucléique transférée. Ce complexe protège le génome viral des nucléases de la cellule hôte, et lui procure ainsi de multiples signaux de localisation aux plasmodesmes, augmentant du coup l'efficacité du mouvement. Similaire aux protéines de transport nucléaire (Adam *et al.*, 1989), il est possible que les signaux putatifs de localisation aux plasmodesmes interagissent avec des protéines «navettes» spécifiques de la cellule hôte qui dirigent les complexes de mouvement vers les canaux plasmodesmataux. Le transport des complexes de mouvement viraux du cytoplasme au plasmodesme pourrait se faire par des interactions directes ou indirectes avec le réseau de microtubules des cellules de plante.

La troisième étape consiste en des *interactions entre la protéine de mouvement et les sous-unités régulatrices des canaux plasmodesmataux*, aboutissant à une augmentation de la perméabilité de ces derniers. La nature de ces interactions est inconnue, mais un processus de phosphorylation/déphosphorylation pourrait être impliqué. Si la P30 de TMV induit une augmentation de la limite d'exclusion moléculaire des plasmodesmes de 0.73nm à 2.4-3.1nm comme observée dans les plants transgéniques, ceci reflète une activité biologique de cette protéine, le mouvement des complexes acide nucléique -protéine de diamètre 2 à 3 nm pourrait se produire.

La quatrième et dernière étape du transport du virus de cellule à cellule est *la translocation de l'acide nucléique viral*, à travers le canal du

plasmodesme, à la cellule hôte adjacente. Deux mécanismes de translocation sont possibles. Le complexe de mouvement peut être transporté à travers les plasmodesmes élargis:

a) Après la translocation, *le complexe de mouvement sera désassemblé*, probablement par des mécanismes similaires à la décapsulation de particules virales intactes. Dans ce cas, la perméabilité plasmodesmatale redeviendra normale après le transport. Alternativement, le complexe de transport pourra être inséré dans le canal du plasmodesme avec les molécules de protéine de mouvement associées aux sous-unités du canal ;

b) A ce stade *le brin d'acide nucléique se dissociera de la protéine de mouvement et progressera à travers le canal*. La translocation pourrait être dirigée par l'engagement de l'extrémité émergente de l'acide nucléique viral dans la machinerie de traduction de la cellule. Dans ce cas, la protéine de mouvement qui demeure intacte dans le canal du plasmodesme, pourrait maintenir sa perméabilité altérée.

#### 2. 4. 2. Modèle de Deom *et al.* (1992).

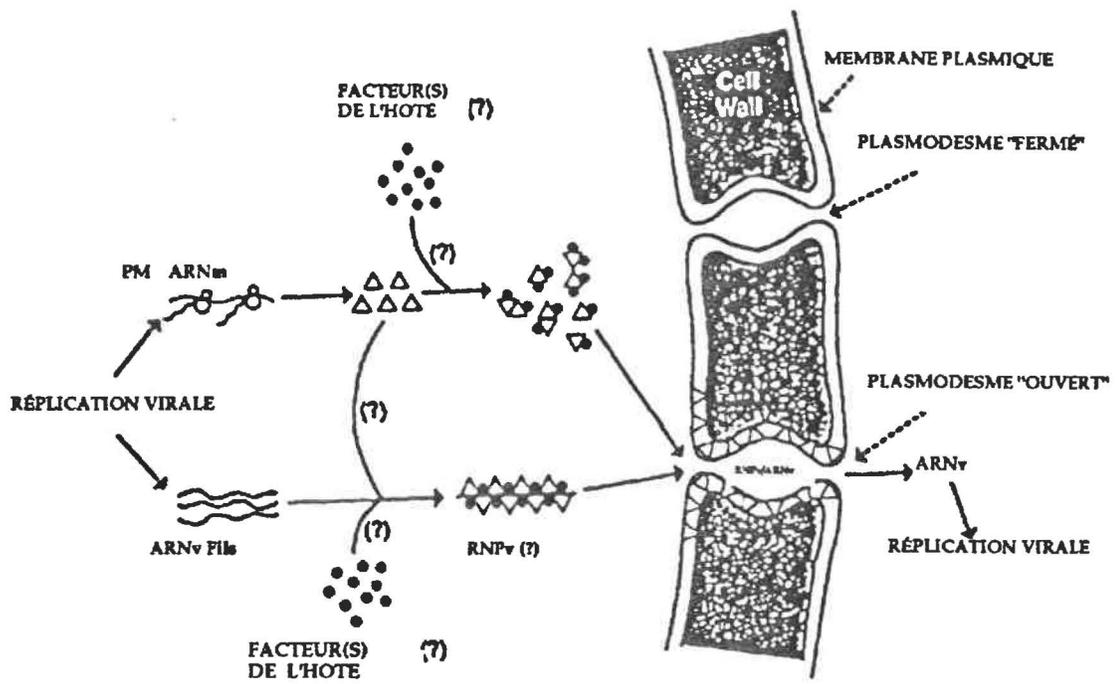
La figure 5 illustre un modèle pour la translocation du génome de TMV à travers la paroi cellulaire. Elle montre les interactions possibles entre la protéine de mouvement, les facteurs de l'hôte qui doivent être requis pour le mouvement du virus, et le génome du TMV pour former un complexe ribonucléoprotéique de transport. La voie et la forme que la protéine de

mouvement doit prendre afin d'atteindre les plasmodesmes sont inconnues. Il n'existe aucune information, provenant d'études *in vivo*, sur la liaison de la protéine de mouvement aux acides nucléiques, ou sur le rôle possible d'autres facteurs viraux ou de l'hôte dans la formation du complexe ribonucléoprotéique de transport. Les mécanismes moléculaires par lesquels la protéine de mouvement modifie le diamètre des plasmodesmes demeurent obscurs.

Ce modèle diffère du précédent par le fait qu'il suppose la participation de facteurs cellulaires dans le transport des complexes ribonucléoprotéiques à travers les plasmodesmes déjà élargis par l'action de la *protéine de mouvement*.

**FIGURE 5: Modèle de DEOM *et al.***

Cette figure montre les interactions possibles entre la protéine de mouvement (triangles), les facteurs de l'hôte qui seraient requis pour le transport du virus (cercles noirs), et le génome viral pour former un complexe ribonucléoprotéique (RNPv) transportable qui est ensuite dirigé vers les plasmodesmes ouverts favorisant son passage dans les cellules saines voisines.



## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 1. BACTÉRIES, VECTEURS .

### 1. 1. SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI*

<b>Souches:</b>	Génotype .
<b>XL1- Blue</b>	endA1, gyrAqb, thi-1, hsdR17, supE44, tet <sup>r</sup> rec A1, lac <sup>-</sup> , F' [ pro AB+ lacI <sup>9</sup> , lacZ M15, Tn10 ] cette souche a surtout été utilisée dans les travaux de clonage.
<b>BL21 (DE3)</b>	hsds, gal, cI, ts857, ind1, sam7, nin5, lac UV5, T7 gene 1 Cette souche contient une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle du promoteur lacUV5 inductible par l'IPTG. Elle a été utilisée essentiellement, pour l'expression de la protéine recombinante.

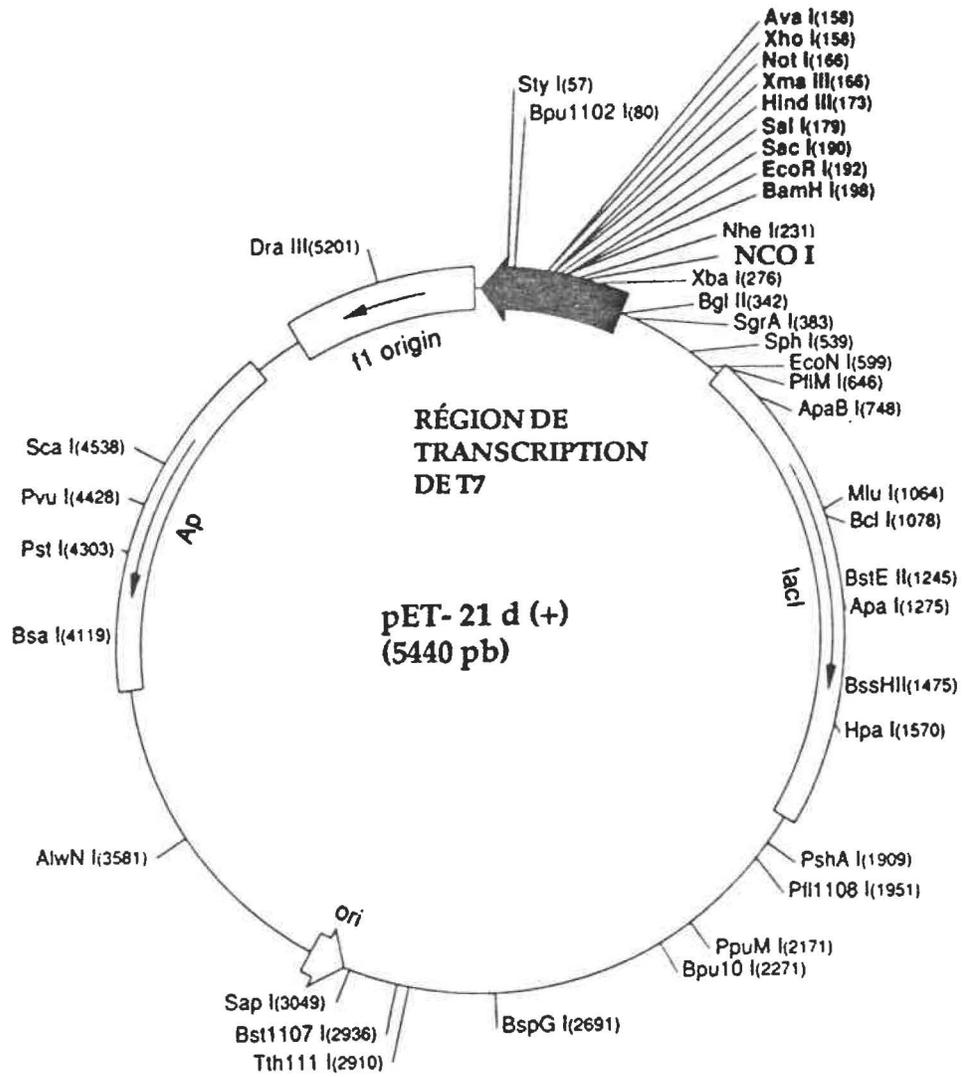
### 1. 2. VECTEUR PLASMIDIQUE

pET-21d (+) (5440 pb) (Novagen, Madison, WI) : Il porte l'origine de réplication du phage f1, le gène de la bêta-lactamase (Amp<sup>r</sup>), le promoteur lac T7, un site multiple de clonage, un gène du represser lacI (figure 6).

## 2. MILIEUX DE CULTURE, TAMPONS, SOLUTIONS.

**FIGURE 6:** Vecteur d'expression pET-21d

La grosse flèche noire illustre le sens de la transcription par l'ARN polymérase du phage T7. Les gènes de la bêta-lactamase, du repressur lacI et l'origine de réplication du plasmide sont marqués.



## 2. 1. MILIEUX DE CULTURE DES BACTÉRIES

### Milieu Luria-Bertani (LB) liquide:

NaCl	10 g
Extrait de levure	5 g
bacto-tryptone	10 g
H <sub>2</sub> O distillée	1 litre
pH 7.0 - 7.35 ( ajuster avec NaOH 10N )	

### Milieu LB solide (LB agar):

idem LB liquide + 15g/l de bacto-agar.

### Milieu SOB.

NaCl	0.5 g
Extrait de levure	5g
Bacto-Tryptone	20 g
H <sub>2</sub> O distillée	1 litre

(Ajouter 10 ml/l de KCl 250mM avant la stérilisation, et après 10 ml/l d'une solution stérile de (1M MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O + 1M Mg SO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O))

### Milieu SOC :

idem milieu SOB + 20 mM glucose stérile.

## 2. 2. ANTIBIOTIQUE.

Seule l'ampicilline (Ampi) a été utilisée pour la sélection des souches d'*E. coli* transformées par les plasmides. Elle a été utilisée à une concentration

finale de 100 µg/ml à partir d'une solution stock stérile à 50 mg/l (Boehringer Mannheim).

### 2.3 TAMPONS ET SOLUTIONS.

#### TAMPON KGB 10X : pour les réactions enzymatiques

Glutamate de potassium	1M
Tris-acétate pH 7.5	250 mM
Acétate de magnésium	100 mM
Albumine sérique de boeuf (fraction V)	500g/ml
2- mercaptoéthanol	5 mM

#### Tampon MOPS 10X : pour gels d'agarose, ARN

Mops [acide 3-(N-morpholino) propane sulfureux]	200 mM
Acétate de sodium	50 mM
EDTA	10 mM
pH 7.0 ( ajusté avec acide acétique)	

#### Tampon TAE 50X : pour gels d'agarose, ADN

Tris-base	242 g
Acide acétique glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100 ml
H <sub>2</sub> O distillée	1 litre

#### Tampon de transfert de protéine sur nitrocellulose

Glycine	39 mM
Tris.base	48 mM
SDS	0.037%
Méthanol	20%
H <sub>2</sub> O	1 litre.

#### Tampon TBE 5X: pour gels de polyacrylamide

Tris	54 g
Acide borique	27.5 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20 ml
H <sub>2</sub> O distillée	1 litre

**Tampon TE pH 8.0:**

Tris pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

**Tampon de charge 6X :pour ADN**

Bleu de bromophénol	0.25 %
Xylène cyanol	0.25 %
Glycérol	30 %

**Tampon de charge 1.2X: pour ARN**

Formamide désionisée	750 µl
Tampon MOPS 10X	150 µl
Formaldéhyde à 37 %	240 µl
Glycérol 100 %	100 µl
Bleu de bromophénol à 10 %	80 µl
Eau stérile	100 µl

**Tampon de charge 1x: pour protéines.**

Bleu de bromophénol	0.1 %
Sodium dodécyl sulfate (SDS)	2%
Glycérol	10 %
Tris.Cl pH 6.8	50 mM

**STE :**

NaCl	0.1 M
Tris.Cl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

**ACÉTATE DE POTASSIUM (3MK<sup>+</sup>, 5M ACÉTATE): 100 ML**

Acétate de potassium 5M	60 ml
Acide acétique glacial	11.5 ml
Eau distillée	28.5 ml

**SSC 20X :**

NaCl	17.3 g
Citrate de sodium	88.2 g
Eau distillée	1litre
pH7.0 (ajusté avec NaOH 10N)	

**TEG**

Tris-HCl pH 8.0	25 mM
EDTA pH 8.0	20 mM
Glucose	50 mM

**Solution de coloration au bleu de Coomassie (100ml)**

Bleu brillant de coomassie R250	0.25 g
Eau distillée	45 ml
Méthanol 100 %	45 ml
Acide acétique glacial	10 ml

**Solution de décoloration des gels SDS-PAGE (1000 ml)**

Eau distillée	450 ml
Méthanol 100 %	450 ml
Acide acétique glacial	100 ml

**Solution PBS-Lait 5 %**

Lait poudre écrémé	5g
Azide de sodium	0.02%
PBS 1X	100 ml

**Solution PBS -Triton 0.5%**

PBS 1X	100 ml
--------	--------

Eau distillée	895 ml
Triton X-100	5 ml

### Substrat DAB

Tris. HCl 1M	180 µl
Eau distillée	18 ml
DAB	12 mg
CoCl <sub>2</sub> 0,3%	2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 50%	12 µL

## 3. CONSTRUCTION DE PLASMIDES RECOMBINANTS.

### 3.1. OLIGONUCLÉOTIDES

Les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés au laboratoire du Dr. François. Shareck (Centre de recherche en microbiologie appliquée) à l'aide d'un synthétiseur automatique d'oligonucléotides (Gene Assembler, Pharmacia Canada Inc. ).

### 3.2. AMPLIFICATION PAR LA RÉACTION DE LA POLYMÉRISATION EN CHAÎNE.

La technique de la polymérisation en chaîne (PCR) à été utilisée pour amplifier le gène de la protéine P1 à partir d'un ADNc complet du TuMV. Cette technique utilise la capacité que possède la Taq ADN polymérase (l'ADN polymérase thermorésistante de *Thermus aquaticus* ( BIO/CAN Scientific Inc., Mississauga, Ont. ) à catalyser la synthèse d'ADN à haute température.

Le mélange réactionnel, d'un volume de 100  $\mu$ l, était composé comme suit:

10  $\mu$ l Tampon 10X (0.5M KCl, 0.1 M Tris.HCl pH 9.0, 0.1% Triton X-100)  
 1  $\mu$ l Mélange des 4 dNTP à 20 mM  
 1  $\mu$ l TMAC  $5.10^{-3}$ M (Chlorure d'Ammonium Tétraméthyle )  
 10 pmole chaque amorce oligonucléotidique (YS1 et YS2 )  
 1 à 4 mM MgCl<sub>2</sub> ( à partir d'une solution mère à 25 mM )  
 1  $\mu$ l ADNc du TuMV (dilué à 1 ng/ $\mu$ l )  
 2.5 U Taq ADN polymérase  
 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Les Conditions d'amplification utilisées étaient les suivantes :

- Cycles 1 - 2 : dénaturation de 2 min à 94°C, appariement de 30 sec à 37°C, élongation de 2 min 30 sec à 72°C.
- Cycles 3 -35 : dénaturation de 1 min à 94°C, appariement de 30 sec à 50°C, élongation de 2 min 30 sec à 72°C.
- Cycles 36 : dénaturation de 1 min à 94°C, appariement de 30 sec à 50°C, élongation de 10 min à 72°C.

Le mélange réactionnel était recouvert de 50  $\mu$ l d'huile de paraffine stérile. A la fin des 36 cycles, l'efficacité de la réaction d'amplification était analysée, par électrophorèse, en plaçant 10  $\mu$ l du mélange sur un gel d'agarose à 1 %. L'huile de paraffine était ensuite éliminée par une extraction au chloroforme (140  $\mu$ l de chloroforme étaient ajoutés au contenu du tube Eppendorf, vortexés et centrifugés à 12 000 g pour 2-3 min et le surnageant représentant la phase aqueuse était récupéré dans un tube propre).

L'ADN amplifié contenu dans la fraction aqueuse, ci-dessus récupérée, était davantage nettoyé par une extraction au phénol, une extraction phénol-chloroforme et une extraction chloroforme selon les conditions standards décrites par Sambrook *et al.* (1989).

L'ADN ainsi purifié était ensuite précipité 20 min à -20°C par deux volumes d'éthanol à 95 % en présence d'un 1/10e de volume d'acétate de sodium 3 M. Après centrifugation de 10 min à 12 000 g, le culot était lavé une fois avec 100 µl d'éthanol à 70 % et resuspendu ensuite dans 30 µl de TE pH 8.0 et conservé à -20°C pour usages ultérieurs.

### 3.3. DIGESTION ENZYMATIQUE D'ADN.

Les mélanges réactionnels étaient composés comme suit:

- Volume nécessaire de Tampon KGB 10x (variable de 0.5 à 2X selon la concentration optimale de l'enzyme utilisée);
- Quantité d'ADN dissoute dans du Tampon TE pH 8.0;
- 0.5 µl -1µl d'enzyme contenant 2-10u/µl;
- Volume final de la réaction ajusté à 10-30µl avec du tampon TE pH 8.0.

Les concentrations optimales de tampon KGB sont spécifiquement définies pour chaque enzyme par Sambrook *et al.* (1989). Les digestions étaient

faites en incubant les mélanges à la température optimale de l'enzyme tel que définie par le manufacturier pour une à plusieurs heures dépendamment de la quantité d'ADN à digérer.

La qualité de la digestion était ensuite analysée en plaçant tout ou partie du mélange réactionnel sur un gel d'agarose pour séparation des différents fragments par électrophorèse.

### 3. 4. ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE

Des gels d'agarose (agarose de qualité électrophorèse, Bio-RAD, Mississauga, Ont.) ont été utilisés pour visualiser la qualité des réactions enzymatiques. Les concentrations des gels variaient entre 0.6 et 1.2 % en fonction des tailles des ADN. Les gels étaient préparés conformément aux conditions décrites par Sambrook *et al.* (1989), le bromure d'éthidium (Bet) était ajouté à l'agarose dissout, à la concentration finale de 0.5µg/ml, avant de couler le liquide dans la plaque de migration. Un marqueur de 1 kb ( Gibco Canada, Burlington, Ont.) était utilisé pour évaluer la taille des fragments d'ADN qui étaient visualisés et photographiés (au besoin) sur une lampe U.V.

### 3.5 PURIFICATION DES FRAGMENTS D'ADN APRÈS DIGESTION PAR LES ENZYMES

Les bandes de fragments d'ADN (plasmides et inserts), digérés par les enzymes appropriées et séparées par électrophorèse sur gel d'agarose, étaient directement prélevées à l'aide d'une lame de bistouri et placées dans des tubes

Eppendorf dont les poids à vide étaient connus. La purification était faite à l'aide du kit de purification d'ADN "Geneclean<sup>md</sup>" (Bio/CAN) conformément à la procédure établie par le manufacturier. Ce kit permet une très bonne purification des fragments d'ADN d'une taille supérieure ou égale à 300 pb.

Les fragments d'ADN ainsi purifiés étaient ensuite utilisés pour les réactions de ligation.

### 3. 6. LIGATION DE FRAGMENTS D'ADN

Les fragments d'ADN (inserts) et les plasmides (vecteurs) digérés par les enzymes appropriées (créant des extrémités cohésives) étaient mélangés, dans un rapport molaire supérieur à 3, avec l'ATP, le tampon KGB 1X et l'ADN ligase du phage T4 (Pharmacia) dans les proportions définies par Sambrook *et al.* (1989). Les mélanges de ligation étaient ensuite incubés à +16°C pour environ 16 heures.

### 3. 7. TRANSFORMATION DE CELLULES BACTÉRIENNES

Les cellules bactériennes d'*E. coli*, rendues compétentes par la méthode décrite par Hanahan (1983) et congelées à -70°C sous forme d'aliquots de 200µl dans des tubes de 1.5 ml, ont été transformées par le protocole défini par Sambrook *et al.* (1989). Ce protocole consiste essentiellement à transformer les cellules par 2-5µl du mixte de ligation. Après incubations successives à +4°C

(sur glace pour 30 min), +42°C (pour 90 sec) et +4°C (pour 2 min) ; un volume de 800 µl de milieu SOC est ajouté aux cellules ayant subi le choc thermique. Les cellules sont ensuite incubées à +37 °C avec forte agitation pour 45 min. Après une brève centrifugation de 30 sec à 12 000 g, le culot bactérien est resuspendu dans 200 µl de milieu SOB dont 20 à 200µl sont étalés sur milieu solide LB agar contenant de l'ampicilline à 50 µg/ml et incubé dans l'étuve à +37 °C (en présence de 5 % CO<sub>2</sub> et d'humidité) pour une nuit.

Après l'incubation, les colonies ayant poussé sont soigneusement repiquées sur un nouveau milieu solide de LB agar-ampi portant une grille numérotée de 1 à 100. Après croissance de cellules à +37 °C , les colonies bien isolées sont alors soumises au criblage pour identifier celles qui contiennent le plasmide recombinant.

### 3.8. SÉLECTION DES COLONIES RECOMBINANTES PAR HYBRIDATION *IN SITU*

Les colonies bactériennes ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. La lyse des cellules, la dénaturation et la fixation de l'ADN plasmidique, ont été faites conformément à la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989).

La sonde utilisée (non radiomarquée) provenait du gène de la protéine P1 amplifiée par PCR et préparée selon le protocole défini par Sambrook *et al.* (1989). Les étapes de préhybridation et d'hybridation ont été effectuées selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989).

Les plasmides des clones positifs (ayant réagi avec la sonde) ont été extraits pour une analyse avancée.

### 3. 9. MINIPRÉPARATION D'ADN PLASMIDIQUE

Les colonies, bien isolées et identifiées, étaient prélevées à l'aide de cure-dents stériles et placées dans des tubes de polypropylène de 10 ml contenant 3 à 5 ml de milieu LB additionné de 50 µg/ml d'ampicilline. Ces tubes étaient ensuite incubés à +37°C pour une nuit sous une forte agitation (200 à 210 rpm). Un volume de 1.5 ml de culture était transféré dans un tube de 1.5 ml et centrifugé à 12 000 g pour 1 à 2 min. Le culot bactérien était resuspendu dans 100µl d'une solution froide de TEG en vortexant légèrement. Après 2 à 5 min d'incubation à la température de la pièce, 200 µl d'une solution fraîche de NaOH 0.2 N, SDS 1 % étaient ajoutés à la suspension cellulaire. Après 5 min d'incubation sur glace, 150 µl d'une solution froide d'acétate de sodium 3 M, pH 5.2 était additionnés au mélange qui était ensuite réincubé dans les mêmes conditions. A la fin de l'incubation, le mélange subissait une centrifugation à 12 000 g pour 10 min, le surnageant était soigneusement transféré dans un nouveau tube de 1.5 ml et était extrait au phénol-chloroforme 1:1 (v/v) et au chloroforme selon la méthode de Sambrook *et al* (1989). La phase aqueuse (contenant l'ADN dissout) était récupérée et l'ADN précipité à -20°C pour 15 min par 2 volumes d'éthanol en présence d'acétate de sodium. Le culot était lavé avec 200µl d'éthanol à 70 %, séché et dissout dans 10-20 µl de TE pH 8.0.

L'ADN plasmidique, ainsi préparé, était utilisé pour l'identification des plasmides recombinants par cartographie de restriction.

### 3. 10 IDENTIFICATION DES PLASMIDES RECOMBINANTS

La sélection des bons plasmides recombinants se faisait selon leurs profils de migration électrophorétique sur gel d'agarose de 0.7 à 1 % après digestion par différentes endonucléases. Les gels d'agarose et les réactions de digestions étaient faits comme précédemment décrits en 3.3 et 3.4.

### 3. 11. PRODUCTION À GRANDE ÉCHELLE DE PLASMIDE RECOMBINANT

La technique de purification des plasmides au polyéthylène glycol (PEG) décrite par Sambrook *et al.* (1989) est utilisée pour la production massive d'ADN plasmidique destiné aux réactions de séquençage, de transcription *in vitro*. Cette technique possède de nombreuses versions modifiées dont une est ci-dessous décrite.

Une culture bactérienne de 50 ml (milieu LB + ampicilline) est placée dans un tube FALCON de 50 ml et centrifugé 5 à 10 min à 5000 rpm à 4°C dans une centrifugeuse SORVAL (DUPONT) à l'aide du rotor GSA10 (Dupont). Le culot cellulaire est resuspendu dans 10 ml de solution STE et centrifugé comme avant. Le culot est de nouveau repris avec 3 ml d'une solution froide de TEG et incubé 5 min à la température de la pièce. On ajoute 6 ml d'une solution fraîche de 0.2 NaOH, 1 % SDS, on mélange en retournant plusieurs fois le tube et on laisse incuber sur la glace pendant 5 à 10 min. On ajoute 3 ml d'acétate de potassium (3 M K<sup>+</sup>, 5M Acétate), le tube est inversé plusieurs fois pour bien

mélanger on dépose ensuite le tube sur la glace pour 5 à 10 min et on centrifuge 10 à 20 min à 4°C à 5000-8 000 rpm. Le surnageant est soigneusement filtré à l'aide d'un filtre nylon (6µm de diamètre) dans un tube COREX propre. On ajoute au filtrat deux volumes d'éthanol à 95 % ou un volume d'isopropanol froid. On vortexe vigoureusement et on laisse sur la glace pour 10 min. On centrifuge ensuite à 12 000 rpm à 4°C à l'aide du rotor SS34 (Dupont) pendant 20 min. Le culot est lavé une fois avec 2 à 5 ml d'éthanol à 70 % froid, puis il est laissé sécher. On resuspend le culot dans 500 µl de TE pH8.0 on y ajoute 1 µl de RNase A à 20µg/ml et on incube 30 min à 37 °C. On procède à une extraction par un volume de phénol, une extraction par un volume d'un mélange de phénol-chloroforme 1:1 (v/v) et une dernière extraction par un volume de chloroforme. On ajoute un dixième de volume d'acétate de sodium 3M et deux volumes d'éthanol à 95 % froid. On mélange en vortexant fortement et on laisse le tube sur glace pour 10 à 15 min. Après le mélange est centrifugé 10 à 15 min à 12 000 g à +4 °C. Il est rincé une fois avec 500 µl d'éthanol à 70 % et séché à l'air. Ensuite on resuspend le culot, en ajoutant dans l'ordre, 480 µl d'eau distillée, 120 µl de NaCl 4 M et 600 µl de PEG 13 %. On mélange en agitant et on dépose le tube sur la glace pour 20 min, ensuite on centrifuge à 12 000 g à 4 °C pendant 10 à 15 min et on lave le culot avec 500 µl d'éthanol à 70%. Le culot est laissé sécher à l'air libre et resuspendu dans 100 µl de tampon TE pH 8.0. La concentration en ADN dans la préparation est évaluée par la lecture spectrophotométrique de l'absorbance d'une solution d'ADN diluée à 1/800 (dans de l'eau ou du TE) selon la règle de calcul décrite par Sambrook *et al.* (1989).

### 3. 12. ANALYSE DE SÉQUENCE D'ADN

Les réactions de séquençage ont été faites au niveau du service de l'Institut Armand-Frappier, spécialisé en la matière : le service de séquençage est sous la direction du Dr P. Tijssen du Centre de Recherche en Virologie. Elles ont été faites par la méthode enzymatique décrite par Sanger *et al.* (1977) en utilisant l'ADN polymérase du phage T7 et des kits de séquençage préfabriqués, en suivant les protocoles définis par les manufacturiers.

## 4. EXPRESSION DE GÈNES CLONÉS DANS *E. COLI* BL 21 (DE3)

### 4. 1. INDUCTION DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES RECOMBINANTES PAR L'IPTG

Un volume de 20 ml de milieu liquide LB, contenant le l'ampi à 100 µg / ml, est inoculé avec 200 µl de bouillon bactérien mis en culture la veille. Le milieu de culture est ensuite incubé à 37 °C, sous une agitation de 210 rpm, jusqu'à une densité optique (D.O) de 0.7 à 0.8 à 600 nm (phase de croissance exponentielle). Le milieu est ensuite additionné de 200 µl d'IPTG à 100 mM. Aussitôt après l'addition de l'inducteur, un volume de 1 ml de bouillon est prélevé pour analyse par SDS-PAGE (c'est le temps zéro, To, d'induction). Le reste de la culture est réincubé à +37 °C pour 2 à 3 heures. Au cours de cette réincubation, on procède à des prélèvements de 1 ml à des intervalles de temps de 30 min, 1 heure, 2 heures et 3 heures pour l'analyse de l'expression de la protéine cible sur gel de polyacrylamide.

## 4. 2. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR SDS-PAGE

Les échantillons de 1 ml de bouillon de culture, prélevés à différents moments de l'incubation, étaient placés dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml et centrifugés à 12 000 g pendant 2 à 3 min. Le culot cellulaire était resuspendu dans 100 µl de tampon de charge 1x et bouilli pour 3 à 5 min. Le tube était agité fortement, pour dénaturer l'ADN cellulaire. Après une centrifugation de 3 min à 12 000- 13 000 g, un volume de 10 ou 20 µl était mis dans un puits d'un gel de polyacrylamide à 10 %.

La préparation des gels, les tampons et les conditions d'électrophorèse étaient faits, essentiellement, selon les protocoles décrits par Sambrook *et al* (1989). L'appareillage utilisé pour l'électrophorèse des protéines était du type Mini-Protean II cell (Bio- RAD laboratories).

## 5. PRODUCTION MASSIVE DE PROTÉINE P1 DANS *E. COLI*

### 5. 1. INDUCTION DE L'EXPRESSION ET EXTRACTION DES CORPS D'INCLUSION.

Un bouillon de culture initial de la souche 408, contenant le plasmide recombinant pET-P1, est préparé comme précédemment décrit en 4.1. Le lendemain matin, un volume de 250 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline et placé dans un Erlenmeyer d'un litre est inoculé avec 2.5 ml (rapport final 1/100) de la suspension bactérienne préparée la veille. Après

inoculation l'Erlenmeyer est placé dans un incubateur à 37 °C sous une forte agitation (210-220 rpm) jusqu'à ce que la densité optique des cellules à 600 nm atteigne 0.8 à 0.9 . L'expression de la protéine P1 est alors induite par addition de 3.75 ml d'une solution d'IPTG à 100 mM (pour atteindre une concentration finale de 1.5 mM). Après l'addition de l'inducteur, l'IPTG, 1 ml de bouillon est prélevé pour servir de témoin négatif d'induction (T<sub>0</sub> d'induction) et le reste de la culture est réincubé à 37 °C pour 5 heures. A la fin de cette période de réincubation, 1 ml de bouillon est prélevé et traité comme déjà décrit en 4.3.1. Ces échantillons de 1 ml prélevés aux temps T<sub>0</sub> et T<sub>5</sub> sont analysés par SDS-PAGE sur un gel de 10 %, pour vérifier l'expression de la protéine P1.

Le reste de la suspension bactérienne est transféré dans des flacons en plastique de 250 ml et centrifugé à 9 000 g pour 10 min à 4 °C dans une centrifugeuse SORVAL (DUPONT) à l'aide du rotor GSA 10 (Dupont). Après centrifugation, le surnageant est éliminé, le culot cellulaire est resuspendu dans 20 ml de tampon A [500 mM NaCl, 160 mM Tris HCl pH 8.0], transféré dans un tube en polypropylène de 50 ml et additionné de lysozyme en poudre à une concentration finale de 2mg/ml. La suspension, ainsi obtenue, est incubée 20 min à la température de la pièce. Après cette incubation, les cellules bactériennes sont lysées d'avantage par 4 cycles de congélation à -70 °C et décongélation à 37 °C. Le lysat cellulaire est placé sur glace et soumis à 8 cycles (de 30 sec chacun à puissance maximale) de sonication à l'aide d'un sonicateur, Braun-Sonic 2000 (BRAUN) et ensuite homogénéisé au polytron PCU-2-110 (Kinematica GMBH) à vitesse maximale. La suspension homogénéisée est transférée dans un tube COREX et soumis à une centrifugation de 20 min à 15 000 g à 4 °C dans une centrifugeuse SORVAL (Dupont) à l'aide du rotor SS34,

pour séparer le culot (contenant essentiellement les corps d'inclusions) des fractions solubles d'*E. coli*. Le culot de corps d'inclusions, contenant la protéine P1, est lavé une fois dans 10 ml de tampon A et recentrifugé à 15 000 g, 20 min à 4 °C, comme pour l'étape précédente.

Les corps d'inclusions sont dissouts dans 20 ml de tampon B [6 M Guanidine -HCl, 5 mM B- mércaptoéthanol, 0.1 % Tween 20, 500 mM NaCl, 160 mM Tris-HCl, PH 8.0] et incubés à la température de la pièce (en vortexant de temps à autre). Les protéines solubilisées sont séparées des fractions cellulaires insolubles par ultracentrifugation à 150 000 g pour 40 min à 4 °C en utilisant le rotor SW 41 (BECKMAN). Après cette ultracentrifugation, la phase soluble contenant les protéines dissoutes dans la guanidine-HCl est transférée, dans un tube propre et conservée à -70 °C avant de subir l'étape de purification

## **5. 2. PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ.**

### **5. 2. 1. Préparation de la résine NI-NTA.**

Un volume de 2.5 ml de résine NI-NTA<sup>MD</sup> (Qiagen, Californie) est placé dans un tube en polypropylène de 15 ml. La résine est lavée trois fois avec 10 ml d'eau distillée et ensuite équilibrée par trois lavages dans 10 ml (chacun) de tampon B.

### **5. 2. 2. Étape de purification**

On ajoute 10 ml de corps d'inclusions dissout dans le tampon B à la résine NI-NTA<sup>MD</sup> (Qiagen) équilibrée à l'étape précédente. On mélange la solution de protéines avec la résine en l'agitant doucement. Le tube est ensuite placé sur une plate forme rotative agitant lentement et ainsi incubé pour 45 min à la température de la pièce. Ensuite, on centrifuge à 1200 rpm à 4 °C pour 5 min pour séparer la résine du surnageant (phase soluble contenant les protéines non fixées à la résine). Ce surnageant est prélevé et placé dans un nouveau tube de 15 ml, il constitue le volume  $V_0$  ou volume exclu conservé pour analyse par SDS-PAGE. A la résine on ajoute 8 ml de tampon B, on agite à la température de la pièce pour 5 min, on centrifuge à 200 g pendant 5 min et on recueille le surnageant dans un nouveau tube en polypropylène de 50 ml, c'est la fraction de lavage. Cette opération de lavage est répétée deux autres fois. La protéine liée à la résine en est décrochée par des lavages de 10 ml de tampon B contenant les concentrations suivantes d'imidazole : 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM et 250mM. Ces lavages sont réalisés comme décrit ci-dessus. Les différentes fractions de protéines ainsi éluées, sont placées séparément dans des tubes en polypropylène de 15 ml et utilisées pour l'analyse ultérieure de la qualité de la purification sur gel SDS-PAGE.

### 5. 2. 3. Analyse de la qualité de la purification

Une portion des différents échantillons provenant de l'étape de purification ( $V_0$ , lavages, volumes élués par, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM et 250 mM d'imidazole) est préalablement précipitée au TCA 10 % avant d'être déposée sur gel SDS-PAGE, comme suit : 100  $\mu$ l de chaque fraction sont placés dans un tube Eppendorf de 1.5 ml, dilués par 600  $\mu$ l d'eau distillée et 700  $\mu$ l de

TCA 10 %. On mélange ensuite en vortexant et on dépose le tube sur glace pour 20 min pour précipiter les protéines. On centrifuge ensuite à 12 000 rpm pendant 15 min, le surnageant est jeté tandis que le culot est lavé deux fois avec 200 µl d'éthanol à 95 % froid. Après un séchage à l'air libre, le culot est resuspendu dans 20 µl de tampon de charge 1X de protéines additionné de 2 mM de B-mercaptoéthanol. Ce mélange est ensuite placé dans un bain bouillant pour 3 min, les 20 µl de protéines dissoutes sont alors chargés dans un puits d'un gel SDS-PAGE à 10 %. Les conditions d'électrophorèse sont celles décrites par Sambrook *et al.* (1989).

### 5. 3. DIALYSE DE LA PROTÉINE PURIFIÉE.

Après analyse de la qualité de la purification, les fractions très pures sont mises ensemble et sont soumises à une dialyse contre de l'eau distillée pour éliminer d'une part l'agent dénaturant (la Guanidine-HCl) et l'imidazole et obtenir d'autre part une protéine soluble. La dialyse est faite en plaçant un certain volume de protéine purifiée, provenant de l'étape précédente, dans des tubes à dialyse préparés selon un protocole établi par Sambrook *et al.* (1989) ; cette opération est faite, en immergeant les tubes contenant la protéine dans 1 litre d'eau distillée placée dans un bécher, à 4 °C pour 24 heures (en renouvelant le liquide trois fois) sous une légère agitation.

### 5. 4. DOSAGE DE PROTÉINE PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD MODIFIÉE.

La concentration en protéine du dialysat est estimée par un dosage des protéines utilisant la méthode de Bradford (1976) réalisée à l'aide d'un réactif de source commerciale « *Dye reagent concentrate, BIO-RAD PROTEIN ASSAY* » (Bio-RAD Laboratories). Cette méthode de Bradford est basée sur le principe que le pic de l'absorbance d'une solution acide de bleu de coomassie G-250 va du rouge au bleu à 595-600 nm après liaison aux groupements aminés libres des protéines. La courbe standard est faite en utilisant des concentrations connues de BSA (variant de 5 à 25 µg/ml). La lecture spectrophotométrique de l'absorbance est faite à 595 nm, en utilisant un blanc (contenant le réactif de Bradford dilué dans de l'eau). Deux dilutions de la protéine à doser (1/50, 1/100) étaient utilisées pour établir la concentration effective en protéine de la préparation.

## 6. PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI-P1 ET IMMUNODÉTECTION

### 6.1. IMMUNISATION DES LAPINS.

Deux lapins ont été immunisés avec trois doses différentes de corps d'inclusions purifiés de la protéine P1, afin de produire des anticorps polyclonaux anti-P1 du TuMV.

Les lapins ont été initialement inoculés avec une dose de 200 µg de protéine pure, administrée par voie intradermique selon un protocole standard en vigueur au service des animaleries de l'édifice 27 du CRV de l'Institut Armand-Frappier. Avant l'administration de cette première dose, environ 10 ml de sang ont été prélevés chez chaque animal. Les sérums provenant de ces

sangs sont les témoins négatifs (sérums pré-immuns) dans les tests ultérieurs d'immunodétection avec l'antisérum anti-P1.

Trois semaines après la première dose d'antigène, les lapins ont été inoculés avec une nouvelle dose de 350 µg de protéine P1 pure. L'administration de la troisième dose a été faite trois semaines après la seconde. Elle a consisté en l'injection d'une quantité de 450 µg de protéine par lapin. Avant d'administrer la troisième et dernière dose d'antigène, on a prélevé environ 10 ml de sang chez chacun des lapins (les sérums provenant de ces prélèvements sont utilisés comme antisérums de la deuxième immunisation destinés à évaluer la réaction sérologique des animaux).

Chaque dose d'antigène (quantité appropriée de corps d'inclusions purifiés de la P1) a été soigneusement mélangée avec une quantité précise d'adjuvant de RIBI<sup>md</sup> (RIBI immunochem, Californie) comme suit:

Les corps d'inclusion purs de la protéine P1 ont été resuspendus dans 2 ml de tampon PBS 1X. Cette suspension a ensuite été injectée à l'aide d'une seringue, dans le flacon d'adjuvant RIBI<sup>md</sup> préalablement chauffé 10 min à 45 °C (selon les indications du manufacturier). Le flacon est agité vigoureusement pour bien mélanger l'adjuvant et l'antigène.

Deux semaines après la troisième dose d'antigène, on a prélevé un échantillon de sérum chez chacun des lapins pour analyser le taux d'anticorps. Les animaux sont ensuite saignés à blanc pour recueillir de grandes quantités d'antisérums.

## 6. 2. ADSORPTION D'ANTISÉRUM SUR LYSAT TOTAL D'*E. COLI*

### 6. 2. 1. Préparation du lysat total d'*E. coli*

Un bouillon de culture fraîche, de 10 ml (milieu LB avec ampi à 100 µg/ml) à 37 °C de la souche 429 (*E. coli* XL1 Blue contenant le plasmide pET-P1), est utilisé pour inoculer 1 litre de milieu LB-Ampi 100 g/ml (réparti en raison de 250 ml par erlenmeyer de 1000 ml). Après inoculation, les Erlenmeyers sont incubés à 37 °C, pour une nuit, sous une forte agitation (210 rpm). La suspension cellulaire est transférée dans des flacons de 250 ml et soumise à une centrifugation de 10 min à 5 000 rpm à 4 °C. Le culot est ensuite resuspendu dans 20 ml de tampon A et les cellules sont lysées. Après l'étape de centrifugation à 15 000 g pendant 20 min, le surnageant (contenant les protéines solubles de *E. coli*) est transféré dans un tube en polypropylène de 50 ml et conservé à -20 °C pour l'adsorption avec l'antisérum.

### 6. 2. 2. Adsorption d'antisérum sur lysat de *E. coli*

Le protocole utilisé est celui décrit par Sambrook *et al.* (1989) et qui consiste essentiellement à incuber 4 heures à température ambiante, sous agitation constante, un mélange contenant 200 µl d'antisérum anti-P1, 1800 µl de tampon TNT (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % gélatine, 0.05 % Tween 20), 3 % BSA, 1000 µl de lysat total *E. coli*. Après l'incubation, le mélange est transféré dans un tube COREX de 10 ml et centrifugé à 15 000 g pour 20 min à 4 °C. Le surnageant est transféré dans un tube propre et additionné de 1500 µl de lysat de *E.coli*. Ce mélange est réincubé et traité comme ci-dessus décrit, ce

traitement est répété une troisième fois en ajoutant un volume adéquat de lysat bactérien. On ajoute ensuite 225 µl (soit 10 % du volume total) de tampon TNT contenant 3 % BSA et 0.05 % d'azide de sodium du mélange avant de le conserver à 4 °C pour usages ultérieurs.

### **6. 3. IMMUNODÉTECTION**

#### **6. 3. 1. Transfert sur membrane de nitrocellulose**

Les protéines, après séparation par électrophorèse sur un gel 10 % SDS-PAGE, sont transférée sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil appelé le *trans-blot cell* (Bio-RAD) selon les recommandations du manufacturier, en utilisant un tampon de transfert de protéine sur nitrocellulose. Le transfert se fait en 1 heure à 100 v (200 mA).

#### **6. 3. 2. Immunodétection enzymatique.**

Après le transfert des protéines, la membrane de nitrocellulose est placée dans un petit bac plastique à couvercle contenant 10 ml de solution bloquante (5g lait en poudre écrémé dissout dans 100 ml de PBS 1X avec 0,02 % d'azide de sodium). On laisse incuber 30 min à la température de la pièce, sous agitation sur une plateforme rotative. On ajoute ensuite à la membrane 25 µl d'antisérum préparé à l'étape 6.2.2 (dilution finale de l'anti-P1 = 1/10 000). On laisse incuber une nuit à la température ambiante sous agitation. Le lendemain matin, la membrane est lavée trois fois avec environ 250 ml/lavage de solution

PBS-Triton 0.5 % ( 100 ml PBS 1x, 895 ml Eau, 5 ml Triton 100). On lave ensuite une fois avec 250 ml de Tris-NaCl, pH.7.5 (50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl). On incube la membrane, 1 heure en agitant, dans la solution bloquante en présence de 5 µl de conjugué (anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase). On lave quatre fois avec du Tris-NaCl, pH 7.5 . On révèle ensuite en ajoutant à la membrane une solution de substrat DAB (le temps de révélation dépend de la quantité de protéine transférée sur la membrane).

## 7. PRODUCTION DE FRAGMENTS D'ARN SYNTHÉTIQUE

### 7.1. TRANSCRIPTION *IN VITRO*

Pour produire des sondes d'ARN marquées et non marquées, nous avons utilisé la méthode de la transcription *in vitro* utilisant l'ARN polymérase du phage T7, décrite par Stern and Grissem (1987). Les réactions de synthèse ont été faites à l'aide du kit commercial de transcription *in vitro* : «Riboprobe<sup>md</sup> II coresystem, T7 RNA Polymerase» (Promega, WI) . Les mélanges réactionnels contenaient 1 à 2µg de plasmides linéarisés et les autres composants nécessaires à la synthèse d'ARN. Les quantités respectives de ces différents composants ainsi que le protocole utilisé, étaient ceux définis par le manufacturier. Pour les sondes ARN radiomarquées, du [<sup>32</sup>P] UTP était ajouté au mélange réactionnel à une concentration finale de 50 µCi (soit 5 µl d'une solution fraîche d'UTP - <sup>32</sup>P à 10 mci/ml). La réaction de synthèse était faite par incubation du mélange à 37 °C pendant trois heures. A la fin de cette incubation, la réaction était arrêtée par addition d'une unité de DNase I au milieu, suivi d'une incubation

de 15 min à 37 °C ( pour digérer la matrice plasmidique). On ajoute ensuite 100 µl de tampon TE et on extrait deux fois au phénol-chloroforme 1 : 1 (V/V) une fois au chloroforme (pour éliminer toutes protéines du milieu). L'ARN synthétisé est ensuite précipité, par un dixième de volume d'acétate de potassium et deux volumes d'éthanol à 95 % froid.. A la fin de la précipitation à -70 °C pendant 30 min, le mélange était centrifugé 15 min à 13 000 g et le culot d'ARN était lavé avec 300 µl d'éthanol à 70 %. Après un séchage du culot, l'ARN était ensuite resuspendu dans 30 µl de TE/DEPC. Il est à noter que le matériel et tous les réactifs, utilisés dans cette synthèse, étaient au préalable traités au DEPC et stériles selon les recommandations de Sambrook *et al* (1989). Un microlitre de l'ARN, dissout dans du TE/DEPC, était placé dans un tube contenant 5 ml de TCA 10 % froid. L'ARN était précipité en plaçant le tube sur glace pendant 20 à 30 min. Le contenu du tube était ensuite filtré sur un disque de fibre de verre GF/C (Whatmann) préalablement mouillé par 5 ml de TCA 10 % froid. Après deux lavages avec 10 ml de TCA 10 %, le disque était placé dans un flacon de comptage, séché à l'air, dissout dans 5 ml de liquide à scintillation Cytoscint (ICN). La radioactivité contenue dans le filtre était comptée à l'aide d'un compteur gamma, pour le calcul de l'activité spécifique de la sonde ARN. L'analyse de la qualité, de l'intégrité et de la quantité approximative de l'ARN transcrit, était faite par électrophorèse sur un gel dénaturant d'agarose pour ARN.

## 7. 2. GEL DÉNATURANT D'AGAROSE POUR ARN.

L'électrophorèse de l'ARN a été faite sur un gel d'agarose dénaturant à 1% préparé dans du tampon MOPS 1x (contenant 660 mM de formaldéhyde) selon

un protocole décrit par Fourney *et al.* (1988). Les échantillons à analyser sur gel sont préparés comme suit : 5  $\mu$ l de l'ARN dissout dans le TE sont additionnés de 25  $\mu$ l de tampon de charge 1.2X pour ARN et de 1  $\mu$ l de Bet à 10 mg/ml. Ce mélange est ensuite chauffé 15 min à 65 °C , pour dénaturer l'ARN, et chargé sur gel. L'électrophorèse est faite dans du tampon MOPS 1X à 80 v pendant 2 heures. Un mélange d'ARN, de source commerciale (GIBCO), contenant des fragments de tailles différentes (0.24-9.5 kb) est utilisé comme marqueurs de poids moléculaires. Après l'électrophorèse, les bandes d'ARN peuvent être visualisées et photographiées, au besoin, sur une lampe UV.

## 8. ESSAIS DE LIAISON PROTÉINE P1-ACIDES NUCLÉIQUES

### 8.1. GEL DE RETARDEMENT

Les expériences de gel de retardement ont été faites pour étudier la liaison coopérative de la P1 aux sondes d'ARN simple brin radiomarquées et pour évaluer la stabilité des complexes, P1-ARN, dans différentes concentrations de sels. Dans ces expériences, différentes quantités de la P1 soluble et pure furent incubées pendant 45 min à 4 °C dans 20  $\mu$ l de tampon C [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1mM EDTA] avec 10 ng de sondes ARN marquées à l'UTP [<sup>32</sup>P].

Après incubation, les mélanges réactionnels sont additionnés de 4  $\mu$ l de tampon de charge 6X pour ADN, chargés sur gels non dénaturants de polyacrylamide à 5 % et soumis à l'électrophorèse. La préparation des gels et les conditions électrophorétiques sont adaptées de protocoles décrits par Sambrook

*et al* (1989). Après électrophorèse, les complexes protéine-acides nucléiques sont détectés par autoradiographie des gels exposés à des films KODAK X-AR (KODAK, ROCHESTER, NY).

## 8. 2. LIAISON CROISÉE ENTRE LA P1 ET L'ARN PAR LA LUMIÈRE UV.

Cette expérience, qui consiste à transformer les liaisons électrostatiques, entre une protéine et un acide nucléique, en liaisons covalentes plus fortes, est aussi appelée " *UV Light cross-linking*" des complexes protéines-acides nucléiques. Ces expériences ont été faites selon un protocole décrit par Citovsky *et al* (1990). Les mélanges réactionnels, qui contenaient 2 ng de sonde ARN marquée et différentes quantités de protéines solubles étaient préparés dans du tampon C pour un volume final de 10 µl. Après une incubation de 45 min à 4 °C, les mélanges furent irradiés avec 1.8 joules de lumières UV fournie par un appareil appelé GS GENELINKER UV chamber (BIO-RAD Laboratories). Les ARN non liés aux protéines sont ensuite digérés avec 5 µg de RNase A. Les mélanges furent chargés sur des gels SDS-PAGE à 10 % l'électrophorèse des complexes ARN-protéines, la coloration des gels au bleu de Coomassie et leurs autoradiographies furent réalisées comme décrit par Sambrook *et al.* (1989).

## 8. 3. RÉTENTION DES COMPLEXES P1- ACIDES NUCLÉIQUES SUR FILTRE

Elle est basée sur la capacité que possèdent les filtres de nitrocellulose ou de fibres de verre à lier, de manière irréversible, les complexes protéines-acides nucléiques. Cette expérience est également appelée "*Filter binding experiment*".

Elle a été utilisée pour étudier les effets des concentrations croissantes de sels (NaCl et KCl) sur la liaison de la protéine P1 aux sondes ARN ainsi que pour les essais de compétition entre différents acides nucléiques. Les mélanges de réactions ont été faits dans un volume total de 10  $\mu$ l de tampon D [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0] contenant des quantités variables de NaCl, 1  $\mu$ g de P1 soluble et 10 ng de sonde ARN radiomarquée. Les échantillons furent incubés à 4 °C pendant 45 min. Après l'incubation, ils furent dilués dans 1 ml du même tampon D et appliqués sur un disque de filtre GF/C (Whatmann) prémouillé avec 2.5 ml du tampon D. Les filtres furent lavés avec 10 ml du même tampon, placés dans des flacons de comptage, séchés à l'air sous une hotte chimique, recouverts avec 5 ml de liquide de scintillation Cytoscint<sup>md</sup> (ICN Biochemicals) et comptés.

Les expériences de compétition ont été faites comme décrit ci-dessus pour les effets des sels, avec les exceptions que les échantillons furent préparés dans un volume total de 10  $\mu$ l de tampon C, 10 ng d'ARN [<sup>32</sup>P], 1  $\mu$ g de P1 soluble et des quantités variables de compétiteurs (acides nucléiques simple ou double brin) non marqués.

## RÉSULTATS

---

## 1. CONSTRUCTION DE PLASMIDES RECOMBINANTS

### 1.1. CONSTRUCTION DU PLASMIDE pET-P1

Pour produire la protéine P1 du TuMV chez *Escherichia coli*, son gène a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides YS1 et YS2 à partir d'un ADNc complet du virus disponible au laboratoire. L'oligonucléotide YS1 (amorce 5') a permis d'introduire un site de restriction NcoI dans le gène de la P1. Un autre site de restriction XhoI a également été introduit en 3' du gène à l'aide de l'amorce YS2. Le site NcoI, CCATGG, contient le codon d'initiation de la transcription. Après l'amplification par PCR, l'ADN du gène de la P1 a été précipité par de l'éthanol 95 % et dissout dans du tampon TE. Une quantité d'environ 1 µg de cet ADN a été digéré par les endonucléases de restriction NcoI et XhoI. Après électrophorèse de cette digestion sur un gel d'agarose à 0.8 %, la bande de 1086 pb correspondant au gène de la protéine P1 a été prélevée et purifiée. Le plasmide pET-21d a été digéré par les mêmes enzymes NcoI et XhoI, débarrassé des composés protéiques par extractions phénol-chloroforme 1:1 (V : V) et chloroforme, précipité et dissout dans du tampon TE.

L'introduction de l'insert (le gène de la P1) dans le plasmide digéré a été faite par une réaction de ligation contenant un rapport 3/1 (trois parties d'insert pour une partie de vecteur). L'introduction de l'insert dans le vecteur se fait de manière dirigée puisque les extrémités cohésives créées par les enzymes sont complémentaires et s'apparient donc entre elles. Le rapport 3/1 a été choisi

pour maximiser le nombre de plasmides recombinants contenant le bon insert. Un volume de 2 à 5  $\mu$ l de la réaction de ligation a été utilisé pour transformer des bactéries compétentes *E. coli* XL1 blue. Comme témoins négatifs de la transformation, des bactéries *E. coli* XL1, ont été transformées d'une part avec du vecteur digéré par les enzymes NcoI et XhoI (sans insert) et d'autre part avec une réaction contenant l'insert et le vecteur mais sans enzyme T4 ADN ligase.

Une centaine de colonies transformantes ont été soigneusement repiquées sur un nouveau milieu de culture solide. Après croissance des bactéries, les colonies bien isolées et identifiées ont été adsorbées sur membrane de nitrocellulose et soumises à la réaction d'hybridation *in situ*. Cette réaction d'hybridation a permis l'identification des clones positifs en utilisant une sonde non radiomarquée préparée avec l'ADN de la P1.

Les plasmides d'une dizaine de colonies positives ont été extraits par minipréparations d'ADN. Ces ADN ont ensuite été soumis à des réactions de digestions par les enzymes NcoI et XhoI. Les différents fragments d'ADN générés par les endonucléases ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 %. Seuls les plasmides contenant des fragments d'ADN d'une taille égale à 1086 pb ont été retenus comme contenant le bon insert. Une fraction de l'ADN du gène de la protéine P1, provenant du PCR, a été utilisée comme témoin positif de l'insert, tandis que le plasmide pET-21d linéarisé par NcoI a servi de témoin du vecteur.

Les ADN de trois des plasmides recombinants retenus ont été isolés en grande quantité et ont été séquencés. L'analyse des séquences obtenues a permis

d'identifier le plasmide contenant le bon gène de la protéine P1. Le plasmide recombinant, ainsi caractérisé, a été dénommé pET-P1 (figure 7) et la souche d'*E. coli* XL1 qui en contient a été congelée (souche 429).

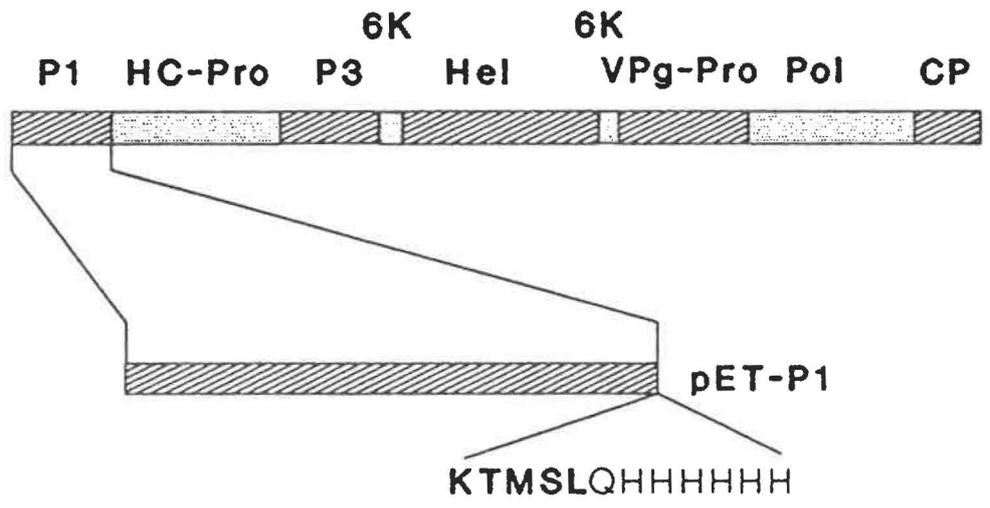
Le plasmide pET-P1 de la souche 429 a été utilisé pour transformer des bactéries compétentes *E. coli* BL 21(DE3). La souche BL21 (DE3), contrairement à la souche XL1, permet l'expression de protéines codées par le plasmide pET puisqu'elle contient une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle du promoteur lac UV5.

La présence du plasmide pET-P1 dans les bactéries BL21 (DE3) a été vérifiée par une minipréparation d'ADN plasmidique suivie d'une analyse du profil de digestion par les enzymes NcoI et XhoI. Ainsi les bactéries BL21 (DE3) contenant le plasmide pET-P1 ont été utilisées pour la production de la protéine P1 par induction de son expression par l'IPTG. Les bactéries *E. coli* BL21(DE3) contenant le plasmide pET-P1 ont été congelées sous le numéro 408.

**FIGURE 7:** Construction du plasmide recombinant pET-P1.

Le génome du TuMV est représenté en haut avec les régions codantes indiquées par des cases.

La séquence d'acides aminés, en lettre unique, représente les 12 résidus de la P1 recombinante: les amino-acides, en caractère gras, sont codés par le virus tandis que les résidus, en caractère normal, sont d'origine plasmidique.



## 2. EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

### 2.1. EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTÉINE P1

Pour tester ses activités de liaison aux acides nucléiques, la protéine P1 devrait être produite et purifiée en grande quantité.

Dans le but de tester la capacité de la souche 408 à produire la protéine P1 une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle a été induite par l'IPTG. L'expression de la protéine par les bactéries a été ensuite analysée à partir de différents échantillons du bouillon d'induction prélevés aux temps zéro, 30 min, 1 heure, 2 heures et 3 heures post-induction. Des aliquots de 10  $\mu$ l, de chacun de ces échantillons, ont été chargés sur un gel de polyacrylamide à 10 %. Un aliquot de 10  $\mu$ l d'un bouillon d'induction de la souche 393 (exprimant la protéine CI) a été déposé sur le même gel comme témoin positif. Après électrophorèse des protéines et coloration du gel au bleu de Coomassie, l'analyse du patron protéinique des différents échantillons a permis de déceler l'apparition d'une bande intense de protéine de 40kDa dans les échantillons des temps 30 min, 1, 2 et 3 heures. Cette bande à 40 KDa correspond bien à la taille attendue de la protéine P1 du TuMV (poids moléculaire déduit de sa séquence nucléotidique). Ainsi, l'on a pu déduire que la protéine P1 était bien exprimée par la souche 408 et que l'expression augmentait avec le temps. Une bande de protéine CI était également détectable dans l'échantillon provenant du bouillon d'induction de la souche 393.

La localisation intracellulaire de la protéine P1 exprimée par la souche 408 a été déterminée. En d'autres termes, il s'agissait de savoir si la P1 était produite sous forme soluble (dans le cytoplasme) ou insoluble (corps d'inclusions cytoplasmiques). Pour ce faire, les cellules bactériennes exprimant la protéine P1 ont été collectées par centrifugation, résuspendues dans un tampon approprié. Les cellules bactériennes furent lysées par addition de lysozyme et sonication. Après leur séparation par centrifugation, les surnageants et les culots furent préparés pour l'analyse de leur patron protéinique sur gel SDS-PAGE à 10 %. Ceci a permis de constater qu'aucune trace de protéine P1 n'était présente dans la fraction soluble tandis qu'elle était détectable dans le culot. Cette protéine était produite sous forme de corps d'inclusions cytoplasmiques insolubles.

En vue d'obtenir une forme soluble et active de la protéine P1 l'induction de son expression a été faite à des températures plus basses que 37°C (température à laquelle la protéine est produite sous forme insoluble). Parfois les protéines peuvent être produites sous formes solubles à plus faibles températures. La protéine P1 a ainsi été exprimée par la souche 408 à 20, 30 et 37 degrés Celsius. L'analyse de l'expression de la P1, par SDS-PAGE, a permis de noter que cette protéine était produite, en quantités identiques, à chacune des températures d'induction. Toutefois, *E. coli* exprimait toujours la P1 sous forme de corps d'inclusion insolubles à 20, 30, et 37°C, aucune protéine recombinante n'était présente dans les fractions cellulaires solubles.

L'obtention d'une protéine P1 native soluble s'avérant impossible, il a été décidé d'en produire une grande quantité sous forme de corps d'inclusion

insolubles destinés aux essais de renaturation. L'expression de la protéine P1 a été induite par ajout d'IPTG à un volume de 250 ml de culture bactérienne, en phase de croissance exponentielle à 37°C. Cinq heures post-induction, l'expression de protéine P1 fut analysée, à partir d'un échantillon de bouillon de culture, par SDS-PAGE. On observe une très forte expression de protéine P1 par la souche 408 au cours des cinq heures de culture (fig 8, puits 2). La protéine P1 produite serait estimée à environ 50 % des protéines totales de *E. coli*. Le culot bactérien a été collecté et les cellules lysées pour séparer les corps d'inclusions de la fraction soluble. Ces corps d'inclusions furent ensuite dissous dans un tampon dénaturant contenant de la Guanidine 6M. La solution de protéine a été placée dans un tube contenant de la résine NI-NTA<sup>MD</sup> et la protéine P1 fut séparée des autres protéines cellulaires par chromatographie d'affinité grâce à la queue d'histidines qu'elle contient. Les protéines retenues par la résine furent éluées par différentes concentrations d'imidazole. Cette purification, en une seule étape, donnait une protéine P1 qui ne donne qu'une seule bande majeure révélée par coloration au bleu de Coomassie d'un gel de polyacrylamide (fig 8, puits 3).

**FIGURE 8:** Expression et purification de la protéine P1.

Gel SDS-PAGE de 10% coloré au bleu de Coomassie montrant les protéines totales de *E. coli* contenant le plasmide pET-21d.

To d'induction (puits 1);

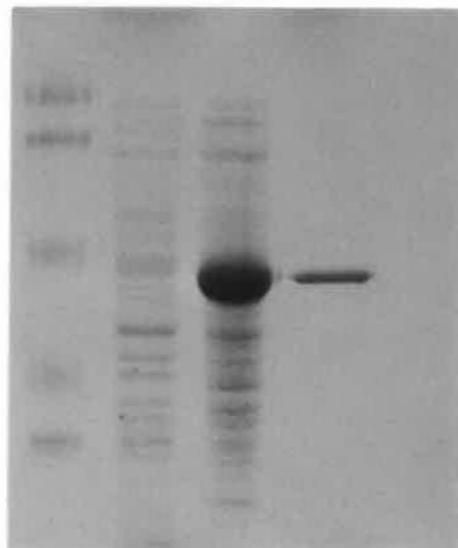
les protéines de *E. coli* exprimant la P1 5 heures post-induction (puits 2);

la protéine P1 purifiée par chromatographie sur résine NiNTA<sup>MD</sup>(puits 3).

Les marqueurs de poids moléculaires sont mentionnés à gauche.

1 2 3

106 kDa—  
80 kDa—  
49 kDa—  
32 kDa—  
27 kDa—



La concentration en protéine P1 de la fraction ainsi purifiée, a été déterminée par la méthode de Bradford en utilisant des concentrations connues de BSA pour la courbe standard. Ainsi la production de protéine P1 purifiée a été estimée à 10 mg par 100 ml de culture bactérienne.

### **3. RENATURATION DE LA PROTÉINE P1 PURIFIÉE**

La protéine P1 a été solubilisée par un agent dénaturant, la guanidine-HCl pour en faciliter la purification. Ainsi, on a obtenu une protéine pure mais biologiquement inactive. Elle a donc besoin d'être renaturée ou solubilisée dans sa conformation tertiaire naturelle afin de recouvrer son activité.

La renaturation se fait généralement par une dilution graduelle de l'agent dénaturant, ce qui assurerait une reformation des ponts disulfures appropriés. Il n'existe, cependant, aucun protocole standard de renaturation de protéines purifiées dans des conditions dénaturantes. En règle général, il est admis qu'elle devrait se faire lentement dans une solution diluée, afin d'éviter la formation d'aggrégats insolubles, ayant un potentiel redox assez proche de l'équilibre cystéine réduite / cystéine oxydée. L'addition de glutathion réduit et oxydé au tampon de dialyse favoriserait le maintien d'un tel équilibre.

En accord avec les principes ci-dessus cités, plusieurs essais de renaturation de la P1 ont été faits. La fraction de protéine purifiée a été dialysée contre différents tampons contenant des concentrations variables d'agents redox comme les glutathions réduit et oxydé en présence de 50 mM Tris.HCl pH 8.0 et de 150 mM NaCl. A chaque fois, la protéine précipitait aussitôt que l'agent

dénaturant fût totalement éliminé. D'autres tampons de dialyse contenant du DTT et/ou du glycérol avec du Tris.HCl et du NaCl (aux concentrations respectives de 50 mM et 150 mM) furent également utilisés sans succès. Tous ces tampons ont la caractéristique commune de contenir de fortes concentrations de sels :Tris.HCl et NaCl. Pour évaluer l'effet de cette forte concentration ionique sur la solubilité de la P1 purifiée, elle a été dialysée contre de l'eau distillée. Après l'élimination totale de la guanidine, la protéine P1 est restée soluble à 100 % puisqu'aucun précipité n'était visible suite à l'ultracentrifugation du dialysat. Ainsi sachant qu'elle était soluble dans l'eau, la solubilisation de la P1 fut tentée dans des tampons contenant de faibles quantités d'électrolytes (10 mM Tris-HCl pH 6.9 ou pH 9.0, 20 mM NaCl). Il fut agréable de constater que la protéine restait totalement soluble après élimination complète de l'agent dénaturant. La précipitation de la protéine P1, dans les autres tampons de dialyse, était plutôt attribuable aux concentrations ioniques qu'aux pH de ces solutions.

L'activité de la protéine P1 ainsi solubilisée, par dialyse, contre de l'eau ou du tampon, fut déterminée par sa capacité à lier une sonde d'ARN *in vitro*.

#### 4. OBTENTION DE SÉRUM DIRIGÉ CONTRE LA P1.

Dans le but d'obtenir un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine P1 du TuMV, deux lapins ont été immunisés avec trois doses de corps d'inclusions purifiés. A la fin de la période optimale d'immunisation, des sérums furent prélevés des lapins, adsorbés sur un lysat total de *E. coli*, pour en

débarasser les anticorps anti-coli. Pour déterminer si les antisérums possèdent un titre élevé d'anticorps anti-P1, des tests d'immunodétection furent réalisés.

L'immunodétection est basée sur la capacité d'un anticorps (dit primaire) à détecter un antigène précis dans un mélange complexe. Le complexe antigène-anticorps formé est révélé grâce à une réaction colorimétrique impliquant un deuxième anticorps (dit secondaire) dirigé contre le premier et couplé à un groupement rapporteur. La méthode d'immunodétection utilisée fut celle du «Western blot» qui consiste à transférer un antigène sur un support solide (généralement une membrane) avant de le mettre en contact avec l'anticorps.

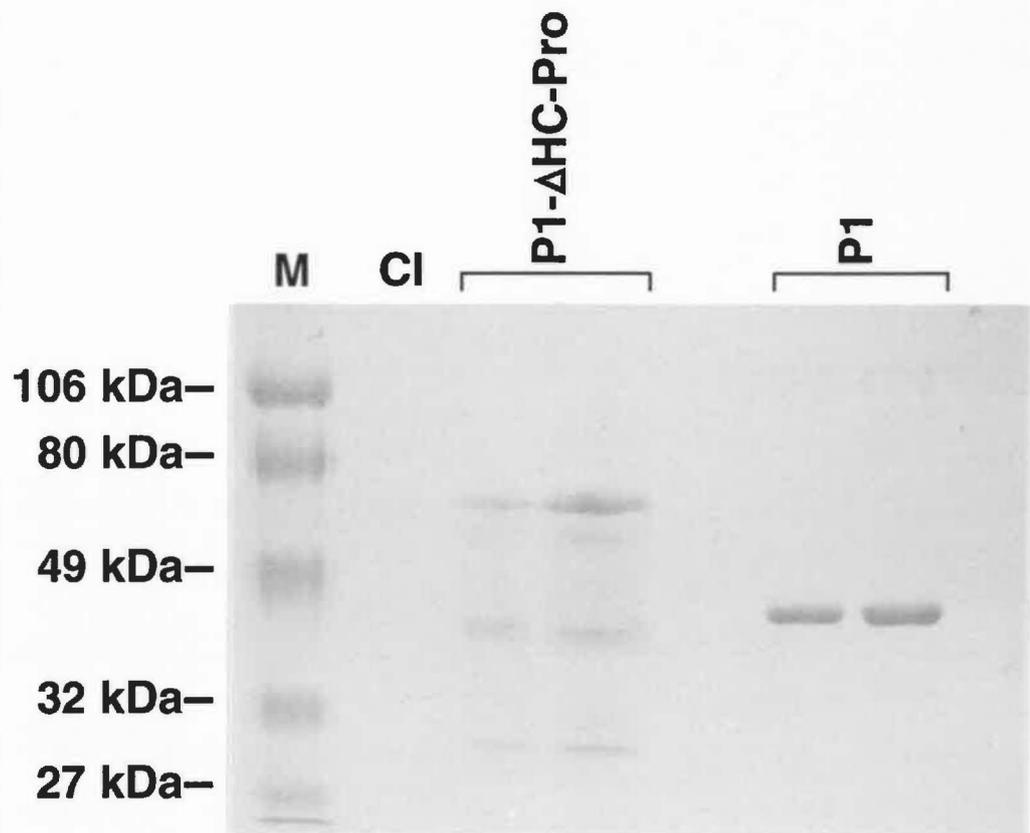
Les souches 496 et 393 ont été induites. Des aliquots, prélevés trois heures après induction, ont été préparés et différents volumes mis sur un gel de polyacrylamide à 10 %. La souche 393 qui exprime la protéine CI du TuMV a été utilisée comme témoin négatif pour établir si l'anticorps détectait la P1 de façon spécifique. Deux aliquots de l'induction de la souche 496 ont été déposés sur le même gel. Un volume de 10  $\mu$ l de corps d'inclusions de la protéine P1 purifiés ayant servi à l'immunisation des lapins ont été mis sur le gel de même que 15  $\mu$ l de la P1 solubilisée. Après séparation électrophorétique, les protéines furent transférées sur membrane de nitrocellulose. Deux gels identiques ont été préparés de la même manière et transférés sur des membranes distincts. Une des deux membranes a été incubée avec le sérum préimmun de lapin. La seconde membrane a été incubée avec l'antisérum de lapin et elle devrait contenir des bandes de complexes antigènes-anticorps.

**FIGURE 9:** Immunobuvardage avec un antisérum dirigé contre la protéine P1.

Les puits P1 representent les protéines totales de *E. coli* exprimant la P1 (à gauche M est le marqueur de poids moléculaire)

CI represente le puits dans lequel un aliquot de protéines totales de *E. coli* exprimant la protéine CI a été déposé.

Les puits P1- $\Delta$ HC-Pro contiennent respectivement 10  $\mu$ l (à gauche) et 20  $\mu$ l (à droite) de protéines de *E. coli* exprimant la P1- $\Delta$ HC-Pro et la fraction purifiée et renaturée de la P1 (à droite).



La figure 9 montre les résultats de l'immunodétection avec l'antisérum anti-P1. Comme attendu, l'absence de bande majeure dans l'échantillon de la souche 393, suppose que l'antisérum ne détecte pas la protéine CI du TuMV (fig 9, puits CI). La grande dilution de l'anticorps (1/10 000) ne permet pas de détecter, non plus, les protéines de *E. coli* (absence de bruit de fond dans le puits CI). Cependant, l'anticorps réagit bien avec la P1- $\Delta$ HC-Pro ( une protéine contenant la totalité de la P1 et une portion de la HC-Pro) puisqu'on détecte deux bandes correspondant à cette protéine (fig 9, puits P1- $\Delta$ HC-Pro). Il est à noter, qu'en plus de la bande de la P1- $\Delta$ HC-Pro à environ 70 kDa, l'anticorps permet de détecter deux autres bandes à 30 kDa et 38 kDa respectivement. Ces protéines seraient soit des protéines de *E.coli* soit des fragments issus du clivage ou de la dégradation de la polyprotéine P1- $\Delta$ HC-Pro. Deux signaux sont détectés aux puits P1 et correspondent à la protéine P1, d'un poids moléculaire de 40 kDa. Alors l'anticorps réagit spécifiquement avec la protéine P1 puisqu'aucune protéine de *E. coli* n'est détectable dans le puits CI à la concentration d'antisérum utilisée.

## 5. ESSAIS DE LIAISON DE LA P1 AUX ACIDES NUCLÉIQUES.

### 5. 1. LA PROTÉINE P1 LIE L'ARN SIMPLE BRIN DU TUMV

Les interactions de la P1 avec les acides nucléiques ont été initialement évaluées par sa capacité à retarder une sonde radiomarquée dans un gel de retardement. Le gel de retardement, selon Lane *et al.* (1992), est basé sur

l'observation que la liaison d'une protéine à un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) conduit habituellement à la réduction de la mobilité électrophorétique de ce fragment dans un gel natif de polyacrylamide ou d'agarose. Parmi les multiples avantages de cette technique, il faudrait citer sa simplicité d'exécution et son faible besoin en matériels (protéine et acide nucléique). La préférence a été donnée aux gels natifs de polyacrylamide à cause surtout de leur facilité de manipulation. Étant donné que le TuMV est un virus à ARN, l'ARN simple brin semble être le substrat naturel de la P1. Alors, il semble plus juste d'évaluer sa capacité à lier l'ARN. Ainsi, une sonde d'ARN simple brin radiomarquée au  $^{32}\text{P}$  a été produite à partir d'un fragment de restriction du pET-P1. Cette sonde ARN de 380 nt était spécifique au TuMV, puisqu'elle correspond au tier 5' terminal du gène de la P1. Des concentrations croissantes de P1 purifiée et solubilisée ont été incubées avec une quantité fixe de sonde ARN. Les mélanges réactionnels ont ensuite été soumis à la séparation par électrophorèse sur gel non dénaturant de polyacrylamide.

La figure 10 est une autoradiographie d'un gel de retardement. Elle montre la liaison de la P1 à l'ARN marqué dérivé du TuMV. En l'absence de protéine, la sonde n'est pas retardée (figure 10, puits 1). Ce premier puits sert de repère pour faire la différence entre les formes libre et retardée de l'ARN. Aux concentrations de protéine inférieures à 200 ng (figure 10, puits 2 à 5), la mobilité de la sonde n'est pas affectée. Elle migre comme si aucune protéine n'était présente dans la réaction. Lorsque la quantité de P1 a atteint 200 ng, on observe deux types d'ARN (figure 10, puits 6), l'un retardé et l'autre totalement libre. Au fur et à mesure que la concentration de protéine augmente, on observe une réduction de la forme libre de l'ARN (figure 10, puits 7 à 10).

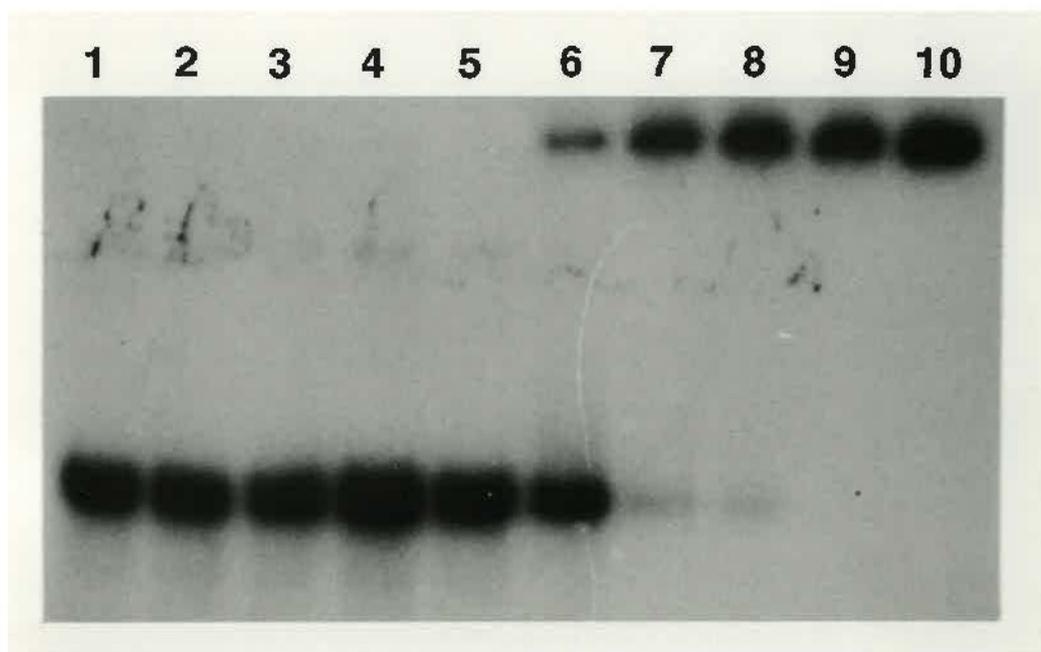
On n'observe sur le gel aucune bande de sonde partiellement retardée formant une sorte d'intermédiaire entre les formes complètement liées (donc retardées) et celles non liées. Ce profil de migration des complexes P1-ARN suggère que la liaison est de type *coopératif*. En général, selon Senear *et al.* (1991), la *coopérativité* d'une liaison entre une protéine et un acide nucléique peut être déduite de l'absence de formes intermédiaires entre les formes complètement liées (retardées) et les formes non liées. La liaison de la P1 à l'ARN simple brin semble respecter la loi du "tout ou rien" c'est à dire qu'aux concentrations de subsaturation de la protéine, on observe seulement deux sortes de sonde: une sonde libre et une sonde totalement retardée.

La grande différence dans la migration, entre les sondes libre et liée à la protéine, suggère que plus d'une molécule de P1 est liée à l'ARN. La liaison ne semble pas se faire au hasard et les monomères de P1 semblent se lier de façon continue sur une molécule d'ARN pour la recouvrir entièrement. Ceci donne alors naissance à des ARN recouverts *in extenso* tandis que les autres molécules de sonde restent libres.

**FIGURE 10:** Gel de retardement de la liaison de la protéine P1 à l'ARN.  
La sonde utilisée est le transcrit de 380 nt du plasmide pET-P1 linéarisé par Nde I et marquée au  $^{32}\text{P}$ .

10 ng d'ARN synthétique marqué au  $^{32}\text{P}$  est incubé avec des concentrations croissantes de P1 et soumis à l'électrophorèse dans un gel non dénaturant de polyacrylamide à 5% et autoradiographié

Puits 1, pas de P1; puits 2, 4 ng de P1; puits 3, 10 ng; puits 4, 40 ng;  
puits 5, 100 ng; puits 6, 200 ng; puits 7, 400 ng; puits 8, 800 ng;  
puits 9, 1300 ng; puits 10, 1700 ng.



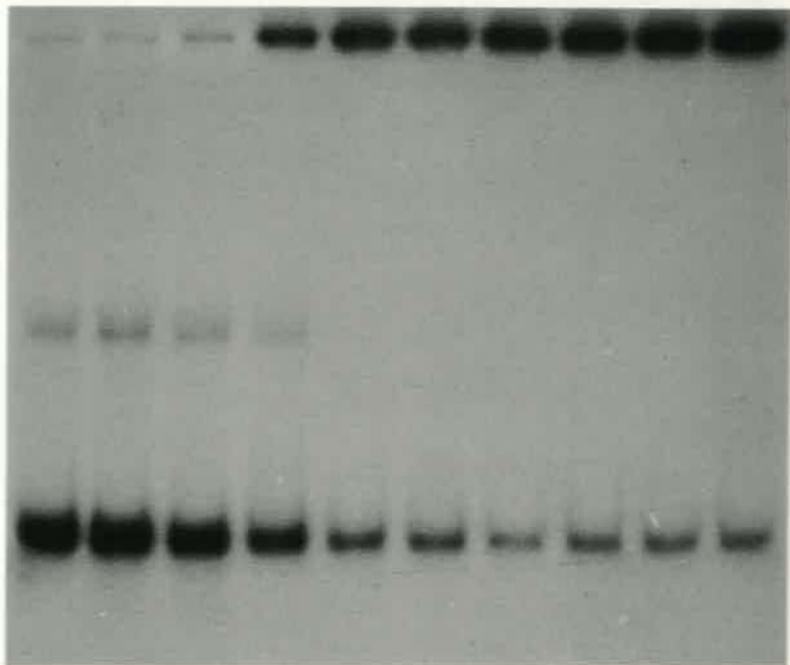
**FIGURE 11:** Gel de retardement de la liaison de la protéine P1 à l'ARN transcrit du plasmide pTZ5'.

Sonde ARN marquée au  $^{32}\text{P}$  de 130 nt.

Un mélange contenant 10 ng d'ARN et des concentrations croissantes de P1 est incubé, soumis à l'électrophorèse dans un gel natif de polyacrylamide à 5% et autoradiographié.

Puits 1, pas de P1; puits 2, 4 ng de P1; puits 3, 10 ng; puits 4, 40 ng; puits 5, 100 ng; puits 6, 200 ng; puits 7, 400 ng; puits 8, 800 ng; puits 9, 1300 ng; puits 10, 1700 ng.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



La capacité de la protéine P1 à lier une autre sonde d'ARN simple brin, dérivée du TuMV, a été évaluée. Pour ce faire, une sonde d'ARN marqué au  $^{32}\text{P}$  a été synthétisée à partir d'un fragment de restriction du plasmide pTZ5' (Basso *et al.* 1994). La sonde d'ARN simple brin, ainsi produite, correspond aux 130 nt du 5'NTR du TuMV. La liaison de la P1 à cette sonde a été testée par gel de retardement. Des cocktails, contenant une quantité fixe de sonde radiomarquée et des concentrations croissantes de P1 ont été soumis à l'électrophorèse après un délai d'incubation favorisant la formation de complexes ribonucléoprotéiques. La figure 11 représente une autoradiographie du gel de retardement de la liaison P1 à la sonde ARN pTZ5'. Le puits 1 de cette figure, montre le profil de migration de la sonde en l'absence de protéine et il sert à la fois de témoin négatif de la liaison et de repère. Aux faibles concentrations de protéines (inférieures à 100 ng) on n'observe que des bandes de sondes libres migrant plus rapidement dans le gel (figure 11, puits 2 et 3). L'accroissement de la concentration de P1 provoque l'apparition de deux formes de sondes : une forme libre et les complexes formés par la liaison de la protéine à l'ARN, observables en haut du gel (figure 11, puits 4 à 10).

La P1 lierait également l'ARN simple brin du 5'NTR du TuMV de manière coopérative puisque l'on n'observe pas de formes de sonde incomplètement retardées. Comme pour la première sonde, il semble que plusieurs molécules de P1 se fixeraient à cette seconde sonde car on observe une grande différence entre les formes non liées et liées. Sur la figure 11, on peut observer que malgré les concentrations de protéine (jusqu'à 1700 ng dans le puits 10) il n'y a pas saturation totale de la sonde. Cette difficulté de la P1 à

saturer l'ARN du 5'NTR serait probablement due à une affinité réduite de la protéine pour son substrat. Cette faible affinité de la P1 serait causée probablement soit par la composition nucléotidique soit par la structure secondaire du 5'NTR du TuMV qui est très riche en A et U.

*Ainsi, la protéine P1 purifiée et solubilisée est capable de lier l'ARN simple brin et cette liaison est hautement coopérative.*

## 5. 2. LA LIAISON EST SPÉCIFIQUE À LA P1

La réduction de la mobilité électrophorétique des sondes marquées dans le gel pourrait être due à un artéfact des conditions expérimentales ou à une liaison non spécifique engendrée par les six résidus d'histidine. Une protéine de *E. coli*, présente en quantité même infime dans la protéine P1 purifiée, pourrait également être à l'origine de la liaison observée.

Afin de vérifier la présence d'artéfacts ou d'interactions non spécifiques, une expérience de liaison de la P1 à l'ARN simple brin a été faite en utilisant la BSA comme témoin. Des concentrations identiques de 500 ng et 1 µg de P1 et de BSA ont été incubées dans des mélanges réactionnels contenant une quantité fixe de sonde ARN. L'analyse du patron de migration de la sonde dans les différents échantillons, soumis à l'électrophorèse sur gel natif de polyacrylamide, révèle une absence de liaison de l'ARN à la BSA (figure 12, puits 3 et 5).

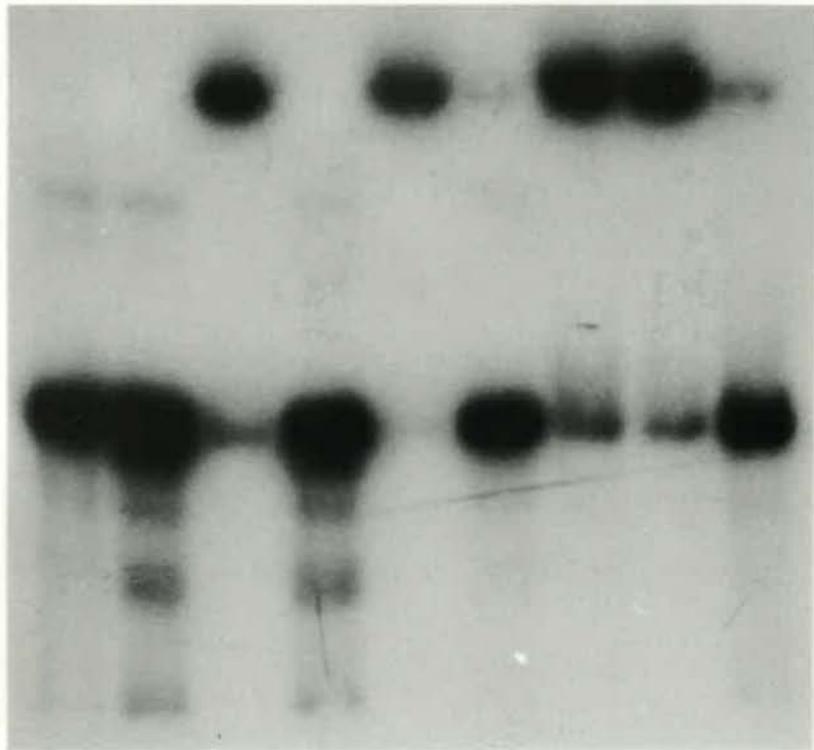
**FIGURE 12:** Spécificité de la liaison de la protéine P1 avec l'ARN. Gel de retardement avec la BSA.

La sonde ARN utilisée est le transcrit du pET-P1 (380 nt).

10 ng d'ARN sont incubés avec les quantités indiquées de protéines (P1 ou BSA), séparés par électrophorèse en gel natif de polyacrylamide de 5% et autoradiographié.

Puits 1, pas de protéine; puits 2, 500 ng de BSA; puits 3, 500 ng de P1; puits 4, 1 µg de BSA; puits 5, 1 µg de P1; puits 6, 500 ng de P1 dénaturée par la chaleur (65°C, 10 min); puits 7 et 8, 500 ng de P1 incubée en présence de 10 mM 2-ME ou 1.0 mM DTT respectivement; puits 9, 500 ng de P1 dénaturée par 4.0 M urée.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Les résidus d'histidine, fortement basiques, pourraient se lier à la sonde d'ARN grâce à des interactions électrostatiques, engendrant ainsi un retardement de cet acide nucléique. Pour discriminer l'implication de la queue d'histidines dans la liaison à l'ARN, la P1 a été préalablement dénaturée par la chaleur (incubation à 65°C pendant 10 minutes) et par un puissant agent dénaturant : l'urée 4 M, avant son incubation avec la sonde radiomarquée. Il apparaît que ni la P1 dénaturée par la chaleur (figure 12, puits 6) ni la P1 dénaturée par l'urée (figure 12, puits 9) ne conservent leurs capacités de liaison à l'ARN. L'addition d'agents réducteurs comme le 2-mercaptoéthanol (figure 12, puits 7) et le DTT (figure 12, puits 8), au tampon d'incubation, ne semble pas affecter la liaison de la P1 à la sonde.

Malgré les résultats ci-dessus décrits, la recherche d'une éventuelle participation des résidus d'histidine à la liaison de la P1 à son substrat a été poussée plus en profondeur. C'est ainsi que la capacité d'une protéine recombinante du TuMV, la VPg-Pro, produite chez *E. coli* et contenant également la queue d'histidine, à modifier la mobilité d'une sonde ARN radiomarquée dans un gel de retardement, a été analysée. Des quantités de 500 ng, 1 000 ng et 1500 ng de protéine VPg-Pro pure et soluble, ont été incubées en présence de la sonde ARN marquée au  $^{32}\text{P}$ . Le profil de migration de la sonde décelé par autoradiographie du gel de retardement après électrophorèse, montre une absence de liaison de l'ARN à la VPg-Pro (figure 13A, puits 3, 4 et 5). Les puits 1 et 2 montrent respectivement une sonde ARN non retardée et une sonde retardée à cause de sa liaison à la P1.

**FIGURE 13: Spécificité de la liaison de la protéine P1 avec l'ARN.**

La sonde ARN utilisée est transcrit du pET-P1 (380 nt).

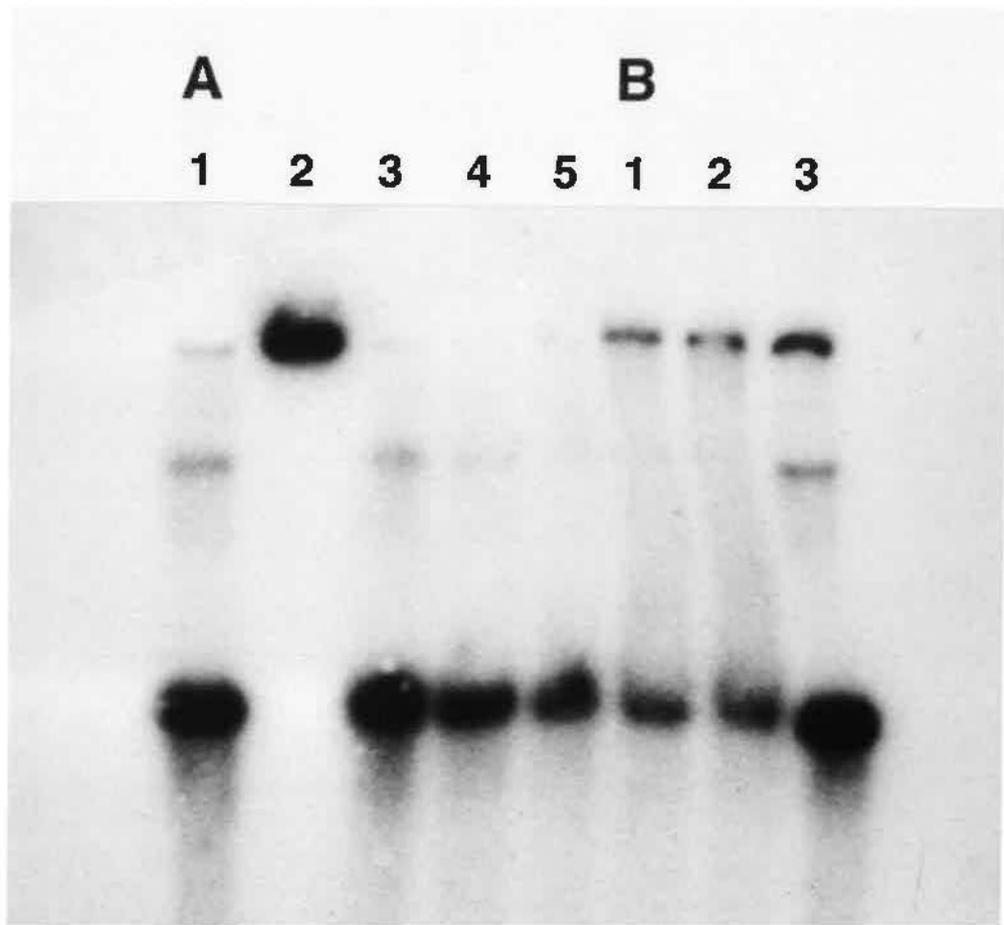
A) Gel de retardement avec la VPg-Pro.

10 ng d'ARN marqué au  $^{32}\text{P}$  sont incubés avec les concentrations indiquées de protéines, soumis à l'électrophorèse et autoradiographié.

Puits 1, sans protéine; puits 2, 500 ng de P1; puits 3, 500 ng de VPg-Pro; puits 4, 1  $\mu\text{g}$  de VPg-Pro; puits 5, 1.5  $\mu\text{g}$  de VPg-Pro.

B) Gel de retardement avec la P1 renaturée par dialyse contre le tampon (10 mM Tris.HCl, pH 8.0, 20 mM NaCl).

Puits 1, 500 ng de P1; puits 2, 1  $\mu\text{g}$ ; puits 3, 1.5  $\mu\text{g}$ .



L'activité de la P1, solubilisée par dialyse contre le tampon Tris-NaCl (10 mM Tris.HCl pH 8.0, 20 mM NaCl), a été testée par une expérience de gel de retardement. Des concentrations de 500 ng, 1000 ng, 1500ng de P1 ont été mis en contact dans un tampon approprié avec une quantité fixe de sonde ARN. La figure 13B montre que la P1 solubilisée dans le tampon Tris est peu active par rapport à celle renaturée dans l'eau distillée, si l'on compare le comportement de la sonde ARN dans les puits 1, 2, 3 de la figure 13B avec le puits 2 de la figure 13A.

Une expérience de liaison croisée par la lumière UV, entre la P1 et la sonde ARN, a été faite pour déterminer si le retardement observé était dû à la P1 plutôt qu'à une protéine contaminante de *E. coli* présente sous forme de traces dans la préparation protéinique purifiée. Des mélanges, contenant des concentrations croissantes de P1 ou de protéines totales de *E. coli*, ont été incubés avec la sonde ARN marquée au  $^{32}\text{P}$  dans un tampon adéquat. Les complexes ribonucléoprotéiniques formés ont ensuite été irradiés par les rayons UV, digérés par la RNAase pour éliminer l'ARN non lié et séparés par un SDS-PAGE. La figure 14 montre une autoradiographie après SDS-PAGE. Cette figure montre que la sonde ARN est liée de manière covalente à la P1 car les complexes P1-ARN migrent à une hauteur très voisine de celle de la protéine seule révélée par coloration au bleu de Coomassie du même gel d'acrylamide (figure 14, panneau A). L'accroissement de la quantité de P1 ne révèle aucune autre protéine capable de se lier à la sonde (figure 14, puits 1,3 et 5). Dans les protéines totales de *E. coli*, n'exprimant pas la P1, l'expérience de l'irradiation par l'UV révèle, comme on pourrait s'y attendre, une espèce de protéine capable de lier l'ARN marqué. Les complexes formés entre cette protéine

bactérienne et la sonde, détectables sur la figure 14 (puits 2, 4 et 6) diffèrent par leurs tailles de ceux formés entre la P1 et l'ARN. Ceci confirmerait que la liaison obtenue est due uniquement à la P1 purifiée et solubilisée.

### 5. 3. LES COMPLEXES P1-ARN SONT STABLES DANS LES SELS

La P1 est une protéine très positivement chargée. Sa liaison à la sonde ARN pourrait être due à des interactions électrostatiques non spécifiques entre les résidus positivement chargés et les groupements phosphates négativement chargés des acides nucléiques. L'addition de sel au milieu réactionnel permet d'accroître la sélectivité en rompant les liaisons ioniques non spécifiques tout en sauvegardant celles qui sont plus spécifiques et plus fortes.

L'affinité de la P1 pour l'ARN pourrait également être déduite de la concentration de sel nécessaire pour déplacer les complexes P1-ARN et inhiber ainsi la liaison. Ainsi dans le but de tester l'affinité de la P1 pour la sonde et la spécificité de leurs interactions, des concentrations croissantes de sels ont été additionnées au milieu réactionnel où la protéine et l'ARN marqué sont mis en contact. Deux sortes d'expériences ont été faites, dont l'une à caractère qualitatif consistant en gel de retardement et l'autre plus quantitative a consisté en une expérience de rétention sur disques de fibres de verre ou "filter binding". La stabilité des complexes P1-ARN en présence de NaCl et de KCl, a été évaluée.

**FIGURE 14: Spécificité de la liaison de la protéine P1 avec l'ARN.**

Sonde ARN utilisée est transcrit du pET-P1 (380 nt).

A) Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués à gauche.

Le puits 1 contient 400 ng de P1 pure.

B) Des concentrations croissantes de P1 ou de protéines totales de *E. coli* n'exprimant pas la P1 sont incubées avec 1.0 ng d'ARN <sup>32</sup>P, irradiées par la lumière UV, traitées avec la RNase A, séparées dans un gel SDS-PAGE de 10% et autoradiographiées.

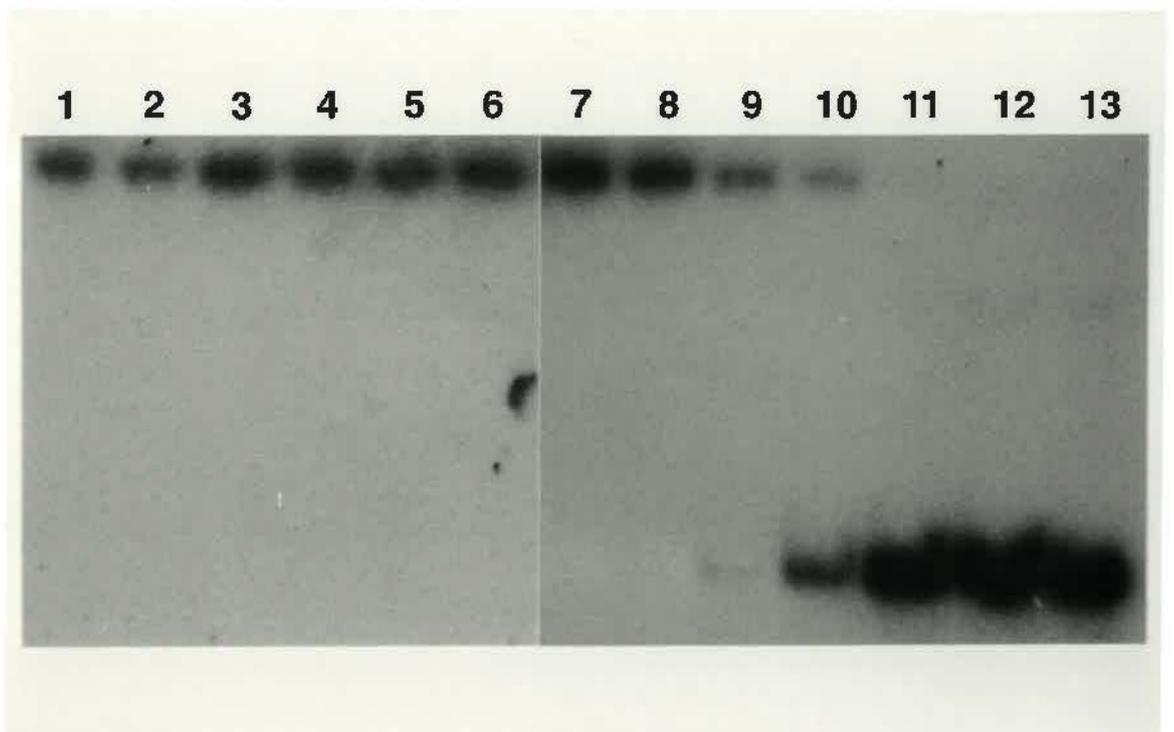
Puits 1, 3 et 5, 400ng, 800 ng et 1200 ng de P1 respectivement;  
puits 2, 4 et 6, 400 ng, 800 ng et 1200 ng de protéines totales de *E. coli* respectivement.



**FIGURE 15:** Effet des concentrations de NaCl sur la liaison de la protéine P1 à l'ARN. Gel de retardement.

Les puits 1 à 13 correspondent respectivement à 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000 mM NaCl.

10 ng d'ARN  $^{32}\text{P}$  sont incubés avec 1  $\mu\text{g}$  de P1 en présence des concentrations ci-dessus indiquées de NaCl. Les mélanges sont soumis à l'électrophorèse et le gel obtenu est autoradiographié.



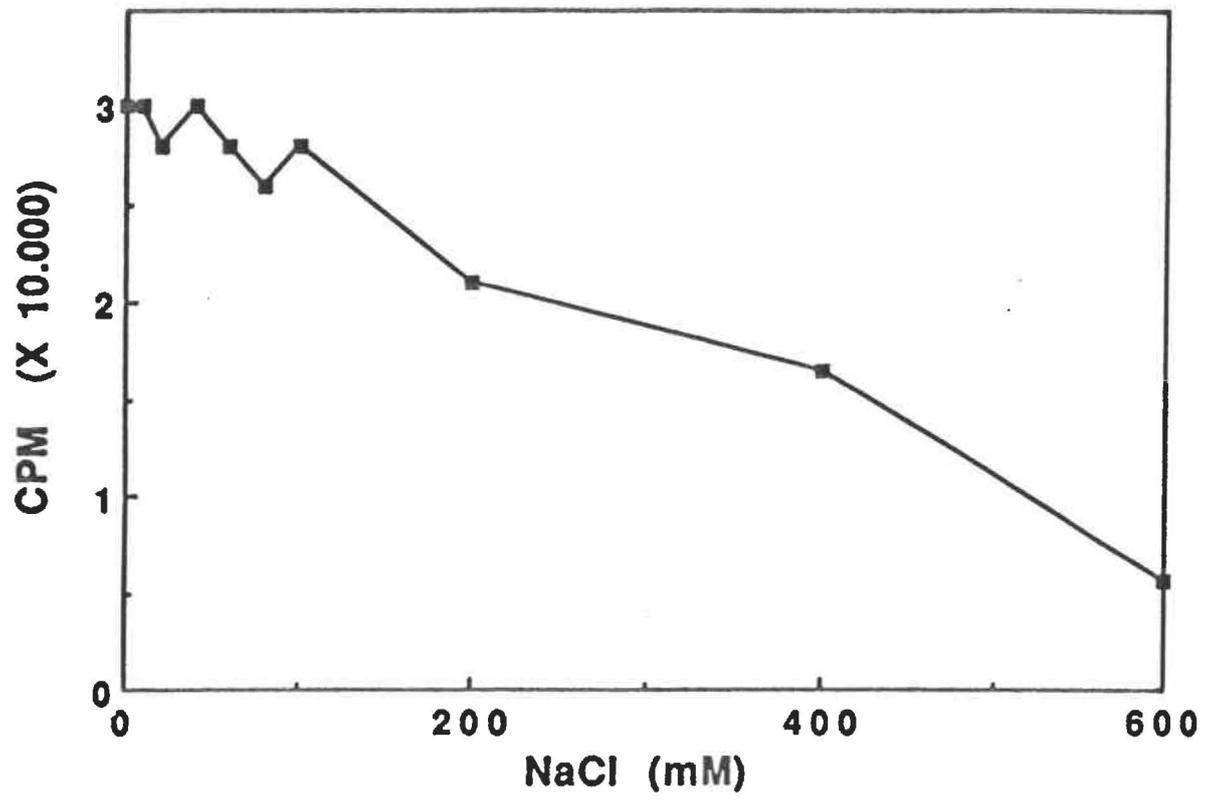
Des concentrations de NaCl, variant de 0 à 2000 mM, ont été ajoutées dans différents mélanges contenant des quantités fixes de protéine et de sonde. Après un délai d'incubation nécessaire à la formation optimale des complexes ribonucléoprotéiques, les mélanges ont été déposés sur un gel de retardement. La liaison de la P1 à la sonde ARN radiomarquée est observée par le profil de migration de cette dernière, tel que révélé par l'autoradiogramme du gel (figure 15). Les complexes P1-ARN semblent être très stables dans les concentrations de NaCl comprises entre 0 et 100 mM (figure 15 puits 1 à 7). Ils sont ensuite progressivement déplacés lorsque les quantités de NaCl croissent et à partir de 400 mM de sel on peut observer l'apparition d'une forme non retardée de la sonde (figure 15, puits 9). La liaison de la P1 avec son substrat semble être totalement abolie lorsque la concentration de NaCl atteint le seuil de 1000 mM dans le mélange (figure 15, puits 12).

Un tracé graphique de l'effet des concentrations croissantes de NaCl sur la liaison P1-ARN a été obtenu en utilisant la méthode de rétention des complexes ribonucléoprotéiques sur filtres de fibre de verre. Une quantité fixe de P1 (1  $\mu\text{g}$ ) a été incubée avec 10 ng de sonde marquée au  $^{32}\text{p}$ , en présence de plusieurs concentrations de chlorure de sodium (de 0 à 2000 mM). Les complexes protéine-ARN formés sont ensuite filtrés sur disques de fibre de verre comme décrit dans matériel et méthodes. La radioactivité des complexes P1-ARN retenus a permis d'obtenir la courbe d'évolution de la liaison en fonction de la concentration de NaCl (figure 16). Pour éviter les changements d'échelles, la concentration maximale utilisée fut de 600 mM NaCl.

**FIGURE 16:** Effet des concentrations de NaCl sur la liaison de la protéine P1 à l'ARN.

Représentation graphique réalisée par mesure de la liaison de l'ARN par rétention sur filtre.

Les CPM correspondent à la radioactivité retenue sur filtre.



Le graphique de la figure 16 montre que les complexes P1-ARN sont stables à 600 mM et qu'il faut environ 400 mM de NaCl pour inhiber la liaison à 50%. Ceci est en corrélation étroite avec le résultat obtenu par la méthode du gel de retardement où on observait l'apparition d'une forme libre de la sonde à partir de 400 mM de NaCl.

La sensibilité de la liaison P1-ARN au chlorure de potassium (KCl) a été également étudiée par la méthode du gel de retardement. La protéine P1 a été mise en contact avec la sonde ARN en présence de concentrations croissantes de KCl, variant de 0 à 2000 mM. La figure 17 représente l'autoradiogramme du gel de retardement obtenu. Le puits 1 de cette figure illustre le patron de migration électrophorétique de la sonde seule non liée à la P1. La stabilité des complexes P1-ARN en présence de KCl est assez similaire à celle obtenue pour le NaCl. Cependant, la liaison de la P1 à la sonde semble être légèrement plus stable dans le KCl qu'en présence de NaCl. La formation des complexes P1-ARN est totalement abolie en présence d'une concentration de 1000 mM de NaCl, alors qu'elle ne l'est pas totalement avec la même quantité de KCl.

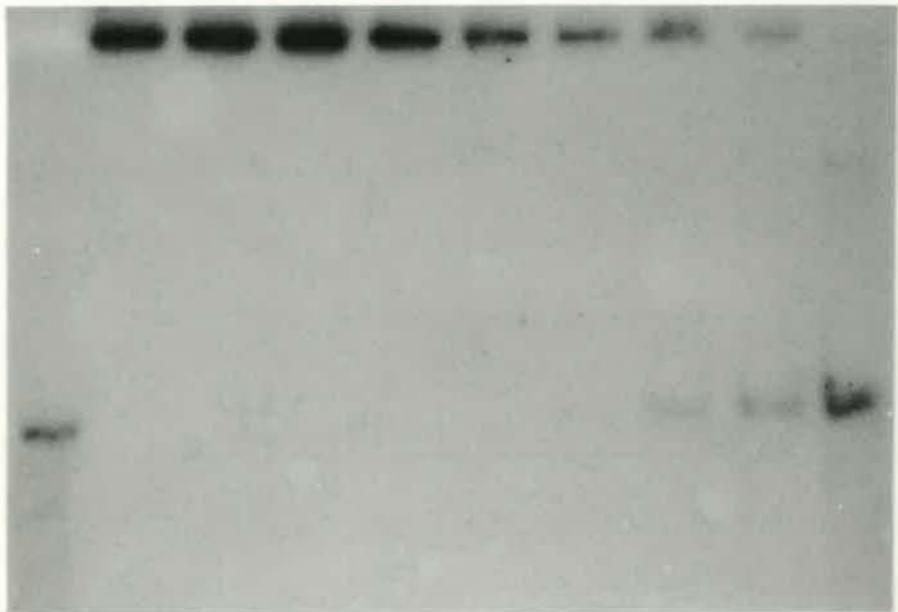
La stabilité observée des complexes P1-ARN dans les concentrations fortes de sels indique que la liaison protéine sonde n'est pas due exclusivement à des interactions électrostatiques non spécifiques entre une protéine chargée positivement et un acide nucléique négativement chargé. Les résultats obtenus indiquent une forte affinité de la P1 pour l'ARN du TuMV.

**FIGURE 17:** Effet des concentrations de KCl sur la liaison de la protéine P1 avec l'ARN. Gel de retardement.

Puits 1, ARN  $^{32}\text{P}$  de 380 nt sans P1.

Les puits 2 à 10 correspondent respectivement à 0, 10, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000 mM de KCl.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



#### 5. 4. LA P1 PEUT LIER D'AUTRES TYPES D'ACIDES NUCLÉIQUES

L'affinité relative de la P1 pour différents acides nucléiques a été évaluée par des expériences de compétition de liaison. Ces expériences de compétition de liaison ont permis de comparer les capacités de molécules d'ARN simple brin du TuMV, d'ARNt, d'ADN simple brin du phage M13mp18, de compétitionner avec la sonde d'ARN radiomarquée (spécifique du TuMV) pour la liaison à la protéine P1. La capacité de molécules d'ARN double brin et d'ADN double brin, à déplacer la liaison P1-ARN marqué, a également été testée. Pour ces expériences des molécules d'acides nucléiques non radiomarquées ont été ajoutées à des mélanges contenant la P1 et la sonde ARN simple brin marquée au  $^{32}\text{P}$ , et la diminution de la formation des complexes ribonucléoprotéiques est mesurée par la méthode de rétention sur disques de fibres de verre ou «filter binding experiment». La figure 18 montre les courbes de déplacement de liaison à la P1 de la sonde ARN par les molécules d'acides nucléiques simple brin. Ces graphiques montrent que les compétiteurs utilisés : l'ARN simple brin du TuMV (transcrit de 1 500 nt), l'ARNt et l'ADN simple brin du M13mp18 (7250 nt) ; sont capables de déplacer la sonde marquée, de sa liaison à la P1 avec une efficacité presque identique. La P1 présente une très forte affinité de liaison pour l'ARNt et 50% d'inhibition de la liaison à la sonde marquée est atteinte à un ratio compétiteur / sonde (P/P) égal à 10. L'ARN simple brin du TuMV et l'ADN monocaténaire du M13mp18 déplacent la liaison P1-sonde de 50% à un ratio (compétiteur/sonde) égal à 25. Les courbes de compétition de la figure 18 montrent que la P1 présente une affinité identique de liaison pour les acides nucléiques simples brins (ADN ou ARN). Des expériences de compétition utilisant des acides nucléiques double

brin comme compétiteurs, ont été faites dans l'ultime but d'évaluer l'affinité relative de la P1 pour ces molécules. Pour ce faire, la P1 a été incubée avec la sonde ARN [<sup>32</sup>p] en présence de concentrations croissantes d'ADN bicaténaire linéarisé du plasmide pTZ19U et l'ARN double brin du VNPI (un birnavirus). La figure 18 illustre les courbes de compétition obtenues avec ces molécules d'acides nucléiques bicaténaires. On constate que contrairement aux acides nucléiques simple brin, dont le profil de compétition est représenté en figure 18 (*en haut*), l'ADN bicaténaire ne déplace presque pas les complexes P1-sonde tandis que l'ARN double brin présente une affinité élevée de liaison à la P1. L'affinité de la P1 pour les ARN simple brin du TuMV et double brin du VNPI est très similaire d'autant plus que ce dernier déplace les complexes P1-ARN marqué de 50% à un ratio compétiteur/sonde (P/P) d'environ 25.

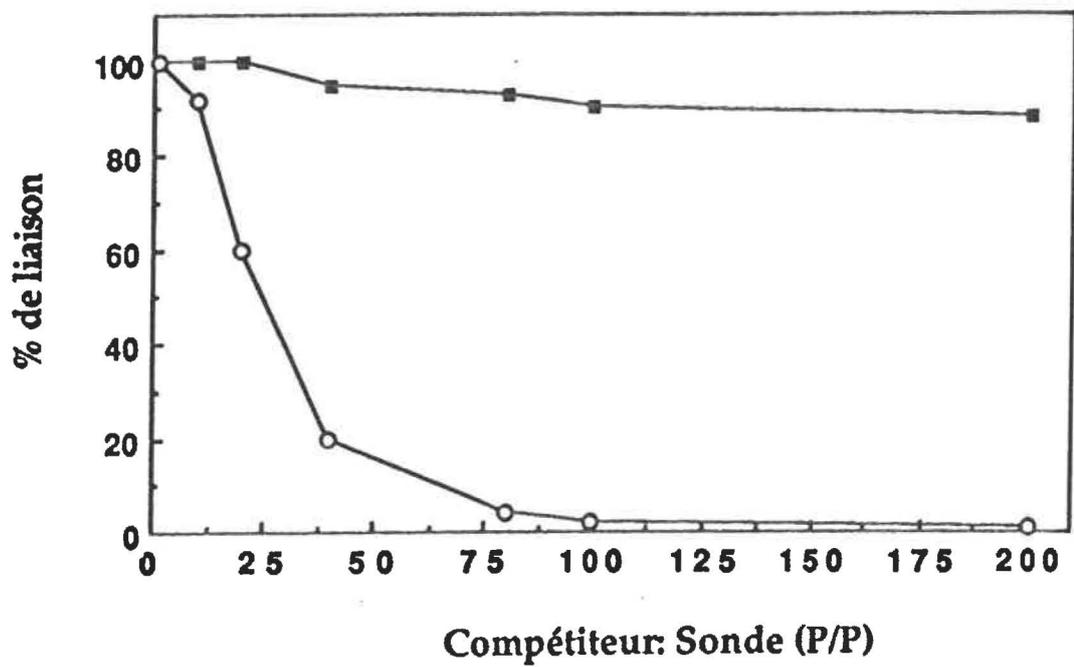
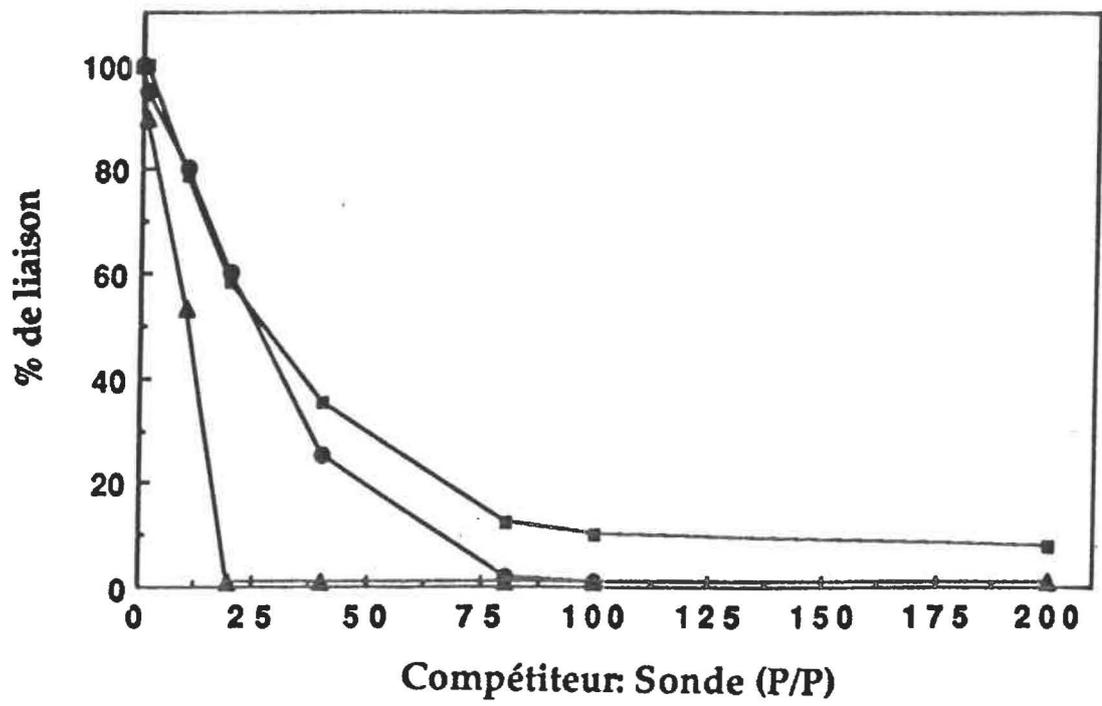
Les compétiteurs utilisés, comme l'ADN simple brin du M13mp18, l'ARN<sub>t</sub>, l'ARN bicaténaire du VNPI (virus de la nécrose pancréatique infectieuse), n'ont pas une séquence nucléotidique proche de celle du TuMV. Cependant les résultats, ci-dessus décrits, suggèrent fortement que la P1 présente la même affinité de liaison pour ces acides nucléiques qui sont très différents de son substrat naturel, l'ARN du TuMV. Alors, on pourrait en déduire que la P1 lie les acides nucléiques simple brin et l'ARN bicaténaire de manière *séquence non-spécifique*. Les différents résultats, obtenus jusqu'ici, montrent que la protéine P1 lie l'ARN simple brin de manière coopérative et qu'elle est capable de lier également d'autres types d'acides nucléiques, non apparentés à l'ARN viral, de façon *séquence non-spécifique*.

**FIGURE 18:** Compétition de différents acides nucléiques pour la liaison à la P1 évaluée par rétention sur filtre.

Les acides nucléiques utilisés comme compétiteurs sont:

*(en haut)* ARN sb de TuMV(cercle noir); ADN sb de M13mp18 (carré noir); ARNt (triangle noir);

*(en bas)* ARN db de VNPI (cercle blanc); ADN db de pTZ19U (carré noir).



La liaison coopérative de protéines aux acides nucléiques monocaténares, semble se produire sans spécificité pour la séquence nucléotidique (Citovsky *et al.* 1990, 1989, 1988). Il est cependant probable qu'en plus de ses capacités générales de liaison aux acides nucléiques, que la P1 possède une capacité spécifique à se lier à l'ARN du TuMV. Il est possible, que dans les cellules infectées par le TuMV, des conditions particulières existent et qui favoriseraient la liaison spécifique de la P1 au génome viral.

## 6. IDENTIFICATION D'UN DOMAINE POTENTIEL DE LIAISON À L'ARN SUR LA P1

La comparaison de séquences des protéines de mouvement de plusieurs groupes différents de virus de plante a révélé la présence de motifs d'acides aminés conservés ( Melcher, 1990, Koonin *et al.*, 1991) mais aucune similarité n'a été observée avec les protéines potyvirales. La protéine P1 du TuMV possède un domaine très basique RSSRAMKQKRARERRAQQ, couvrant les résidus 150 à 168. Ce domaine contient plusieurs acides aminés ayant une capacité potentielle d'interactions avec les acides nucléiques. Les résidus basiques (K,R) pourraient former des liaisons ioniques avec les groupements phosphates négativement chargés, tandis que les amides (Q), les acides (E) et les hydroxyles (S) interagiraient par l'intermédiaire de liaisons hydrogène avec les bases des acides nucléiques. Les résidus arginine (R) possèdent la capacité de reconnaître une molécule d'ARN (Calnan *et al.*, 1991) et il a été démontré que des peptides synthétiques, dérivant de protéines virales, et riches en arginine peuvent lier l'ARN (Lazinski *et al.*, 1989 ; Poisson *et al.* ; 1993 ; Weeks *et al.* ; 1990). La comparaison de ce domaine basique de la P1 avec ces peptides

synthétiques, riches en arginine, montre une homologie de 45 % avec un domaine de la protéine tat du VIH1, de 37 % avec un domaine de l'antigène delta du virus de l'hépatite D, de 45 % avec un domaine de la protéine N du phage 22 (figure 19). Ce domaine de la P1 pourrait également se superposer, à un certain niveau, à la séquence consensus BOBRBJRRZZB proposée par Lazinski *et al.* (1989) pour 17 protéines potentielles capables de lier l'ARN (B est un résidu basique, J un résidu acide, O un résidu polaire non basique, Z un résidu chargé) (figure 19).

Ce domaine basique de la P1 représente un domaine important pour les fonctions biologiques de la protéine, incluant sa capacité à lier les acides nucléiques. Son implication réelle dans ces fonctions devra être confirmée, ultérieurement, par des études expérimentales.

**FIGURE 19:** Domaine potentiel de liaison de la P1, homologues de séquences avec d'autres protéines riches en arginine liant l'ARN.

B, basique; J, acide; O, polaire non basique; P, polaire; X, pas ou n'importe quel acide aminé; Z, chargé.

PROTÉINE P1 DE TuMV

PROTÉINE TAT DE VIH 1

Ag DELTA DE HBV

PROTÉINE N DU PHAGE 22

R s s r a m K q K R a R E R R R A q Q  
l G i s y g R k K R - R q R R R p p Q  
R G g f t d K e R q d H r R R k A l e  
t f a g n a K t R R - H E R R R k l a

SÉQUENCE CONSENSUS

DE PEPTIDES CAPABLES

DE LIER L'ARN

K P B R X B P R R R  
B O B R - B J R R Z Z B

## **DISCUSSION**

---

## 1. EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROTEINE P1 DU TuMV DANS *E. COLI*.

De nombreuses protéines du virus de la mosaïque du navet (TuMV) ont été produites dans les cellules hétérologues procaryotiques d'*Escherichia coli*, à l'aide de vecteurs d'expression du système pET. Les protéines du TuMV produites dans *E. coli* comprennent la CP, la première à l'être; suivie dans un ordre non chronologique de la VPg-Pro, la CI, la Polymérase et la P1. Le gène de la P1 a été sous-cloné dans le vecteur pET-21d et exprimé dans *E. coli*. Environ trois heures après induction à l'IPTG, la quantité de protéine produite atteignait plus de 50% des protéines totales bactériennes. Les vecteurs d'expression du système pET possèdent, entre autres avantages, la qualité de permettre une très bonne production de protéine recombinante. La protéine nouvellement synthétisée est facile à identifier par un SDS-PAGE des protéines totales bactériennes suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. A la température habituelle d'incubation, c'est à dire 37°C, l'expression de la P1 était très abondante dans les bactéries et semblait augmenter avec le temps. Ainsi, il était possible d'obtenir de grandes quantités de protéine P1, mais celle-ci était toujours produite sous forme de corps d'inclusion insolubles et biologiquement inactifs. Puisque l'obtention d'une P1 recombinante soluble et active était nécessaire à l'évaluation de son activité biologique, sa production chez *E. coli* a été tentée à des températures plus basses que 37°C: température ambiante et 30°C. Bowden *et al.* (1991) suggèrent que la production de protéine recombinante sous forme soluble dans la bactérie serait favorisée par l'abaissement de la température d'incubation. Ceci devrait, en principe, empêcher l'accumulation de la protéine sous forme de corps d'inclusion insolubles. La protéine P1, malgré le changement de température d'expression,

était toujours produite de manière abondante dans *E. coli* qui continuait à l'accumuler sous forme de corps d'inclusion. Le très haut niveau d'expression de la P1 devrait être à l'origine de cette situation. Yasueda *et al.* (1990) estiment que les protéines recombinantes produites en très grande quantité dans *E. coli* ont tendance à s'accumuler sous forme de corps d'inclusion. Cette tendance marquée de la P1 à s'accumuler sous forme d'aggrégats insolubles pourrait également être due aux faits qu'elle soit très chargée et qu'elle soit fusionnée à six résidus d'histidine. Les protéines hautement chargées ont tendance à former des protéines de fusion insolubles (Smith et Johnson, 1988).

L'éclatement des cellules bactériennes permet de collecter, par une assez forte centrifugation, les corps d'inclusion contenant la P1. La solubilisation de ces aggrégats protéiniques par un puissant agent dénaturant, la guanidine-HCl, facilite la purification de la protéine ainsi dénaturée mais solubilisée par chromatographie d'affinité. Les résidus d'histidine présents sur la protéine forment un chélate avec les ions  $Ni^{2+}$  de la résine ce qui permet de la purifier aisément. C'est ainsi que la P1 a pu être purifiée à plus de 95% en une seule étape car aucune autre protéine n'était détectable en coloration au bleu de Coomassie sur gel de polyacrylamide. Les protéines VPg-Pro et CI du TuMV ont été purifiées par la même technique, mais dans ces cas il a souvent fallu plus d'une étape de purification pour obtenir un niveau de pureté similaire. Le haut rendement de la protéine P1 pure, 10 mg/100 ml de culture bactérienne, se situe dans les normes habituelles de production de protéines recombinantes obtenues à l'aide du système pET. Cependant, de toutes les protéines de TuMV exprimées dans *E. coli* à l'aide de ce système, le rendement obtenu pour la P1 est le plus élevé.

De nombreuses *protéines de mouvement* de virus de plante ont été produites chez *E. coli* à l'aide du système pET: la P30 de TMV (Citovsky *et al.*, 1990), la protéine du gène I de CaMV (Citovsky *et al.*, 1991), la *protéine de mouvement* de RCNMV (Osman *et al.*, 1992). Pour ces protéines, les niveaux d'expression obtenus étaient nettement plus faibles que celui de la P1 de TuMV. Le système pET s'est avéré très efficace d'autant plus qu'il a permis la production d'importantes quantités de P1 dans *E. coli*. Après purification de la protéine recombinante dans les conditions dénaturantes, il était indispensable de la renaturer, c'est à dire lui restituer sa conformation naturelle, qui seule possède une activité biologique mesurable. Pour cela, la P1 purifiée a été dialysée contre différents tampons pour éliminer l'agent dénaturant et obtenir une fraction protéique soluble. Plusieurs essais infructueux ont été faits afin de solubiliser la P1 contre des tampons de dialyse d'une force ionique élevée. Elle a finalement été solubilisée à 100% lorsque ces tampons ont été remplacés par de l'eau distillée ou un tampon de faible force ionique. Donc la concentration saline du milieu de renaturation serait un facteur déterminant pour la solubilisation de cette protéine. Ce comportement particulier de la P1 la distingue de nombreuses autres protéines recombinantes qui ont pu être renaturées par dialyse contre des tampons de concentration ionique élevée.

L'expression d'une protéine appelée P1- $\Delta$ HC-Pro, contenant la séquence entière de la P1 et le tiers N-terminal de HC-Pro, a été induite dans *E. coli* à l'aide du vecteur d'expression pET-21d. Lorsque produite et purifiée en grande quantité, cette protéine devrait permettre d'obtenir une P1 dénudée de sa queue d'histidine car elle était supposée se libérer de la portion HC-Pro par un

processus de protéolyse en cis. La fraction HC-Pro resterait liée aux résidus His d'origine vectorielle. L'analyse de son expression par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie, a permis de constater que cette protéine était produite chez *E. coli*, car l'on décelait une bande protéique de 70 kDa qui était absente dans les témoins négatifs utilisés (résultats non montrés). Sa production, contrairement à celle de la P1 seule, était dramatiquement très faible et n'augmentait pas avec le temps d'incubation. Il a également été très difficile de la purifier et de la renaturer. Cette baisse de l'expression pourrait probablement être due à l'augmentation de la taille de la P1 par ajout de quelques acides aminés de la séquence de HC-Pro.

L'anticorps polyclonal, produit chez les lapins à l'aide de corps d'inclusion de la P1, a été utilisé dans des tests de détection des protéines P1 et P1- $\Delta$ CH-Pro par immunobuvardage ou «*Western blot*». Ceci a permis de déterminer sa spécificité à détecter la P1 (pure ou contenue dans un lysat total bactérien) et la HC-Pro. La spécificité de l'anticorps a également été démontrée par sa capacité à former des complexes Ag-Ac dans un test d'immunoprécipitation utilisant une protéine P1 produite par traduction *in vitro* dans un lysat de réticulocyte de lapin (résultats non montrés). L'anticorps anti-P1 reconnaissait bien les formes dénaturée et native de la P1. Le but ultime de la production d'anticorps anti-P1, faudrait-il le rappeler, est la localisation de cette protéine *in vivo* par immunocytochimie. La P1 vient d'être détectée dans les cellules infectées à l'aide de l'anticorps produit par FORTIN (1994).

## **2. ACTIVITÉS DE LIAISON DE LA PROTÉINE P1 AUX ACIDES NUCLÉIQUES.**

Comme l'objectif fondamental de ce travail était de démontrer que la P1 était capable de lier l'ARN viral *in vitro*, nous avons procédé à des expériences de liaison en utilisant la technique du gel de retardement en gel de polyacrylamide en conditions non-dénaturantes.

Ces expériences ont permis de démontrer que la P1 était capable de lier deux sondes distinctes d'ARN simple brin marquées spécifiques du TuMV et que cette liaison était hautement coopérative. Ainsi, nous démontrions pour la deuxième fois, qu'une protéine P1 d'un potyvirus était capable de lier une sonde d'ARN simple brin. Cette capacité de liaison a été démontrée pour la première fois pour la P1 de TVMV (Brantley et Hunt, 1993). Ces deux protéines potyvirales (P1 de TuMV et celle de TVMV) ne possèdent aucune homologie de séquence significative et la meilleure différence entre elles est leurs tailles; la P1 de TVMV a une masse molaire de 29 kDa (Rodriguez-Cerezo et Shaw, 1991) tandis que celle de TuMV en a 40 kDa. La recherche informatisée de petites régions d'homologie entre les deux protéines n'a pas été concluante. Ceci suggère que les domaines de ces protéines qui interagissent avec les acides nucléiques diffèrent, du moins au niveau de la séquence primaire.

La liaison coopérative de la P1 à l'ARN ressemble à celles obtenues pour d'autres *protéines de mouvement*, telles que la P30 de TMV (Citovsky *et al.*, 1990), la protéine du gène I de CaMV (Citovsky *et al.*, 1991), la *protéine de mouvement* de RCNMV (Osman *et al.*, 1992). Mais elle diffère de la liaison de la P3 de AIMV (Schoumacher *et al.*, 1992) qui lie l'ARN d'une manière très peu coopérative.

Il était probable que la liaison observée entre la P1 et l'ARN simple brin soit tout simplement due à des artéfacts expérimentaux ou à une protéine d'origine bactérienne présente, même en quantité infime, dans notre préparation protéinique. Une expérience de gel de retardement, utilisant des témoins comme la BSA et la P1 dénaturée par la chaleur ou l'urée, a permis d'écarter la présence possible d'interactions non spécifiques dans nos conditions expérimentales. L'utilisation de la technique dite de liaison croisée entre une protéine et un ARN, a permis de déceler une protéine de *E. coli* capable de former un complexe nucléoprotéique d'environ 70 kDa avec la sonde. Aucun complexe de cette taille n'était décelable dans notre préparation de P1. Certains auteurs, comme Brantley *et al.* (1993) ont décelé une protéine dans le lysat de *E. coli*, capable de lier l'ARN en formant un complexe d'environ 12 kDa. Ceci diffère nettement du complexe ribonucléoprotéique détecté dans notre expérience. D'autres auteurs, qui ont réalisé des tests similaires pour rechercher des traces de protéines bactériennes dans leurs fractions de protéines recombinantes, déclarent n'avoir trouvé aucune protéine de *E. coli* capable de lier une sonde d'ARN simple brin (Osman *et al.*, 1992). Ceci serait surtout dû à la dégradation de leur sonde par la RNase bactérienne, car il serait surprenant qu'un lysat total de *E. coli* ne contienne pas de protéine liant l'ARN. Ainsi, nous pouvions déduire que la liaison à l'ARN était bien spécifique à la P1.

La protéine P1 produite à l'aide du vecteur pET-21d, possède une queue composée de six résidus His. L'histidine basique pourrait être à l'origine de la liaison P1-ARN, grâce à des interactions électrostatiques. L'implication de la

queue d'histidine a pu être élucidée en utilisant une protéine recombinante VPg-Pro produite à l'aide du système pET et à laquelle est fusionnée une queue de six His, dans un essai de gel de retardement. Puisqu'aucune liaison entre cette protéine et notre sonde n'était observable, même à de hautes concentrations de protéine, nous en avons déduit que les résidus His ne participent pas aux interactions entre la P1 et l'ARN. Toutefois, malgré ces résultats, il aurait été idéal d'utiliser une P1 dépourvue des résidus His pour ces essais de liaison.

On aurait pu déterminer la spécificité de l'anticorps pour la P1 et celle de la P1 pour l'ARN par un test d'inhibition de la liaison causée par l'antisérum dirigé contre cette protéine.

La technique du gel de retardement a permis de démontrer la capacité de la P1 à s'associer avec l'ARN simple brin du TuMV et que plus d'une molécule de protéine était liée par molécule d'ARN. Ceci peut être déduit de la grande différence entre les formes libres et liées de la sonde. Nous n'avons pas déterminé les constantes stoechiométriques de l'interaction P1-ARN, ce qui aurait permis de savoir le nombre de monomères de protéines liés par molécule d'acide nucléique et d'en déduire la taille minimale du site de liaison de l'ARN. La taille du site de liaison de l'acide nucléique a été estimée pour certaines *protéines de mouvement* comme la P1 de TVMV pour laquelle elle est de 35 nt (Brantley et Hunt, 1993), et la P30 de TMV où elle est de 4 à 7 nt (Citovsky *et al.*, 1990). Mascotti et Lohman (1990) suggèrent que la taille du site de liaison d'un acide nucléique peut être déduit du nombre de groupements phosphates neutralisables par la liaison d'une protéine de charge nette connue.

L'on pourrait donc supposer que le site de liaison de l'ARN à la P1 comporterait environ 38 nt car cette protéine possède une charge nette positive de +38. Alors elle serait capable de neutraliser autant de groupements phosphates. Une protéine possédant un point isoélectrique semblable à celle de la P1 aurait probablement exercer les mêmes effets de liaison à une sonde d'ARN. Ce fût le cas de la P1 de TVMV dont le point isoélectrique est de 10 (BRANTLEY *et al.*, 1993).

L'affinité de la P1 pour la sonde ARN a pu être testée par la mesure de la stabilité des complexes formés dans des concentrations élevées de sels. La quantité de sel requise pour déplacer les interactions entre une protéine et un acide nucléique reflète le niveau d'affinité de leurs liaisons. Dans nos tests, nous avons pu déterminer qu'il faut environ 400 mM de NaCl pour déplacer la moitié des complexes ribonucléoprotéiques formés entre la P1 et l'ARN. Un résultat similaire a été obtenu pour le KCl. Nous en avons déduit que les liaisons P1-ARN sont stables, spécifiques et que cette protéine présente une forte affinité pour son substrat naturel qu'est l'ARN du TuMV. La stabilité des complexes P1-ARN, dans les concentrations élevées de NaCl, est très semblable à celle des complexes formés entre la P30 et l'ARN de TMV (Citovsky *et al.*, 1990). Dans ces deux cas il faut en moyenne 400 mM de NaCl pour inhiber leurs liaisons de 50%. Une autre différence majeure entre les deux protéines potyvirales P1 de TuMV et celle de TVMV est la sensibilité de leurs complexes ribonucléoprotéiques aux sels. La liaison de la P1 de TVMV à l'ARN présente deux pics d'interaction maximale, un à 10 mM et l'autre à 250 mM de NaCl (Brantley et Hunt, 1993), tandis qu'une liaison maximale entre la P1 de TuMV et l'ARN est observée entre 0 et 125 mM. Les complexes P1-ARN sont plus

stables dans les sels que ceux formés par la protéine du gène I de CaMV (Citovsky *et al.*, 1991) et par la P3 de AIMV (Schoumacher *et al.*, 1992) qui sont déplacés à 80% par 200 mM de NaCl.

Les fonctions biologiques de la liaison de la P1 à l'ARN du TuMV ne sont pas encore connues. Cependant, nous avons pu démontrer que la P1 de TuMV possède une égale affinité pour l'ADN et l'ARN simple brin. Cette propriété de la P1 est similaire à celle de protéines virales comme la P30 de TMV (Citovsky *et al.*, 1990), la P3 de AIMV (Schoumacher *et al.*, 1992). Contrairement à la P1 de TuMV, la protéine du gène I de CaMV (Citovsky *et al.*, 1991) et la P1 de TVMV (Brantley *et al.*, 1993) présentent plutôt une affinité de liaison plus forte pour l'ARN monocaténaire.

La P1 présente une très forte affinité de liaison pour l'ARN de transfert (ARNt). Ceci peut faire penser qu'elle pourrait interférer avec le système de traduction de la cellule infectée par le virus en bloquant, par exemple, la synthèse de protéines cellulaires. Deux arguments majeurs semblent écarter une telle éventualité. D'une part, il n'a jamais été démontré que les potyvirus abolissent la synthèse protéique de leurs hôtes. D'autre part, la réplication et la traduction de l'ARN des virus de plantes sont très compartimentées, les *protéines de mouvement* néosynthétisées se lieraient plus facilement au génome viral qu'aux molécules d'ARN de l'hôte (Palikaitis et Zaitlin, 1986).

A l'instar de toutes les *protéines de mouvement*, jusqu'ici étudiées, la P1 de TuMV ne présente aucune affinité de liaison pour l'ADN bicaténaire.

Contrairement aux autres protéines dites de mouvement des virus de plante, la P1 de TuMV possède une forte capacité de liaison à l'ARN bicaténaire. La P1 lie les molécules d'ARN simple et double brin avec une affinité presque identique. Les rôles biologiques que pourrait avoir une telle affinité dans les cellules infectées sont à élucider. Par ailleurs, une liaison similaire a été rapportée pour une protéine initialement décrite comme liant l'ARN monocaténaire, c'est le cas par exemple de la protéine NS1 du virus influenza A (Hatada *et al.*, 1992).

Nous avons constaté, dans nos gels de retardement, que la quantité de P1 devrait atteindre 200 ng pour qu'apparaisse une forme retardée de la sonde ARN. Ceci représente un ratio (P/P) de 20/1 entre la protéine et l'ARN. Dans le microenvironnement cellulaire, la présence d'infimes quantités de protéine P1 pourrait être suffisante à la formation de complexes ribonucléoprotéiques transportables à travers les plasmodesmes cellulaires modifiés, d'autres fonctions de la P1 ne sauraient être exclues.

## CONCLUSION

---

Les objectifs assignés à ce travail de maîtrise étaient de produire de grandes quantités de la protéine P1 du virus de la mosaïque du navet (TuMV) dans *Escherichia coli*, et d'étudier sa capacité à lier l'ARN *in vitro*.

En vue d'atteindre ces objectifs, nous avons procédé au sous-clonage de la P1 dans un vecteur d'expression du système pET, en utilisant la technique de la polymérisation en chaîne (PCR). Le système hétérologue d'*E. coli* a permis de produire de grandes quantités de protéine P1 recombinante du TuMV, mais presque exclusivement sous forme de corps d'inclusion insolubles. Les corps d'inclusion ont été utilisés pour produire un anticorps anti-P1, qui servira ultérieurement à la localisation et à la détection de la P1 *in vivo*.

La purification de la P1, dans des conditions dénaturantes par chromatographie d'affinité, suivie de sa renaturation par dialyse contre de l'eau pour éliminer l'agent dénaturant, nous a permis d'obtenir une protéine très pure et soluble.

L'activité biologique de la protéine P1 pure et soluble a été évaluée par son pouvoir à lier une sonde d'ARN radiomarquée spécifique du TuMV. Des tests de gels de retardement nous ont permis de démontrer que la P1 du TuMV était capable de lier l'ARN viral *in vitro* et que la liaison était hautement *coopérative*.

La liaison observée était spécifique à la P1 et les complexes ribonucléoprotéiques formés étaient stables dans de fortes concentrations

salines (NaCl, KCl). Ceci démontre que la liaison P1-ARN n'est pas due à des interactions non spécifiques entre une protéine chargée positivement et un acide nucléique chargé négativement.

Au cours d'essais de compétition, nous avons démontré que la P1 était capable de lier les acides nucléiques simples brins (ADN et ARN) avec une affinité similaire. Elle possède également une forte affinité de liaison pour l'ARN double brin et l'ARNt. Nous avons également pu déterminer que la P1 ne possède pas la capacité de lier l'ADN double brin.

Ce travail de maîtrise a donc permis d'acquérir des connaissances nouvelles sur certaines fonctions biologiques de la P1 du TuMV, notamment sa capacité à lier l'ARN viral *in vitro*. Il ouvre la voie à des études plus avancées qui permettront d'augmenter nos connaissances sur:

- la localisation intracellulaire de la protéine P1 ainsi que son état *in vivo*, car elle pourrait être glycosylée et/ou phosphorylée;
- les domaines de la P1 réellement impliqués dans les interactions avec l'ARN génomique du TuMV;
- les éléments du plasmodesme sur lesquels cette protéine exercerait son action;
- les facteurs cellulaires participant au transport des génomes viraux.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier très chaleureusement mon directeur de recherche Jean François LALIBERTÉ de m'avoir accepté dans son laboratoire et m'avoir encadré d'une manière exemplaire au cours de mes travaux. Je voudrais également lui exprimer toute ma gratitude pour le soutien financier et moral qu'il m'a assuré tout au long de mes études.

Mes meilleures pensées vont à Madame Henriette CHATEL qui a su m'assister dans mes travaux par son expertise technique. Je ne saurais la remercier assez pour tout le soutien qu'elle m'a accordé au cours de nos deux années de bonne et fructueuse collaboration.

Je remercie Monsieur Olivier NICOLAS qui a bien su m'initier aux techniques de biologie moléculaire.

Mes sincères remerciements vont à tous mes collègues de laboratoire, Paul DALLAIRE, Serge CORBEIL, Hélène BÉLANGER, Sylvie WITTMANN, Johnny BASSO, pour leur très chaleureuse et amicale collaboration.

## **BIBLIOGRAPHIE**

---

ADAM, S. A.; T. J. LOBL; M. A. MITTCHELL et L. GERACE. 1989. Identification of specific binding proteins for a nuclear location sequence. *Nature* 337: 276-279.

ALBERTS, B.; D. BRAY; J. LEWIS; M. RAFF; K. ROBERTS et J. D. WATSON. 1989. *Biologie moléculaire de la cellule*. 2è ed. Flammarion Médecine-Sciences. Paris.

ALBRECHT, H.; A. GELDREICH; J. MENISSIER DE MURCA; D. KIRCHHERR; J.-M. MENARD et G. LEBEURIER. 1988. Cauliflower mosaic virus gene I product detected in a cell wall-enriched fraction. *Virology* 163: 503-508.

ALLISON, R.F.; W. G. DOUGHERTY; T. D. PARKS; L. WILLIS; R. E. JOHNSTON; M. KELLY et F. B. ARMSTRONG. 1985. Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* 147: 309-316.

ATABEKOV, J. G. et L. DOROKOV YU. 1984. Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses. *Adv. Virus Res.* 29: 313-364.

BARON-EPEL, O.; D. HERNANDEZ; L.-W. JIANG; S. MEINERS et M. SCHINDLER. 1988. Dynamic continuity of cytoplasmic and membrane compartments between plants cells. *J. Cell Biol.* 106: 715- 721.

BASSO, J.; P. DALLAIRE; P. J. CHAREST; Y. DEVANTIER et J.F. LALIBERTÉ. 1994. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5'nontranslated region of the turnip mosaic potyvirus RNA. *J. Gen. Virol* (sous presse).

BERNA, A.; R. GAFNY; S. WOLF; W. J. LUCAS; C. A. HOLT. et R N. BEACHY. 1991. The TMV movement protein: role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology* 182: 682-689.

BLOOMER, A. C. et P. J. G. BUTLER. 1986. Tobacco mosaic virus: structure and self-assembly. *The Plant Virus* 2, 19-57.

BRANTLEY, J. D. et A. G. HUNT. 1993. The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottling virus is an RNA-binding protein. *J. Gen. Virol* 74: 1157-1162

- CALNAN, B. J.; B. TIBOR; S. BIANCALANA; D. HUDSON et A. D FRANKEL. 1991. Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science* 252: 1167-1171.
- CARRINGTON, J. C. et D. F. DEOM. 1990. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5'nontranslated region. *J. Virol.* 64: 1590-1597.
- CARRINGTON, J. C. et K. L. HERDON. 1992. Characterization of the potyviral HC-Pro autocatalytic cleavage site. *Virology* 187, 308-315.
- CARRINGTON, J. C. et W. G. DOUGHERTY. 1987. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Virology* 61, 2540-2548.
- CHASE, J. W. et K. R. WILLIAMS. 1986. Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 1193-1197.
- CITOVSKY, V.; M. L. WONG et P. ZAMBRISKY. 1989. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *Proc Ntl Acad Sci USA.* 86,1193-1197.
- CITOVSKY, V.; D. KNORR et P. ZAMBRISKY. 1991. Gene 1, a potential cell-to-cell movement locus of cauliflower mosaic virus, encodes an RNA binding protein. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA.* 88, 3476-3480
- CITOVSKY, V.; D. KNORR; G. SCHUSTER et P. ZAMBRISKY. 1990. The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-stranded nucleic acid binding protein. *Cell* 60, 673-687
- CITOVSKY, V.; M. E. WONG; A. L. SHAW; P. VENKETARAM et P. ZAMBRISKY. 1992. Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *The Plant Cell* 4, 397-411.
- DAWSON, W. O.; P. BUBRICK et G. L. GRANTHAM. 1988. Modifications of tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement and symptomatology. *Phytopathology* 78: 783-789.
-

DEOM, C. M.; M. J. SHAW et R. N. BEACHY. 1987. The 30-kDa gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 327, 389-394.

DEOM, C. M.; K. R. SCHUBERT; S. WOLF; C. A. HOLT; W. J. LUCAS et R. N. BEACHY. 1990. Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 3284-3288.

DEOM, C. M.; M. LAPIDOT et R. N. BEACHY 1992. Plant virus movement proteins. *Cell* 69: 221-224.

DOMIER, L. L.; K. M. FRANKLIN; M. SHAHABUDDIN; G. M. HELLMANN; J. H. OVERMEYER; S. T. HIREMATH; M. F. E. SHAW; G. P. LOMONOSSOF et R. E. RHOADS. 1986. The nucleotide sequence of tobacco vein mottling virus RNA. *Nucl. Acids Res.* 14, 5417-5421.

DOMIER, L. L.; J. G. SHAW et R. E. RHOADS. 1987. Potyvirus proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology* 178, 285-288.

DOUGHERTY, W. G. et J. C. CARRINGTON. 1988. Expression and function of potyviral gene products. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26, 123-142.

EDWARSON, J. R. et R. G. CHRISTIE. 1986. Turnip mosaic virus dans Virus infecting forage legumes II, 14: 438-453.

FENCZIK, C. A.; P. J. MOORE et R. N. BEACHY. 1991. Biochemical and ultrastructural localization of TMV-MP in transgenic tobacco plants (Abstract). *J. Cel. Biol., Supplément* 15A, p. 55.

FORTIN, M. 1994. Communication personnelle.

FOURNEY, R. M.; J. MIYAKOSHI; R. S. DAY et M. C. PATERSON. 1988. Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *FOCUS* 10: 5-6.

FUJIWARA, T.; D. GIESMAN-COOKMEYER; B. DING; S. A. LOMMEL et W. J. LUCAS. 1993. Cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata

potentiated by red clover necrotic mosaic virus movement protein. *The Plant Cell* 5, 1783-1794.

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.

GIBBS, A. J. 1976. Viruses and plasmodesmata dans *Intercellular Communication in Plants: Studies on Plasmodesmata*. eds. B. E. S. Gunning, A. W. Robards, pp149-164, Springer-Verlag, Berlin.

GIEMANN-COOKMEYER, D. et S. A. LOMMEL. 1993. Alanine scanning mutagenesis of plant virus movement protein identifies three functional domains. *The Plant Cell* 5, 973-982.

GOELET, P.; G. P. LOMONOSSOFF; P. J. G. BUTLER; M. E. AKAM; M. J. GAIT et J. KARN. 1982. Nucleotid sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 5818-5822.

GOLBACH, R. 1986. Molecular evolution of plant RNA viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 289-310.

GUILLEY, H.; R. K. DUDLEY; J. JONARD; E. BALAZS et K. E. RICHARDS, . 1982. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell* 30: 763-773.

GUNNING, B.E.S et R. L. OVERALL. 1983. Plamodesmata and cell-to-cell transport in plants. *Bioscience* 33: 260-265.

HANAHAN, N. et R. H. SYMONS. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

HATADA, E. et R. FUKUDA. 1992. Binding of influenza A virus NS1 protein to ds RNA in vitro. *J. Gen. Virol.* 73: 3325-3329.

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

- HEPLER, P.K. 1982. Endoplasmic reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. *Protoplasma* 111, 121-133.
- HEPPEL, J.; L. BERTHIAUME; E. TARRAB; J. LECOMTE et M. ARELLA. 1992. Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J. Gen. Virol.* 73, 2863-2870.
- HILL, H. J. et R. J. SHEPHERD. 1972. Biochemical properties of turnip mosaic virus. *Virology* 47, 807-816.
- HOLT, C. A. et R. N. BEACHY. 1991 In vivo complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plant. *Virology*. 181: 109-117.
- HULL, R. et S. N. COVEY. 1985. Cauliflower mosaic virus: pathway of infection. *BioEssays* 3, 160-163.
- HULL, R. 1989. The movement of viruses in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 213-240.
- JOCKUSCH, H. 1966. Relations between temperature sensitivity, amino acid replacement, and quaternary structure of mutants proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24: 577-583.
- KOONIN, E. V.; A. R. MUSHEGIAN; E. V. RYABOV et V. V. DOLJA. 1991. Diverse groups of plant RNA and DNA viruses share related movement proteins that may possess chaperone-like activity. *J. Gen. Virol.* 72, 2895-2903.
- LAIN, S.; J. L. RIECHMANN et J. A. GARCIA . 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res.* 13, 157-172.
- LAIN, S.; M. T. MARTIN; J. L. RIECHMANN et J. A. GARCIA. 1991. Novel catalytic activity with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J. Virol.* 63, 1-6.
-

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. Acids Res.* 18, 7003-7006.

LANE, D.; P. PRENTKI et M. CHANDLER. 1992. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.* 56: 509-528.

LAZINSKI, D.; E. GRZADZIELSKA et A. DAS. 1989. Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell* 59, 207-218.

LINSTEAD, P. J.; G. J. HILLES; K. A. PLASKITT; J. G. WILSON; C. L. HARKER et A. J. MAULE. 1988. The subcellular location of gene I product of cauliflower mosaic virus is consistent with a function associated with virus spread. *J. Gen. Virol.* 69, 1809-1818.

LOEWENSTEIN, W. R. 1987. The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell* 48, 725-726.

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.

MALYSHENKO, S. I.; L. G. LAPCHIC; O. A. KONDAKOVA; L. L. KUZNETZOVA; M. E. TALIANSKY et J. G. ATABEKOV. 1988. Red clover mottle comovirus B-RNA spreads between cells in tobamovirus-infected tissues. *J. Gen. Virol.* 69: 407-412.

MASCOTTI, D. P. et T. M. LOHMAN. 1990. Thermodynamic extent of counterion release upon binding oligolysines to single-stranded nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3142-3146.

MAULE, A. J.; C. L. HARKER et I. G. WILSON. 1989. The pattern of accumulation of cauliflower mosaic virus-specific products in infected turnips. *Virology*. 169: 436-446.

- MELCHER, U. 1990. Similarities between putative transport proteins of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 71, 1009-1018.
- MESHI, T.; Y. WATANABE; T. SAITO; A. SUGIMOTO; T. MAEDA et Y. OKADA. 1987. Function of the 30 kDa protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. *EMBO J.* 6, 2557-2563.
- MILLER, R.H. et R. H. PURCELL. 1990. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA.* 87: 2057-2061.
- MILNE, R. G. 1988. Taxonomy of the rod-shaped filamentous viruses. *The plant Viruses* 4: 3-50.
- 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.
- NICOLAS, O. 1993. Caractérisation moléculaire du virus de la mosaïque du navet. Thèse de PhD. Laval.
- NICOLAS, O. et J.-F. LALIBERTÉ. 1992. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *J. Gen. Virol.* 73, 2785-2793.
- NICOLAS, O. et J.-F. LALIBERTÉ. 1991. The use of PCR for the cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. *J. Virol. Meth.* 32, 57-66.
- NISHIGUCHI, M.; F. MOTOYOSHI; N. OSHIMA. 1980. Further investigation of a temperature-sensitive strain of tobacco mosaic virus: its behavior in tomato leaf epidermis. *J. Gen. Virol.* 46: 497-500.
- ODELL, J.T. et S. H. HOWELL. 1980. The identification, mapping and characterization of mRNA for p66, a cauliflower mosaic virus- coded protein. *Virology* 102: 349-359.
-

- OLSEN, P. 1979. The neck constriction in plasmodesmata evidence for a sphincter-like structure revealed by fixation with tannic-acid. *Planta* 144: 349-358.
- OSMAN, T. A. M.; R. J. HAYES et K. W. BUCK. 1992. Cooperative binding of red clover necrotic mosaic virus movement protein to single-stranded nucleic acids. *J. Gen. Virol.* 73, 223-227.
- OSMAN, T. A. M.; P. THOMMES et K. W. BUCK. 1993. Localization of a single stranded RNA- binding domain in the movement protein of red clover necrotic mosaic dianthovirus. *J. Gen. Virol.* 74, 2453-2457.
- PALIKAITIS, P. et M. ZAITLIN. 1986. Tobacco mosaic virus: infectivity and replication. *The Plant Viruses* 2, 105-131.
- PETERS, D.L. et T. M. MURPHY. 1975. Selection of temperature sensitive mutants of tobacco mosaic virus by lesion morphology. *Virology* 65: 595-600.
- POISSON, F.; P. ROINGEARD; A. BAILLOU; F. DUBOIS; F. BONELLI; R. A. CALOGERO et A. GOUDEAU. 1993. Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen. *J. Gen. Virol.* 74, 2473-2477.
- PORTER, K. R.; R. D. MACHADO. 1960. Studies on the endoplasmic reticulum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7: 167-180.
- RESTREPO-HARTWIG, M. A. et J. CARRINGTON. 1994. The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J. Virol.* 68: 2388-2397.
- RIECHMANN, J. L.; S. LAIN et J. A. GARCIA. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73, 1-16.
- ROBAGLIA, C.; M. DURAND-TARDIF; M. TRONCHET; G. BOUDAZIN, G., ASTIER-MANIFACIER et F. CASSE-DELBART. 1989. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 70: 935-947.
- ROBARDS, A. W. et W. J. LUCAS. 1990. Plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 41, 369-419.

- ROBARDS, A.W. 1975. Plasmodesmata. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 13-29.
- RODRIGUEZ-CEREZO, E. et J. G. SHAW. 1991. Two newly-detected non-structural viral proteins in potyvirus infected cells. *Virology* 185, 572-579.
- SAMBROOK, J.; E. F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2d edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANGER, F.; S. NICKLEN et A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467.
- SCHOUMACHER, F.; C. ERNY; A. BERNA; T. GODEFROY-COLBURN et C. STUSSI-GARAUD 1992. Nucleic acid-binding properties of the alfalfa mosaic virus movement protein produced in yeast. *Virology* 188, 896-899.
- SENEAR, D. F. et M. BRENOWITZ. 1991. Determination of binding constants for cooperative site-specific protein-DNA interactions using the gel mobility-shift assay. *J. Biol. Chem.* 226: 13661-13671.
- SHEPHERD, R. J. 1989. Biochemistry of DNA plant viruses. *The Biochemistry of Plants* 15, 563-616.
- SHUKLA, D. D. E et C. W.WARD. 1989. Structure of potyvirus coat proteins and its application in taxonomy of the potyvirus group. *Adv. Virus Res.* 36, 273-314.
- SIMPSON, I.; B. ROSE; W. R. LOEWENSTEIN. 1977. Size limits of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* 197: 294-296.
- SMITH, K.M. 1972. Turnip mosaic virus dans *A textbook of plant viruses diseases*. Academic Press, New-York, 556-560.
- STERN, D. B. et W. GRUISSEM. 1987. Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription. *Cell* 51, 1145-1157.
- STOBBS, L. W. et I. SHATTUCK. 1989. Turnip mosaic virus strains in Southern Ontario, Canada. *Plant Disease* 73, 208-212.

- STRATFORD, R. et S. N. COVEY. 1989. Segregation of cauliflower mosaic virus symptom genetic determinants. *Virology* 172, 451-459.
- STUDIER, F. W. et B. A. MOFFATT. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- TANGL, E. 1879. Ueber offene Communicationen Zwischen den Zellen des Endosperms einiger Samen. *Jb. Wiss. Bot* 12: 170-190.
- TERRY, B. R. et A. W. ROBARDS. 1987. Hydrodynamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. *Planta* 171, 145-157
- THORNBURY, D. W.; G. M. HELLMANN; R. E. RHOADS et T. P. PIRONE. 1985. Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* 144: 260-267.
- TOMENIUS, K.; D. CLAPHAM et T. MESHI. 1987. Localization by immunogold cytochemistry of the virus coded 30 K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 160, 363-371.
- TOMLINSON, J.A. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* 110: 661-681.
- TREMBLAY, M.-F.; O. NICOLAS; R. C. SINSHA; C. LAZURE et J.-F. LALIBERTÉ. 1990. Sequence of the 3'-terminal region of turnip mosaic virus RNA and the capsid protein gene. *J. Gen. Virol.* 71: 2769-2772.
- TUCKER, E. B. 1988. Inositol biphosphate and inositol triphosphate inhibit cell-to-cell passage of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setereasea purpurea*. *Planta* 174: 358-363.
- Van LENT, J. W. M. 1988. Localization of viral antigens in leaf protoplasts and plants by immunogold labeling. Thèse PhD. Wageningen.
- VERCHOT, J.; E. V. KOONIN et J. C. CARRINGTON. 1991. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185, 527-535.

VOS, P.; J. VERVER; M. JAEGLE; J. WELLINK; A. VAN KAMMEN et R. GOLDBACH. 1988. Two viral proteins involved in the proteolytic processing of the cowpea mosaic virus polyprotein. *Nucl. Acids Res.* 16, 1967-1985.

WARD, C. W. et D. D. SHUKLA. 1991. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology* 32: 269-296

WEEKS, K. M.; C. AMPE; S. C. SCHULTZ; T. A. STEITZ. et D. M. CROTHERS. 1990. Fragments of HIV-1 tat protein specifically bind tar RNA. *Science* 249, 1281-1285.

WELLINK, J et A. van KAMMEN 1989. Cell-to-cell transport of cowpea mosaic virus requires both the 58K/48K proteins and the capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 70: 2279-2286.

WELLINK, J.; J. W. M. van LENT; J. VERVER; T. SIJEN; R. W. GOLDBACH, . et A. van KAMMEN. 1993. The cowpea mosaic virus M RNA-encoded 48-kilodalton protein is responsible for induction of tubular structures in protoplasts. *J. Virol.* 67: 3660-3664.

WELLINK, J et A. van KAMMEN. 1988. Proteases in the processing of polyproteins. *Brief Rev. Arch. Virol.* 98: 1-26.

WOLF, S.; C. M. DEOM; R. N. BEACHY et W. J. LUCAS. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246, 377-379.

WOLF, S.; C. M. DEOM; R. BEACHY et W. J. LUCAS. 1991. Plasmodesmatal function is probed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *The Plant Cell* 3, 593-604.

YANG, J. et A. G. HUNT. 1992. Purification and characterization of a 70-kDa polyadenylate-binding protein from pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* 98, 1115-1120.

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.

ZAITLIN, M. et R. HULL. 1987. Plant virus-host interactions. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 291-315.

## ANNEXES

## ANNEXE 1

## SOUCHES BACTÉRIENNES:

- SOUCHE 429:** *E. coli* XL 1 transformé avec le plasmide pET-P1 (Plasmide pET-21d contenant les 1086 pb du gène de la protéine P1 inséré dans les sites Nco I et Xho I)
- SOUCHE 408:** *E. coli* BL21 (DE3) transformé avec le plasmide pET-P1.
- SOUCHE 393:** *E. coli* BL21 (DE3) transformé avec le plasmide pET-C I ( Plasmide pET-21b contenant les 1920 pb du gène de la protéine C I inséré dans les sites Nde I et Xho I.
- SOUCHE 496:** *E. coli* bl21 (DE3) transformé avec le plasmide pET-P1- $\Delta$ Hc-Pro (pET-21d contenant 1400 pb du 5' terminal de l'ADNc du TuMV inséré dans sites Nco I et Xho I.

## ANNEXE 2

## AMORCES OLIGONUCLÉOTIDIQUES:

YS1: 5'-ACAGCAAGCCCATGGCACAGTC-3'

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (T+A) = 72^{\circ}\text{C}$$

Site Nco I = CCATGG

YS2 5'-TACGATCTCGAGACTCATTGT-3'

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (T+A) = 60^{\circ}\text{C}$$

Site Xho I = CTCGAGA

## ANNEXE 3

**ARTICLE:** Cet article démontre à la fois deux choses. D'une part, que la protéine P1 du Virus de la Mosaïque du Navet (TuMV) peut être produite sous forme recombinante dans un système d'expression procaryotique, purifiée par chromatographie d'affinité en conditions dénaturantes, puis renaturée par dialyse. D'autre part, que cette protéine possède la capacité de lier *in vitro* l'ARN simple brin du TuMV d'une manière *coopérative*. J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article.

**Youssef Soumounou and Jean-François Laliberté (1994): Nucleic acid-binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*.**

**Journal of General Virology: 75, 2567-2573.**