

Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier

**LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU NAVET (TuMV) COMME VECTEUR POUR
L'EXPRESSION DE PROTÉINES HÉTÉRODIMÉRIQUES**

Par
Véronique Bougie

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury
Examineur externe

Patrick Labonté
Louise Brisson
Faculté des sciences et de génie
Université Laval

Examineur interne

Patrick Labonté

Directeur de recherche

Jean-François Laliberté

Résumé

Il est maintenant possible de convertir les plantes en usines naturelles de médicaments ou autres molécules à hautes valeurs ajoutées. L'agriculture moléculaire, ou moléculture, répond ainsi à une demande pressante. La variable critique pour la viabilité économique de cette approche est la rapidité avec laquelle une forte concentration de protéines d'intérêt est atteinte dans la plante. En combinant la capacité répliquative des virus et l'intégration stable d'un transgène dans la plante, il sera possible d'amplifier de manière très significative et ce, rapidement, la quantité de protéines estimées produites au moment de la récolte.

Le virus de la mosaïque du navet (TuMV) est membre du grand groupe des Potyvirus. Son génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive longue de 10 000 nucléotides. Le TuMV code pour une polyprotéine unique qui est clivée en 10 protéines matures par trois protéinases virales. Les caractéristiques importantes du TuMV qui en font un candidat de choix pour le développement d'un vecteur d'expression sont premièrement, qu'une protéine d'intérêt qui ferait partie de la polyprotéine serait synthétisée au même niveau que les autres protéines virales; deuxièmement, la forme filamenteuse du virus offre la possibilité d'introduire plus d'un gène étranger dans le même vecteur.

En utilisant une copie ADN du génome viral cloné sous le contrôle d'un promoteur constitutif, notre équipe a pu réaliser deux premières constructions contenant soit le gène rapporteur *gfp* ou *uidA* inséré entre les gènes codant pour les protéines P1 et HC-Pro du TuMV. Malgré que la libération de ces protéines de la polyprotéine virale générerait la présence d'acides aminés supplémentaires aux extrémités, les résultats des tests *in planta* ont révélé la production de GFP et de GUS fonctionnels.

Les objectifs de nos travaux visent donc à : 1) déterminer la possibilité d'exploiter un second site d'insertion, et 2) d'élaborer une stratégie nouvelle d'insertion qui permettrait la production de protéines aux extrémités carboxy-terminales non-modifiées. Ainsi dans un premier temps, les gènes *gfp* ou *uidA* ont été insérés entre les gènes codant pour les protéines Pol et CP du virus. Des essais transitoires furent réalisés sur des plants de *Brassica* par la technique de biolistique. L'observation aux ultraviolets et des tests histochimiques ont révélés la présence *in vivo* des protéines GFP et GUS fonctionnelles. Des immunobuvardages de type western et des analyses par RT-PCR ont montré la bonne expression de chacune des protéines insérées et que la stabilité transcriptionnelle semble influencée par la taille, la nature et/ou la position du gène étranger.

Suite à ces résultats, nous avons donc dans un deuxième temps tenté l'expression simultanée des deux gènes rapporteurs insérés dans une même construction. La maintenance du caractère infectieux du vecteur et l'expression efficace des gènes introduits nous ont ensuite mené à tester la production d'anticorps par l'intermédiaire de notre vecteur. Finalement, des délétions furent réalisées par PCR au niveau de la capsid virale. Ces mutations avaient pour but d'identifier les séquences *cis* nécessaires à la réplication du TuMV. Les constructions ADN délétées furent transfectées sur des protoplastes de *Nicotiana benthamiana*. Les résultats préliminaires ont semblé démontrer la possibilité d'éliminer la séquence codante entre le 3^e et le 263^e codon de la capsid tout en conservant une capacité de réplication plus qu'intéressante pour les besoins encourus.


Étudiant

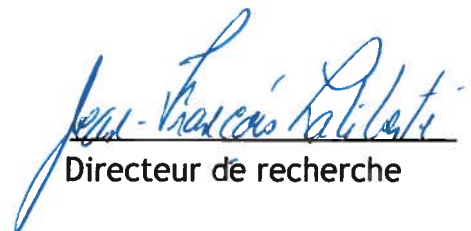

Directeur de recherche

Table des matières

Résumé	III
Table des matières	V
Table des illustrations	IX
Liste des tableaux	XI
Avant-propos et remerciements	XIII
CHAPITRE 1	1
Revue de littérature	1
1 LA PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES	1
2 L'AGRICULTURE MOLÉCULAIRE	3
2.1 Exemples de protéines recombinantes produites dans les plantes	4
2.1.1 Anticorps thérapeutiques et diagnostiques	11
2.1.2 Vaccins exprimés dans les plantes	12
2.1.3 Produits biopharmaceutiques dans les plantes	13
2.2 Les stratégies d'expression dans les plantes	13
2.2.1 Transformation stable	13
2.2.2 Expression transitoire	14
2.3 Méthodes de transformation	15
2.3.1 Agroinfection	15
2.3.2 Bombardement particulaire	18
2.3.3 Vecteurs viraux	18
3 LES PHYTOVIRUS, VECTEURS D'EXPRESSION	20
3.1 Exemples d'utilisation des vecteurs viraux	22
3.2 Les potyvirus	26
3.2.1 Organisation génomique et stratégie d'expression des potyvirus	26
3.2.2 Fonctions des protéines potyvrales	28
3.2.2.1 La première protéine (P1) (~40.03 kDa)	28
3.2.2.2 La protéine HC-Pro (~51.67 kDa)	28
3.2.2.3 Les protéines P3(~40.32 kDa), 6K1(~5.93 kDa) et 6K2(~6.00 kDa)	29
3.2.2.4 La protéine d'inclusion cylindrique (CI)(~71.78 kDa)	29
3.2.2.5 La protéine NIa (VPg-Pro)(~49.21 kDa)	29
3.2.2.6 La réplicase NIb (Pol)(~59.62 kDa)	30
3.2.2.7 La capside(~32.74 kDa)	31
3.2.3 Les potyvirus comme vecteurs viraux	32
3.3 Avantages des vecteurs viraux	33
3.4 Désavantages des vecteurs viraux	34

4	HYPOTHÈSE.....	36
4.1	Développement d'un réplicon viral inductible	36
5	OBJECTIFS DE TRAVAIL	38
5.1	Insertion de gènes étrangers	38
5.2	Élaboration d'une nouvelle stratégie d'insertion	38
CHAPITRE 2.....		39
Matériel et Méthodes.....		39
1	SOUCHES BACTÉRIENNES.....	39
2	MILIEUX DE CULTURE	39
3	VECTEURS DE CLONAGE	40
3.1	Le plasmide pBin m- <i>gfp5</i> -ER	40
3.2	Le plasmide pBI221	41
3.3	Les plasmides pSK-C5.1 <i>kappa</i> et pSK-C5.1 <i>gamma</i>	41
3.4	Le plasmide pCR® 4Blunt TOPO®	41
3.5	Système de vecteur binaire (pGreenII 0000/pSoup)	42
4	CONSTRUCTIONS DE DÉPART	43
4.1	p35TuNos.....	43
4.1.1	p35TuNos-SacII, p35TuNos-N-GFP et p35TuNos-N-GUS.....	44
4.1.2	pSK-ClaI/VNN.....	44
5	PROCÉDURES DE CLONAGE.....	46
5.1	Amplification de fragments d'ADN par la technique des réactions de polymérase en chaînes.....	46
5.2	Mutagenèse dirigée par PCR.....	47
5.3	Techniques de sous clonage par l'utilisation d'enzymes.....	50
5.3.1	Digestion enzymatique.....	50
5.3.2	Déphosphorylation.....	50
5.3.3	Ligation.....	51
5.4	Transformation par électroporation	51
5.4.1	Préparation des bactéries (<i>E.coli</i>).....	51
5.4.2	Préparation des bactéries (<i>A. tumefaciens</i>)	52
5.4.3	Électroporation.....	52
5.5	Transformation par choc thermique(<i>E.coli</i>)	53
5.5.1	Préparation des bactéries	53
5.5.2	Choc thermique	53
5.6	Caractérisation des clones.....	53
5.6.1	Préparation d'une sonde marquée au DIG	53
5.6.2	Hybridation <i>in situ</i>	54
5.7	Extraction d'ADN plasmidique	55
5.7.1	Lyse alcaline avec SDS	55
5.7.2	Midipréparation QIAGEN	55

5.7.3	Analyse sur gel d'agarose	56
6	MULTIPLICATION DU VIRUS DANS UNE PLANTE HÔTE.....	56
6.1	Plantes hôtes	56
6.2	Transformation des cellules végétales.....	57
6.2.1	Expression transitoire dans les feuilles de <i>Brassica perviridis</i>	57
6.2.1.1	Préparation des microprojectiles.....	57
6.2.1.2	Adsorption de l'ADN	58
6.2.1.3	Bombardement particulaire	58
6.2.2	Expression transitoire dans des protoplastes de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	60
6.2.2.1	Germination de graines in vitro	60
6.2.2.2	Préparation des protoplastes	60
6.2.2.3	Transfection chimique des protoplastes.....	61
6.2.3	Expression transitoire dans les feuilles de <i>Nicotiana benthamiana</i>	61
6.2.3.1	Agroinfiltration.....	61
7	ANALYSE DE L'EXPRESSION	63
7.1	Observation de l'expression des gènes rapporteurs	63
7.1.1	Protéine de fluorescence verte	63
7.1.2	□-Glucuronidase	63
7.2	Extraction des protéines totales solubles	64
7.2.1	Immunobuvardage	64
7.2.1.1	Séparation des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide	64
7.2.1.2	Immunorévélation après transfert	65
7.2.2	Dosage quantitatif par spectrofluorométrie	66
7.3	Extraction des ARNs totaux.....	67
7.3.1	Analyse par transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)	67
CHAPITRE 3.....		69
Résultats		69
1	INSERTIONS DES GÈNES RAPPORTEURS DANS LE TUMV	69
1.1	Constructions des plasmides	69
1.2	Expression transitoire dans <i>Brassica perviridis</i>	75
1.2.1	Transfection	75
1.2.2	Expression des gènes rapporteurs	78
1.2.2.1	Protéine à fluorescence verte	78
1.2.2.2	□-Glucuronidase	79
1.2.3	Analyse de l'expression des gènes rapporteurs	80
1.2.4	Stabilité des insertions.....	82
2	INSERTION DES GÈNES CODANTS POUR UN ANTICORPS DANS LE TUMV	85
2.1	Constructions des plasmides	85
2.2	Expression transitoire dans <i>Brassica perviridis</i>	88

2.2.1	Transfection	88
2.2.2	Expression des gènes rapporteurs	90
2.2.3	Analyse de l'expression des gènes <i>kappa</i> et <i>gamma</i>	91
2.2.4	Stabilité des insertions.....	94
3	ÉLABORATION D'UNE NOUVELLE STRATÉGIE D'INSERTION	97
3.1	Constructions des plasmides	97
3.2	Expression transitoire dans <i>Nicotiana benthamiana</i>	101
3.2.1	Transfection chimique de protoplastes.....	101
3.2.2	Agroinfiltration de feuilles de <i>Nicotiana benthamiana</i>	104
CHAPITRE 4.....		107
Discussion.....		107
1	INSERTION DE GÈNES RAPPORTEURS	108
2	INSERTIONS DES GÈNES CODANTS POUR C5.1	115
3	ÉLABORATION D'UNE NOUVELLE STRATÉGIE D'INSERTION	126
4	PERSPECTIVES D'AVENIR.....	130
CHAPITRE 5.....		133
Conclusion.....		133
Bibliographie		137

Table des illustrations

Figure 1 : Méthode de transformation de cellules végétales par agroinfection en vue d'une expression stable.	17
Figure 2 : Méthode de transformation de cellules végétales par bombardement particulaire en vue d'une expression stable ou transitoire.	19
Figure 3 : Cycle de réplication des virus à ARN dans une cellule végétale.	21
Figure 4 : Organisation génomique et stratégie d'expression des potyvirus.	27
Figure 5 : Représentation schématique des fonctions connues de la capside....	31
Figure 6 : Schématisation de l'instabilité génétique d'un gène étranger.	35
Figure 7 : Hypothèse de travail	37
Figure 8 : Le vecteur pGreenII0000 (A) et le plasmide pSoup (B)	42
Figure 9 : Carte de restriction des constructions de départ p35TuNos et p35TuNos-SacII	43
Figure 10 : Carte des restriction des constructions de départ p35TuNos-SacII, p35TuNos-N-GFP, p35TuNos-N-GUS et pSK-Cla/VNN	45
Figure 11 : Exploitation de la salle de croissance	57
Figure 12 : Méthode de transformation de cellules végétales par bombardement particulaire.	59
Figure 13 : Méthode de transformation de cellules végétales par agroinfiltration en vue d'une expression transitoire	62
Figure 14 : Constructions du vecteur TuMV pour l'expression d'un gène rapporteur unique	70
Figure 15 : Cartes de restriction de p35TuNos-Delta-SacI et p35TuNos-NgoMIV.	71
Figure 16 : Cartes de restriction de p35TuNos-C-GFP et p35TuNos-C-GUS	72
Figure 17 : Construction du vecteur TuMV pour l'expression de deux gènes rapporteurs	73
Figure 18 : Cartes de restriction de p35TuNos-GFP-GUS, p35TuNos-GUS-GFP ...	74
Figure 19 : Témoins positif et négatif de transfection par bombardement particulaire	77
Figure 20 : Fluorescence de la GFP.....	78
Figure 21 : Activité de la β-glucuronidase dans des feuilles bombardées par les vecteurs TuMV porteurs du gène <i>uidA</i>.....	79
Figure 22 : Immunobuvardage de type western sur des extractions protéiques issues de feuilles de <i>B. perviridis</i> non-infectées ou transfectées avec les constructions p35TuNos, p35TuNos-CGFP, p35TuNos-CGUS, p35TuNos-GFP-GUS ou p35TuNos-GUS-GFP.	81
Figure 23 : Patron de migration des amplicons obtenus par RT-PCR : stabilité des gènes <i>gfp</i> et <i>uidA</i> dans la séquence du TuMV.	84
Figure 24 : Construction du vecteur TuMV pour l'expression des gènes codant pour les chaînes légère et lourde de l'anticorps C5.1	86

Figure 25 : Cartes de restriction des constructions p35TuNos-κ-GUS, p35TuNos-GFP-γ et p35TuNos-κ-γ.....	87
Figure 26 : Immunobuvardage de type western sur des extractions protéiques issues de feuilles de <i>B. perviridis</i> transfectées avec les constructions p35TuNos, p35TuNos-κ-γ, p35TuNos-κ-GUS ou p35TuNos-GFP-γ.....	89
Figure 27 : Expression des gènes rapporteurs.....	90
Figure 28 : Immunobuvardage de type western sur des feuilles de <i>B. perviridis</i> non-infectées ou transfectées avec les constructions p35TuNos-κ-γ, p35TuNos-GFP-γ, p35TuNos et p35TuNos-κ-GUS.	93
Figure 29 : Stabilité des gènes <i>kappa</i> et <i>gamma</i> dans la séquence du TuMV.....	96
Figure 30 : Alignement des séquences codant pour la capsid virale des potyvirus TuMV, TEV, PPV et ZYMV	98
Figure 31 : Représentation schématique des délétions introduites dans la séquence codant pour la capsid virale du TuMV.....	99
Figure 32 : Carte de restriction de p35TuNos-CGUS/VNN.....	100
Figure 33 : Pourcentage de réplication génomique de différents TuMV mutants pour la capsid.....	102
Figure 34 : Activité de la β-glucuronidase dans des feuilles agroinfiltrées par les TuMV mutants pour la capsid, le motif VNN et le gène <i>uidA</i> uniquement.	105
Figure 35 : Modèle hypothétique du déroulement du processus de translocation de la polyprotéine du TuMV-κ-γ.	121
Figure 36 : Modèle hypothétique de la synthèse de la polyprotéine du TuMV-κ-γ dans le cas où le processus de translocation aurait été bloqué.	123

Liste des tableaux

Tableau I : Comparaison des différents systèmes de production de protéines recombinantes	5
Tableau II : Production d'anticorps thérapeutiques dans les plantes transgéniques	6
Tableau III : Production de vaccins dans les plantes transgéniques.....	7
Tableau III : Production de vaccins dans les plantes transgéniques (suite).....	8
Tableau IV : Production de produits pharmaceutiques dans les plantes transgéniques	9
Tableau IV : Production de produits pharmaceutiques dans les plantes transgéniques (suite).....	10
Tableau V : Protéines d'intérêt médical, diagnostique ou agricole exprimé dans les plantes via les vecteurs viraux	24
Tableau V : Protéines d'intérêt médical, diagnostique ou agricole exprimé dans les plantes via les vecteurs viraux (suite)	25
Tableau VI : Amorceurs utilisés pour l'insertion des gènes étrangers	48
Tableau VII : Amorceurs utilisés pour créer les délétions	49
Tableau VIII : Dilution des anticorps utilisés pour les Western Blot	66
Tableau IX : Amorceurs utilisés pour l'amplification des régions comprenant un site d'insertion.....	68
Tableau X : Résultats obtenus suite à la transfection de plantes de <i>B.perviridis</i> avec les constructions contenant un ou des gènes rapporteurs	77
Tableau XI : Tailles attendues des amplicons issus de RT-PCR réalisés sur des extractions d'ARN de feuilles infectées par le virus TuMV, TuMV-CGFP, TuMV-CGUS, TuMV-GFP-GUS ou TuMV-GUS-GFP	83
Tableau XII : Apparition des symptômes suite à la transfection de plantes de <i>B.perviridis</i> avec les constructions contenant une chaîne légère ou lourde et un gène rapporteur ou les deux chaînes	89
Tableau XIII : Tailles attendues des amplicons issus de RT-PCR réalisés sur des extractions d'ARN de feuilles infectées par le virus TuMV, TuMV-κ-GUS, TuMV-GFP-γ ou TuMV-κ-γ.....	95

Avant-propos et remerciements

La réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible sans la participation de plusieurs personnes.

Ma profonde reconnaissance va au Dr Jean-François Laliberté, mon directeur de recherche, pour l'encadrement qu'il m'a donné, le temps qu'il m'a consacré et la liberté dont j'ai disposé afin de réaliser ces études. Je le remercie également pour m'avoir fourni les conditions appropriées à la réussite de mes travaux dans son laboratoire et pour m'avoir permis d'effectuer un stage inoubliable à l'INRA de Bordeaux, en France. Sa compréhension et son grand humanisme m'ont de plus permis de prendre le temps d'unir ma vie à celle de l'homme que j'aime et de donner naissance à la plus jolie petite fille du monde, Ellie-Jeanne Hébert [*ex aequo* avec Florence et Marie-Jeanne Laliberté, bien sûr...].

De précieux collaborateurs m'ont accompagnée au cours de ce travail de recherche. À chacun, j'exprime toute ma gratitude pour le support, les critiques, les discussions et les encouragements.

De chaleureux remerciements rejoignent également toute ma famille : l'ensemble des membres pour leur appui; ma mère tout spécialement pour le temps passé avec sa petite-fille; mon époux pour son amour, sa compréhension et ses talents de papa.

Enfin, je remercie sincèrement la compagnie Médicago et le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) dont l'aide financière a permis la réalisation de ces travaux.

Chapitre 1

Revue de littérature

1 La production de protéines recombinantes

La recherche scientifique des dernières décennies a révolutionné le traitement de nombreuses maladies suite à la production de protéines recombinantes telles que l'insuline et les immunoglobulines. Néanmoins, les coûts associés à la synthèse de ces molécules limitent encore aujourd'hui leur disponibilité. Compte tenu du vieillissement des populations et des besoins toujours insatisfaits des pays en voie de développement, il est clair que la demande en médicaments et autres dérivés pharmaceutiques est appelée à s'accroître considérablement dans les années futures. Il est alors légitime et même prescrit de s'assurer qu'ils seront disponibles en quantités suffisantes, et ce, sur une base économique raisonnable. Aussi est-il urgent de développer de nouvelles stratégies de production plus efficaces et économiques que celles traditionnellement employées.

Actuellement, la majorité des compagnies de biotechnologie utilisent principalement les cellules CHO (« chinese hamster ovary ») ou NS0 (lignée cellulaire d'un myélome murin) pour la production de protéines pharmaceutiques, alors que les champignons filamenteux, les levures et les bactéries sont surtout utilisés pour la production d'enzymes industrielles. L'utilisation des cellules animales modifiées offre l'avantage de produire une protéine très proche de l'originale. Ces cellules sont néanmoins particulièrement sensibles aux changements environnementaux (température, pH, O₂), ce qui nécessite des conditions de cultures rigoureusement contrôlées (Giddings et al. 2000). Le recours à ces systèmes est donc coûteux et ne peut se faire qu'à une échelle réduite. Par ailleurs, malgré que les systèmes utilisant

des microorganismes tels que les bactéries et les champignons soient plus résistants, ils ne peuvent servir qu'à la production de petits polypeptides simples comme l'insuline ou les hormones de croissance. Ceci s'explique par le fait que les protéines complexes y sont repliées incorrectement et s'accumulent en agrégats insolubles connus sous le nom de corps d'inclusion (Daniell et al. 2001b; Schillberg et al. 2003). Finalement, en vue d'applications thérapeutiques *in vivo*, ces systèmes d'expression exigent des précautions additionnelles afin d'éliminer toutes séquences oncogéniques, contaminants protéiques (endotoxines) ou agents pathogènes (Fischer & Emans 2000).

Parallèlement, d'intenses recherches sont effectuées en vue de l'utilisation d'animaux transgéniques en tant que bioréacteurs pharmacologiques, particulièrement les chèvres, les vaches, les moutons et les porcs. Bien que la productivité y soit élevée, de plus en plus de restrictions d'ordre légal et éthique limitent l'utilisation d'animaux transgéniques (Fischer & Emans 2000). La création de ces animaux exige énormément de temps et une très forte proportion des embryons meurent suivant l'intégration du transgène, compte tenu de la toxicité liée à l'expression *in vivo* de certaines protéines recombinantes (Pogue et al. 2002). De plus, la préoccupation associée à la contamination par des agents infectieux ou par des séquences oncogéniques demeure.

2 L'agriculture moléculaire

Les nombreuses limitations associées aux méthodes traditionnelles de production de protéines recombinantes ont précipité l'exploitation des plantes en tant qu'alternative économique, sécuritaire et efficace. Les récents développements dans les technologies de l'ADN recombinant, de transformation de plantes et d'ingénierie d'anticorps favorisent d'autant plus l'avènement de l'agriculture moléculaire.

Par «agriculture moléculaire», il faut entendre « la culture de plantes pour la production de biomolécules utiles sur le plan industriel, médical ou scientifique, plutôt que pour les usages traditionnels que sont la production soit d'aliments pour les humains, soit d'aliments pour le bétail, soit de fibres » (<http://www.inspection.gc.ca/francais/plaveg/pbo/mf/reportprocedf.pdf>).

La production de protéines recombinantes dans les plantes présente des avantages significatifs face aux systèmes d'expression classiques (Tableau 1; (Fischer & Emans 2000)). Tout d'abord, les plantes peuvent croître en conditions non stériles, sans besoin en nutriments coûteux ni conditions environnementales strictes (Awram et al. 2002). Ainsi, l'emprunt des infrastructures déjà implantées en agriculture pour la récolte, la transformation et l'entreposage minimiserait de manière importante l'ampleur des investissements requis pour la production commerciale (Giddings 2001; Fischer et al. 2003). Contrairement aux animaux transgéniques, il n'y a aucun besoin de maintenir de « géniteurs » puisque les lignées de plantes transgéniques peuvent être conservées à l'état de graines (Fischer et al. 2003). De plus, les végétaux ne sont l'hôte d'aucun virus pathogène pour l'homme ou l'animal et la plupart des protéines potentiellement allergènes peuvent être évitées par le choix de la variété de plante appropriée (Schillberg et al. 2003). Par ailleurs, la synthèse, la sécrétion et les modifications post-traductionnelles des protéines sont très similaires à celles des cellules animales arborant quelques différences mineures au niveau de la glycosylation (Fischer et al. 2003). En ce qui concerne l'usage des codons dans

les plantes, la dégénérescence du code génétique permet de faire des ajustements au niveau de la séquence des transgènes afin d'optimiser l'efficacité de la traduction (Giddings 2001). Il est également possible de cibler les protéines d'intérêt vers des compartiments intracellulaires ou encore des organes précis. Ceci favorise une plus grande stabilité, des niveaux de production plus élevés et une purification simplifiée (Awram et al. 2002). En effet, selon le type de protéine produit, l'élimination de l'étape de purification peut être envisagée si l'organe cible en est un comestible.

Tous ces avantages vouent un brillant avenir l'utilisation des plantes en tant que nouvelle plate-forme manufacturière.

2.1 Exemples de protéines recombinantes produites dans les plantes

Le potentiel d'utiliser les plantes en tant que système de production de molécules recombinantes fut démontré pour la première fois par l'expression d'une hormone de croissance humaine (Barta et al. 1986). Mais c'est en 1989, avec l'expression dans le tabac d'un anticorps fonctionnel (Hiatt et al. 1989) que l'agriculture moléculaire a véritablement pris son envol. Depuis, le nombre de protéines exprimées dans les plantes est en constante évolution et inclut protéines plasmatiques, enzymes, hormones, interleukines, réactifs de diagnostics, anticorps et vaccins recombinants (tableau 2-4).

Tableau I : Comparaison des différents systèmes de production de protéines recombinantes

		Plantes	Levures	Bactéries	Cellules animales (culture)	Animaux
Coûts	Production	Faibles	Moyens	Faibles	Élevés	Moyens
	Temps et efforts	Élevés	Moyens	Faibles	Élevés	Élevés
	Augmentation de production	Faibles	Élevés	Élevés	Élevés	Moyens
Qualité	Homogénéité des protéines	Élevée	Moyenne	Faible	Élevée	Élevée
	Glycosylation	Correcte ?	Incorrecte	Absente	Correcte	Correcte
	Risques de contamination	Absents	Absents	Présents	Présents	Présents
Applications	Assemblage multimérique	Oui	Non	Non	Non	Oui
	Entreposage	Économique /TP	Économique /-20°C	Économique /-20°C	Coûteux/N ₂	Coûteux
	Distribution	Facile	Faisable	Faisable	Difficile	Difficile
	Production	Mondiale	Limitée	Limitée	Limitée	Limitée

Adapté des articles de (Fischer & Emans 2000) et (Schillberg et al. 2003).

Tableau II : Production d'anticorps thérapeutiques dans les plantes transgéniques

Application potentielle et spécificité	Plantes	Forme de l'anticorps	Références
Diagnostic			
Substance P (neuropeptide)	Tabac	dAb (domaine V _H)	(Benvenuto et al. 1991)
Infarctus du myocarde (anti-créatine kinase humaine)	Tabac, <i>Arabidopsis</i>	IgG1, scFv, Fab,	(De Neve et al. 1993; Bruyns et al. 1996)
Banques de sang (anti-IgG humain)	Luzerne	IgG	(Khoudi et al. 1999)
Traitement et/ou prévention			
Cancers hématologiques (anti-CD40)	Tabac	scFv-IT	(Francisco et al. 1997)
Herpès génital (anti-HSV 2)	Soya	IgG	(Zeitlin et al. 1998)
Hépatite B (antigène de surface)	Tabac	IgG	(Valdes et al. 2003)
Lymphome non Hodgkinien (anti-idiotype)	Tabac	scFv anti-idiotype d'IgG de lymphome B	(McCormick et al. 1999; McCormick et al. 2003)
Cancer (anti-CEA)	Blé, riz et tabac	scFvT84.66	(Stoger et al. 2000; Vaquero et al. 2002)
Carie dentaire (anti-adhésine II de <i>S. mutans</i>)	Tabac	sIgA-G, IgG1	(Ma et al. 1995; Vine et al. 2001)

dAb : anticorps simple domaine, scFv : fragments à chaîne unique, Fab : fragment ab, scFv-IT : scFv-immunotoxine-bryodine, CEA : Antigènes carcinoembryogéniques.

Adapté de (Beauchemin 2003) et des articles de (Giddings et al. 2000); (Daniell et al. 2001b) et (Schillberg et al. 2003).

Tableau III : Production de vaccins dans les plantes transgéniques

Cible	Plantes	Protéine ou peptide exprimé	Références
Humain			
<i>E. coli</i> entérotoxigénique	Tabac, Pomme de terre, maïs	Sous-unité B de la toxine thermosensible	(Haq et al. 1995; Tacket et al. 1998; Mason et al. 1998)
Rotavirus	Pomme de terre	Sous-unité A2 du rotavirus	(Yu & Langridge 2001)
<i>Vibrio cholerae</i>	Pomme de terre, Tabac	Sous-unités des toxines CtxA et CtxB de <i>V. cholerae</i>	(Arakawa et al. 1998; Daniell et al. 2001a)
Virus de l'hépatite B	Tabac, Pomme de terre, Laitue	rHBsAg - protéine de surface	(Mason et al. 1992; Thanavala et al. 1995; Kapusta et al. 1999; Richter et al. 2000; Kong et al. 2001)
Virus de Norwalk	Tabac, Pomme de terre	Protéine de la capside	(Mason et al. 1996; Tacket et al. 2000)
Virus de la rage	Tomate	Glycoprotéine	(McGarvey et al. 1995)
Cytomégalo virus	Tabac	Glycoprotéine B	(Tackaberry et al. 1999)
Virus de la rougeole	Tabac, Carotte	Hémagglutinine	(Huang et al. 2001; Marquet-Blouin et al. 2003)
Virus respiratoire syncytial	Tomate, Tabac	Protéine RSV-F et RSV-G	(Belanger et al. 2000; Sandhu et al. 2000)
Virus de l'immunodéficience acquise humaine (VIH)	Tabac	Épitope de VIH (p29)	(Zhang et al. 2002)
Tétanos	Tabac	Fragment C de la toxine tétanique	(Tregoning et al. 2003)

Adapté de (Beauchemin 2003) et des articles de (Giddings et al. 2000); (Fischer & Emans 2000) et (Daniell et al. 2001b).

Tableau III : Production de vaccins dans les plantes transgéniques (suite)

Cible	Plantes	Protéine ou peptide exprimé	Références
Animal			
Virus hémorragique du lapin	Pomme de terre	VP60	(Castanon et al. 1999)
Pneumonie à <i>Pasteurella</i> (bovins)	Trèfle blanc	Leucotoxine Lkt66/50	(Lee et al. 2001)
Parvovirus canin	<i>Arabidopsis</i> Tabac	Protéine de la capside VP2	(Gil et al. 2001)
Virus de la fièvre aphteuse	<i>Arabidopsis</i> , Luzerne	Protéine structurale VP1	(Carrillo et al. 1998; Wigdorovitz et al. 1999)
Coronavirus Gastro-entérique (TGEV)	<i>Arabidopsis</i> , Tabac, Maïs	Glycoprotéine S	(Gomez et al. 1998; Tuboly et al. 2000)
Rotavirus bovin du groupe A	Pomme de terre	Protéine de la capside VP6	(Matsumura et al. 2002)

Adapté de (Beauchemin 2003) et des articles de (Giddings et al. 2000); (Fischer & Emans 2000) et (Daniell et al. 2001b).

Tableau IV : Production de produits pharmaceutiques dans les plantes transgéniques

Application potentielle	Plantes	Protéine	Références
Anticoagulant			
Voie de synthèse de protéine C	Tabac	Protéine C humaine	(Cramer et al. 1996)
Antithrombine directe (sans besoin de co-facteur)	Tabac, Colza, Moutarde	Hirudine	(Parmenter et al. 1995; Boothe et al. 1997)
Protéines/hormones recombinantes			
Neutropénie	Tabac	Facteur de stimulation de colonie de granulocyte-macrophage humain	(Sardana et al. 2002)
Hormone de croissance	Tabac	Somatotropine humaine	(Staub et al. 2000)
Anémie	Tabac	Erythropoïétine humaine	(Matsumoto et al. 1995)
Réparation de blessures/ contrôle de prolifération cellulaire	Tabac	Facteur de croissance épidermique humain	(Higo et al. 1993)
Facteur de croissance hématopoïétique	Tabac	Facteur de stimulation de colonie de granulocyte-macrophage humain	(James et al. 2000)
Traitement de l'hépatite B et C	Tabac, Pomme de terre	Interféron- β humain; Interféron- α 2b/ 8 humain	(Edelbaum et al. 1992; Ohya et al. 2001)
Cirrhose du foie, Brûlures et chirurgie	Tabac	Albumine de sérum humain	(Sijmons et al. 1990)
Substituts sanguins	Tabac	Hémoglobine α, β humaine	(Dieryck et al. 1997)
Collagène	Tabac	Collagène-1 homotrimérique humain	(Ruggiero et al. 2000)

Adapté de (Beauchemin 2003) et des articles de (Giddings et al. 2000) et (Daniell et al. 2001b).

Tableau IV : Production de produits pharmaceutiques dans les plantes transgéniques (suite)

Application potentielle	Plantes	Protéine	Références
Inhibiteurs de Protéines/Peptides			
Inhibiteur de trypsine pour la transplantation	Maïs	Aprotinine humaine	(Azzoni et al. 2002)
Agent antimicrobien	Pomme de terre, Tabac	Lactoferrine humaine; Magainine (MSI 99)	(Chong & Langridge 2000; DeGray et al. 2001)
Enzymes recombinantes			
Maladie de Gaucher	Tabac	Glucocérébrosidase	(Cramer et al. 1996)
Nutraceutiques			
Déficiences en provitamine A	Riz	Daffodil phytoène synthase	(Burkhardt et al. 1997)
Déficiences en acides aminés	Pomme de terre	Albumine de graine Ama1 de <i>Amaranthus hypochondiracus</i>	(Chakraborty et al. 2000)
Réactifs de laboratoire			
Hydrolyse de stéroïde glucuronique	Maïs	β -Glucuronidase	(Kusnadi et al. 1998)
Diagnostic et purification	Maïs	Avidine (Sigma # A8706)	(Kusnadi et al. 1998)
Dissociation de cellules en culture	Maïs	TrypZean™ (Sigma # T3568)	(Woodard et al. 2003); Prodigene Inc.

Adapté de (Beauchemin 2003) et des articles de (Giddings et al. 2000) et (Daniell et al. 2001b).

2.1.1 Anticorps thérapeutiques et diagnostiques

À ce jour, un petit nombre d'anticorps exprimés dans les plantes (planticorps) ont été développés pour la thérapie humaine (Fischer et al. 2003). Malgré qu'aucun ne soit actuellement sur le marché, deux parmi ceux-ci ont déjà atteint la deuxième phase clinique (Schillberg et al. 2003).

La compagnie NeoRx a développé un immunoglobuline (Ig) G spécifique pour un marqueur du cancer du colon. Les premiers tests en clinique ont démontré que ce planticorps, nommé Avicidin[®], affichait une activité anti-cancéreuse chez les patients atteints de cancers avancés du colon et de la prostate (Fischer et al. 2003). Au cours de la deuxième phase clinique, une forte incidence de diarrhée, probablement due à une réaction croisée avec un épitope relié de la paroi intestinale, a néanmoins obligé son retrait des tests en clinique. (http://www.biospace.com/ccis/news_company.cfm?CompanyID=2447&SR=91; (Fischer et al. 2003)). De nouvelles analyses sont en cours.

Le second planticorps actuellement en deuxième phase d'essais cliniques se nomme CaroRx[™], un IgA-IgG chimérique produit dans des plants de tabac transgéniques (Ma et al. 1995; Ma et al. 1998; Larrick et al. 2001; Fischer et al. 2003). Ce dernier est spécifique pour un antigène de surface de la bactérie responsable de la carie, *Streptococcus mutans*. L'application topique de cet anticorps aide à prévenir, sur une période allant jusqu'à quatre mois, la recolonisation par *S. mutans* et mène au remplacement de cet organisme pathogène par une flore endogène sans danger. La production de cet anticorps a nécessité l'expression des quatre chaînes polypeptidiques dans quatre plantes différentes, lesquelles furent ensuite croisées après deux générations pour éventuellement obtenir tous les transgènes dans la même lignée.

Un troisième anticorps, contre l'antigène carcinoembryogénique (CEA), a également été exprimé dans les plantes (Stoger et al. 2000). Cette glycoprotéine de surface est l'un des antigènes associés aux tumeurs les mieux caractérisés

(Daniell et al. 2001b) et les anticorps anti-CEA sont utilisés pour l'imagerie tumorale *in vitro* et la thérapie contre le cancer. Il fut démontré que le fragment Fv à chaîne unique T84.66 anti-CEA s'accumulait à de hauts niveaux dans les feuilles et les graines de riz, les feuilles de tabac, les graines de pois et de blé (Stoger et al. 2000; Schillberg et al. 2003).

Un autre planticorps, dirigé contre le virus de l'herpès simplex de type 2, a quant à lui été exprimé dans des plants de soya transgéniques (Zeitlin et al. 1998; Fischer et al. 2003). Malgré qu'il n'ait pas encore été testé chez l'humain, son application topique chez un modèle murin de la maladie a démontré pouvoir prévenir la transmission du HSV-2. Selon la même étude, l'activité *in vitro* et *in vivo* de l'anticorps est par ailleurs identique à celle de l'anticorps monoclonal témoin. Ces quatre exemples expriment clairement la faisabilité de la production d'anticorps dans les plantes pour un usage thérapeutique chez l'humain.

2.1.2 Vaccins exprimés dans les plantes

Les antigènes microbiens ou viraux furent parmi les premiers exemples choisis pour démontrer la faisabilité des systèmes d'expression dans les plantes transgéniques (Daniell et al. 2001b). Plusieurs d'entre eux furent testés avec succès en tant qu'éventuels vaccins contre une grande variété de maladies humaines et animales telles que l'hépatite B (Kapusta et al. 1999; Richter et al. 2000) et la fièvre aphteuse (Wigdorovitz et al. 1999) (tableau 3). La compagnie Prodigene Inc. est actuellement en première phase d'essais cliniques pour un vaccin comestible efficace contre la « maladie du voyageur » (<http://www.centerwatch.com>). En effet, il a été démontré que la sous-unité Lt-B de l'entérotoxine thermosensible de la bactérie *E. coli* pouvait induire une réponse immune chez des volontaires humains (Tacket et al. 1998).

2.1.3 Produits biopharmaceutiques dans les plantes

Plusieurs protéines utilisées abondamment en laboratoire ont été produites avec succès dans les plantes transgéniques et certaines d'entre elles sont actuellement disponibles sur le marché. À titre d'exemple, mentionnons l'avidine, un réactif diagnostique, qui fut originalement purifiée à partir de blancs d'oeufs, où elle se retrouve en quantité relativement abondante. C'est dans le but de trouver une source encore plus économique que Kusnadi et ses collègues ont réalisé des essais avec des plants de maïs transgéniques (Kusnadi et al. 1998). L'équipe estime que cette avidine est 10 fois moins coûteuse que celle extraite des oeufs. La molécule produite est fonctionnelle et est présentement disponible commercialement (Sigma-Aldrich # A8706).

2.2 Les stratégies d'expression dans les plantes

Il existe actuellement deux stratégies d'expression de séquences étrangères dans les plantes : la transformation génétique stable et l'expression transitoire.

2.2.1 Transformation stable

La transgénèse implique l'intégration stable de gènes hétérologues dans le génome d'une plante hôte. La transcription du gène intégré est assurée par la présence d'un promoteur positionné immédiatement en amont de la région codante. Plusieurs considérations doivent être faites en ce qui concerne le choix du promoteur à utiliser; il en existe une grande variété capable de réguler différents types d'expression (Lessard et al. 2002). Cette stratégie d'expression de gènes étrangers dans les plantes est largement utilisée et offre l'avantage que la séquence intégrée est héréditaire (Porta & Lomonossoff 2002).

Malgré le fait que les techniques générales de transformation soient de plus en plus maîtrisées, certaines espèces majeures demeurent impossibles à transformer (Fischer & Emans 2000). Par ailleurs, cette approche présente d'autres inconvénients. Ainsi, les niveaux d'expression atteints sont souvent faibles et des phénomènes indésirables, tels que le « gene silencing » surviennent fréquemment (Porta & Lomonossoff 2002). Le « gene silencing » peut survenir pour de nombreuses raisons, comme des intégrations multiples, la présence de séquences homologues ou de sites de méthylation de l'ADN et la synthèse d'ARNm anti-sens, lesquels résultent en la formation de molécule d'ARN double-brin qui ne peuvent être traduites (Awram et al. 2002). L'expression de l'ADN étranger varie donc selon l'endroit où il s'est intégré dans le génome de la plante et il est nécessaire d'évaluer un nombre élevé de plantes régénérées différentes. L'élaboration de lignées exprimant suffisamment de protéines recombinantes nécessite donc énormément de temps et d'énergie. Selon les espèces, de 3 à 9 mois sont requis pour qu'une plante transgénique soit disponible (Fischer et al. 2003).

2.2.2 Expression transitoire

Avant de s'investir profondément dans le processus de transformation, l'efficacité d'expression des constructions plasmidiques et l'activité des protéines sont d'abord vérifiées par des tests en expression transitoire (Lessard et al. 2002; Fischer et al. 2003; Schillberg et al. 2003). Les principaux problèmes sont alors identifiés puis corrigés, augmentant la probabilité de générer la bonne plante transgénique.

L'expression transitoire dans les plantes offre plusieurs avantages par rapport à la génération de plantes transgéniques. Le plus important est qu'en quelques jours, le produit d'un gène d'intérêt peut être isolé et analysé pour vérifier sa fonctionnalité et sa stabilité. Si une modification est désirée, elle

peut très vite être introduite sans besoin de générer d'autres lignées de plantes transgéniques.

2.3 Méthodes de transformation

Deux principales techniques sont généralement utilisées afin de générer des plantes transgéniques. Le transfert de gène peut soit se faire via la bactérie du sol phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*, soit selon un mode de livraison mécanique appelé biolistique. Un schéma décrivant la transformation selon chacun de ces deux procédés est illustré dans les figures 1 et 2. Il est important de noter que ces deux techniques peuvent également servir à la transformation de quelques cellules seulement en vue d'une expression transitoire.

2.3.1 Agroinfection

A. tumefaciens provoque, chez les plantes qu'elle infecte, une tumeur connue sous le nom de gale du collet. Son pouvoir pathogène lui est conféré par la présence d'un grand plasmide (~ 200kb) appelé Ti (*Tumor inducing*). Ce plasmide porte des gènes *vir* (pour virulence) dont les produits agissant en *trans* dirigent le processus de transformation cellulaire. Lors de l'infection, une partie de ce plasmide, appelée T-ADN (*Transferred-DNA*), est transférée dans la plante. C'est l'ADN localisé entre les extrémités droite et gauche du T-DNA qui s'intègre plus ou moins au hasard dans un chromosome de la plante. La bactérie assure elle-même l'exportation du T-DNA et son adressage vers le noyau de la cellule végétale. Par contre, l'intégration dans le génome est prise en charge par les enzymes responsables de la réparation de l'ADN de la cellule végétale hôte (<http://www.tikho.com/agro/index.html>; (Bevan 1984; Lessard et al. 2002)).

En pratique, puisque le plasmide Ti est trop grand pour être manipulé facilement, un système de vecteurs binaires a été créé (Bevan 1984). Un

premier vecteur capable de se répliquer dans *E.coli* et dans *Agrobacterium* (d'où le terme « vecteur binaire ») porte un gène d'intérêt et un marqueur de sélection, l'ensemble bordé des extrémités droite et gauche du T-DNA. Ce vecteur s'utilise en compagnie d'un second plasmide dérivé du plasmide Ti duquel on a retiré les gènes inducteurs de tumeurs. Les agrobactéries qui contiennent le plasmide désarmé et le vecteur binaire peuvent être utilisées pour inoculer des fragments de tissu végétal (Figure 1a). La transformation est suivie par la sélection des cellules qui ont intégré le gène d'intérêt et le gène qui procure une résistance à un antibiotique.

En vue de tests en expression transitoire, l'agroinfiltration s'effectue sur des feuilles entières et l'expression des protéines étudiées peut être détectée trois jours après infiltration. Les feuilles sont donc utilisées pour une production temporaire de protéine et il n'est pas nécessaire d'avoir recours à une méthode de sélection pour identifier les cellules transformées. Comme pour générer des plantes transgéniques, le gène d'intérêt est cloné dans un vecteur binaire mais dont la taille peut être réduite. Un avantage majeur de cette technique est que plusieurs gènes présents dans des populations différentes d'*Agrobacterium* peuvent être exprimés simultanément (Vaquero et al. 1999). L'assemblage de protéines multimériques peut donc être testé *in planta* bien plus rapidement qu'avec les plantes transgéniques où l'on doit attendre le croisement de tous les individus exprimant un des composés du complexe.

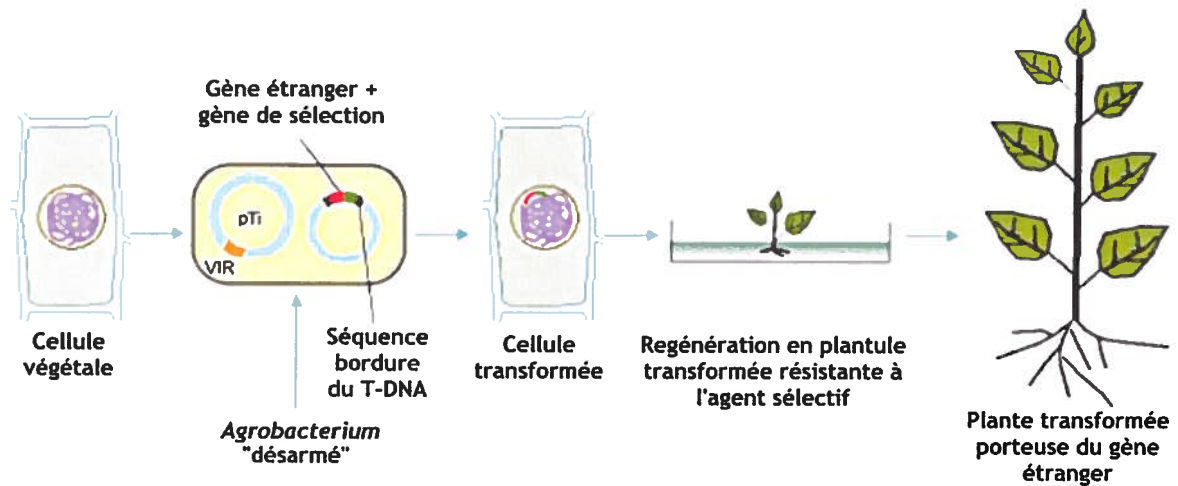


Figure 1 : Méthode de transformation de cellules végétales par agroinfection en vue d'une expression stable.

Un gène d'intérêt et un marqueur de sélection dans la plante sont clonés dans un vecteur binaire. Ce dernier est transformé dans *Agrobacterium tumefaciens* porteur du plasmide Ti. Un bouillon de culture est mis en présence de disques foliaires pour une co-culture de 48 heures. Ceux-ci sont ensuite transférés sur un milieu de culture contenant un agent de sélection pour la régénérescence des cellules transformées (cals). Les plantules transformées avec le gène d'intérêt montrent la croissance de racines et de tigelles et sont cultivées dans un milieu adéquat pour la régénérescence d'une plante complète.

2.3.2 Bombardement particulaire

A. tumefaciens possède un spectre d'hôte restreint et infecte inefficacement les plantes monocotylédones. Le bombardement particulaire est donc principalement utilisé pour transformer les cellules de ces plantes, comme le maïs et le riz. Cette méthode consiste à précipiter le matériel génétique désiré sur des microparticules d'or ou de tungstène. Ces billes sont ensuite propulsées à la vitesse requise pour pénétrer dans le noyau de quelques cellules végétales (figure 2). L'ADN y est libéré et intégré au génome de la plante de manière aléatoire. Il s'agit de la procédure la plus fréquemment utilisée pour l'expression transitoire (Lessard et al. 2002). Comme pour la transformation stable générée par agroinfiltration, la livraison de l'ADN s'effectue sur un fragment de tissu végétal et doit être suivie par la sélection et la propagation des cellules transformées afin de régénérer une plante entière.

2.3.3 Vecteurs viraux

En plus des deux techniques de transformation mentionnées précédemment, il existe un troisième mode de livraison d'un gène dans les cellules d'une plante : l'infection avec un vecteur viral modifié. Dans ce cas, une plante non transgénique est inoculée avec un virus recombinant qui exprime un transgène au cours de sa réplication dans la cellule hôte. Cette approche sera plus amplement décrite dans la prochaine section.

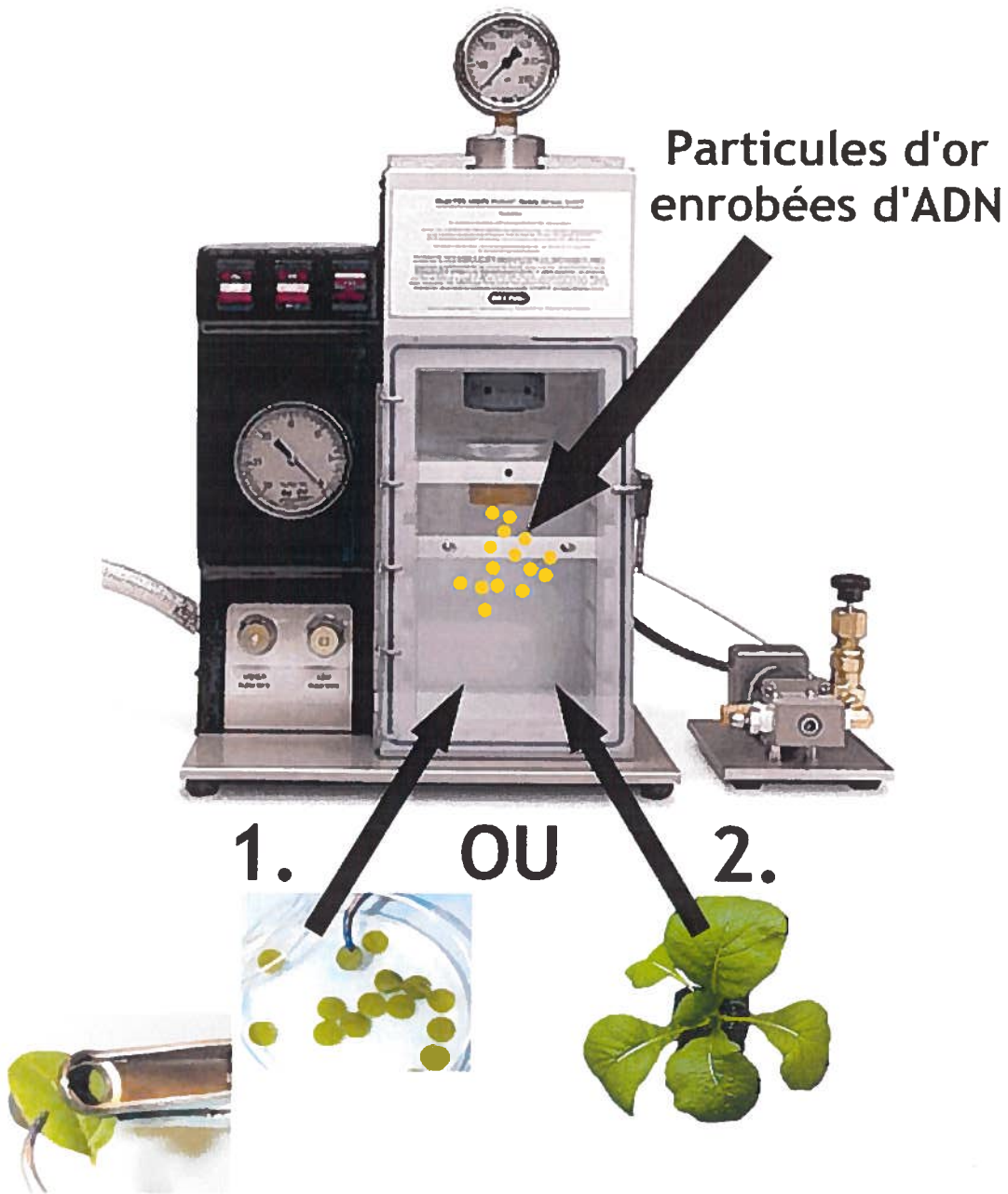


Figure 2 : Méthode de transformation de cellules végétales par bombardement particulaire en vue d'une expression stable ou transitoire.

Appareil de biolistique PDS-1000 He-system commercialisé par BIO-Rad. La pression des gaz propulse les microbilles d'or préalablement enrobées de l'ADN à tester. Si une plante transgénique est désirée, (1) des disques foliaires seront bombardés puis mis à régénérer. Si par contre, des analyses en expression transitoire sont recherchées, le bombardement s'effectuera sur une feuille de jeune plante.

3 Les phytovirus, vecteurs d'expression

La majorité des virus de plantes ont un génome constitué d'un ou plusieurs brins d'ARN de polarité positive. Possédant généralement une gamme d'hôtes très large et pouvant atteindre des titres extrêmement élevés, il est très intéressant de se baser sur ces virus pour créer des vecteurs d'expression. En clonant la séquence ADN du virus en aval d'un promoteur fort, il est possible de produire des clones qui sont directement infectieux lorsqu'ils sont inoculés mécaniquement ou lorsqu'ils sont introduits par agroinfiltration. L'entrée du matériel infectieux dans une cellule est ensuite suivie par l'amplification et l'accumulation du virus, puis par sa dissémination dans la plante entière (Figure 3). Le virus sélectionné pour jouer le rôle de vecteur est manipulé génétiquement afin d'introduire une séquence étrangère dans son génome.

Chez les premiers vecteurs viraux (BMV, TMV), la séquence codant pour une fonction non essentielle à la réplication de l'ARN, telle que celle de la capsid (CP), était remplacée par une séquence d'intérêt. Malgré que ces vecteurs pouvaient exprimer le gène étranger, ils étaient généralement incapables de causer une infection systémique dans une plante (French et al. 1986; Takamatsu et al. 1987). Les niveaux d'expression de protéines étrangères étant par conséquent limités, ces systèmes ont été plutôt utiles pour l'élucidation des fonctions de gènes viraux (Porta & Lomonossoff 2002). Éventuellement, les vecteurs furent construits pour exprimer un gène étranger en plus de tous les gènes viraux. De tels vecteurs ont conservé la capacité de se propager dans un hôte susceptible. Le gène additionnel est alors cloné dans le même cadre de lecture que le reste des gènes viraux. La protéine résultante peut soit demeurer en fusion avec une protéine virale, soit être libérée dans la cellule végétale. Dans ce cas, des sites de clivages protéolytiques doivent être ajoutés de part et d'autre de la séquence étrangère afin de générer une protéine libre.

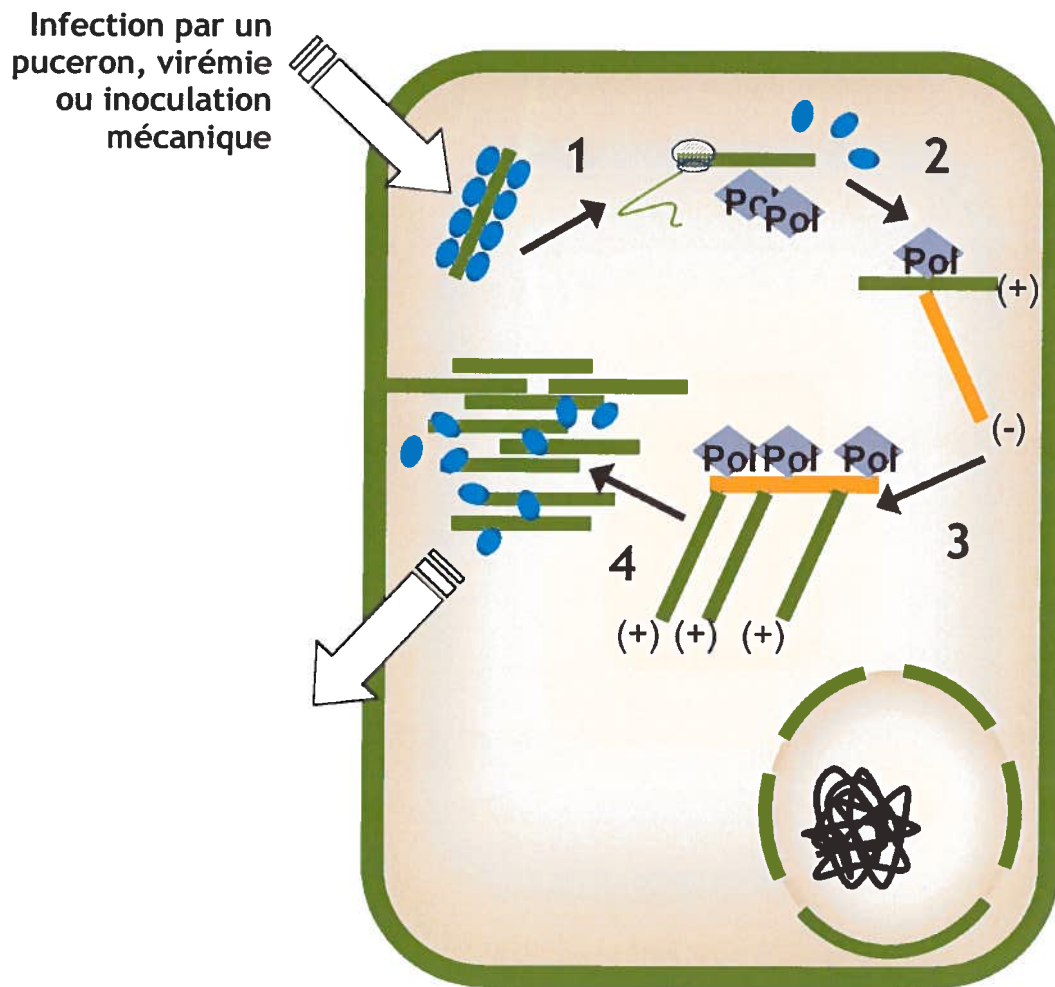


Figure 3 : Cycle de réplication des virus à ARN dans une cellule végétale.

Chez les phytovirus, le génome est souvent un ARN de polarité positive. (1) L'ARN génomique, une fois à l'intérieur de la cellule, est traduit par la machinerie cellulaire et les protéines du complexe de réplication sont ainsi synthétisées. (2) Le complexe de réplication transcrit l'ARN viral en brin complémentaire, qui lui sert de matrice (3) pour la synthèse de plusieurs brins positifs. (4) Ces ARN sont à nouveau traduits et une grande quantité de protéines virales en résulte. Une seule particule virale peut ainsi fabriquer les protéines nécessaires à la confection de milliers de virions dans une seule cellule.

3.1 Exemples d'utilisation des vecteurs viraux

La stratégie la mieux appropriée pour l'expression d'un gène étranger via un vecteur viral dépend de la combinaison hôte/virus et du gène cible lui-même. Les vecteurs basés sur les virus de forme icosaédrique ont des contraintes d'assemblage plus sévères que ceux de forme hélicoïdale. Dans ce cas, le remplacement de gène est utilisé pour la génération de vecteurs viraux recombinants. L'insertion de gène est désirée où de grandes séquences codantes ont à être exprimées. Les fusions de gènes ont, quant à elles, été créées principalement avec le gène de la capsid et sont un moyen efficace pour la présentation de séquences peptidiques étrangères sur la surface des particules virales.

La production de vaccins est un exemple à l'étude pour un grand nombre de vecteurs viraux (tableau V). La compagnie Large Scale Biology Corp. a actuellement complété avec succès la première phase d'essais cliniques pour évaluer le potentiel thérapeutique d'un système basé sur le virus de la mosaïque du tabac (TMV), pour la lutte contre le lymphome non-Hodgkinnien (<http://www.centerwatch.com>). Dans ce cas, un vecteur TMV est utilisé pour produire des vaccins qui expriment des molécules scFv clonées à partir d'immunoglobulines (IgG) de surface de cellules tumorales qui sont uniques pour chaque patient. Le but est de stimuler une réponse immune et de détruire les cellules tumorales présentant ces IgG. Les scFv sont purifiés à partir de plantes inoculées avec le vecteur TMV et ces protéines sont utilisées en tant que vaccin pour le patient en rémission induite par chimiothérapie. La thérapie actuelle fait appel à des hybridomes (anticorps monoclonaux) pour cibler ces cellules cancéreuses et prend pratiquement une année à développer, alors que la méthode du TMV peut être complétée à l'intérieur de 1 à 2 mois (Scholthof et al. 2002).

Le potentiel de cette méthode de vaccination par scFv fut initialement démontré par l'équipe de McCormick et al. (McCormick et al. 1999). En effet, ils

ont rapporté avoir exprimé avec succès des vaccins scFv spécifiques pour l'idiotype de l'immunoglobuline (Ig) du lymphome des cellules B murines 38C13 à partir d'un vecteur viral basé sur le TMV. Ce fragment d'anticorps réagissait avec un anticorps monoclonal anti-idiotypique (S1C5), suggérant que le scFv 38C13 était correctement replié (McCormick et al. 1999). L'immunisation de souris avec les scFv purifiés a produit une réponse immune anti-idiotypique résultant en ~80% de survie chez les souris ayant reçu une dose létale d'une lignée tumorale de cellule B exprimant cette immunoglobuline (McCormick et al. 1999). Ce système de production rapide de vaccins personnalisés pourrait procurer une nouvelle stratégie pour le traitement du lymphome non-Hodgkinnien (Pogue et al. 2002).

Les vecteurs viraux ont aussi un rôle prometteur dans la production commerciale de produits pharmaceutiques. Un exemple, également en phase d'essais cliniques, est la production de la α -galactosidase A humaine pour le traitement des patients atteints de la maladie de Fabry (Pogue et al. 1998; Pogue et al. 2002).

Tableau V : Protéines d'intérêt médical, diagnostique ou agricole exprimé dans les plantes via les vecteurs viraux

Groupe	Virus	Exemples	Références
Bromovirus	BMV	IFN- γ	(French et al. 1986; Mori et al. 1993)
Comovirus	CPMV	Épitope gp41 du VIH-1	(McLain et al. 1995; Durrani et al. 1998; Buratti et al. 1998; Cleveland et al. 2000)
		Épitope HR14 du rhinovirus humain	(Porta et al. 1994)
		Protéine F de la membrane externe de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Brennan et al. 1999b)
		Protéine de liaison à la fibronectine (FnBP) de <i>Staphylococcus aureus</i>	(Brennan et al. 1999a; Brennan et al. 1999c)
		Épitope VP1 du virus de la fièvre aphteuse	(Usha et al. 1993)
		Épitope VP2 du virus entérique du vison	(Dalsgaard et al. 1997)
		Épitope VP2 du parvovirus canin	(Langeveld et al. 2001)
Potex	PVX	Protéine de liaison à la fibronectine (FnBP) de <i>Staphylococcus aureus</i>	(Brennan et al. 1999c)
		Protéines insecticides : WIN3	(Lawrence & Novak 2001)
		Peptide gp41 du VIH-1	(Marusic et al. 2001)
Potyvirus	CLYVV	Expression de glutamine synthase	(Masuta et al. 2000)
	PPV	Peptide VP2 du parvovirus canin	(Fernandez-Fernandez et al. 1998)
		VP60 du Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)	(Fernandez-Fernandez et al. 2001)
	TEV	Expression de l'herbicide bar dans <i>Arabidopsis</i>	(Whitham et al. 1999)
	ZYMV	Interféron- α 2	(Arazi et al. 2001b)
		Protéines antitumorales MP30 et GAP32	(Arazi et al. 2002)

Tableau V : Protéines d'intérêt médical, diagnostique ou agricole exprimé dans les plantes via les vecteurs viraux (suite)

Groupe	Virus	Exemples	Références
Tobamovirus	TMV	α -trichosanthine	(Kumagai et al. 1993)
		Peptide inhibiteur d'enzyme	(Hamamoto et al. 1993)
		Peptide GP3 du virus de la rage	(Yusibov et al. 1997; Modelska et al. 1998)
		Peptide du VIH-1	(Sugiyama et al. 1995; Yusibov et al. 1997)
		α -galactosidase A humaine	(Pogue et al. 1998)
		Vaccin scFv idiotypique	(McCormick et al. 1999)
		Anticorps CO17-1A anti-GA337-2 (antigène associé au cancer colorectal)	(Verch et al. 1998)
		VP1 du virus de la fièvre aphteuse	(Wigdorovitz et al. 1999)
		Épitope hémagglutinine du virus de l'Influenza	(Sugiyama et al. 1995)
		Peptide du parasite de la Malaria	(Turpen et al. 1995)
		Peptide du virus de l'hépatite murin	(Koo et al. 1999)
		Peptide ZP3 du zona murin	(Fitch et al. 1995)
		Peptide du virus de l'hépatite C	(Nemchinov et al. 2000)
Tombusvirus	TBSV	Peptide gp120 du VIH-1	(Joelson et al. 1997)

Abréviations : BMV (Brome mosaic virus), CLYVV (Clover yellow vein virus), CPMV (Cowpea mosaic virus), PPV (Plum pox virus), PVX (Potato virus X), TEV (Tobacco etch virus), TMV (Tobacco mosaic virus), TBSV (Tomato bushy stunt virus), ZYMV (Zucchini yellow mosaic virus).

Adapté de (Beauchemin 2003) et des articles de (Giddings et al. 2000) et (Pogue et al. 2002).

3.2 Les potyvirus

Le tableau V présente une grande diversité de vecteurs basés sur les potyvirus. Compte tenu de l'expertise de notre laboratoire pour un membre de cette famille, le virus de la mosaïque du navet (TuMV), nous présenterons plus en détail cette famille de virus.

3.2.1 Organisation génomique et stratégie d'expression des potyvirus

Les potyvirus font parties de la superfamille des *Picornaviridae*. Leurs virions ont l'aspect de longues particules flexibles et filamenteuses, formées par 2000 copies de protéine de capsid qui enferment un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 10 kb. L'extrémité 5' de leur génome est liée de manière covalente à la protéine virale VPg alors que l'extrémité 3' est polyadénylée (Riechmann et al. 1992). L'organisation génomique des potyvirus est illustrée à la figure 4. Comme pour les picornavirus et les comovirus, le génome des potyvirus contient un seul cadre de lecture (ORF) qui est traduit en une grande polyprotéine précurseur d'environ 350 kDa. La polyprotéine est ensuite co- et post-traductionnellement hydrolysée par trois protéinases virales en dix protéines (Figure 4) (Dougherty et al. 1988). L'ordre de ces protéines de l'extrémité amino-terminale vers l'extrémité carboxy-terminale de la polyprotéine est le suivant : la première protéine (P1, protéinase), la protéine HC-Pro (helper component/protéinase), la troisième protéine (P3), un peptide de 6 kDa (6K1), la protéine d'inclusion cylindrique (CI; hélicase), un second peptide de 6 kDa (6K2), la protéine d'inclusion nucléaire *a* (NIa; VPg et une protéinase), la protéine d'inclusion nucléaire *b* (NIb; l'ARN polymérase ARN dépendante) et la protéine de la capsid (CP).

Une caractéristique importante des potyvirus est la présence d'une région non traduite (UTR) à l'extrémité 5' du génome. Sa longueur varie selon les groupes de potyvirus et atteint 130 nucléotides chez le TuMV. Cette région est

riche en résidus adénine et ne possède que quelques résidus guanine. L'alignement des régions 5'UTR de plusieurs potyvirus révèle des séquences conservées, ce qui suggère qu'elles pourraient jouer un rôle important dans l'encapsidation virale et/ou la réplication (Riechmann et al. 1992). La région 3'UTR de différents potyvirus fut décrite comme étant hétérogène en taille, en séquence et en structure secondaire (Turpen 1989). Par contre, une caractéristique commune est la présence de segments riches en AU et le fait que chaque séquence ait la possibilité de former une structure secondaire stable (Turpen 1989). Les queues poly (A) des ARN sont, quant à elles, très variées en longueur.

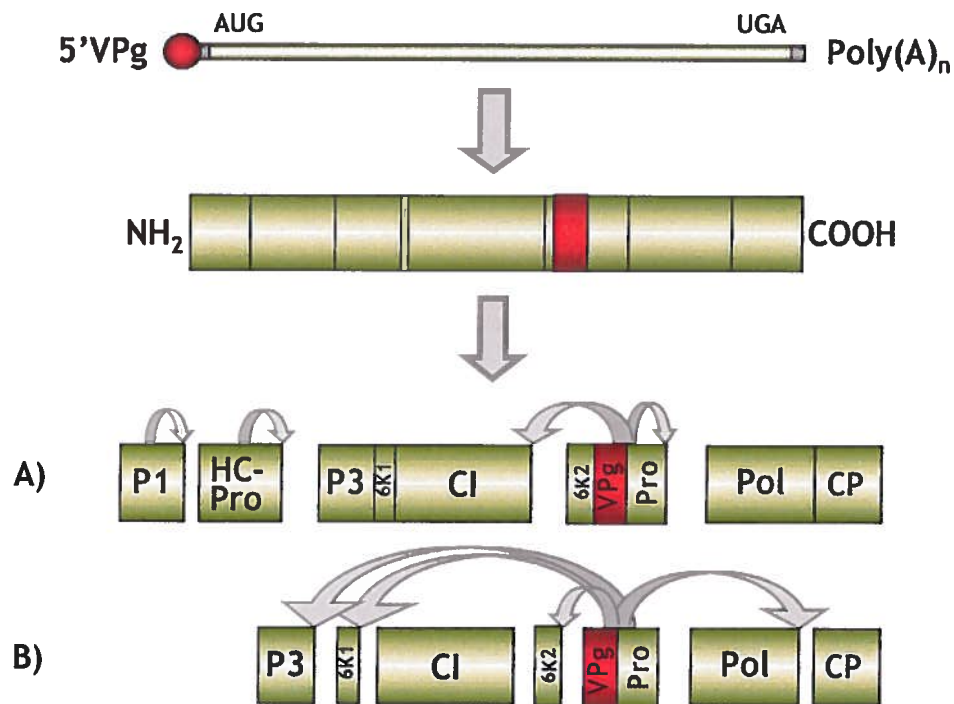


Figure 4 : Organisation génomique et stratégie d'expression des potyvirus.

L'ARN de polarité positive est traduit en une seule polyprotéine. Celle-ci s'auto-hydrolyse via les domaines protéinasiqes compris dans les protéines P1, HC-Pro et NIa (VPg-Pro) pour produire les protéines virales matures. En A) sont représentés les clivages qui s'effectuent co-traductionnellement et en B), ceux réalisés post-traductionnellement. Les sites de clivage des différentes protéinases sont indiqués par des flèches.

3.2.2 Fonctions des protéines potyvirales

3.2.2.1 La première protéine (P1) (~40.03 kDa)

La protéine P1 possède une activité protéasique de type sérine qui catalyse le clivage entre elle-même et la protéinase HC-Pro (Verchot et al. 1991) (Figure 4). Son extrémité carboxy-terminale de 147 résidus d'acides aminés constitue la protéinase fonctionnelle complète alors que les 157 résidus de l'extrémité N-terminale n'interviennent pas dans l'activité protéinase. La protéine P1 se lie de manière non-spécifique à l'ARN (Soumounou & Laliberte 1994), ce qui laisse sous-entendre qu'elle pourrait être impliquée dans le transport systémique du virus dans la plante. La délétion de l'entière séquence codante de P1 n'a seulement que des effets mineurs sur les déplacements de mutants TEV, mais réduit néanmoins considérablement les niveaux d'amplification génomique (Verchot & Carrington 1995). La fonction de P1 serait donc plutôt reliée à la réplication virale.

3.2.2.2 La protéine HC-Pro (~51.67 kDa)

HC-Pro est une protéine multifonctionnelle dont les régions amino- et carboxy- terminales sont impliquées dans la transmission des virions par les pucerons et le mouvement cellule à cellule dans la plante (Rojas et al. 1997; Peng et al. 1998; Blanc et al. 1998; Urcuqui-Inchima et al. 2001). La principale caractéristique de son domaine carboxy-terminal est une activité protéinase de type cystéine qui catalyse le clivage entre HC-Pro et la protéine P3 (Kasschau & Carrington 1995; Maia et al. 1996). En ce qui concerne la région centrale de la protéine, elle semble participer à l'amplification génomique et le mouvement systémique du virus (Cronin et al. 1995; Kasschau et al. 1997). HC-Pro fonctionne également en tant que suppresseur du mécanisme naturel de résistance virale qui limite l'accumulation d'ARN dans les plantes (Kasschau & Carrington 1998).

3.2.2.3 Les protéines P3(~40.32 kDa), 6K1(~5.93 kDa) et 6K2(~6.00 kDa)

La troisième protéine est la moins bien caractérisée et la moins conservée des protéines potyvirales. Chez le TEV, elle est retrouvée associée à la protéine NIa dans le noyau cellulaire, suggérant qu'elle soit impliquée dans les premières étapes de la réplication virale. Dans le cas du TMV (Tobacco Vein Mottling Virus), sa participation à l'amplification génomique semble plutôt liée à son interaction avec l'hélicase dans le cytoplasme (Urcuqui-Inchima et al. 2001). Les deux petites protéines 6K1 et 6K2 coexistent dans les corps d'inclusion nucléaires avec NIa et NIb, suggérant qu'elles joueraient elles aussi un rôle dans la réplication de l'ARN. Possédant un domaine hydrophobique central flanqué de résidus chargés, 6K2 est une protéine intégrale des membranes dérivées du réticulum endoplasmique (RE) (Schaad et al. 1997). Ainsi, en interagissant avec la VPg-Pro, elle permet l'ancrage du complexe de réplication (Urcuqui-Inchima et al. 2001).

3.2.2.4 La protéine d'inclusion cylindrique (CI)(~71.78 kDa)

Comme principale caractéristique, la protéine CI possède une activité ATPase et un motif de liaison nucléotidique typique des hélicases lui permettant de dérouler les duplexes ARN au moment de la réplication virale. La protéine CI s'accumule dans le cytoplasme en structures coniques associées à l'ARN viral encapsidé ou à des complexes ARN-protéines. Ces structures contribueraient au mouvement cellule à cellule en facilitant le passage à travers les plasmodesmes (Carrington et al., 1998); (Urcuqui-Inchima et al., 2001).

3.2.2.5 La protéine NIa (VPg-Pro)(~49.21 kDa)

Nommée ainsi parce que retrouvée dans le noyau cellulaire souvent sous forme de corps d'inclusion nucléaire, elle est composée de deux domaines : le domaine VPg à son extrémité amino-terminale et le domaine Pro (protéinase) à son extrémité carboxy-terminale (Urcuqui-Inchima et al. 2001). La VPg-Pro est responsable de la maturation des deux-tiers de la polyprotéine, dont son propre

autoclivage générant les sous-produits VPg et Pro (Laliberte et al. 1992; Urcuqui-Inchima et al. 2001) (Figure 4). Ce processus est contrôlé par la vitesse d'hydrolyse qui diffère selon le site de clivage afin d'obtenir des produits intermédiaires et matures possédant chacun des fonctions distinctes.

L'extrémité 5' des ARN potyviraux ne possède pas de coiffe telle que celle des ARNm eucaryotiques. Aussi, la protéine VPg est attachée à cette extrémité de leur génome. Elle y sert d'amorce pour la synthèse de l'ARN viral et joue un rôle prédominant dans sa traduction (Wittmann et al. 1997; Leonard et al. 2000). Elle lie en effet la protéine de liaison à la coiffe des ARNm cellulaires eIF(iso)4E pour former le complexe de traduction et ainsi initier la synthèse de la polyprotéine. En contrôlant la machinerie cellulaire, cette interaction permettrait de déjouer les mécanismes de défense de la plante hôte en limitant la synthèse de ses protéines.

3.2.2.6 La réplicase Nlb (Pol)(~59.62 kDa)

La Nlb est la polymérase des potyvirus. Elle est responsable de la réplication des molécules d'ARN viral de polarité positive et négative. Sa principale caractéristique est la présence du motif conservé glycine-aspartate-aspartate (GDD), signature des ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) (Urcuqui-Inchima et al. 2001). Il fut démontré qu'elle interagit avec les domaines VPg et Pro de NIa de même qu'avec la protéine de liaison à la queue de poly(a) de la cellule hôte (PABP) (Urcuqui-Inchima et al. 2001). La traduction et la réplication semblent donc des étapes fortement liées.

Malgré qu'elle soit requise dans le cytoplasme ou dans les complexes de réplication associés aux membranes durant la synthèse de l'ARN, la Nlb se retrouve chez un bon nombre de potyvirus co-localisée avec la NIa dans des corps d'inclusion nucléaire. Leur fonction dans le noyau demeure inconnue (Urcuqui-Inchima et al. 2001).

3.2.2.7 La capside (~32.74 kDa)

Les régions centrale et carboxy-terminale de la capside (CP) sont hautement conservées et impliquées dans l'encapsidation des ARN viraux. La région amino-terminale, présentée à la surface des virions, est très variable et jouerait un rôle important dans les déplacements systémiques du virus (Dolja et al. 1994). De plus, le motif conservé DAG localisé à cette extrémité de la protéine et le motif PTK de la protéine HC-Pro semblent impliqués dans une interaction nécessaire à la transmission par les pucerons (Atreya et al. 1995; Blanc et al. 1997; Lopez-Moya & Pirone 1998). Par ailleurs, les résultats des travaux de Rojas et al. démontrent que ces deux protéines peuvent également augmenter la limite d'exclusion de taille des plasmodesmes et ainsi faciliter le mouvement de cellule en cellule des ARN viraux (Rojas et al. 1997). Finalement, il fut suggéré que la séquence codant pour la CP possède des séquences agissant *in cis* capable de stimuler l'amplification génomique (Mahajan et al. 1996; Haldeman-Cahill et al. 1998).

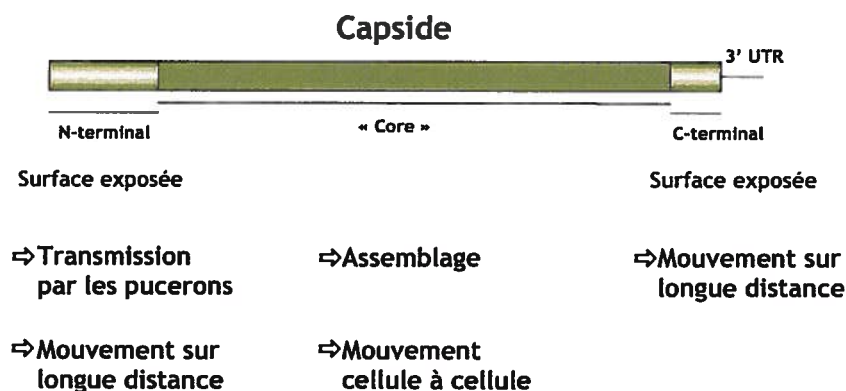


Figure 5 : Représentation schématique des fonctions connues de la capside

Schéma illustrant la séquence codant pour la capside du TuMV et des fonctions associées aux trois principales régions.

3.2.3 Les potyvirus comme vecteurs viraux

Une caractéristique importante des vecteurs viraux exprimant leur génome sous la forme d'une polyprotéine est que toutes les protéines, incluant la protéine étrangère, sont synthétisées en quantité équimolaire. Les différences dans les niveaux d'accumulation dépendra exclusivement de leur stabilité dans la plante infectée (Fernandez-Fernandez et al. 2001). De plus, compte tenu de la forme filamenteuse hélicoïdale des potyvirus, il serait virtuellement possible d'introduire plus d'un gène étranger dans la même construction. Deux sites d'insertion ont individuellement été testés chez différents potyvirus, un premier entre les protéines P1 et HC-Pro (Dolja et al. 1992) et un second entre les protéines NIb et CP (Fernandez-Fernandez et al. 2001). Par ailleurs, il fut démontré que ces virus ont la capacité de déjouer les contrôles de défenses antivirales de l'hôte (Kasschau & Carrington 1998; Li & Ding 2001), leur permettant d'atteindre des niveaux d'expression très élevés. Finalement, notre laboratoire a démontré que l'ARN du TuMV pourrait avoir un avantage traductionnel sur les ARNm cellulaires via une interaction entre la VPg et le facteur de traduction eiF(iso)4E (Leonard et al. 2000).

Le premier exemple d'un potyvirus manipulé avec succès fut l'insertion de la séquence GUS entre P1 et HC-Pro du TEV (Dolja et al. 1992). L'action des deux protéinases de part et d'autre de GUS ont assuré qu'une protéine GUS-HC-Pro en fusion puisse être libérée de la polyprotéine. Le virus était capable de se déplacer systématiquement dans les plantes et de s'accumuler à des niveaux comparables au type sauvage. Les TEV marqué avec GUS ont montré être très utiles dans le suivi des mouvements viraux à l'intérieur d'une plante (Mahajan et al. 1998). Depuis, d'autres potyvirus ont été testés afin de développer des vecteurs capable d'infecter des espèces de plantes vivaces (Guo et al. 1998), des légumes (Masuta et al. 2000) et des céréales (Choi et al. 2000).

3.3 Avantages des vecteurs viraux

Un des attraits des vecteurs viraux est que les virus de plantes (phytovirus) se multiplient dans les cellules infectées. N'importe quel gène étranger incorporé dans le génome viral est donc amplifié de manière concomitante. Les très hauts niveaux d'expression atteints ne sont alors que très rarement comparables à ceux rencontrés par les transgènes sous le contrôle de promoteurs constitutifs ou inductibles (Pogue et al. 2002; Porta & Lomonossoff 2002).

De plus, les phytovirus se répliquent dans le cytoplasme au cours d'une infection. Les ARN issus de la réplication virale sont par la suite pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire et sujets aux mêmes modifications post-traductionnelles que les ARNm cellulaires. Puisque leur génome n'est pas intégré à celui de la plante susceptible, il n'y a pas d'effets de positionnement pouvant influencer les niveaux d'expression (Koprowski & Yusibov 2001; Awram et al. 2002).

Finalement, compte tenu du large spectre d'hôte de la plupart des phytovirus, un même vecteur peut permettre l'expression d'un gène d'intérêt dans différentes espèces de plantes sans besoin de modifier la construction initiale (Koprowski & Yusibov 2001).

Néanmoins, le bénéfice le plus important suivant l'utilisation des vecteurs viraux est qu'ils représentent une procédure d'essai très rapide sur le matériel à l'étude. De grandes quantités de protéines étrangères peuvent être isolées en l'espace d'une à deux semaines après l'inoculation des plantes. Si une modification est désirée, elle peut être rapidement introduite dans le virus sans le besoin de générer de nouvelles plantes transgéniques (Scholthof et al. 2002). Les hauts niveaux d'expression du gène introduit et la rapidité d'accumulation des produits appropriés font alors des phytovirus de très bons vecteurs pour l'expression transitoire (Fischer & Emans 2000).

3.4 Désavantages des vecteurs viraux

L'inconvénient majeur associé à l'utilisation des vecteurs viraux est l'instabilité génétique. Les mutations spontanées dans les séquences non virales représentent un problème potentiel pour la production de vecteurs viraux. Un vecteur générant des produits de séquences non homogènes rendrait ces produits de moins grande valeur thérapeutique.

Les ARN polymérases ARN dépendantes ne possèdent pas d'activité exonucléasique susceptible de corriger les erreurs de synthèse. Aussi, les vecteurs d'expression dérivés du génome de virus à ARN sont très sujets à ce type de modification. Du point de vue du virus, des avantages sélectifs sont rarement gagnés par mutation ponctuelle, néanmoins un avantage significatif est retrouvé dans l'élimination de séquences non essentielles. En effet, la réduction de taille procure un net avantage cinétique pour la réplication ainsi qu'un avantage pour le mouvement systémique (Pogue et al. 2002).

La délétion de gènes hétérologues insérés parmi les séquences virales fut décrite pour plusieurs vecteurs viraux (Donson et al. 1991; Chapman et al. 1992; Dolja et al. 1993; Guo et al. 1998; Choi et al. 2000; German-Retana et al. 2000; Fernandez-Fernandez et al. 2001; Arazi et al. 2001a). Le mécanisme responsable de l'instabilité génétique des inserts demeure toutefois mal compris. Dolja et ses collègues ont proposé un phénomène de recombinaison non-homologue selon lequel l'ARN polymérase aurait tendance à changer spontanément de matrice durant la réplication (Dolja et al. 1993) (Figure 6). Aucune structure secondaire susceptible d'expliquer ce type de réarrangement n'a pu être identifiée. De plus, l'analyse des séquences démontre généralement une distribution aléatoire des points de délétion entre les différents mutants générés (Guo et al. 1998). La dissociation et la réassociation de l'ARN polymérase semblent donc s'effectuer au hasard. Les recombinants viables ou avantageés seraient ceux qui auraient perdu seulement des éléments non essentiels pour la réplication et le mouvement.

Un second désavantage relié à l'usage de virus recombinants est qu'ils engendrent habituellement des pertes significatives au niveau des récoltes. De plus, l'induction de symptômes sévères dans les plantes peut être un aspect négatif des vecteurs viraux puisque la réponse de la plante hôte peut affecter le rendement, la stabilité ou l'activité de la protéine étrangère (Scholthof et al. 2002). Dans ce contexte, une avenue qui commence à peine à être explorée est le développement de souches virales atténuées qui ont de faibles impacts sur la santé des plantes (Arazi et al. 2001b).

L'instabilité génétique et la virulence des vecteurs viraux limite donc leur usage et des solutions doivent être trouvées pour minimiser ce problème.

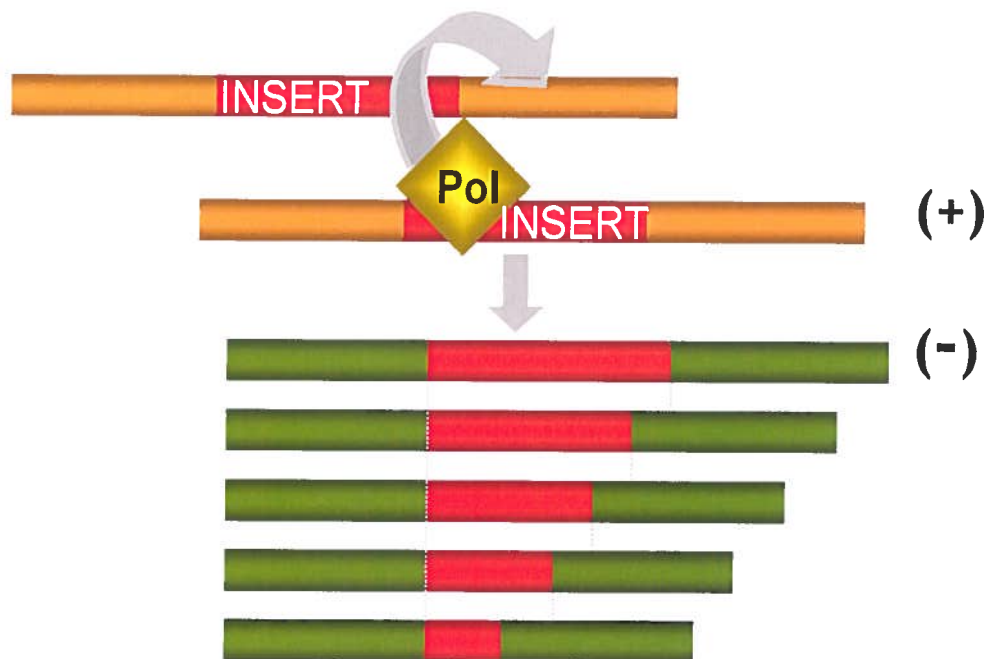


Figure 6 : Schématisation de l'instabilité génétique d'un gène étranger.

Au cours de la réplication, l'ARN polymérase aurait tendance à changer spontanément de matrice lors de la synthèse du brin négatif. Ceci mènerait à la délétion progressive et aléatoire des séquences non-essentiels à la survie du virus.

4 Hypothèse

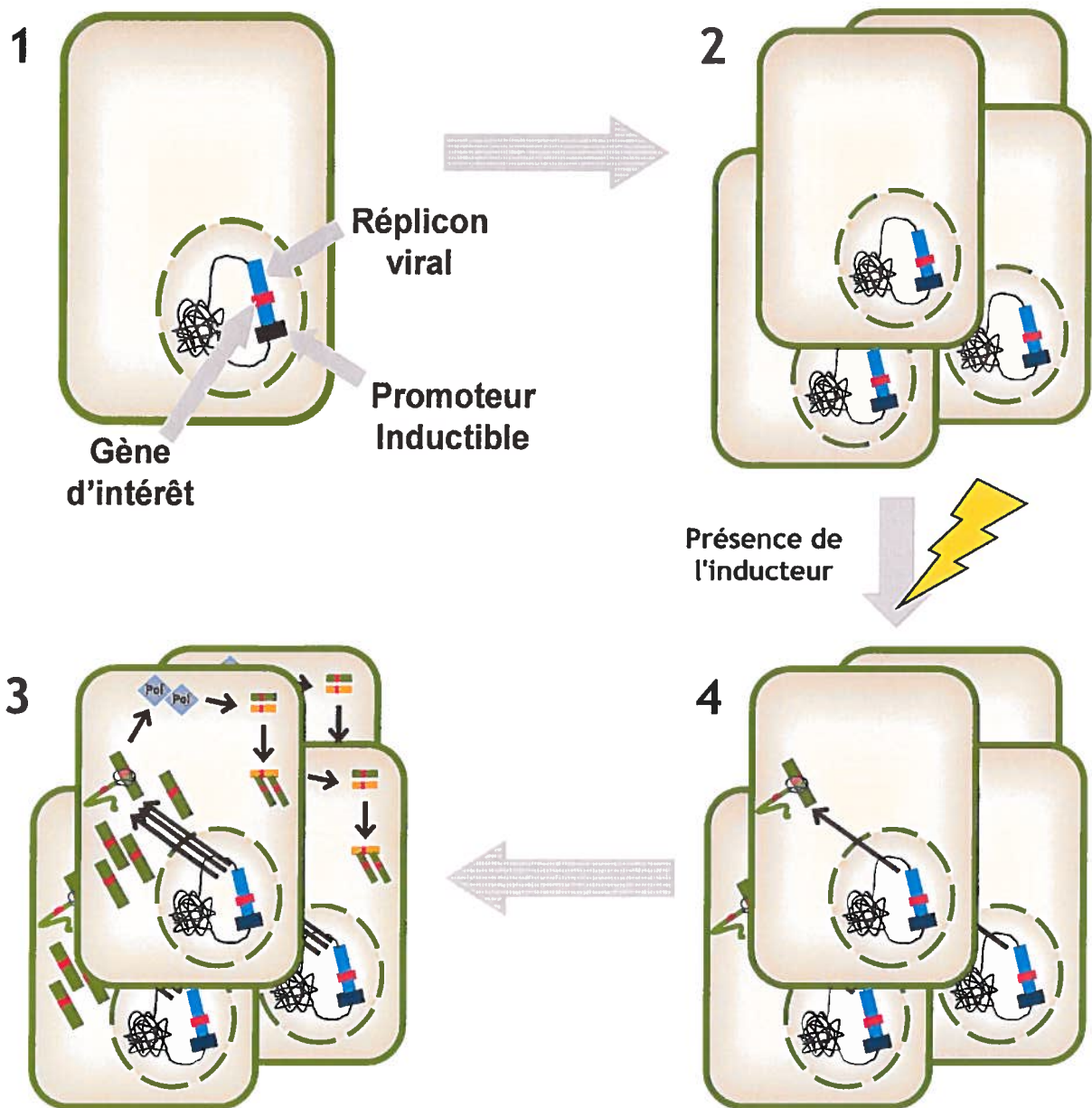
4.1 Développement d'un réplicon viral inductible

L'expression directe de protéines recombinantes dans les plantes transgéniques ne satisfait pas toujours les besoins en hauts niveaux de production. La rapidité avec laquelle cette forte concentration de protéines d'intérêt doit être atteinte est une variable critique pour la viabilité économique de cette approche. Une alternative plus efficace à l'utilisation de plantes transgéniques pour la production de protéines ou peptides de hautes valeurs fut envisagée via l'utilisation des vecteurs viraux. Néanmoins, les gènes étrangers sont instables dans le temps lorsqu'ils sont incorporés au génome de virus recombinant.

Nous croyons qu'une source stable de transcrits permettrait de conserver l'insert dans un maximum de copies virales. Notre hypothèse de travail est la suivante (Figure 7) : en combinant le pouvoir réplcatif des virus, l'intégration stable d'un transgène et le contrôle d'un promoteur inductible, il serait possible de déjouer l'instabilité génétique des vecteurs viraux et d'amplifier de manière significative la quantité de protéine estimée disponible au moment de la récolte. Nous proposons donc de créer des plantes de tabac transgéniques pour une copie ADNc d'un TuMV modifié et porteur de gènes d'intérêt. L'expression contrôlée dans le temps de ce réplicon viral permettra la croissance des plantes jusqu'au stade requis pour atteindre les niveaux d'expression visés.

Notre équipe a d'abord élaboré avec succès un système d'induction basé sur le promoteur Top10 (P_{Top10}) inductible au dexaméthasone (Beauchemin, 2003). L'étape suivante consiste alors à étudier les possibilités d'insertion de gènes étrangers dans le génome du TuMV.

Figure 7 : Hypothèse de travail



5 Objectifs de travail

5.1 Insertion de gènes étrangers

Les deux sites d'insertion rencontrés dans la littérature seront testés sur notre modèle viral. Ainsi, le gène codant pour la GFP ou GUS ont déjà été incorporés entre les protéines P1 et HC-Pro (Beauchemin 2003). L'étape suivante sera d'introduire ces mêmes gènes entre les cistrons codant pour les protéines Pol et CP. Ces gènes permettront facilement de suivre l'infection virale, tout en vérifiant la possibilité d'ajouter des gènes d'intérêt au génome du TuMV. Afin que la protéine étrangère soit libérée de la polyprotéine, sa séquence sera insérée suivant celle codant pour le site de clivage d'une protéinase virale. De plus, un site de clivage VPg-Pro artificiel sera créé à l'extrémité 3' de sa propre séquence.

Si l'ajout de ces séquences étrangères au génome viral ne nuit pas à sa réplication, une insertion double sera tentée. Ceci permettrait la production de protéine à multiples sous-unités telles que les immunoglobulines.

5.2 Élaboration d'une nouvelle stratégie d'insertion

Les protéinases virales identifient un site de clivage compris dans une polyprotéine en reconnaissant une séquence qui compte habituellement entre cinq et sept acides aminés. L'hydrolyse du lien peptidique au site reconnu divise cette séquence entre les deux extrémités des protéines séparées. Selon la protéinase et le site de clivage, entre un et six acides aminés peuvent ainsi être additionnés à l'extrémité d'une protéine. Des efforts seront donc consacrés à la recherche d'un troisième site d'insertion qui permettrait de produire une protéine étrangère dont l'extrémité carboxy-terminal serait identique à celle de la protéine originale.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1 Souches bactériennes

Escherichia coli

XLI-Blue : supE44/ hsdR17/ recA1/ endA1/ gyrA46/ thi-1/ relA1/
lac [F'/ proAB⁺ / lacI^q / lacZ Δ M15 :: Tn10(tet^R)]

DH5 α : supE44/ Δ lacU169 (lacZ Δ M15)/ hsdR17/ recA1/ endA1/
gyrA96/thi-1/ relA1

Agrobacterium tumefaciens

GV3101 : Rif^R/ plasmide Ti pCH32 (Tet^R)

2 Milieux de culture

Le milieu qui fut employé pour la culture des souches d'*Escherichia coli* et d'*Agrobacterium tumefaciens* est celui élaboré par Luria-Bertani (LB). Composé de 1% tryptone, 0.5% extrait de levure et de 1% NaCl lorsqu'utilisé en culture liquide, on y ajoute 1.5% agar pour une utilisation solide. Dans les deux cas, le pH est ajusté à 7.0 à l'aide de NaOH 5N. Ce milieu fut additionné d'un ou plusieurs des 4 antibiotiques suivants pour la sélection des clones positifs, soit; l'ampicilline (100 μ g/mL), la kanamycine (50 μ g/mL), la rifampicine (50 μ g/mL) et la tétracycline (2 μ g/mL).

La température de croissance de *E. coli* fut établie selon que le plasmide porté contenait l'ADNc du virus en entier (30°C) ou tronqué (37°C). En ce qui concerne la croissance d'*A. tumefaciens*, elle fut réalisée à 28°C.

La culture *in vitro* des plants de *Nicotiana benthamiana* fut réalisée sur milieu minimal Murashige et Skoog (MS) avec des vitamines du milieu de Gamborg (SIGMA M0404, lot. 111K2301). Composé de 20.6mM NH₄NO₃, 100µM H₃BO₃, 3mM CaCl₂, 105nM CoCl₂-6H₂O, 100nM CuSO₄-5H₂O, 1µM Na₂-EDTA, 100µM FeSO₄-7H₂O, 1.5mM MgSO₄, 100µM MnSO₄-H₂O, 1µM Na₂MoO₄-2H₂O, 5µM KI, 18.8mM KNO₃, 1.25mM KH₂PO₄, 30µM ZnSO₄-7H₂O, 100mg/L myo-Inositol, 1.0 mg/L acide nicotinique, 1.0 mg/L pyridoxine-HCL et de 10.0mg/L thiamine-HCL, ce dernier fut supplémenté par 3% sucrose et 0.7% phytoagar. Le pH fut ajusté à 5.8 à l'aide de NaOH 5N.

Le milieu qui servit à l'agroinfiltration fut constitué à partir de milieux LB supplémentés des antibiotiques appropriés, de 10mM MES pH6.3 et de 20µM d'acétosyringone.

3 Vecteurs de clonage

3.1 Le plasmide pBin m-gfp5-ER

Fourni par le laboratoire du Dr. Armand Séguin du Centre de Foresterie des Laurentides, ce plasmide est porteur du gène de résistance à la kanamycine. Il est dérivé du vecteur binaire pBI121 où le gène *uidA* fut remplacé par le gène modifié de la protéine à fluorescence verte, *m-gfp5-ER* ((Siemering et al. 1996), GenBank U87974). Le plasmide comprend un site de liaison aux ribosomes procaryotiques (RBS) de même qu'une séquence d'initiation de la traduction chez la plante (TICS) en amont du gène *m-gfp5-ER*.

3.2 Le plasmide pBI221

Le fragment HindIII-EcoRI porteur du promoteur CaMV 35S, du gène *uidA* d'*E.coli* et du terminateur de la nopaline synthétase (tnos) fut digéré du vecteur binaire pBI121 et cloné dans le vecteur pUC19 (Chen et al. 2003). La sélection se fait par l'emploi de l'ampicilline. La séquence du vecteur d'expression transitoire pBI221 fut déposée dans la banque GenBank et porte le numéro AF502128. Gracieuseté de la compagnie Médicago, ce vecteur fut commercialisé par BD Bioscience Clontech.

3.3 Les plasmides pSK-C5.1 *kappa* et pSK-C5.1 *gamma*

Ces plasmides furent mis à notre disposition par la compagnie Médicago (souches no.1201 et 1202). La séquence codant pour les chaînes légère et lourde de l'anticorps C5.1 fut indépendamment clonée dans le site EcoRI du vecteur pBlueScript SK- commercialisé par Stratagene.

3.4 Le plasmide pCR[®]4Blunt TOPO[®]

Utilisé pour faciliter le clonage de certains produits PCR, ce vecteur est commercialisé par la compagnie Invitrogen. La particularité de ce vecteur est l'enzyme topoisomérase I qui joue à la fois le rôle d'enzyme de restriction et de ligase. Le vecteur est vendu sous forme linéarisée avec l'enzyme liée de manière covalente à chacune de ses extrémités 3'. La ligation des séquences ADN ayant des extrémités compatibles se fait alors rapidement et génère un produit prêt pour la transformation dans *E. coli*.

3.5 Système de vecteur binaire (pGreenII 0000/pSoup)

pGreenII0000 (Figure 8A) est un vecteur Ti binaire ayant un site multiple de clonage basé sur le vecteur pBlueScript. La région du T-DNA est flanquée par deux sites *Bgl*III et permet la sélection bleu-blanc via la complémentation *lacZ*. L'origine de répllication *ori-pSa* provient du fragment *Sau*III A du plasmide pGV1122 (ATTC 37171). Elle doit être complétée en *trans* par le gène de la réplicase correspondante (*RepA*) situé sur un second plasmide, pSoup (Figure 8B). La co-transformation du plasmide pSoup est donc nécessaire à la répllication du vecteur pGreenII0000 dans *Agrobacterium*. Le gène *NptI*, provenant du plasmide pACYC 177, procure une résistance à la kanamycine et est utilisé pour la sélection après transformation dans *E.coli* ou dans *A. tumefaciens*.

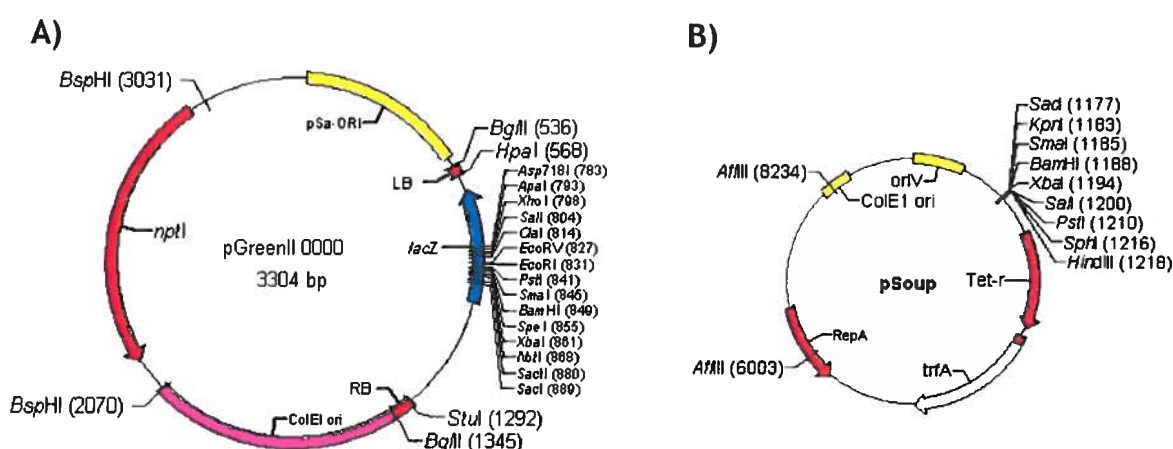


Figure 8 : Le vecteur pGreenII0000 (A) et le plasmide pSoup (B)

4 Constructions de départ

4.1 p35TuNos

L'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARN viral de l'isolat britannique (UK) du TuMV (GenBank AF169561) a été obtenu de l'équipe du Dr Fernando Ponz en Espagne (Sanchez et al. 1998). Cet ADNc a été cloné en aval du promoteur CaMV 35S dans le vecteur pUC12. Une queue poly A suivie du terminateur de la nopaline synthétase (tnos) ont été ajoutés à l'extrémité 3' de l'ADNc. Baptisé p35TuNos (Figure 9), le vecteur résultant a une taille approximative de 13 kb et possède le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection dans *E. coli*.

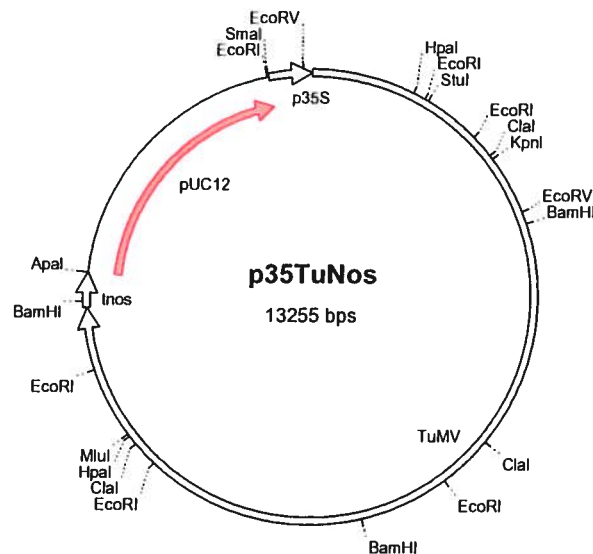


Figure 9 : Carte de restriction des constructions de départ p35TuNos et p35TuNos-SacII

4.1.1 p35TuNos-SacII, p35TuNos-N-GFP et p35TuNos-N-GUS

Ces constructions furent réalisées par Chantal Beauchemin au cours de ses travaux de maîtrise (Beauchemin 2003). Le site de restriction *SacII* fut ajouté au plasmide p35TuNos par mutagenèse dirigée (Figure 10) afin de permettre l'insertion des gènes *gfp* et *uidA* entre ceux codant pour les protéines P1 et HC-Pro (Figure 10).

4.1.2 pSK-Clal/VNN

Cette construction fut réalisée par Simon Léonard lors de ses travaux de doctorat. Le fragment *Clal* de 3695pb du plasmide p35TuNos fut cloné dans le vecteur pBluescript SK+. Par mutagenèse dirigée, le motif conservé Gly-Asp-Asp (GDD) fut changé pour Val-Asn-Asn (VNN). Les nucléotides furent modifiés de manière à créer un site *HpaI* au niveau de la mutation (Figure 10). Ces substitutions ont pour résultat d'inactiver la polymérase (Li & Carrington 1995).

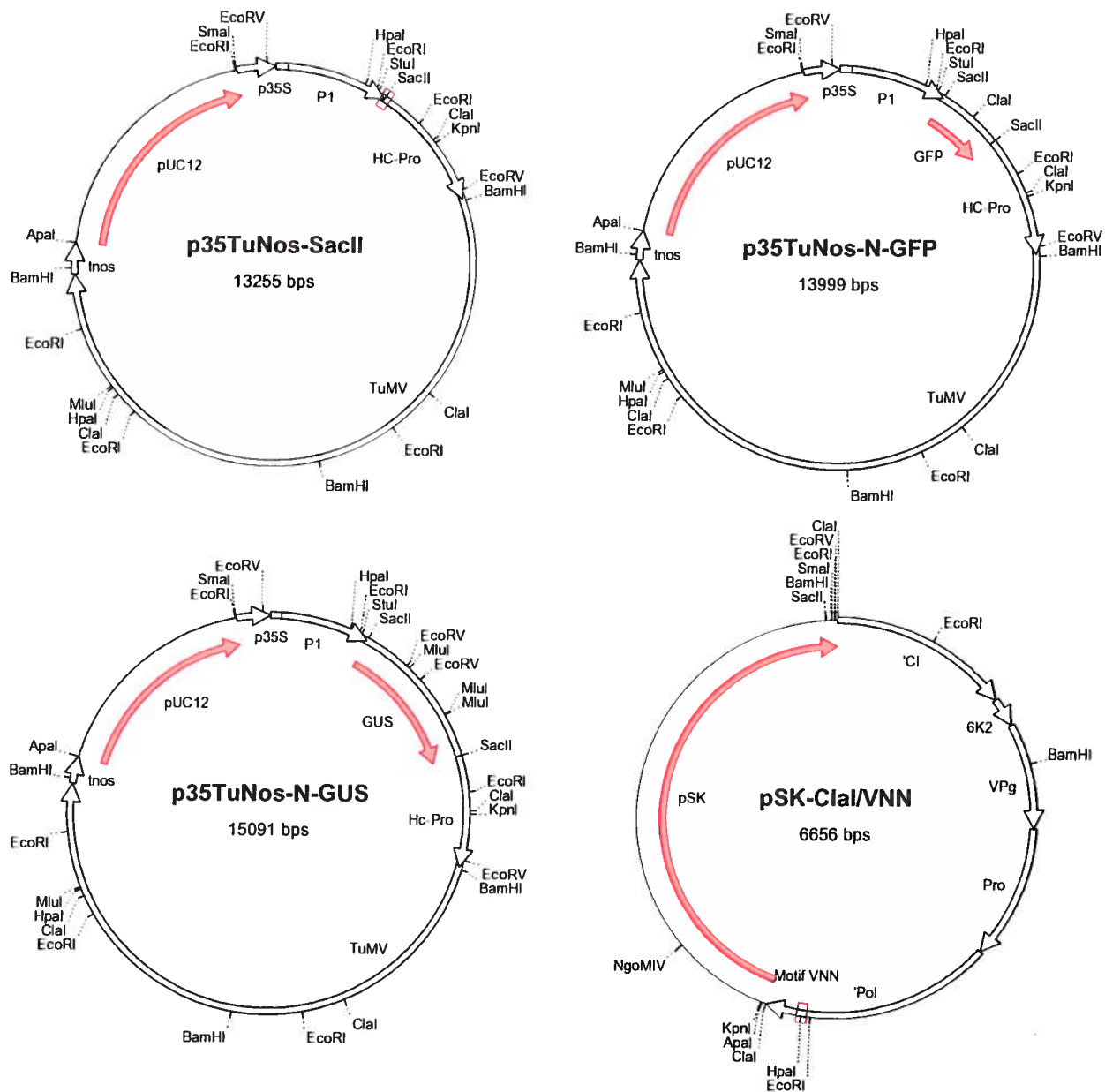


Figure 10 : Carte des restriction des constructions de départ p35TuNos-SacII, p35TuNos-N-GFP, p35TuNos-N-GUS et pSK-Cla/VNN

5 Procédures de clonage

5.1 Amplification de fragments d'ADN par la technique des réactions de polymérase en chaînes

Selon les besoins encourus, deux polymérases furent utilisées. La première, Pwo (Roche catalogue #1644955), est une ADN polymérase de haute fidélité qui possède une activité 3'-5' exonucléase (aussi connue sous le nom de « proofreading activity ») sans activité 5'-3' exonucléase détectable. Les produits PCR générés par cette enzyme ont des extrémités franches. Ses propriétés en font une candidate de choix pour l'amplification de fragments d'ADN destinés au sous-clonage ou pour une utilisation en mutagénèse dirigée. Pour chaque réaction, 2.5 U furent employées en présence d'une dilution 1X de son tampon 10X (100mM Tris-HCl pH 8.85, 250mM KCl, 50mM (NH₄)₂SO₄ et 20mM MgSO₄). La seconde polymérase, Taq (Biogene catalogue #D1000Y), en est une ne possédant aucune activité de correction et fut donc plutôt utilisée en situation d'analyse. Ainsi, 2.5 U furent utilisées pour chaque amplification en présence de son tampon 10X (750mM Tris-HCl pH 8.8, 200mM (NH₄)₂SO₄, et 0.1% v/v Tween 20) et de 100mM de MgCl₂.

Les réactions furent réalisées dans un volume total de 50µl contenant, 50pmol de chaque amorce, 50ng de matrice et 200µM de dNTPs. Les cycles étaient constitués d'une suite d'incubations successives de 30 sec. à 95°C correspondant à l'étape de dénaturation, de 30 sec. à ~ 5°C sous la plus basse T_m des amorces à utiliser pour leur hybridation et de n sec. à 72°C pour l'élongation. La température d'hybridation d'une amorce est donnée par la relation suivante : $T_a = 69.3 + 0.41(\%GC) - (650 / \text{taille})$. Le temps d'élongation (n) fut déterminé en utilisant un temps moyen de 45 sec (Pwo) et de 2 min. (Taq) pour amplifier un fragment de 1kb. Dans le cas d'amplification de fragment d'ADN de grande taille, l'utilisation de DMSO à une concentration de 6% a permis

de minimiser les structures secondaires et ainsi d'optimiser la PCR. Les amorces utilisées sont décrites dans les tableaux VI et VII.

Les produits PCR furent ensuite soit clonés directement dans le vecteur pCR4Blunt TOPO, soit digérés en vue d'un sous-clonage dans le vecteur approprié ou encore, analysés sur gel. La propagation des diverses constructions réalisées s'est effectuée dans différentes souches de *E.coli* qui furent transformées soit par électroporation, soit par choc thermique.

5.2 Mutagenèse dirigée par PCR

Quatre amorces (tableaux VI et VII) et trois PCR furent utilisés pour réaliser chacune des mutations de l'ADNc du TuMV. La technique de mutagenèse de sites spécifiques par extension des chevauchements utilisée fut celle décrite au protocole 6 du 13^e chapitre du livre de référence Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989). Une paire d'amorces fut utilisée pour amplifier l'ADN contenant le site de mutation et un bout de séquence en amont. La seconde paire d'amorces fut employée dans une autre PCR pour amplifier l'ADN contenant le site de mutation et un bout de séquence en aval. La mutation désirée fut localisée dans la région du chevauchement et ainsi, dans chacun des fragments amplifiés. Les fragments chevauchants furent ensuite mélangés, dénaturés et hybridés pour générer des hétéroduplexes servant de matrice pour l'élongation et, dans une troisième PCR, amplifiés en un ADN pleine longueur utilisant deux amorces se liant aux extrémités des deux fragments initiaux. La polymérase sélectionnée pour réaliser ces expériences fut la Pwo et les conditions décrites dans la section précédente furent rencontrées.

Tableau VI : Amorces utilisées pour l'insertion des gènes étrangers

Utilité	Matrice	Nom de l'amorce*	Séquence 5' → 3'
Création du site de restriction <i>NgoMIV</i> entre les gènes <i>Pol</i> et <i>CP</i> du TuMV	p35Tunos Δ <i>SacI</i>	JF <i>Pol NgoMIV</i>	TT TAT CAC CAG <u>GCC GGC</u> GAA ACG CTT G
		FT <i>pUC18 Rp</i>	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
		FT <i>CP NgoMIV</i>	C AAG CGT TTC <u>GCC GGC</u> CTG GTG ATA AA
		IF <i>nUC18 Hn</i>	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG
Ajout du site de restriction <i>NgoMIV</i> de part et d'autre du gène <i>gfp</i>	pBin m- <i>gfp5-ER</i>	JF <i>GFP NgoMIV</i>	TTA TCC TCG <u>GCC GGC</u> TTC AGT AAA G
		FT <i>GFP NgoMIV</i>	TTT TTT <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTT GTA TAG TTC ATC CAT GC
Ajout du site de restriction <i>NgoMIV</i> de part et d'autre du gène <i>uidA</i>	pBI221	JF <i>GUS NgoMIV</i>	C ATC ATA <u>GCC GGC</u> ATG TTA CGT CCT GTA GA
		FT <i>GUS NgoMIV</i>	TTT TTT <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTG TTT GGC TCC CTG C
Ajout du site de restriction <i>SacII</i> de part et d'autre du gène <i>kappa</i>	pSKC5.1-□	JF <i>C5.1 □ SacII</i>	TT ATC CTC <u>CGC GGC</u> AAT GGT TTT CAC ACC TCA G
		FT <i>C5.1 □ SacII</i>	C CTC <u>CGC GGC</u> TGC CTG GTG ATA GAC ACA Δ <i>GC ΔCA CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTT GA</i>
Ajout du site de restriction <i>NgoMIV</i> de part et d'autre du gène <i>gamma</i>	pSKC5.1-□	JF <i>C5.1 □ NgoMIV</i>	G AAT ATT <u>GCC GGC</u> ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG
		FT <i>C5.1 □ NgoMIV</i>	G AAT ATT <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTT Δ <i>CC ΔGG ΔGA GTG GGA</i>

* Les amorces « sens » commencent par JF et les amorces « antisens » commencent par FT.
Les sites de restrictions sont soulignés
La séquence de reconnaissance du site de clivage de la VPg-Pro est identifiée en gras

Tableau VII : Amorces utilisées pour créer les délétions

Utilité	Matrice	Nom de l'amorce*	Séquence 5' → 3'
Première paire d'amorces pour la création des délétions	p35TuNos-CGUS	JFCP Δ125	AT CAA <u>GCC GGC</u> GAA ACG GAG GAC AAA ATG CAA ATC A
		JFCP Δ176	AA <u>GCC GGC</u> GAA ACA TTT AGG CAG ATA ATG GCC CAT TTC AG
		JFCP Δ215	AA <u>GCC GGC</u> GAA AGC TTA GCT CGA TAC GCA TTT GAT TTC TAT GAA
		JFCP Δ230	AA <u>GCC GGC</u> GAA ACT CCA ATA CGT GCG AGA
		JFCP Δ263	AA <u>GCC GGC</u> GAA ACG GTA GAG AAC ACG GAG AGG CAT A
		JFCP Δ272	AA <u>GCC GGC</u> GAA ACC GAG GAC GTT ATT CGG AA
		JFCP Δ288	AA <u>GCC GGC</u> GAA TGA AGT TGT ATG CTG GTA G
Seconde paire d'amorces pour la création des délétions	p35TuNos-CGUS	FTUp <i>Apal</i>	GT CGA <u>GGG CCC</u> GAT CGT TCA AAC ATT TGG CAA TAA
		JFGUS <i>MscI</i>	AG GTG <u>GTG GCC</u> AAT GGT GAT GTC AGC GTT GAA
		FTCP Δ125	TTT GTC CTC CGT TTC <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTG
		FTCP Δ176	G CCT AAA TGT TTC <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTG
		FTCP Δ215	G AGC TAA GCT TTC <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTG
		FTCP Δ230	G TAT TGG AGT TTC <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTG
		FTCP Δ263	GTT CTC TAC CGT TTC <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTG
		FTCP Δ272	AC GTC CTC GGT TTC <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTG
		FTCP Δ288	A ACT TCA TTC <u>GCC GGC</u> TTG ATG GTA TAC GCA TGC TTG

* Les amorces « sens » commencent par JF et les amorces « antisens » commencent par FT.
Les sites de restrictions sont soulignés
La séquence de reconnaissance du site de clivage de la VPg-Pro est identifiée en gras

5.3 Techniques de sous clonage par l'utilisation d'enzymes

5.3.1 Digestion enzymatique.

De manière générale, pour chaque 1µg d'ADN à digérer, environ deux à trois unités d'enzymes furent utilisées. Les réactions se déroulaient autant que possible dans un volume final de 10µl où 1µl du tampon 10X spécifique à chaque enzyme fut ajouté. Sauf exception, les réactions se sont effectuées pendant 2h à 37°C. Les résultats de chaque digestion furent visualisés sur gel d'agarose. Dans certains cas, selon la taille des fragments recherchés, des purifications à partir du gel furent réalisées en utilisant une des deux trousse d'extraction commerciales suivantes :

QIAquick Gel Extraction kit	(QIAGEN catalogue #28704)
DNA Gel Extraction kit	(MILLIPORE catalogue #LSKG EL0 50)

Lors de digestions de suspensions d'ADN contenant des ARN totaux bactériens en forte concentration, l'addition de RNase A à 10µg/ml fut prévue afin de distinguer plus facilement le produit des digestions.

5.3.2 Déphosphorylation

Cette approche fut utilisée afin de favoriser l'insertion d'un fragment d'ADN en empêchant le vecteur de se refermer sur lui-même lors de l'étape de la ligation. L'enzyme sélectionnée, la phosphatase alcaline de crevette (SAP) (Roche Catalogue #1758250), élimine les phosphates 5' terminaux et peut être complètement inactivée à la chaleur par un traitement de 15 min. à 65°C.

5.3.3 Ligation

L'enzyme, la T4 DNA ligase (New England Biolabs Catalogue #M 0202S), catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3' OH et 5' P de molécules d'ADN. Les conditions dans lesquelles elle fut généralement employée sont les suivantes :

Ratio vecteur/insert de 1/1 ou 1/3
1X Tampon x10
1 µl T4 DNA Ligase
16h à 16°C ou 72h à 4°C

La composition du tampon concentré est 500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10mM ATP, 250µg/ml BSA.

5.4 Transformation par électroporation

5.4.1 Préparation des bactéries (*E.coli*)

Un litre de milieu LB futensemencé par une pré-culture bactérienne de 5 ml. Les bactéries ont été multipliées sous agitation (200rpm) à 37°C jusqu'à ce que la culture atteigne une DO_{600nm} de 0,5 - 0,7. La culture fut refroidie, puis sédimentée par centrifugation pendant 30 min. à 6000 g. Le culot fut lavé deux fois par 500 ml d'eau bidistillée stérile froide, centrifugé 15 min. à 6000 g, puis repris dans 250 ml de glycérol 10% froid. Les bactéries furent de nouveau centrifugées à 6000g pour 15 min., puis remises en suspension dans 1 à 2 ml de glycérol 10% stérile et congelées, par fractions aliquotées, à -80°C .

5.4.2 Préparation des bactéries (*A. tumefaciens*)

Une pré-culture fut préparée dans 5 ml de milieu LB supplémenté de rifampicine et de tétracycline et incubé à 28°C sous agitation. Tôt le lendemain, un vigoureux vortexage fut effectué afin de briser les amas bactériens avant d'inoculer, plus tard dans la journée, 100 ml de milieu LB (contenant les mêmes agents de sélection) avec 0.5 ml de la pré-culture. L'incubation se fit à 28°C sous agitation (250 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne une D.O._{600nm} de 0.5 - 1.0. Elle fut ensuite refroidie, puis sédimentée, par une centrifugation de 5 min. à 4000 rpm à 4°C. Les culots furent d'abord lavés à trois reprises avec du glycérol 10% froid avant d'être finalement suspendus de nouveau dans 1.5 ml de glycérol 10% froid. Des aliquots furent gelés dans l'azote liquide et entreposés à -80°C.

5.4.3 Électroporation

La transformation s'est effectuée dans une cuve à électrodes espacées de 0,2 cm. Chaque réaction de ligation furent précipitée à l'éthanol et remise en suspension dans l'eau. L'ADN (50 à 150 ng) fut mis en présence de 50 µl de suspension bactérienne et incubé au froid environ 1 min. La cuve fut placée dans l'électroporateur Pulse Controller (BioRad) et soumise à une capacité de 25 µF, à une résistance de 200Ω (*E.coli*) ou 400Ω (*A.tumefaciens*) et une impulsion électrique de 12,5 kV/cm avant d'ajouter 1 ml de milieu LB. Après 60 minutes d'incubation à 30°C ou 37°C pour *E.coli* ou 2 heures à 28°C pour *A.tumefaciens*, les bactéries furent étalées sur milieu LB gélosé, additionné de(s) l'antibiotique(s) approprié(s). Après une nuit à 30°C ou 37°C (*E.coli*) ou 2 jours à 28°C (*A.tumefaciens*), les colonies obtenues furent analysées par les techniques décrites plus loin.

5.5 Transformation par choc thermique(*E.coli*)

5.5.1 Préparation des bactéries

100 ml de milieu LB futensemencé par une pré-culture de 1 ml, puis incubé à 37°C sous agitation (250 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne une DO_{600nm} de 0,3 - 0,4. Elle fut ensuite refroidie, puis sédimentée par une centrifugation de 10 min. à 3000 rpm. Les culots furent mis en suspension dans 30 ml de tampon $MgCl_2$ - $CaCl_2$ froid ($MgCl_2$ 80 mM, $CaCl_2$ 20 mM), suspension qui fut recentrifugée et dont le culot repris par 2 ml de $CaCl_2$ 0,1 M froid. Les bactéries furent gardées à 4°C jusqu'à la transformation.

5.5.2 Choc thermique

200 µl de bactéries compétentes furent incubées sur glace pendant 30 min. en présence de 10 µl du mélange de ligation contenant 50 à 150 ng d'ADN plasmidique. Les bactéries furent ensuite soumises à un choc thermique de 90 sec à 42°C suivi d'une brève incubation sur glace (~2min.), puis 1 ml de milieu LB fut ajouté. Après 60 minutes d'incubation à 30°C ou 37°C, les bactéries ainsi transformées furent étalées sur milieu LB gélosé additionné de l'antibiotique approprié. Après une nuit à 30°C ou 37°C, les colonies apparues furent analysées par les techniques décrites plus loin.

5.6 Caractérisation des clones

5.6.1 Préparation d'une sonde marquée au DIG

Un fragment ADN contenant une séquence uniquement retrouvée chez les clones porteurs de chaque nouvelles constructions fut généré par digestion enzymatique et purifié sur gel d'agarose (QIAGEN catalogue #28704). Le marquage des sondes s'est réalisé à l'aide d'une trousse commercialisée par

Boehringer Mannheim (Roche catalogue #1093657). La réaction s'est réalisée selon les conditions suivantes :

100ng à 1µg d'ADN fraîchement dénaturé (10 min. à 95°C)
2µL d'un mélange d'hexanucléotides 10X
2µL d'un mélange de dNTPs 10X : dNTP + DIG-dUTP
Compléter le volume à 19µL avec de l'eau
Ajouter 1µL de Klenow

Au cours de l'incubation, variant de 1 à 20 heures à 37°C, la klenow incorpore les DIG-dUTP tous les 20-25 nucléotides sur le nouveau brin synthétisé à partir de la matrice. La réaction fut arrêtée par l'ajout de 2µl de EDTA 0.2M pH8.0. Les sondes furent précipitées à l'éthanol 95% + 2.5µl de LiCl 4M et récupérées dans 50µl de TE (100mM Tris, 10mM EDTA pH8.0).

5.6.2 Hybridation *in situ*

La détection des clones positifs s'est effectuée par hybridation *in situ* selon le protocole décrit par la trousse utilisée pour le marquage des sondes. Cent colonies comprenant un témoin négatif et un témoin positif ont été repiquées sur milieu LB-Amp 100µg/ml, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les bactéries furent lysées en plaçant la nitrocellulose dans une solution dénaturante 0.5M NaOH, 1.5 M NaCl pendant 5 min. suivi d'un traitement neutralisant de 5 min. dans une solution 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH7.4. Après avoir saturé les membranes dans une solution 2X de SSC (30mM citrate de sodium, 0.3M NaCl, pH 7.0), l'ADN fut ensuite fixé à la nitrocellulose suivant une incubation de 2 hres à 80°C sous vide. Le papier fut pré-hybridé durant 60 minutes à 68°C dans 100 ml de tampon d'hybridation (SSC 5X, agent bloquant 1%, 0.1% N-laurylsarcosine, 0.02% SDS). L'hybridation est réalisée en ajoutant la sonde oligonucléotidique marquée. Après 6 à 24 hres d'hybridation à 68°C, la nitrocellulose fut lavée 2 fois par une solution SSC 2X, SDS 0.1%, puis 2 autres fois par une solution SSC 0.1%, SDS 0.1%, à cette même température afin d'éliminer l'excès de sonde. La sonde s'étant hybridée à l'ADN fixé sur la

membrane de nitrocellulose fut détectée grâce à des anticorps anti-DIG conjugués à la phosphatase alcaline (Anti-DIG-AP). L'addition du substrat de l'enzyme, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP), permet la formation d'un précipité coloré en violet avec le Nitro Blue Tetrazolium Chlorid Monohydrat (NBT).

5.7 Extraction d'ADN plasmidique

5.7.1 Lyse alcaline avec SDS

3ml de milieu LB supplémenté de l'antibiotique approprié furent ensemencés de chaque clone potentiellement positif. Un répliquat sur gélose LB-Agar additionné du même antibiotique fut également préparé. Les culots obtenus suite à la centrifugation de la moitié du bouillon de culture furent remis en suspension dans 100µl de TEG (Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM, Glucose 50mM; pH8.0). L'homogénat fut incubé 5 min. sur glace, puis additionné de 200µl d'une solution de lyse fraîchement préparée (0.2N NaOH, 1% SDS). Après un second 5 min. d'incubation, 150µl d'une solution neutralisante d'acétate de potassium (3M K, 5M acétate; pH8.0) fut ajoutée. L'ADN génomique et les débris cellulaires furent sédimentés par une centrifugation à vitesse maximale de 5 min. L'ADN plasmidique fut récupéré du surnageant par une précipitation à l'éthanol 95% puis suspendu de nouveau dans 30 à 50 µg de TE contenant 20µg/ml de RNase A.

5.7.2 Midipréparation QIAGEN

Une fois les clones positifs identifiés, les ADN plasmidiques furent purifiés à plus grande échelle à l'aide d'une trousse commercialisée par la compagnie QIAGEN (catalogue #12143). Suite à la lyse alcaline avec SDS, les lysats bactériens furent nettoyés par centrifugation et le surnageant déposé sur les colonnes QIAGEN à échange anionique. Les plasmides élués furent récupérés par précipitation à l'isopropanol.

5.7.3 Analyse sur gel d'agarose

Ces gels furent utilisés de manière analytique pour fractionner les fragments d'ADN et pour déterminer leur taille. Le pourcentage d'agarose variait de 0,8 à 1% suivant la taille des fragments à séparer. L'électrophorèse eut lieu en présence de tampon 40mM Tris-acétate pH 8.0, 1mM EDTA (TAE x1). Avant leur dépôt sur gel, les échantillons furent additionnés de tampon de chargement (50mM Tris pH7.5, 100mM EDTA pH 7.5, 10% glycérol, 0.05% Bleu de Bromophénol, 0.05% Xylene Cyanol).

6 Multiplication du virus dans une plante hôte

L'évaluation du potentiel infectieux de chaque construction a nécessité l'expérimentation *in vivo*. Ainsi, les essais orientés vers l'insertion de gènes étrangers dans le TuMV furent analysés via le bombardement particulaire alors que ceux étudiant la possibilité d'éliminer certaines régions de la capside furent analysés par transfection de protoplastes et par agro-infection.

6.1 Plantes hôtes

Deux hôtes ont été sélectionnés pour l'exécution de tests en expression transitoire, soient *Brassica perviridis* et *Nicotiana benthamiana*. Un local aménagé au sous-sol de notre édifice fut exploité en guise de salle de croissance (Figure 11). Les conditions dans cette salle étaient une température de 21°C, une luminosité au niveau de la terre d'environ 5.3 klux et une photopériode de 8 heures.



Figure 11 : Exploitation de la salle de croissance

6.2 Transformation des cellules végétales

6.2.1 Expression transitoire dans les feuilles de *Brassica perviridis*

6.2.1.1 Préparation des microprojectiles

30mg de billes d'or de 0.6µm de diamètre furent vortexées dans 500µl d'éthanol 100%. Suivant une incubation de 30 min. à la température de la pièce, elles furent sédimentées par centrifugation et lavées 2 fois dans un volume de 250µl d'éthanol 100%. Les particules d'or furent finalement reprises dans 250µl d'H₂O stérile avant d'être soniquées durant 5 min.

6.2.1.2 Adsorption de l'ADN

2.5µg de plasmide furent mis en présence de 12.5µl de la solution de billes d'or, 25µl de CaCl₂ 2.5M et de 10µl de spermidine 0.1M. Suite à une brève centrifugation, le surnageant fut éliminé et les billes lavées à l'éthanol 100%. Le culot final fut suspendu de nouveau dans 25µl d'éthanol 100%. Chaque bombardement s'est effectué avec 5µl d'une dilution 0.2X de la suspension de microprojectiles enrobées d'ADN.

6.2.1.3 Bombardement particulaire

Les plants de *Brassica perviridis* furent privés de lumière 24h avant le bombardement particulaire. Seule la surface inférieure des feuilles de plants âgés d'environ 3 semaines fut bombardée. Elles furent ensuite conservées en salle de croissance jusqu'à l'apparition des symptômes. Les bombardements furent réalisés avec l'appareil de biolistique PDS-1000 He-system commercialisé par BIO-Rad (Figure 12). Les conditions suivantes furent rencontrées :

Pression d'hélium : 900psi

Vide : 26.5 pouces de mercure (Hg)

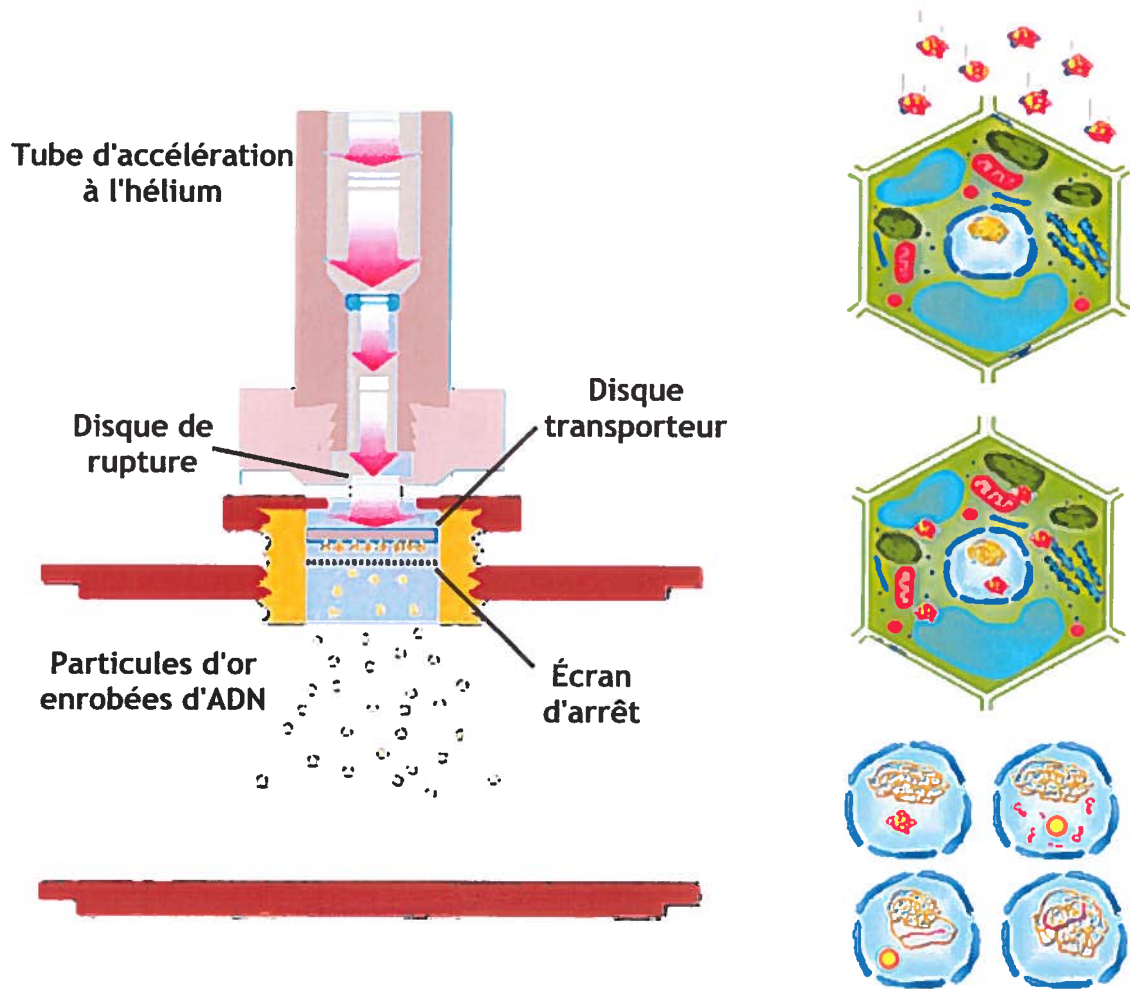


Figure 12 : Méthode de transformation de cellules végétales par bombardement particulaire.

Les billes d'or enrobées d'ADN sont déposées sur un disque transporteur. Les billes sont propulsées par la pression d'hélium déterminée par la robustesse du disque de rupture choisi. L'écran d'arrêt permet aux billes d'être dispersées vers les cellules végétales cibles et d'empêcher le disque transporteur de se retrouver sur la cible. Les particules d'or qui auront atteint le noyau seront libérées de leur ADN qui ira s'incorporer aléatoirement dans le génome de la cellule.

(Adapté de http://www.univ-montp1.fr/biotech/Transgenese/transgenese_vegetale.htm, figures 16-19)

6.2.2 Expression transitoire dans des protoplastes de *Nicotiana benthamiana*

6.2.2.1 Germination de graines *in vitro*

Quelques centaines de graines de *Nicotiana benthamiana* furent stérilisées par un traitement de 5 min. dans de l'éthanol 95% puis dans une solution 2% eau de Javel, 1% Tween 20. Après avoir bien rincé les graines à deux reprises avec de l'eau stérile, 500µl d'acide gibérréllique 2mM (GA) furent ajoutés afin de briser la dormance. Elles y restèrent toute une nuit à la température pièce. Une fois séchées, elles peuvent être conservées à la température pièce durant plusieurs semaines. Les graines furent ensuite semées dans des magenta sur milieu MS + 3% sucrose, 0.7% phytoagar et placées en salle de culture. 24 heures avant une expérience de protoplastes, les magenta furent recouverts de papier d'aluminium afin de priver les plants de lumière.

6.2.2.2 Préparation des protoplastes

Les protoplastes furent isolés à partir de *Nicotiana benthamiana* d'environ six semaines d'âge, cultivés *in vitro*. Une à une, les feuilles furent coupées en deux, face inférieure vers le bas, et incubées dans une solution enzymatique stérilisée par filtration (2.5g/L Polyvinylpyrrolidone mw 10 000, 5.4mM CaCl₂, 0.5M Sucrose, 1g/L Macerozyme R10, 10g/L Cellulase RS). La digestion de la paroi pectocellulosique dura 16hres, sans agitation, en absence de lumière, à 26°C. La solution de protoplastes fut déposée sur un filtre stérile ayant une réticulation de 100µm. Un volume égal d'une solution de sucrose (0.6M Sucrose, 0.1% MES, 15mM CaCl₂; pH5.7 ajusté avec du KOH) fut ajouté aux tissus digérés restant puis filtré avec la solution de protoplastes. Le filtrat fut transféré dans un tube de 13ml et 1ml de W5 (154mM NaCl, 125mM CaCl₂, 5mM KCl, 5mM Glucose, 1.5mM MES pH5.7) fut ajouté goutte par goutte afin de créer un coussin de sucrose. Centrifugés à 750 rpm pendant 10 min., les protoplastes furent récupérés à l'interface séparant les deux solutions. Ils furent ensuite lavés une

fois avec la solution W5, puis repris dans la même solution avant d'être incubés sur glace durant 30 min. Une fraction aliquote fut prélevée afin de dénombrer à l'aide d'un hémacytomètre, les protoplastes obtenus. Immédiatement avant la transformation, la concentration fut ramenée à 2×10^6 protoplastes/ml MaMg (0.5M Mannitol, 15mM $MgCl_2$, 5mM MES; pH 5.7) suite à une brève centrifugation (2 min. 750 rpm).

6.2.2.3 Transfection chimique des protoplastes

Les acides nucléiques furent introduits dans les protoplastes par la technique de transformation chimique. 6.0×10^5 protoplastes (0.3ml de la suspension stock) furent mis en présence de 20 μ g d'ADN stérile et de 300 μ l d'une solution de PEG (0.4M Mannitol, 80mM $(CaNO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 40% Polyéthylène glycol). Les protoplastes furent incubés 30 min. à la température pièce avant qu'on y ajoute 2, 4 et 8 ml de W5 à 5 min. d'intervalle. Conservés 15 min. sur glace, ils furent sédimentés par une centrifugation de 2 min. à 750 rpm et repris dans 4 ml de milieu minimal (0.7M Mannitol, 0.2mM KH_2PO_4 , 1mM KNO_3 , 1mM $MgSO_4$, 10mM $CaCl_2 \cdot H_2O$). La mise en culture s'est fait à 26°C dans le noir pendant une période de 72 heures.

6.2.3 Expression transitoire dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*

6.2.3.1 Agroinfiltration

Les agrobactéries à infiltrer furent mises en pré-culture dans 5 ml de LB contenant les antibiotiques kanamycine (50 μ g/mL), rifampicine (50 μ g/mL), et tétracycline (2 μ g/mL). Après une nuit d'incubation à 28°C sous agitation, la pré-culture servit à inoculer 50 ml de milieu d'agroinfiltration qui furent remis à incuber toute la nuit dans les mêmes conditions. La culture fut ensuite sédimentée par centrifugation pendant 5 min. à 3000 g. Le culot fut lavé dans

l'eau puis remis en suspension dans ± 20 ml de solution d'agroinfiltration (10 mM MES pH 6.3, 10 mM $MgCl_2$ et 150 μM acétosyringone) afin d'obtenir un $DO_{600nm} \approx 0.5$. La solution bactérienne fut laissée 2 à 3 heures à température ambiante.

Des plantules au stade de 4 feuilles furent sélectionnés. L'infiltration fut réalisée par une légère pression sur la surface inférieure d'une feuille à l'aide d'une seringue de 1 ml (sans aiguille) contenant la suspension bactérienne (Figure 13). Chaque fois, 200 à 300 μl furent injectés.

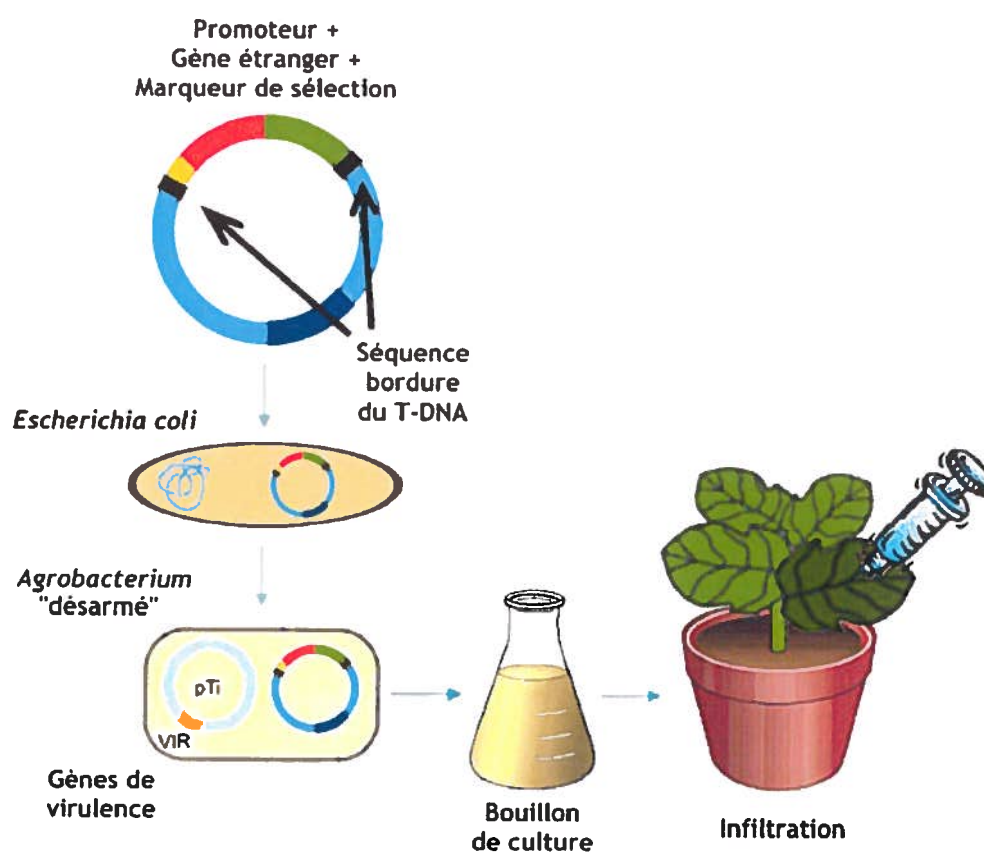


Figure 13 : Méthode de transformation de cellules végétales par agroinfiltration en vue d'une expression transitoire

Le clonage du gène d'intérêt se fait d'abord dans *E. coli* dans un vecteur binaire. Ce dernier est ensuite transféré dans *Agrobacterium tumefaciens* porteur d'un plasmide Ti. Une petite quantité d'un bouillon de culture est ensuite infiltrée dans une jeune feuille sous la pression d'une seringue. 48 heures plus tard, la feuille peut être prélevée et mise sous observation pour l'expression du gène étranger.

7 Analyse de l'expression

7.1 Observation de l'expression des gènes rapporteurs

7.1.1 Protéine de fluorescence verte

Au moins 15 jours suivant l'infection de plants de *Brassica perviridis* par un TuMV recombinant pour le gène *gfp*, une feuille présentant des symptômes fut prélevée et observée au binoculaire ou au microscope à fluorescence.

Le binoculaire à fluorescence Nikon SNZ-1500 du laboratoire du Dr Armand Séguin au Service Canadien des Forêts (Québec) fut ajusté au mode d'excitation vert H 546, avec le filtre d'excitation de 546/12, le filtre d'arrêt (barrier filters, BA) de 590 et le miroir dichroïque (dichroic mirror, DM) de 580. Le microscope à fluorescence Nikon SMZ-1500 fut utilisé avec les filtres d'excitation de 480/40 nm, deux BA de 535/50 et un DM de 505.

7.1.2 β -Glucuronidase

Environ 15 à 20 jours suivant l'infection de plants de *Brassica perviridis* par un TuMV recombinant pour le gène *uidA*, une feuille présentant des symptômes fut prélevée et soumise à un test histochimique pour visualiser l'activité de la β -glucuronidase. Le substrat utilisé fut le X-GlcA (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronide sodium salt, SIGMA catalogue #B5285). D'abord dissout dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) à raison de 15 mg/ml, une solution stock 5X fut préparée en diluant la solution mère de X-GlcA avec le tampon d'incubation (10mM Na₂EDTA, 0.1% Triton X-100, 100mM NaPO₄) dans une proportion de 1 pour 3. Chaque feuille fut immergée dans une solution X-GlcA diluée une fois avec du tampon d'incubation et placée à 37°C jusqu'à l'apparition d'un précipité bleu (entre 4 à 16 hres). Les feuilles furent ensuite décolorées et conservées dans de l'éthanol 70%.

7.2 Extraction des protéines totales solubles

Des prélèvements furent réalisés à 8, 15, 30 et 45 jours suivant le bombardement particulaire des plants de *Brassica perviridis*. Les feuilles prélevées furent immédiatement congelées à -80°C. Elles furent broyées dans l'azote liquide à l'aide d'un pilon et d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. Ces échantillons furent dégelés dans 3 volumes de tampon d'extraction (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 2mM PMSF) par un vigoureux vortexage. Les débris cellulaires et autres impuretés furent sédimentées par centrifugation à vitesse maximale (~15 000rpm) durant 15 min. à 4°C. Le surnageant fut remis à -80°C pour la conservation des protéines.

Les protéines totales solubles provenant des expérimentations sur protoplastes furent obtenues 72 hres suivant leur transfection chimique. Chaque culot obtenu par centrifugation (5min. à 750rpm) fut congelé à -80°C et repris dans 450 µl de tampon d'extraction GUS (50mM NaHPO₄ pH7.0, 10mM β-mercaptoéthanol, 10mM Na₂EDTA, 0.1% Sodium lauryl sarcosine, 0.1% Triton X-100) par vortexage. Le surnageant fut remis à -80°C pour la conservation des protéines.

7.2.1 Immunobuvardage

7.2.1.1 Séparation des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide

7 à 10 µg des protéines présentes dans l'extrait brut furent séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) en présence de SDS selon la technique décrite par Laemmli (Laemmli 1970). Dans le cas des analyses en conditions réductrices, les protéines furent dénaturées par l'addition d'un volume égal de tampon de chargement 2X (100mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 0.2% Bleu de bromophénol, 20% Glycérol, 200mM β-mercaptoéthanol) et par une

ébullition de 3 min. pour rompre les ponts disulfures. 10mM d'ascorbate de sodium furent ajoutés au tampon de chargement employé pour l'analyse de l'expression des gènes κ et γ . Lorsque les échantillons devaient être étudiés en conditions non-réductrices, le même tampon de chargement fut utilisé, mais cette fois, exempt de β -mercaptoéthanol. Après une électrophorèse dans un tampon de migration (25mM Tris-HCl pH6.8, 240mM Glycine, 0.1% SDS; pH8.3) à 100 volts (20 à 30 mA), le gel fut ensuite transféré sur membrane de nitrocellulose à 100 volts durant 60 minutes dans un tampon 25mM Tris-HCl, 192mM Glycine, 20% Méthanol; pH8.3.

7.2.1.2 Immunorévélation après transfert

Une fois la membrane bien séchée, elle fut mise à tremper 10 min. dans du glycérol 10%. Elle fut ensuite immergée dans une solution de blocage PBS-Lait-Tween- 20 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄; pH7.4, 5% lait, 0.2% Tween-20) pendant une heure (ou 16hres à 4°C) pour saturer les sites non spécifiques. Par la suite, la nitrocellulose fut incubée dans une dilution de l'anticorps primaire (voir tableau VIII) pendant deux heures à la température de la pièce. Deux lavages de 5 min. dans une solution PBS-0.2% Tween-20 furent exécutés avant de débiter l'incubation d'une heure avec l'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (voir tableau VIII). La membrane fut finalement lavée 4 fois 10 min. avant de procéder à la méthode détection par chimioluminescence. Le substrat utilisé, le Luminol, est disponible dans la trousse de détection ECL Plus commercialisée par la compagnie Amersham Pharmacia (catalogue #RPN2132).

Tableau VIII : Dilution des anticorps utilisés pour les Western Blot

	Anticorps (primaires et secondaires)	Dilutions (PBS-Lait 5%-0.2% Tween-20)
Primaires	Anti-capside virale de lapin Polyclonal (Fortin, M.; McGill)	1 : 4000
	Anti-GFP de souris Monoclonal (Clontech cat.#8362-1)	1 : 5000
	Anti-GUS de lapin Polyclonal (Molecular Probes cat.#A5790)	1 : 5000
Secondaires	Anti-lapin de mouton - Peroxydase Polyclonal (Chemicon Int'l cat.#AP304P)	1 : 2000
	Anti-IgG (H + L) de souris de chèvre - Peroxydase Polyclonal (KPL cat.#0741806)	1 : 5000

7.2.2 Dosage quantitatif par spectrofluorométrie

L'activité GUS de chaque extrait brut fut mesurée en suivant l'hydrolyse du substrat MUG (4-methylumbelliferyl β -D glucuronide, SIGMA catalogue # M9130) au spectrofluorimètre (Jefferson et al. 1987). 50 μ l d'extrait furent dilués dans 450 μ l de tampon d'essai GUS (2mM MUG dans du tampon d'extraction GUS) préchauffé à 37°C. Le mélange réactionnel fut légèrement vortexé puis aussitôt incubé à 37°C. Au temps 0, puis toutes les 5 min. pendant 15 min, 50 μ l du mélange furent prélevés et la réaction arrêtée par l'addition de 1.950ml de Na₂CO₃ 0,2M. La β -glucuronidase hydrolyse le substrat MUG en MU (4-methylumbelliferone) dont la concentration fut déterminée par la mesure de la fluorescence à 455nm après excitation à 365nm. Le « blanc » fut réalisé avec la solution de carbonate de sodium. Les activités furent exprimées en pmoles de MU formé par minute par mg de protéine. La quantité de protéine par extrait

protéique brut fut mesurée par la technique décrite par Bradford (Bradford 1976).

7.3 Extraction des ARNs totaux

Environ 30 jours suivant le bombardement des plants de *Brassica perviridis* avec les diverses constructions à tester, trois poinçons de feuilles furent prélevés et congelés à -80°C. À l'aide de petits pilons, ces échantillons furent broyés à froid dans des tubes de 1.5 ml jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. C'est avec la trousse d'extraction Rneasy® Plant Mini Kit commercialisée par QIAGEN (catalogue #74903) que les ARNs totaux furent extraits d'un maximum de 100mg de broyat. 1.5µg d'ARN furent déposés sur un gel d'agarose 1% afin de visualiser l'état de l'extraction.

7.3.1 Analyse par transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

La descendance issue de l'ADNc du virus recombinant inoculé aux plants de *Brassica perviridis* fut analysée par transcription inverse. Dans un premier temps, une copie ADN complémentaire de tous les ARNs présents dans l'extraction fut générée. Dans un second temps, les ADNc correspondant au génome viral furent amplifiés par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Ainsi, la réaction de transcription inverse fut réalisée à partir de la trousse ProStar® ultra HF RT-PCR system commercialisée par Stratagene (catalogue #600166). 1µg d'ARNs totaux furent d'abord dénaturés 5 min. à 65°C puis incubés 10 min. à 25°C afin de permettre aux 60ng d'oligo(dT)₁₈ présents dans la préparation de s'hybrider. L'élongation des amorces s'effectua durant 60 min. à 42°C, suite à l'addition de 1µl de tampon StrataScript™ RT 10X (0.5M Tris-HCl pH 8.3, 0.75M KCl et 0.03M MgCl₂), 1U de RNase Inhibitor, 40mM d'un mélange de dNTPs et de 10U de la reverse transcriptase Stratascript™ RT

(extraite du virus de la leucémie murine de Moloney) dans un volume final de 10µl. La polymérase fut ensuite inactivée 5min. à 90°C.

L'amplification des produits de la transcription inverse se fit par PCR à l'aide de la Taq polymérase, tel que décrit précédemment (section 4.1). 1µl de la réaction contenant les ADNc fraîchement synthétisés fut utilisé en guise de matrice. Selon la région à amplifier, les amorces présentées dans le tableau IX furent sélectionnées.

Tableau IX : Amorces utilisées pour l'amplification des régions comprenant un site d'insertion

Utilité	Matrice	Nom de l'amorce*	Séquence 5' → 3'
Amplification de la région comprenant le site d'insertion situé entre P1 et HC-Pro	ADNc issus de RT-PCR	JFP1- <i>HpaI</i>	TA CTC GGG AAG AGA GCA CAG C
		FTHC- <i>XhoI</i>	GT TCT GTT CTT CAG GTA TCG T
Amplification de la région comprenant le site d'insertion situé entre Pol et CP	ADNc issus de RT-PCR	JFPol- <i>XhoI</i>	GA ACC AGG GAA AAA GGA GAC
		FTCP- <i>EcoRI</i>	AG AAA AGA GTG GCT CTA A

* Les amorces « sens » commencent par JF et les amorces « antisens » commencent par FT.

Chapitre 3

Résultats

1 Insertions des gènes rapporteurs dans le TuMV

Les gènes *gfp* et *uidA* furent incorporés dans le génome du TuMV entre les cistrons *P1* et *HC-Pro* ou *Pol* et *CP*. Les constructions contenant un ou les deux gènes furent ensuite transfectées dans des plantes susceptibles au TuMV. L'expression des gènes rapporteurs fut analysée par immunobuvardage et leur stabilité, étudiée par RT-PCR.

1.1 Constructions des plasmides

Un site d'insertion fut créé dans la région 3' de la séquence ADN du TuMV (Figure 14A) contenue dans le plasmide p35TuNos (Sanchez et al. 1998) (Figure 9). Tout d'abord, une version raccourcie du plasmide parental (Figure 15) fut générée par digestion avec l'enzyme *SacI*. Par mutagenèse dirigée, un site de restriction *NgoMIV* fut introduit immédiatement après la séquence codant pour le site de reconnaissance de la protéinase virale VPg-Pro, située entre les protéines Pol et CP. Le fragment *MluI/ApaI* de la construction p35TuNos fut ensuite remplacé par celui de la construction p35TuNos-Delta-*SacI* contenant le site *NgoMIV* pour donner p35TuNos-*NgoMIV* (Figure 15). Ce site de restriction fut également ajouté par PCR de part et d'autre des gènes *gfp* et *uidA* issus des plasmides pBin m-*gfp5-ER* et pBI221 respectivement (Figure 14B). Simultanément, les codons d'arrêt furent éliminés par l'addition, en aval de chacun des gènes rapporteurs (Figure 14B), d'un site artificiel de clivage en *trans* reconnu par la protéinase VPg-Pro (Nicolas & Laliberte 1992). Finalement, les gènes *gfp* et *uidA* modifiés furent insérés dans le site de restriction *NgoMIV* de la construction p35TuNos-*NgoMIV*.

Compte tenu du fait que ce site d'insertion fut créé à proximité de l'extrémité carboxy-terminale, les deux constructions résultantes furent nommées p35TuNos-C-GFP et p35TuNos-C-GUS (Figure 16). Ces dernières furent vérifiées par séquençage afin d'analyser les étapes critiques de l'assemblage.

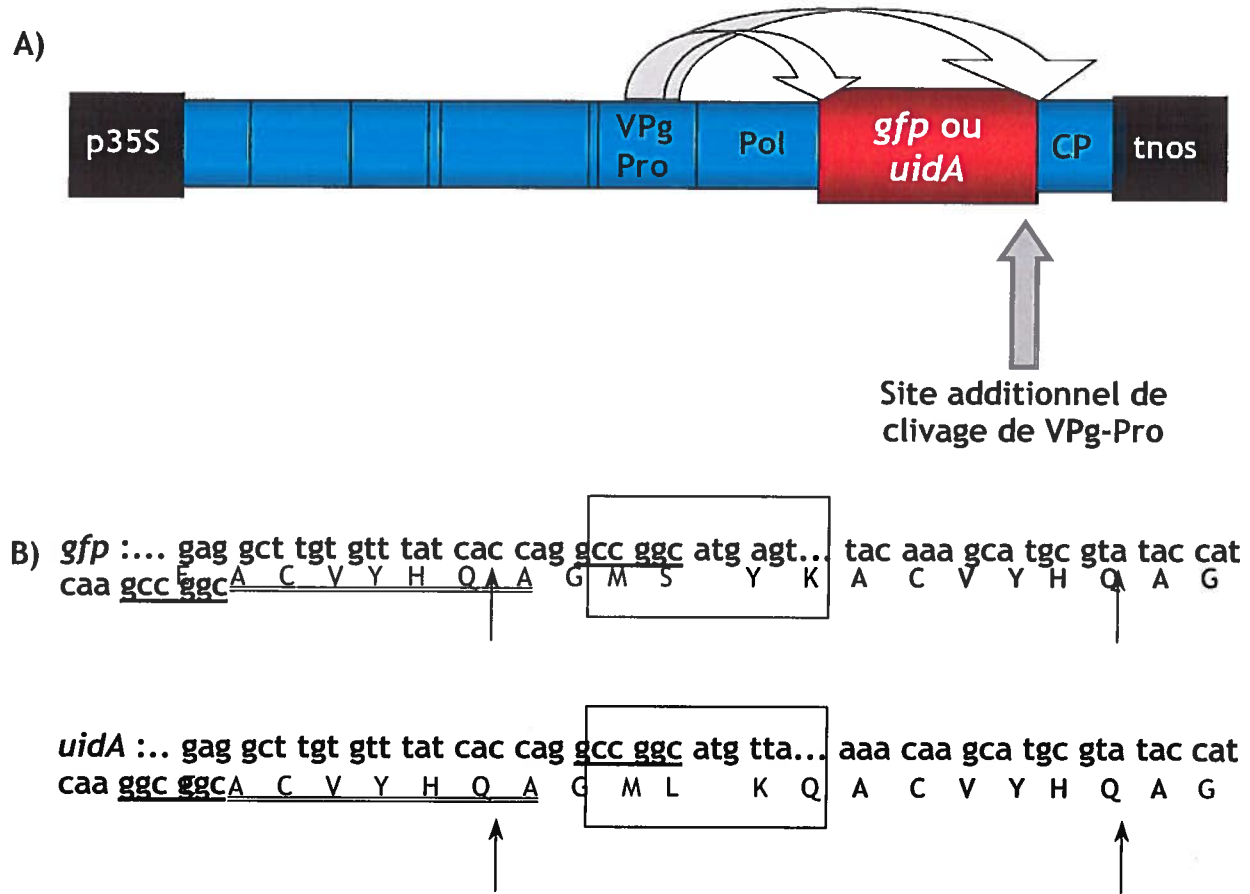


Figure 14 : Constructions du vecteur TuMV pour l'expression d'un gène rapporteur unique

A) Position des gènes étrangers dans la séquence ADN du TuMV. Les gènes *gfp* et *uidA* ont été modifiés par mutagenèse dirigée afin d'être bordés de la séquence du site de restriction *NgoMIV* permettant l'insertion dans la séquence du TuMV. Ils furent également modifiés pour être immédiatement suivis par la séquence de reconnaissance de la protéinase VPg-Pro, permettant leur libération de la polyprotéine (flèches blanches).

B) Séquences : des sites de restriction *NgoMIV* (soulignés) de part et d'autre des gènes *gfp* et *uidA* (encadrés); du site de clivage de la VPg-Pro naturel (double souligné) et; du site de clivage de la VPg-Pro ajouté par mutagenèse dirigée (en gras). Les liens peptidiques clivés sont identifiés par une flèche verticale.

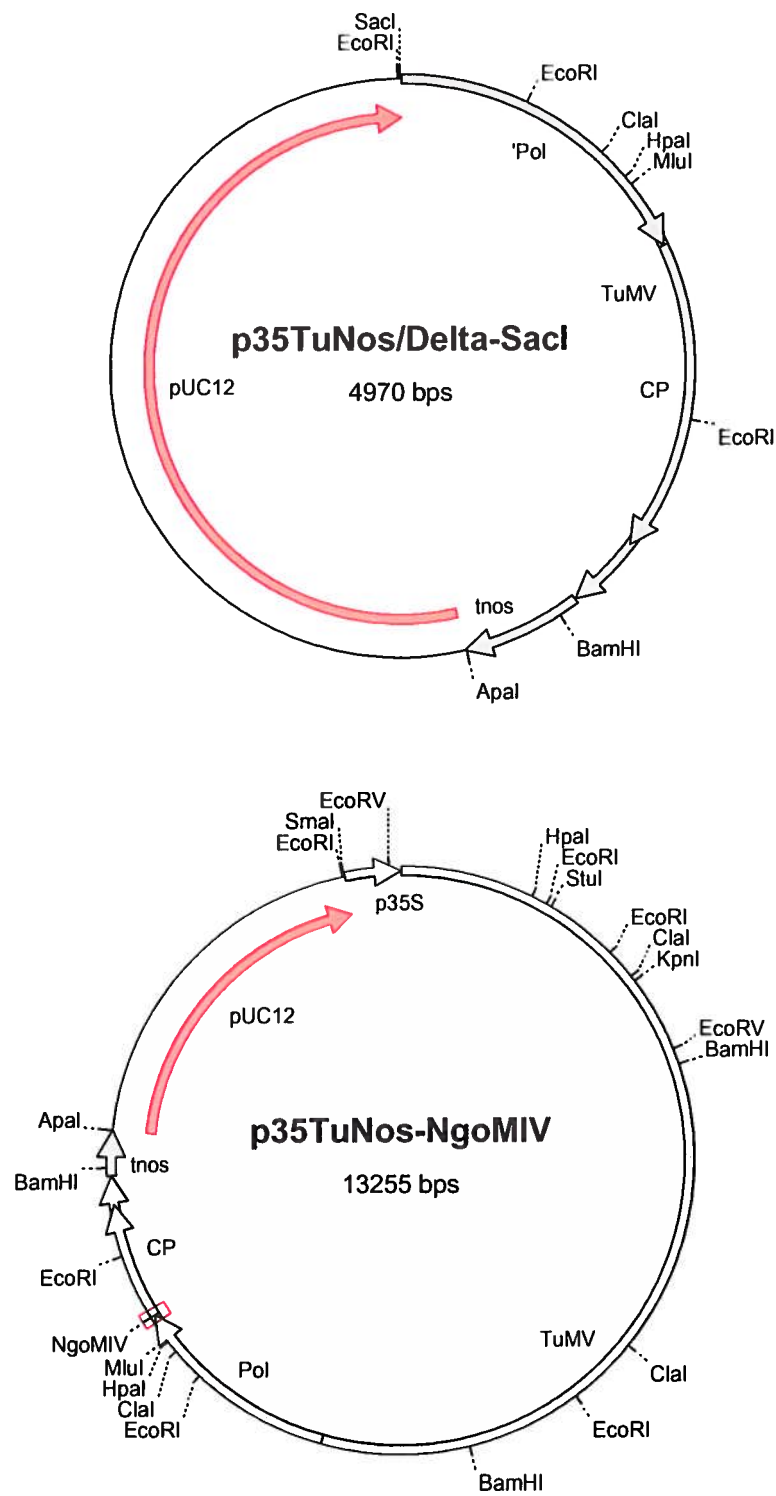


Figure 15 : Cartes de restriction de p35TuNos-Delta-SacI et p35TuNos-NgoMIV

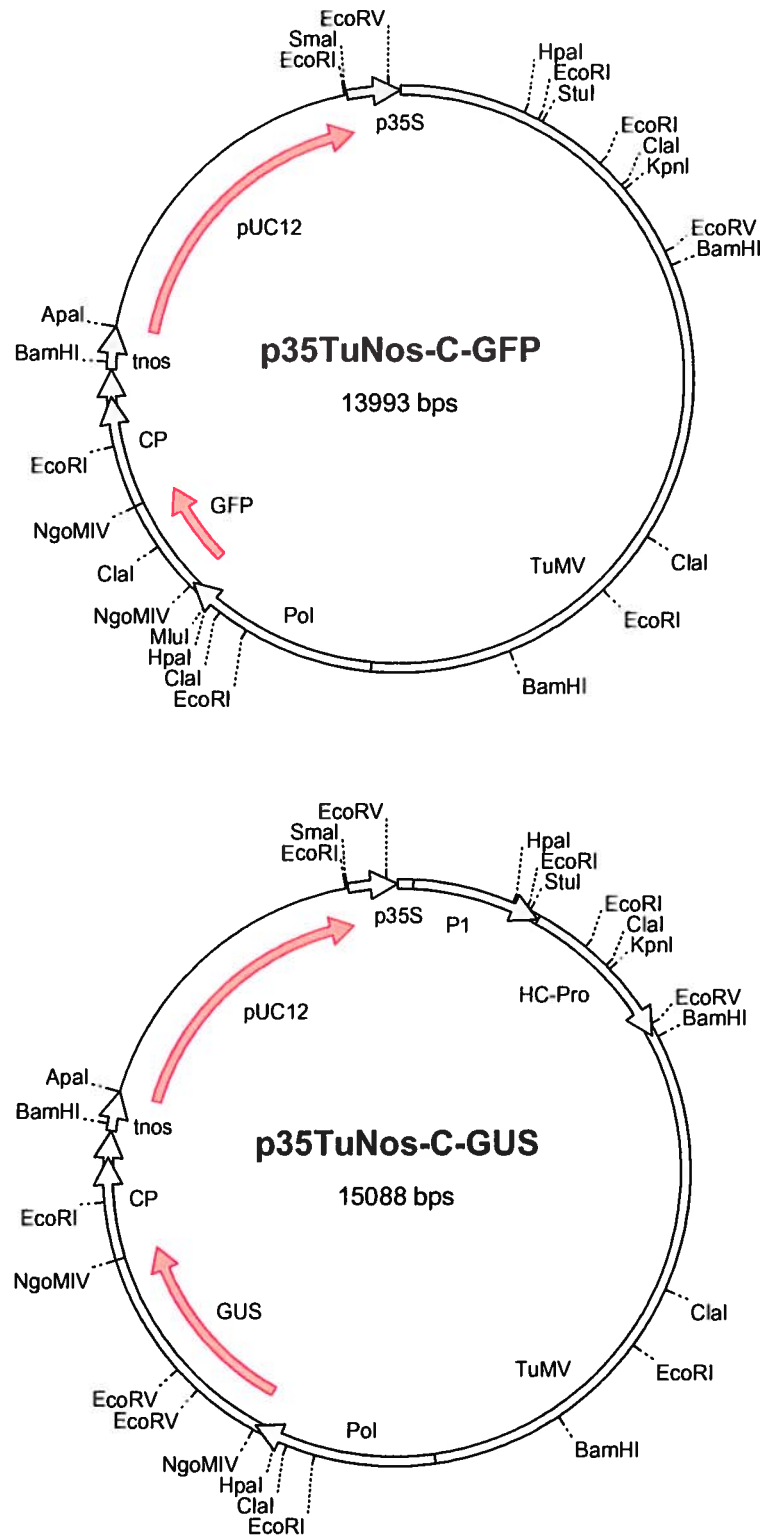


Figure 16 : Cartes de restriction de p35TuNos-C-GFP et p35TuNos-C-GUS

Les deux gènes rapporteurs furent ensuite insérés dans une même construction (Figure 17). Pour ce faire, le fragment *KpnI*/*Apal* de la construction p35TuNos-N-GFP ou p35TuNos-N-GUS (Figure 10) fut remplacé par le fragment *KpnI*/*Apal* de la construction p35TuNos-C-GUS ou p35TuNos-C-GFP (Figure 16). Les deux constructions résultantes, p35TuNos-GFP-GUS et p35TuNos-GUS-GFP (Figure 18) furent nommées en fonction de l'ordre dans lequel se retrouvent les protéines étrangères au sein de la polyprotéine virale. Elles furent analysées par séquençage afin de vérifier les étapes critiques de l'assemblage.

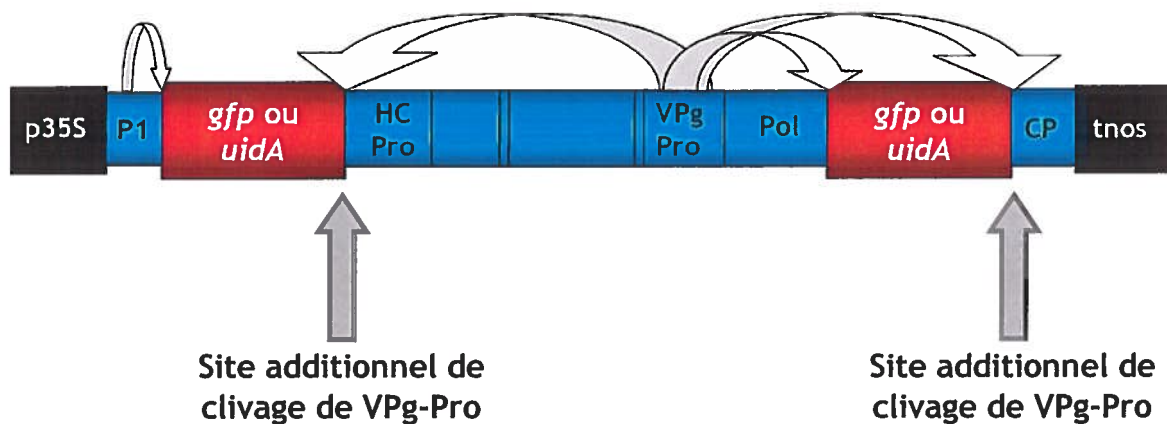


Figure 17 : Construction du vecteur TuMV pour l'expression de deux gènes rapporteurs

Position des gènes étrangers (*gfp* ou *uidA*) dans la séquence ADN du TuMV recombinant. L'addition d'un site de clivage reconnu par la protéinase VPg-Pro à l'extrémité carboxy des protéines GFP et GUS assure leur libération de la polyprotéine virale (flèches blanches).

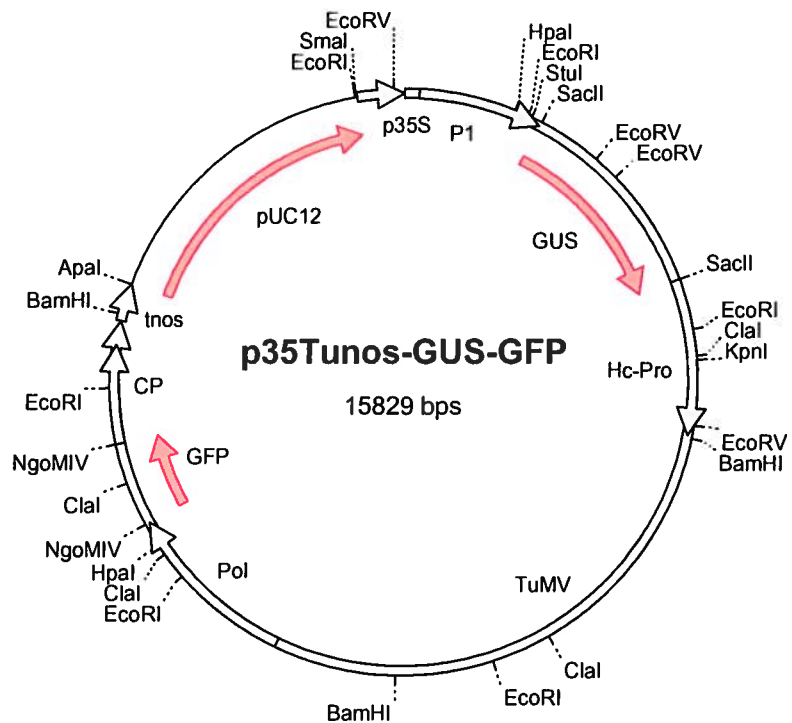
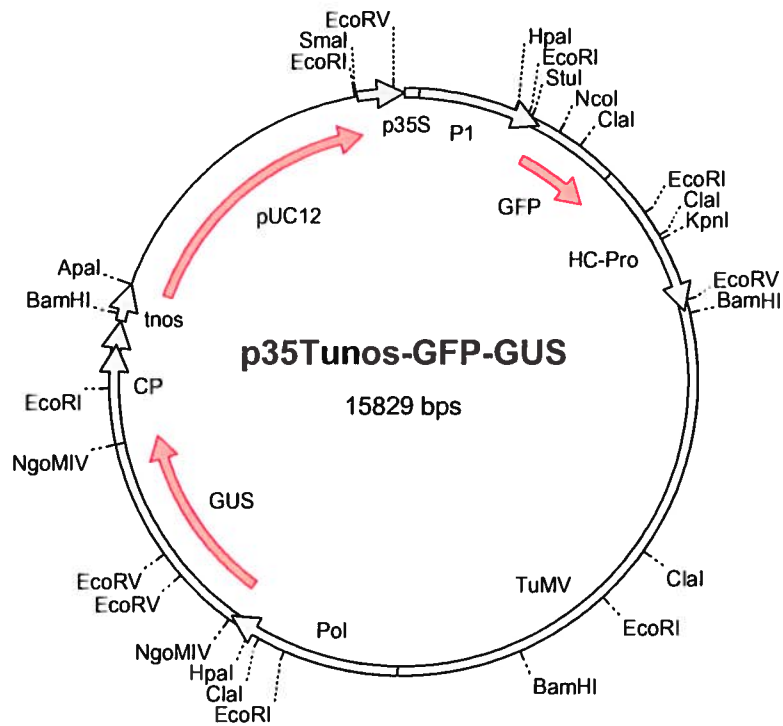


Figure 18 : Cartes de restriction de p35TuNos-GFP-GUS, p35TuNos-GUS-GFP

1.2 Expression transitoire dans *Brassica perviridis*

1.2.1 Transfection

Le potentiel infectieux des constructions fut vérifié en expression transitoire avec la technique de bombardement particulaire. Entre trois et neuf plantes de *B. perviridis* furent transfectées avec la construction p35TuNos-CGFP, p35TuNos-CGUS, p35TuNos-GFP-GUS ou p35TuNos-GUS-GFP. Chaque fois, au moins trois plantes supplémentaires furent bombardées avec des particules d'or en suspension dans de l'eau. Ces plantes, se développant tout comme une plante saine non bombardée, jouaient le rôle de témoin négatif d'infection. De plus, en guise de témoins positifs d'infection, au moins trois plantes additionnelles étaient bombardées avec des particules d'or enrobées de la construction p35TuNos. Tel qu'observé lors d'une infection par le TuMV de type sauvage, les feuilles de ces plantes présentaient une déformation et une décoloration. La croissance de ces plantes était également retardée par rapport aux plantes saines (Figure 19).

Tous les virus recombinants (TuMV-CGFP, TuMV-CGUS, TuMV-GFP-GUS et TuMV-GUS-GFP) ont engendré l'apparition de symptômes caractéristiques d'une infection par le TuMV. La mosaïque typique, constituée de plages vert pâle sur un fond de vert plus foncé, était visible sur les nouvelles feuilles exhibant des déformations. De plus, toutes les plantes infectées montraient un retard de croissance. Néanmoins, en comparaison avec une infection par le TuMV sauvage, un délai d'apparition des symptômes fut rencontré avec chacune des constructions testées. En effet, alors que les symptômes dus au TuMV étaient visibles entre 8 à 12 jours suivant la transfection, ceux attribuables à la présence du TuMV-CGFP furent observés entre 8 à 14 jours. Dans le cas du TuMV-CGUS, il fallut attendre entre 11 à 24 jours avant de pouvoir noter la présence des symptômes. Quant au TuMV-GFP-GUS, il mit entre 14 à 28 jours avant d'affecter le phénotype des plantes hôtes alors que le TuMV-GUS-GFP y mit jusqu'à 31 jours.

L'intensité des symptômes fut par ailleurs variable d'un virus recombinant à l'autre. La mosaïque, la déformation des feuilles et le retard de croissance furent beaucoup plus prononcés dans le cas du TuMV-CGFP que dans celui du TuMV-CGUS. Ils furent d'intensité moins considérable lors d'infections avec le virus TuMV-GFP-GUS ou TuMV-GUS-GFP. De plus, dans tous les cas, l'amplitude des symptômes fut inversement proportionnelle au délai précédant leur apparition. Un résumé des résultats obtenus au cours d'une expérience représentative est présenté dans le tableau IX.

La présence de virus dans les feuilles des plantes transfectées fut confirmée par immunobuvardage de type western (Figure 22A). Puisque le matériel prélevé provenait des deuxième et troisième générations de feuilles, la présence de protéines virales peut suffire à démontrer l'établissement d'une infection systémique. Ainsi, une protéine d'environ 33 kDa fut révélée à l'aide d'un sérum de lapin dirigé contre la capsid virale dans les échantillons transfectés avec les virus TuMV, TuMV-CGFP, TuMV-CGUS, TuMV-GFP-GUS et TuMV-GUS-GFP. Aucun signal ne fut détecté dans les échantillons provenant des plantes bombardées de microprojectiles sans ADN.



Figure 19 : Témoins positif et négatif de transfection par bombardement particulaire

A) Témoin négatif; plante de *B. perviridis* bombardée avec des particules d'or en suspension dans de l'eau. (L'expression « mock inoculated » sera employée pour désigner ce type de transfection.)

B) Témoin positif; plante de *B. perviridis* bombardée avec des particules d'or enrobées de la construction p35TuNos.

Tableau X : Résultats obtenus suite à la transfection de plantes de *B.perviridis* avec les constructions contenant un ou des gènes rapporteurs

Constructions	% de plantes infectées	Ampleur des symptômes *	Nombre de jours avant l'apparition de symptômes
« mock inoculated »	s/o	s/o	s/o
p35TuNos	100 %	++++	8 à 12 jours
p35TuNos-CGFP	89 %	++++	8 à 14 jours
p35TuNos-CGUS	78 %	+++	11 à 24 jours
p35TuNos-GFP-GUS	78 %	++	14 à 28 jours
p35TuNos-GUS-GFP	56 %	++	14 à 31 jours

* Les symptômes comprennent mosaïque, déformation foliaire et retard de croissance.

** s/o : sans objet

1.2.2 Expression des gènes rapporteurs

1.2.2.1 Protéine à fluorescence verte

Les feuilles infectées par les virus TuMV-CGFP et TuMV-GFP-GUS ont montré une fluorescence caractéristique de l'expression de la GFP (Figure 20A et B). Celles ayant été infectées par le TuMV-GUS-GFP ont également révélé la présence de GFP fonctionnelle mais en moins grandes quantités (Figure 20C). Aucune émission de lumière ne fut observée dans le cas des feuilles non-infectées (Figure 20D) ou infectées par le TuMV de type sauvage. Les observations ont eu lieu 20 à 35 jours suivant le bombardement particulaire.

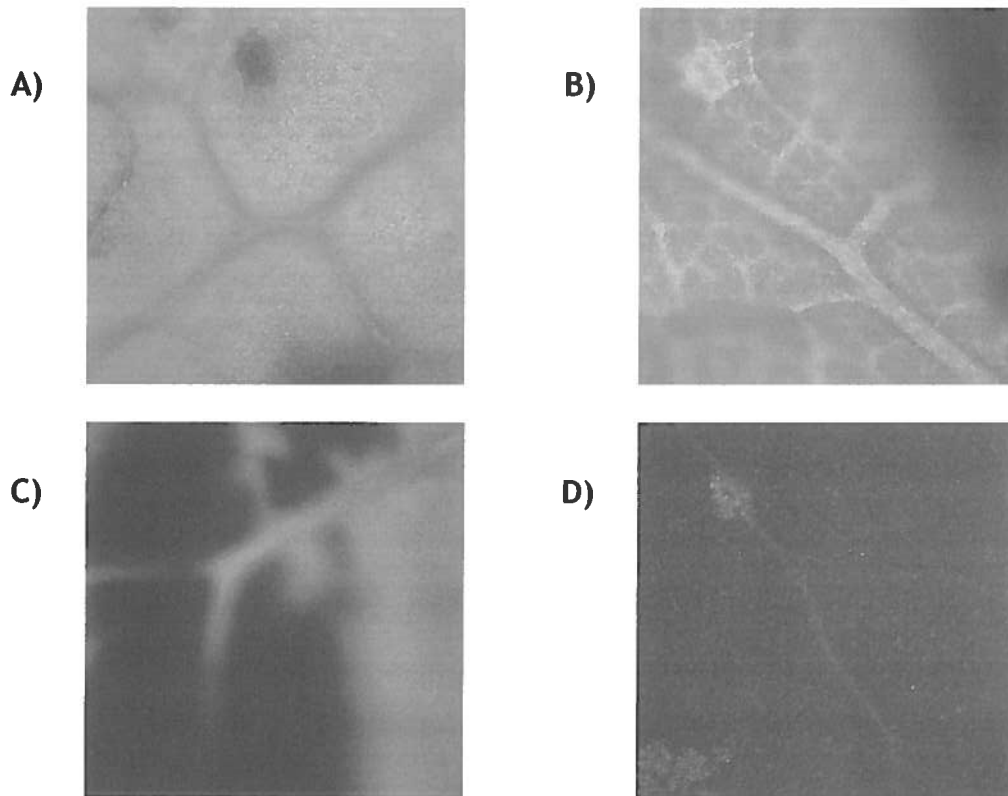


Figure 20 : Fluorescence de la GFP

Observation au microscope à fluorescence de feuilles de *B. perviridis* bombardées de particules enrobées A) de p35TuNos-CGFP, B) de p35TuNos-GFP-GUS, C) de p35TuNos-GUS-GFP ou D) d'eau.

1.2.2.2 β -Glucuronidase

La synthèse de β -glucuronidase fonctionnelle fut vérifiée par un test histochimique. Des feuilles présentant des symptômes furent incubées dans un substrat chromogénique (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique). Des précipités bleus (Figure 21A,B,C), témoins d'une activité enzymatique, firent leur apparition dans les feuilles prélevées de plantes transfectées avec la construction p35TuNos-CGUS, p35TuNos-GFP-GUS ou p35TuNos-GUS-GFP. Aucune activité ne fut décelée sur les échantillons issus de plantes saines (Figure 21D) ou infectées par le TuMV de type sauvage.

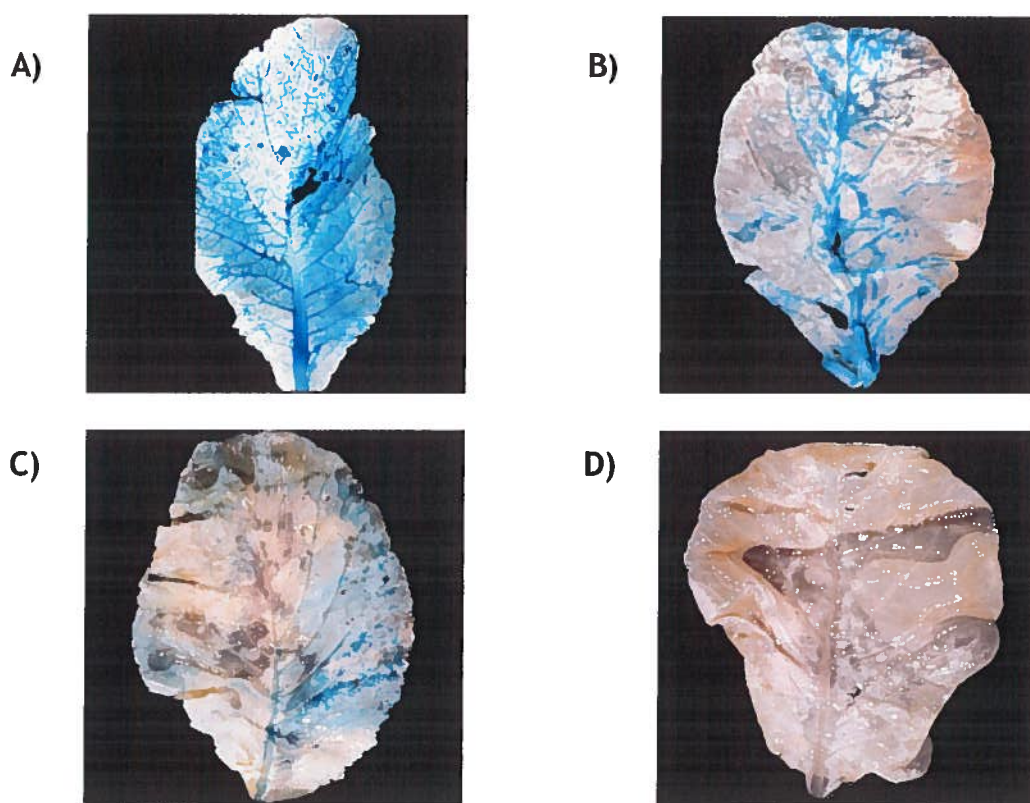


Figure 21 : Activité de la β -glucuronidase dans des feuilles bombardées par les vecteurs TuMV porteurs du gène *uidA*.

Les feuilles furent prélevées environ 20 jours suivant le bombardement des plantes avec des particules enrobées A) de p35TuNos-CGUS, B) de p35TuNos-GFP-GUS, C) de p35TuNos-GUS-GFP ou D) d'eau.

1.2.3 Analyse de l'expression des gènes rapporteurs

Une fois la présence de virus confirmée par la détection de la capside virale (Figure 22A), des immunoblots furent effectués afin de vérifier l'expression de chacun des gènes rapporteurs. Des sérums de lapin dirigés contre la protéine à fluorescence verte (GFP) ou la β -glucuronidase (GUS) furent utilisés pour mettre en évidence la production de chacune des deux protéines (Figure 22B et C). Alors qu'aucun signal ne fut détecté dans les échantillons provenant de plantes infectées avec le TuMV, une protéine d'environ 30 kDa, correspondant au poids moléculaire de la GFP, fut observée dans les plantes infectées avec le TuMV-CGFP, TuMV-GFP-GUS et TuMV-GUS-GFP. De même, une protéine d'environ 70 kDa fut révélée dans les échantillons issus de plantes infectées avec le TuMV-CGUS, TuMV-GFP-GUS et TuMV-GUS-GFP. Cette protéine, au poids moléculaire attendu de GUS, fut absente des prélèvements faits à partir des plantes infectées par le TuMV. De plus, tel qu'attendu dans le cas des vecteurs porteurs de deux gènes étrangers (TuMV-GFP-GUS et -GUS-GFP), les deux protéines furent produites simultanément.

L'insertion de ces gènes eut par ailleurs l'effet de retarder la réplication virale. Alors que la protéine de la capside fut détectée 8 jours suivant le bombardement dans le cas du TuMV sauvage, un délai de 15 jours fut nécessaire pour les virus recombinants TuMV-GFP, TuMV-GUS et TuMV-GFP-GUS. En ce qui concerne les infections par le TuMV-GUS-GFP, 30 jours post-transfection furent requis.

Le poids moléculaire de la GFP ($\pm$ 30 kDa) et de GUS ($\pm$ 70 kDa), détectés dans les échantillons provenant de plantes infectées par TuMV-CGFP, TuMV-CGUS, TuMV-GFP-GUS et TuMV-GUS-GFP, témoigna de l'efficacité de la protéolyse par VPg-Pro et par P1. Par ailleurs, un signal inattendu de haut poids moléculaire ($>$ 113 kDa) fut enregistré dans tous les échantillons où la présence de GUS fut confirmée. Il est possible que ce signal représente une protéine GUS

demeurée en fusion avec la protéine virale qui la précède ou la suit. Dans ce cas, la protéolyse aurait été accomplie de manière incomplète.

Aucun immunoblot réalisé à partir d'échantillons issus de plantes bombardées de particules d'or sans ADN n'a généré de signal. Aussi, les prélèvements faits à partir de plantes infectées par le TuMV n'ont révélé que la présence de la protéine de la capsid virale.

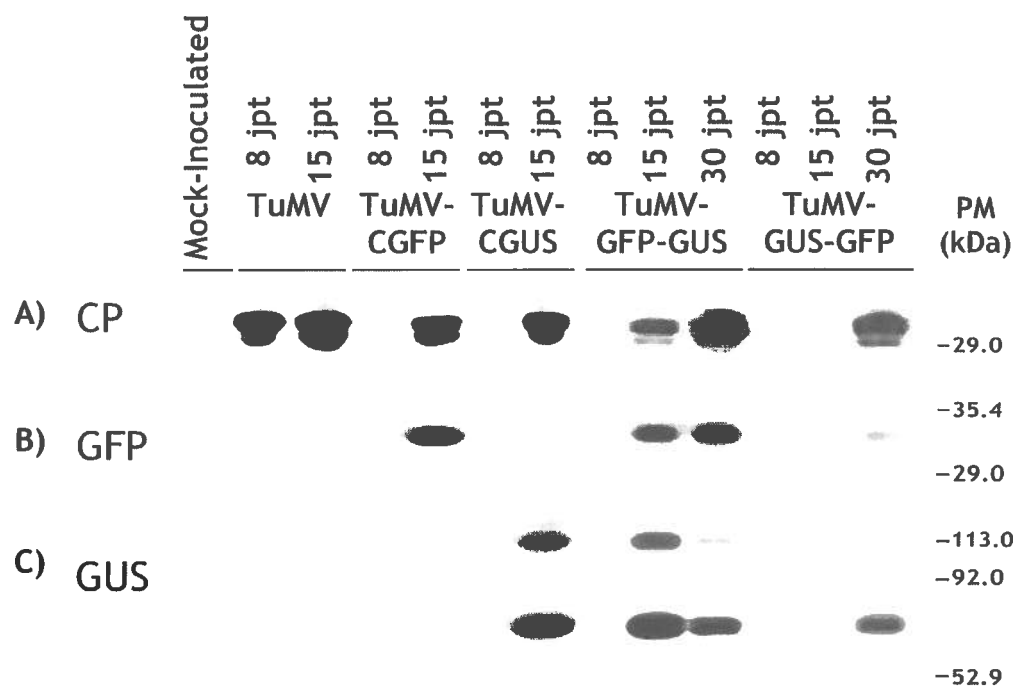


Figure 22 : Immunobuvardage de type western sur des extractions protéiques issues de feuilles de *B. perviridis* non-infectées ou transfectées avec les constructions p35TuNos, p35TuNos-CGFP, p35TuNos-CGUS, p35TuNos-GFP-GUS ou p35TuNos-GUS-GUS.

Les feuilles de deuxième et troisième générations furent récoltées 8, 15 et 30 jours post-transfection (jpt). Les anticorps utilisés étaient dirigés contre A) la capsid du TuMV (CP), B) la protéine à fluorescence verte (GFP) et C) la β -glucuronidase (GUS).

1.2.4 Stabilité des insertions

La stabilité des insertions fut analysée avec la technique du RT-PCR. 15 et 30 jours suivant le bombardement de plantes de *B. perviridis* avec chacune des constructions à tester, des morceaux furent prélevés sur les plus jeunes feuilles présentant des symptômes d'infection. Les ARNs totaux furent extraits du matériel végétal et un oligo dT servit d'amorce pour la synthèse de l'ADN complémentaire du virus.

La région comprenant le site d'insertion situé en 5' des ADNc obtenus fut amplifiée par PCR à l'aide d'amorces s'appariant aux gènes codant pour les protéines P1 et HC-Pro (Tableau IX; Figure 23A). Des fragments ADN d'environ 800 pb furent obtenus pour les virus TuMV, TuMV-CGFP et TuMV-CGUS. Ce résultat est conforme avec la taille attendue des amplicons provenant de virus ne possédant pas d'insert entre les gènes P1 et HC-Pro (Tableau X). Une bande unique, de forte intensité et d'environ 1 500 pb fut observée dans le cas du TuMV-GFP-GUS, synonyme de la présence du gène *gfp* entre les cistrons *P1* et *HC-Pro* (Tableau X). L'absence de fragment ADN de plus petites tailles laisse suggérer que le gène *y* est demeuré entier, même après 30 jours de dissémination virale dans la plante. Dans le cas du virus TuMV-GUS-GFP, la présence du gène *uidA* dans le site d'insertion amplifié fut mise en évidence par l'apparition d'une bande d'environ 2 600 pb. Par contre, des fragments supplémentaires de plus petites tailles (entre 0.7 et 2 Kb) furent également visibles. Ce résultat indique la perte de séquences de longueurs variables entre les régions s'appariant aux amorces utilisées lors de l'amplification. Le gène *uidA* ne semble donc pas être entièrement stable lorsqu'inséré entre les gènes P1 et HC-Pro du TuMV.

La région comprenant le site d'insertion situé en 3' des mêmes ADNc fut quant à elle amplifiée avec une paire d'amorces s'appariant aux cistrons *Pol* et *CP* (Tableau IX; Figure 23B). La bande d'environ 600 pb obtenue suite à l'amplification de cette région de l'ADNc du TuMV témoigne de l'absence

d'insert (Tableau X). Dans le cas des virus TuMV-CGFP et TuMV-GUS-GFP, l'observation de fragments d'environ 1 400 pb laisse présumer de la présence d'un gène *gfp* complet entre leurs gènes Pol et CP (Tableau X). En ce qui concerne la stabilité du gène, elle s'est avérée incomplète 30 jours après la transfection compte tenu de la détection d'une faible bande de taille inférieure à celle attendue. Par ailleurs, sans doute issues d'une amplification non spécifique, des bandes plus grandes furent également enregistrées. Finalement, le patron de migration des amplicons obtenus suite à l'amplification des ADNc du TuMV-CGUS et TuMV-GFP-GUS démontra l'instabilité du gène *uidA* après 30 jours d'infection virale. Une bande principale d'environ 2 500 pb, correspondant à la taille attendue en présence du gène complet (Tableau X), fut observée à partir des échantillons prélevés 15 jours post-transfection. Par contre, cette bande fut remplacée par de nombreux fragments de tailles inférieures (entre 0.6 à 2.2 Kb) dans les prélèvements effectués 30 jours post-transfection.

Tableau XI : Tailles attendues des amplicons issus de RT-PCRs réalisés sur des extractions d'ARN de feuilles infectées par le virus TuMV, TuMV-CGFP, TuMV-CGUS, TuMV-GFP-GUS ou TuMV-GUS-GFP

Insert	Sites d'insertion	
	Entre P1 et HC-Pro	Entre Pol et CP
Aucun	783 pb	656 pb
<i>gfp</i>	1 527 pb	1 394 pb
<i>uidA</i>	2 619 pb	2 486 pb

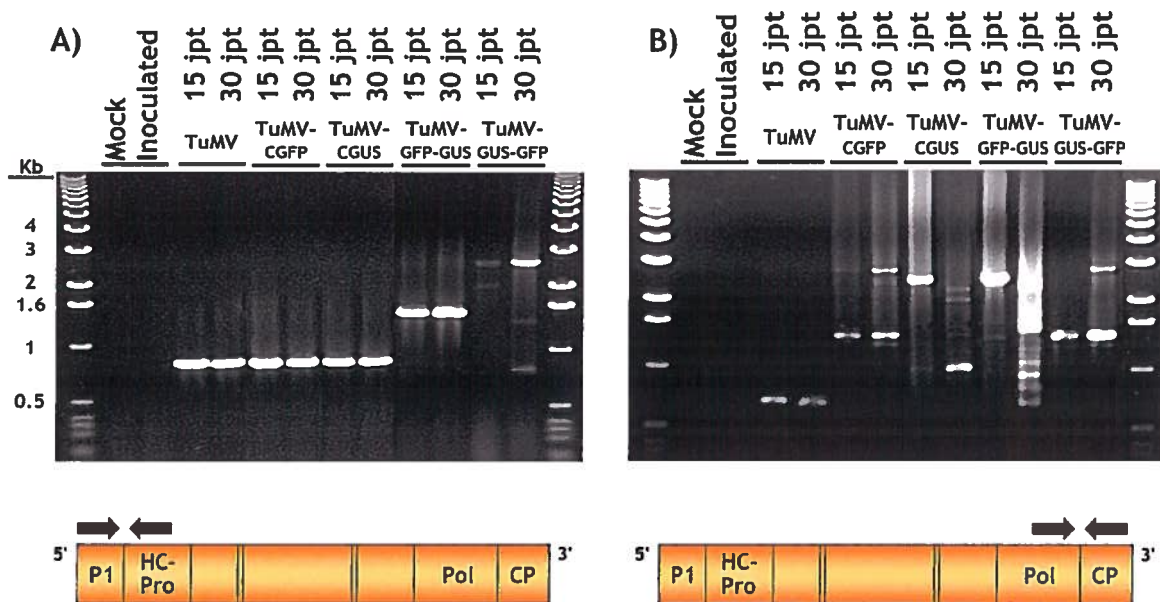


Figure 23 : Patron de migration des amplicons obtenus par RT-PCR : stabilité des gènes *gfp* et *uidA* dans la séquence du TuMV.

RT-PCRs sur des extractions d'ARNs totaux de feuilles bombardées avec de l'eau, la construction p35TuNos, p35TuNos-CGFP, p35TuNos-CGUS, p35TuNos-GFP-GUS ou p35TuNos-GUS-GFP. Les feuilles furent prélevées 15 ou 30 jours post-transfection. Les flèches situées au-dessus du génome viral illustrent l'emplacement des amorces utilisées pour l'amplification de la région en 3' (A) ou en 5' (B).

2 Insertion des gènes codants pour un anticorps dans le TuMV

Compte tenu de la possibilité d'exprimer deux gènes étrangers à partir d'un seul TuMV recombinant, il s'inscrivait dans l'ordre des choses de tenter l'expression d'un hétérodimère. Les anticorps sont sans doute parmi les plus intéressantes protéines recombinantes à être produites en grandes quantités. En effet, leur pouvoir de liaison spécifique fait d'eux des outils versatiles pouvant être utilisés dans de multiples applications. Le dépistage d'immunoglobulines humaines de faible affinité dans les banques de sang compte parmi celles-ci. Employé dans la préparation des produits sanguins en vue d'une éventuelle transfusion, le C5.1 est un anticorps monoclonal dirigé contre les IgG humaines. Il fut produit avec succès dans des plantes transgéniques de *Medicago sativa* (Alfalfa) (Khouidi et al. 1999). Initialement développées par Agriculture Canada, l'Université Laval et Héma-Québec, ces plantes sont maintenant exploitées par la compagnie Médicago. Avec leur collaboration, nous avons donc entamé les essais d'expression du C5.1 à l'aide de notre vecteur TuMV. Les gènes codant pour ses chaînes légères et lourdes furent introduits dans chacun des sites d'insertion exploités précédemment.

2.1 Constructions des plasmides

Le site de restriction *SacII* fut créé de part et d'autre du gène *kappa* (κ), codant pour la chaîne légère de l'anticorps C5.1, compris dans le plasmide pSK-C5.1*kappa* (souche 1201 – Médicago). De même manière, le site de restriction *NgoMIV* fut ajouté aux extrémités du gène *gamma* (γ) codant pour la chaîne lourde du même anticorps, issus du plasmide pSK-C5.1*gamma* (souche 1202 – Médicago). La séquence codant pour le site de reconnaissance de la protéinase VPg-Pro fut également introduit en amont du site de restriction situé en 3' de chacun des gènes (Figure 24). Le gène κ ou γ fut ensuite inséré dans la séquence du TuMV en remplacement du gène *gfp* ou *uidA* compris dans la construction

p35TuNos-GFP-GUS, pour générer les constructions p35TuNos-GFP- γ et p35TuNos- κ -GUS (Figure 25A et B). Finalement, la construction p35TuNos- κ - γ (Figure 25C) fut obtenue en substituant le gène *gfp* de p35TuNos-GFP- γ par celui de la chaîne légère modifiée. La séquence en 5' des gènes *kappa* et *gamma*, codant pour le peptide signal original, fut conservée.

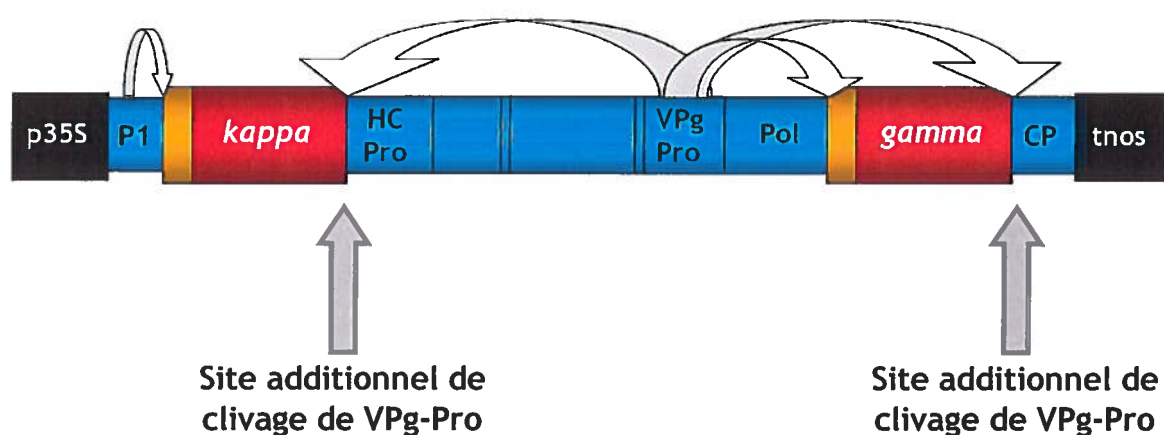


Figure 24 : Construction du vecteur TuMV pour l'expression des gènes codant pour les chaînes légère et lourde de l'anticorps C5.1

Position des gènes κ et γ dans la séquence ADN du TuMV recombinant. La séquence signal originale (rectangle orangé) est présente en 5' des gènes κ et γ . L'addition d'un site de clivage reconnu par la protéinase VPg-Pro à l'extrémité carboxy des protéines kappa et gamma assure leur libération de la polyprotéine virale (flèches blanches).

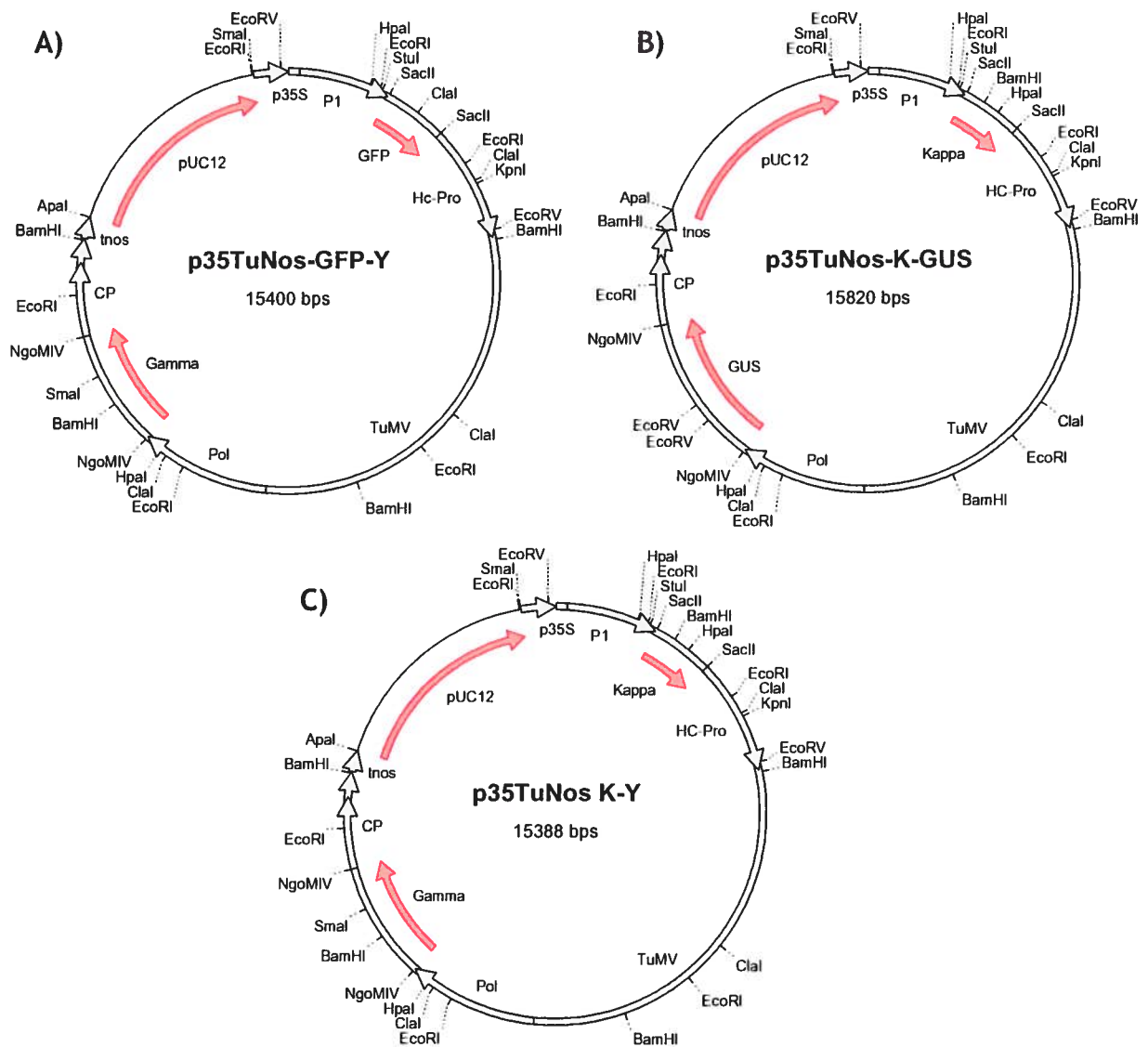


Figure 25 : Cartes de restriction des constructions p35TuNos- κ -GUS, p35TuNos-GFP- γ et p35TuNos- κ - γ

2.2 Expression transitoire dans *Brassica perviridis*

2.2.1 Transfection

Comme dans le cas des constructions comportant un ou deux gènes rapporteurs, l'étude du potentiel infectieux fut réalisée en expression transitoire avec la technique de bombardement particulaire. Selon les essais réalisés, entre cinq et vingt plantes de *B. perviridis* furent transfectées avec la construction p35TuNos-GFP- γ , p35TuNos- κ -GUS ou p35TuNos- κ - γ . Chaque fois, au moins trois plantes furent bombardées de microprojectiles en suspension dans de l'eau. Exemptes de tout symptôme, ces plantes remplirent le rôle de témoins négatifs d'infection. De plus, au moins trois autres plantes furent bombardées avec des particules d'or enrobées de la construction p35TuNos. Développant les symptômes typiquement associés à la présence du TuMV sauvage (mosaïque, déformation foliaire, retard de croissance), ces plantes furent utilisées comme témoins positifs d'infection.

Tous les virus recombinants (TuMV-GFP- γ , TuMV- κ -GUS, TuMV- κ - γ) ont causé des symptômes caractéristiques d'une infection par le TuMV. L'infection s'est toutefois manifestée avec beaucoup moins d'intensité que dans le cas du virus sauvage (tableau XI). En effet, les feuilles des plantes infectées par les virus TuMV- κ -GUS et TuMV- κ - γ ont montré une très faible décoloration et très peu de déformations. L'ampleur des symptômes fut un peu plus grande dans le cas des feuilles de plantes infectées par le TuMV-GFP- γ . Par ailleurs, plus de temps s'est écoulé avant l'apparition des premières mosaïques. Alors qu'elles étaient visibles 16 à 25 jours après la transfection de la construction p35TuNos-GFP- γ , l'attente se prolongea entre 27 à 31 jours et entre 25 à 32 jours dans les cas des constructions p35TuNos- κ -GUS et p35TuNos- κ - γ respectivement. De plus, à chaque essai, une faible proportion des plantes transfectées avec ces deux dernières constructions ont présenté des symptômes. Un résumé des résultats obtenus lors d'une expérience représentative est exposé dans le tableau XI.

Tableau XII : Apparition des symptômes suite à la transfection de plantes de *B.perviridis* avec les constructions contenant une chaîne légère ou lourde et un gène rapporteur ou les deux chaînes

Constructions	% de plantes infectées	Ampleur des symptômes *	Nombre de jours avant l'apparition de symptômes
«Mock inoculated»	s/o	s/o	s/o
p35TuNos	100 %	++++	8 à 14 jours
p35TuNos-κ-GUS	20 %	+	27 à 31 jours
p35TuNos-GFP-γ	75 %	++	16 à 25 jours
p35TuNos-κ-γ	20 %	+	25 à 32 jours

* Les symptômes comprennent mosaïque, déformation foliaire et retard de croissance.

** s/o : sans objet

La présence de virus fut confirmée par le ciblage de la capside virale en immunobuvardage de type western (Figure 26). Une protéine de poids moléculaire correspondant à celui de la capside virale (± 33 kDa) fut révélée dans les échantillons transfectés avec les virus TuMV, TuMV-κ-GUS, TuMV-GFP-γ et TuMV-κ-γ. Aucun signal ne fut détecté dans les échantillons provenant des plantes bombardées de particules d'or en suspension dans l'eau.

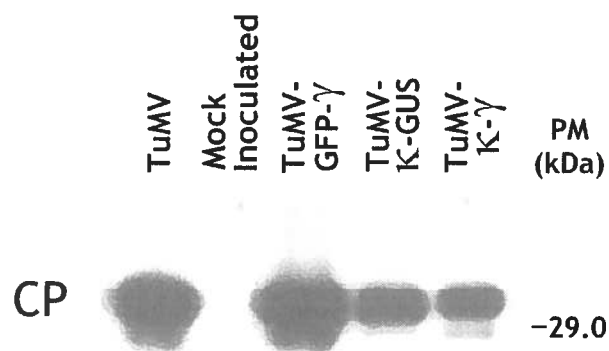


Figure 26 : Immunobuvardage de type western sur des extractions protéiques issues de feuilles de *B. perviridis* transfectées avec les constructions p35TuNos, p35TuNos-κ-γ, p35TuNos-κ-GUS ou p35TuNos-GFP-γ.

Les feuilles de deuxième et troisième générations furent récoltées 30 jours post-transfection. L'anticorps utilisé lors de l'immunorévélation fut un anti-lapin de mouton couplé à la peroxydase.

2.2.2 Expression des gènes rapporteurs

L'activité de la GFP fut visible dans toutes les feuilles infectées avec le TuMV-GFP- γ ayant été observées sous la lumière UV (Figure 27A). À l'opposé, aucune fluorescence ne fut détectée à partir des feuilles transfectées par la construction p35TuNos- κ -GUS ou p35TuNos- κ - γ . Par ailleurs, après incubation dans son substrat (X-GlcA), l'activité de la β -glucuronidase fut dévoilée dans les feuilles de plantes transfectées avec la construction p35TuNos- κ -GUS via l'apparition de précipités bleus (Figure 27B). Les feuilles infectées par les virus TuMV-GFP- γ et TuMV- κ - γ ne présentèrent aucune activité. De même, les échantillons prélevés de plantes saines ou infectées par le TuMV sauvage n'ont pas révélé d'activité lorsqu'elles furent observées au microscope à fluorescence ou suite à une incubation dans le substrat X-GlcA.

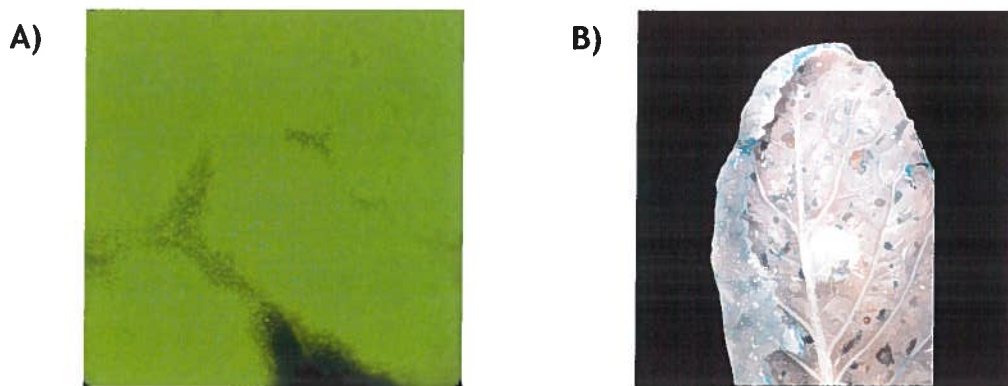


Figure 27 : Expression des gènes rapporteurs

A) Activité de la GFP dans une feuille infectée par le virus TuMV-GFP- γ . L'observation fut réalisée au microscope à fluorescence. B) Observation au binoculaire de l'activité de la β -glucuronidase sur une feuille infectée par le virus TuMV- κ -GUS. L'activité fut mise en évidence par un test histochimique.

2.2.3 Analyse de l'expression des gènes *kappa* et *gamma*

L'expression des gènes *kappa* et *gamma* fut vérifiée par immunobuvardage de type western. Un sérum de chèvre, dirigé contre les protéines murines et couplé à la peroxydase, fut employé pour la détection des chaînes légères et lourdes. Les protéines extraites des feuilles transfectées par les constructions p35TuNos, p35TuNos-GFP- γ , p35TuNos- κ -GUS et p35TuNos- κ - γ furent d'abord analysées en conditions réductrices (Figure 28A). Dans ces conditions, la présence d'agent réducteur (tel que le β -mercaptoéthanol) brise les ponts disulfures internes des protéines que la chaleur a dénaturées. En guise de témoin positif, un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine VPg du virus de la mosaïque de la laitue (LMV) fut utilisé. Ainsi, les chaînes légères et lourdes de ce dernier furent très distinctement visibles (Figure 28A). D'un autre côté, aucun signal ne fut décelé à partir des plantes infectés par le virus sauvage (TuMV), témoin négatif de la présence de chaînes légères et lourdes.

Les essais réalisés avec les protéines extraites du matériel infecté par le TuMV- κ - γ révélèrent la présence de signaux aux environs de 60 kDa et 32 kDa (Figure 28A). Il est possible que ces protéines soient des monomères de chaînes lourdes et légères, bien que leur poids respectif soit légèrement supérieur à celui de chacune des chaînes de l'anticorps témoin. Parallèlement, parmi les protéines issues de feuilles infectées par le TuMV-GFP- γ , deux furent détectées aux mêmes poids moléculaires que les monomères présumés de chaînes lourdes et légères du C5.1 (Figure 28A). Étant donné l'absence du gène *kappa* dans la construction p35TuNos-GFP- γ , la protéine d'environ 32 kDa ne peut être qu'une chaîne lourde tronquée ou dégradée. La chaîne lourde native composerait alors la bande ayant migré au poids le plus élevé. Par ailleurs, dans le cas des extractions protéiques provenant de plantes infectées par le TuMV- κ -GUS, seule une très faible bande d'environ 32 kDa fut visible (Figure 28A). Le poids moléculaire de cette dernière incite à penser qu'il s'agit de chaînes légères.

Les résultats obtenus en conditions réductrices démontrent la bonne maturation de la polyprotéine. En effet, considérant la plus petite protéine virale pouvant être fusionnée à une chaîne du C5.1, soit P1 (40 kDa) dans le cas de la chaîne légère et CP (33 kDa) dans le cas de la chaîne lourde, les protéines détectées auraient eu un poids moléculaire de beaucoup supérieur à celui observé.

Les protéines extraites des feuilles transfectées par les constructions p35TuNos, p35TuNos-GFP- γ , p35TuNos- κ -GUS et p35TuNos- κ - γ furent ensuite analysées en conditions non réductrices (Figure 28B). Dans ces conditions, l'absence d'agent réducteur permet l'observation des complexes protéiques. Ainsi, l'anticorps monoclonal témoin utilisé (anti-LMV) fut nettement visible dans sa forme assemblée (H2L2) (Figure 28B). Dans le cas des échantillons issus de plantes infectées par le virus sauvage, aucun signal ne fut enregistré.

À partir des extractions protéiques provenant de plantes infectées par le virus TuMV- κ - γ , une bande de haut poids moléculaire co-migra avec celle représentant l'anticorps témoin assemblé (~150 kDa). Compte tenu de la faible résolution du gel à cette hauteur, il est probable que cette bande soit constituée d'un assemblage de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères (H2L2) (~150 kDa) ou encore, de deux chaînes lourdes et d'une chaîne légère (H2L) (~130 kDa). De plus, une bande d'environ 100 kDa, correspondant au poids moléculaire d'un dimère de chaînes lourdes (H2), fut également détectée. Finalement, ces mêmes échantillons révélèrent la présence de quatre autres bandes de poids inférieurs d'environ ~52 kDa, ~45 kDa, ~40 kDa et ~30 kDa. Alors que la première de ces bandes (~52 kDa) pourrait être composée de monomères de chaînes lourdes (H) et la dernière (~30 kDa) de monomères de chaînes légères (L), il se peut que les protéines d'environ 45 et 40 kDa détectées soient en fait des produits de dégradation.

Plusieurs protéines furent également détectées à partir des échantillons provenant de plantes infectées par le virus TuMV-GFP- γ . Une très grande

quantité de ces protéines étaient de haut poids moléculaire. La résolution du gel combinée à l'ampleur du signal ne permettent pas d'établir avec précision la mobilité relative de ces protéines. Néanmoins, il est fort probable qu'il s'agissent de dimères de chaînes lourdes (~100 kDa) (H2). De plus, des monomères de chaînes lourdes semblent être présents (52 kDa) (H). Par ailleurs, il est possible que les protéines d'environ 75 kDa, 60 kDa et 40 kDa détectées soient en fait différents stades de dégradation de monomères ou dimères de chaînes lourdes.

En ce qui concerne l'analyse de l'expression du gène *kappa* compris dans la séquence du TuMV- κ -GUS, rien ne put être détecté en conditions non réductrices à partir du matériel prélevé 30 jours suivant la transfection des plantes.

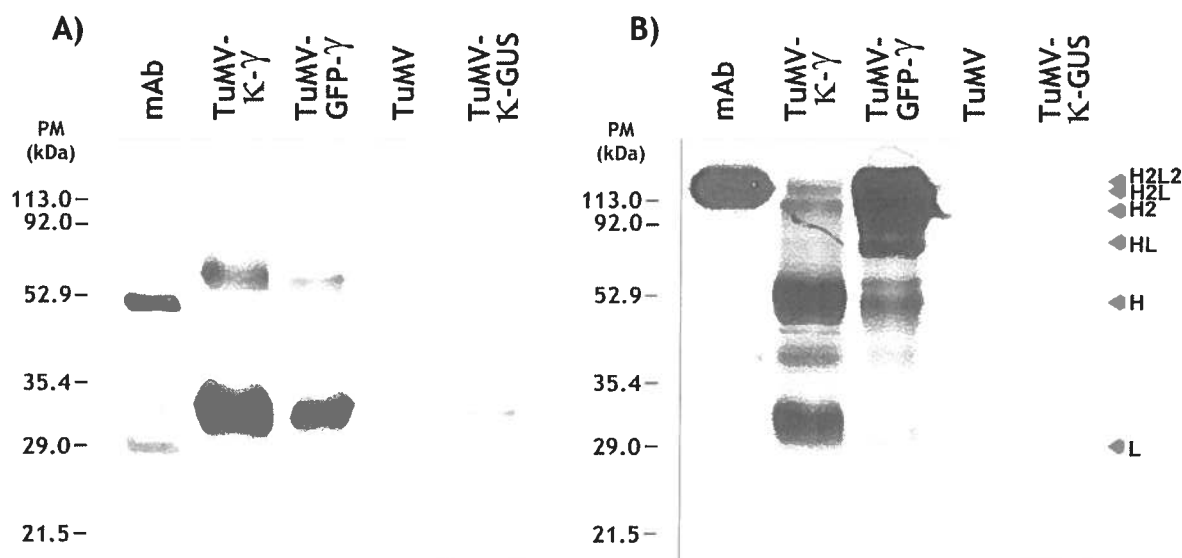


Figure 28 : Immunobuvardage de type western sur des feuilles de *B. perviridis* non-infectées ou transfectées avec les constructions p35TuNos- κ - γ , p35TuNos-GFP- γ , p35TuNos et p35TuNos- κ -GUS.

Les feuilles furent récoltées 30 jours post-transfection (jpt). Un anticorps de chèvre couplé à la peroxydase et dirigé contre les IgG de souris (chaînes légères et lourdes) fut utilisé. Les extractions de protéines totales furent analysées en conditions (A) réductrices (avec β -mercaptoéthanol et acide ascorbique) et (B) non réductrices (sans β -mercaptoéthanol). Un anticorps monoclonal (mAb), dirigé contre la protéine VPg du LMV, fut utilisé en guise de témoin de la présence de chaînes lourdes et légères.

2.2.4 Stabilité des insertions

La stabilité des gènes *kappa* et *gamma* insérés dans la séquence ADN du TuMV fut étudiée par la technique du RT-PCR. Trente jours suivant la transfection de plantes de *B.perviridis* avec chacune des constructions contenant une ou les deux chaînes de l'anticorps C5.1, des morceaux furent prélevés sur les plus jeunes feuilles présentant des symptômes d'infection. La synthèse d'ADN complémentaire fut réalisée avec la même procédure que celle employée lors de l'analyse de la stabilité des gènes rapporteurs.

L'amplification de la région 5' des ADNc aux virus TuMV, TuMV- κ -GUS, TuMV-GFP- γ et TuMV- κ - γ fut réalisée à l'aide d'amorces s'appariant aux gènes codant pour les protéines P1 et HC-Pro (Tableau IX; Figure 29A). Conformément à la taille attendue des amplicons issus de virus sans insert (Tableau XII), un fragment d'ADN d'environ 800 pb fut obtenu dans le cas du TuMV. La présence du gène *kappa* dans les virus recombinants TuMV- κ -GUS et TuMV- κ - γ et du gène *gfp* dans le virus TuMV-GFP- γ fut démontrée par la production de bandes d'environ 1 500 pb. Le fait que ces bandes aient co-migrées avec les amplicons issus de PCR laisse présumer de la stabilité des gènes *gfp* et *kappa*. Ces PCR furent réalisés à partir de l'ADN ayant servi à la transfection des plantes hôtes. Ils comportent donc une séquence n'ayant subi aucune délétion.

L'amplification de la région 3' des ADNc aux mêmes virus fut effectuée avec une paire d'amorces s'appariant aux cistrons *Pol* et *CP*. La bande d'environ 600 pb obtenue dans le cas du TuMV s'accorde avec ce qui fut prévu dans le tableau XII et atteste l'absence de gène étranger. L'insertion du gène *uidA* dans la séquence codant pour le virus TuMV- κ -GUS fut quant à elle marquée par la production d'un fragment d'ADN d'environ 2 500 pb, taille correspondant à celle attendue en présence d'un gène complet (Tableau XII). Ce fragment fut par contre accompagné de bandes plus petites indiquant la perte de séquences de différentes longueurs. Cette instabilité génétique fut également observée dans

le cas des virus TuMV-GFP- γ et TuMV- κ - γ . En effet, en plus du fragment attendu de 2 100 pb attribuable à la présence d'un gène *gamma* entier, l'amplification de la région 3' de l'ADNc au virus TuMV-GFP- γ révéla une bande de taille inférieure comparable à celle obtenue avec le virus sauvage. Dans le cas du TuMV- κ - γ , la réaction de RT-PCR mena à plusieurs produits de tailles intermédiaires entre la forme complète du gène *gamma* et une forme raccourcie d'environ 30 %. Ces résultats amènent à supposer que le gène *gamma* soit instable lorsqu'il est inséré entre les gènes Pol et CP du TuMV.

Tableau XIII : Tailles attendues des amplicons issus de RT-PCRs réalisés sur des extractions d'ARN de feuilles infectées par le virus TuMV, TuMV- κ -GUS, TuMV-GFP- γ ou TuMV- κ - γ

Insert	Sites d'insertion	
	Entre P1 et HC-Pro	Entre Pol et CP
Aucun	783 pb	656 pb
<i>kappa</i>	1 515 pb	s/o
<i>gfp</i>	1 527 pb	s/o
<i>gamma</i>	s/o	2 057 pb
<i>uidA</i>	s/o	2 486 pb

* s/o : sans objet

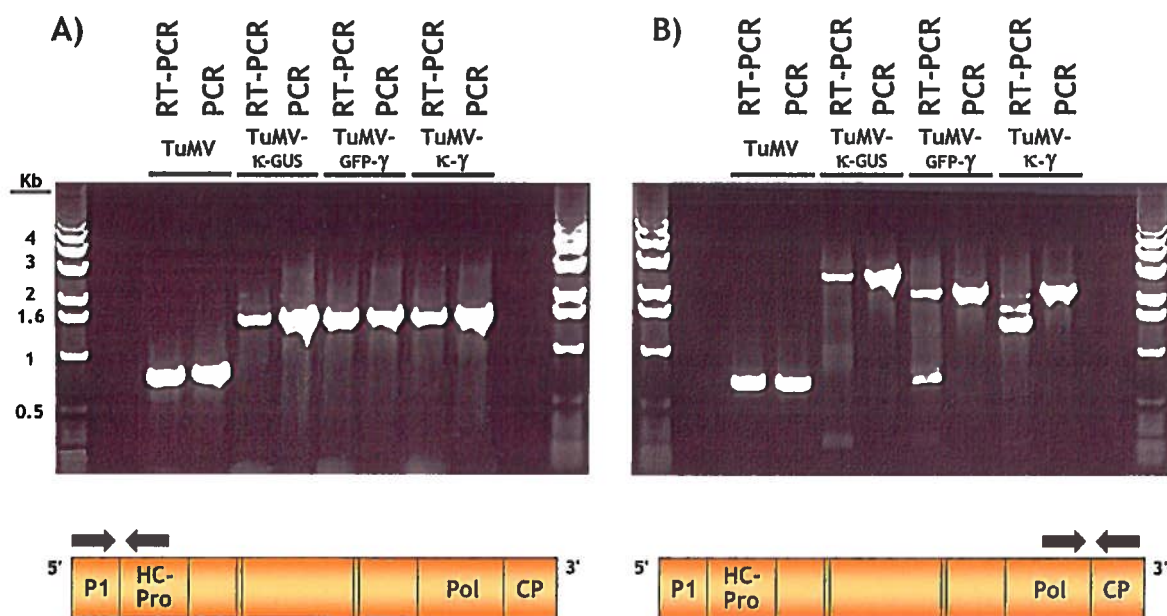


Figure 29 : Stabilité des gènes *kappa* et *gamma* dans la séquence du TuMV.

RT-PCRs sur des extractions d'ARNs totaux de feuilles infectées par le virus TuMV, TuMV-κ-GUS, TuMV-GFP-γ ou TuMV-κ-γ. Les feuilles furent prélevées 30 jours post-transfection. Les flèches situées au-dessus des molécules d'ADN complémentaire illustrent l'emplacement des amorces utilisées pour l'amplification de la région en 5' (A) ou en 3' (B). Pour chaque virus recombinant, le gel d'agarose fut chargé de manière à visualiser les résultats du RT-PCR aux côtés de ceux d'un PCR réalisé sur l'ADN qui sert à la transfection de chacune de leur plante hôte.

3 Élaboration d'une nouvelle stratégie d'insertion

L'élimination de la séquence codant pour la capsid virale permettrait de créer un nouveau site d'insertion dont la particularité serait d'être limité par un codon d'arrêt. Cette caractéristique apporterait l'avantage de générer des protéines étrangères dont l'extrémité carboxy-terminale serait identique à celle de la protéine native. Il est possible toutefois que des séquences agissant en *cis* au niveau de la réplication du virus soient présentes à l'intérieur du cistron *CP*. La délétion de la capsid fut donc divisée en plusieurs étapes afin de rechercher les séquences qui seraient indispensables à la réplication virale.

3.1 Constructions des plasmides

Une série de sept mutants porteurs de délétion au niveau de la capsid fut générée par mutagenèse dirigée à partir de la construction p35TuNos-CGUS. Le choix des sites de mutation fut établi en fonction des travaux effectués avec le TEV par Mahajan et ses collègues (Mahajan et al. 1996). Pour fins de comparaison, les séquences codant pour la capsid de quatre potyvirus, dont le TuMV et le TEV, furent alignées (Figure 30). La séquence codant pour la capsid du TuMV est composée de 288 codons. La séquence contenue entre le 3^e codon et les codons 125, 176, 215, 230, 263 et 272 fut éliminée par la technique d'extension des chevauchements. La septième délétion s'étendit jusqu'au codon d'arrêt. Une représentation schématique des délétions introduites dans la séquence codant pour la capsid virale du TuMV est présentée dans la figure 31.

TuMV-CP	1	AGETLDGLTDEOK-----QAEEKKREKAEEKERQKQLALK-----KGKD	43
TEV-CP	1	-----SGTVDAG-----ADAGKK-----KDCR-----DKKV	21
PPV-CP	1	ADEREDEEEVDAGKEIVVTAPAATSPILCPPEPVICPAERTTAPMLNPFTPATTPATKP	60
LMV-CP	1	-----VDTKIDAG-----QGSKNLIR-QKSSADSRDNVITE-----KSGS	34
ZYMV-CP	1	----SDTQTPRAG-----AGASKKIR-D-EIKDMKKDVASSSA-----SEKA	36
TuMV-CP	44	VACEEG-----KRDKEVNAGTSGTFSVPRKNSITSKMPMP	78
TEV-CP	22	AECAS-----KDRDVNAGTSGTFSVPRINAMATELOYP	54
PPV-CP	61	VSCVPGPQLQTFGTGYGNEDASPSNSNALVNTNRDRDVGAGSISGTFTVPRILKAMTSKISLP	120
LMV-CP	35	SGCVR-----KDIIDINAGLHGKHTIPRTHAITCKMILP	67
ZYMV-CP	37	VATAT-----KDRDVNAGSHGKI-VPRISPIITFMISLP	68
TuMV-CP	79	RYEKPVAIINLCHLILYIPECTDLSNTRSTFRQFTWEEGVMADEYETETNCHLILNGLMV	138
TEV-CP	55	RMRGEVVVNLNHLISYFPCCIDLSNAPATHEQFAAMHOAVMTAYEVALSCMHILNGLFMV	114
PPV-CP	121	KVRGKAIMNLNHLIAHYSAPCVOLSNTRAPQSCFCTWYEGVKFQYDVIDTEMSTIILNSLMV	180
LMV-CP	68	MIRGKVAIINLCHLIEYEPNCPDLSNTRADYRCHESWYDGVKNDYDVLONGMCHLILNGLMV	127
ZYMV-CP	69	RVRGSSVILDDIHLIEYFPDCIELNTPASHCOQFASWENQVKAEXDINEICNSVVMNGFMV	128
TuMV-CP	139	WCIENGTEPNINGWVMMDGDDQVEYEPKPLIDHAKTFRQIMAHFSDVAEAYIEFRNCD	198
TEV-CP	115	WCIENGTSPTNGWVMMDGEDQVEYEPKEMVENACPTLRQIMAHFSDLAEAYIEFRNPE	174
PPV-CP	181	WCIENGTSPTNINGWVMMDGEEQVEYEPKPLIDHAKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEFRNTE	240
LMV-CP	128	WCIENGTSPTNINGWVMMDSEEQVEYEPKPLIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEFRNKK	187
ZYMV-CP	129	WCIENGTSPTINGWVMMDGNEQVEYEPKPLIVENAKPTLRQIMAHFSDAAEAYIEFRNAB	188
TuMV-CP	199	RPYMPRYGLRNILTIYSLAYAFDFYETSTPTFVRAREAHQMKAAALRGANNLFLGLDG	258
TEV-CP	175	RPYMPRYGLRNITIDYSLERYAFDFYETSTPTFVRAREAHQMKAAALVRNSGTRFLFLGLDG	234
PPV-CP	241	RPYMPRYGLRNILTIYSLARYAFDFYETSTPTFVRAREAHQMKAAALRNVCNRLFLGLDG	300
LMV-CP	188	RPYMPRYGRIRSLNDMGLARYAFDFYETSTPTFVRAREAHQMKAAALVGTCNRLFLGLDG	247
ZYMV-CP	189	RPYMPRYGLRNILFDPSLARYAFDFYEVNSTPTFVRAREAVQMKAAALSNVSSRLFLGLDG	248
TuMV-CP	259	NVSTQEDTERHTADVNRMHALLGVRSIL	288 STOP
TEV-CP	235	NVSTQEDTERHTADVNRMHALLGVRSIL	263
PPV-CP	301	NVSTQEDTERHTADVNRMHALLGVRSIL	330
LMV-CP	248	GGSTQEDTERHTADVNRMHALLGVRSILH	278
ZYMV-CP	249	NVATTSQEDTERHTADVNRMHALLGVNTM	279

Figure 30 : Alignement des séquences codant pour la capsid virale des potyvirus TuMV, TEV, PPV et ZYMV

Les acides aminés AGE (soulignés en rouge) furent conservés chez tous les mutants délétés. La séquence comprise entre ces derniers et chacun de ceux encadrés en rouge fut éliminée progressivement pour générer autant de mutants. Une délétion complète (AGE-TAG) fut également réalisée. Les sites de mutations furent choisis en fonction des points de délétions réalisés dans la séquence du TEV au cours des travaux de Mahajan et ses collègues (Mahajan et al. 1996) (soulignés en jaune). Ils furent également sélectionnés de manière à créer une suite d'acides aminés de nature comparable à celle des acides aminés en position 4-5 et 6 (encadrés).

Les produits PCR porteurs des délétions $\Delta 125$, $\Delta 176$, $\Delta 215$, $\Delta 230$ et $\Delta 263$ furent clonés dans le vecteur intermédiaire pCR[®]4Blunt TOPO[®] pour donner les plasmides TOPO- $\Delta 125$, - $\Delta 176$, - $\Delta 215$, - $\Delta 230$ et - $\Delta 263$. Ces derniers furent ensuite digérés par les enzymes de restriction *MscI* et *Apal* afin de transférer le fragment contenant la délétion dans la construction p35TuNos-CGUS. On obtint alors les constructions p35TuNos-CGUS- Δ CP125, - Δ CP176, - Δ CP215, - Δ CP230 et - Δ CP263. Des problèmes d'approvisionnement en vecteurs pCR[®]4Blunt TOPO[®] ont exigé que les autres produits PCR ($\Delta 272$ et Δ CP) soient directement clonés dans la construction p35TuNos-CGUS. Ces produits furent purifiés à partir d'un gel d'agarose et l'échange des fragments *MscI*/*Apal* permit que les constructions p35TuNos-CGUS- Δ CP272 et - Δ CP soient générées.

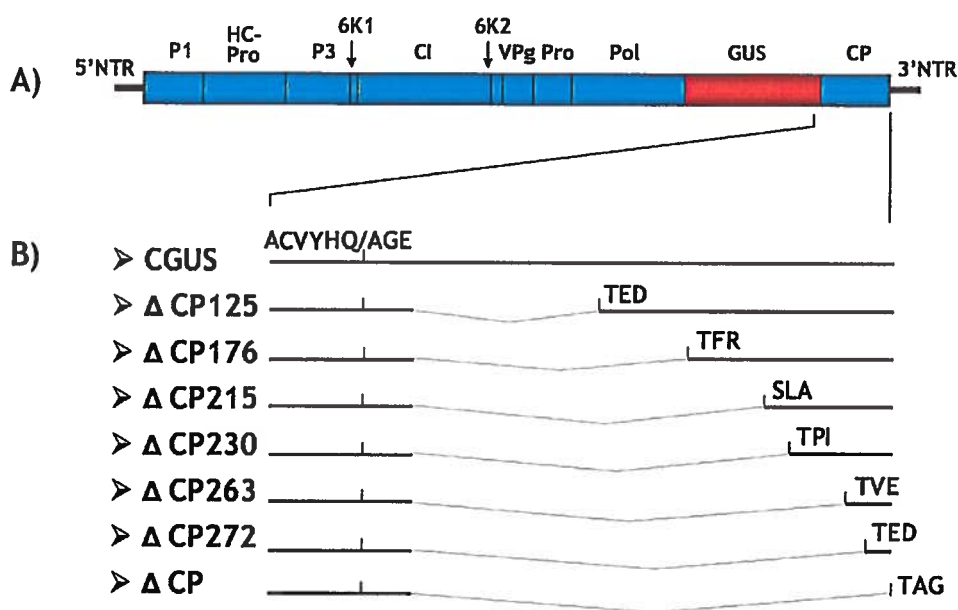


Figure 31 : Représentation schématique des délétions introduites dans la séquence codant pour la capsid virale du TuMV

A) Représentation du génome du TuMV-CGUS. B) Illustration détaillée de région correspondant à la séquence codant pour la capsid et le site de clivage reconnu par la VPg-Pro (ACVYHQ/A). Le dernier acide aminé de la protéine GUS est donc une glutamine (Q) et le premier acide aminé de chacune des capsides tronquées est une alanine (A). Les barres horizontales incurvées représentent la séquence supprimée. Les délétions furent nommées en fonction de la position de l'acide aminé qui suit immédiatement le dernier à avoir été éliminé.

En guise de témoin négatif d'amplification génomique, un mutant défectif pour la réplication fut créé (TuMV-CGUS/VNN). Ce mutant contient des substitutions dans la séquence codant pour la polymérase (Pol), changeant le motif conservé GDD pour VNN. Le plasmide p35TuNos-CGUS/VNN fut assemblé par le transfert du fragment *Clal/Clal* du plasmide pSK-*Clal*/VNN vers la construction p35TuNos-CGUS (Figure 32).

Afin de permettre que la série de TuMV mutants soit testée en agroinfiltration, la séquence ADN de chaque virus recombinant pour la capside, le motif VNN ou le gène *uidA* uniquement, fut transférée par une digestion *SmaI/ApaI* dans le vecteur pGreenII0000. Ainsi, on obtint les constructions pGreen-CGUS- Δ CP125, - Δ CP176, - Δ CP215, - Δ CP230, - Δ CP263, - Δ CP272, - Δ CP, pGreen-CGUS/VNN, pGreen-CGUS.

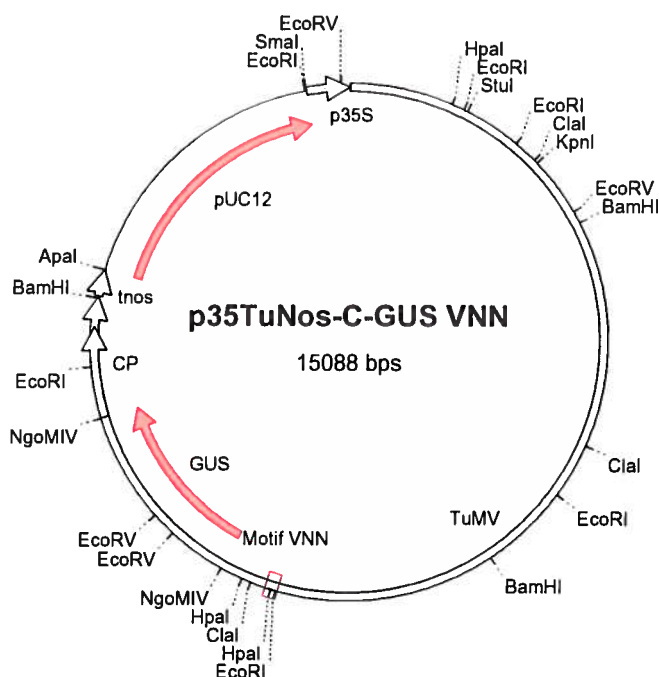


Figure 32 : Carte de restriction de p35TuNos-CGUS/VNN

Il importe de noter que le premier site *Clal* du plasmide p35TuNos (en position 1895) est méthylé dans *E.coli* et par conséquent, n'est pas clivé.

3.2 Expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana*

3.2.1 Transfection chimique de protoplastes

Au cours des essais préliminaires, une quantité égale (20µg) de chacun des plasmides p35TuNos-CGUS-ΔCP125, -ΔCP176, -ΔCP215, -ΔCP230 et -ΔCP263 fut utilisée pour transfecter des protoplastes dérivés de *Nicotiana benthamiana*. La même charge du plasmide parental p35TuNos-CGUS fut inoculée en parallèle afin de remplir le rôle de témoin positif de la réplication virale. Dans le but d'obtenir un témoin négatif en spectrofluorométrie, des protoplastes furent transfectés avec de l'eau uniquement. Chaque transfection fut réalisée en duplicata. Le pouvoir réplcatif des ces cinq mutants fut vérifié indirectement par le dosage enzymatique de l'activité GUS. Les analyses en spectrofluorométrie révélèrent la présence d'une activité variant de 35% à 96% de celle enregistrée avec le TuMV-CGUS (Figure 33). Malgré que le mutant TuMC-CGUS-ΔCP263 ait subi la plus grande délétion de séquence, il présenta une activité GUS de 10.05 pmol/min/mg de protéines, niveau comparable à celui du vecteur TuMV parental (10.44 pmol/min/mg de protéines). Les mutants TuMV-CGUS-ΔCP125 et -ΔCP230 affichèrent quant à eux les plus bas niveaux d'activité, soit 3.84 pmol/min/mg de protéines et 3.72 pmol/min/mg de protéines. Finalement, les mutants TuMV-CGUS-ΔCP176 et -ΔCP215 affichèrent une activité GUS environ 50% moins forte que dans le cas du TuMV-CGUS. Il semble donc que la capacité de réplication ait été maintenue chez tous les mutants testés.

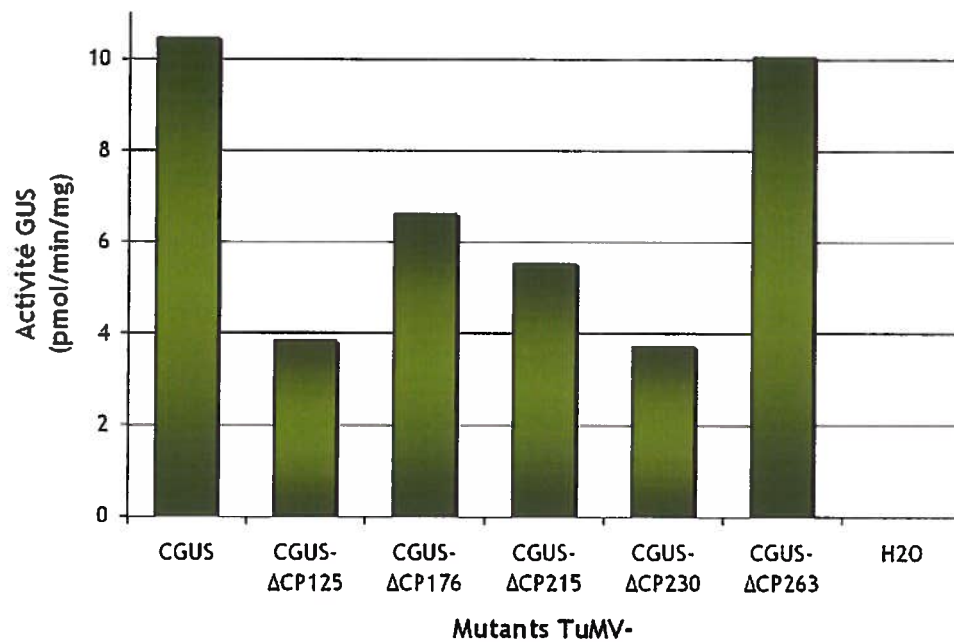


Figure 33 : Pourcentage de répllication génomique de différents TuMV mutants pour la capsid.

La répllication fut évaluée par le dosage enzymatique de l'activité GUS en utilisant un substrat fluorogénique (4-Methylumbelliferyl β -D-glucuronide). Les valeurs moyennes de 4-MU libéré en fonction du temps et de la quantité de protéines totales extraites furent comparées entre les différents mutants testés et le TuMV-CGUS. On peut voir que la capacité de répllication semble avoir été maintenue chez tous les mutants ayant subi la perte de séquence.

Afin de distinguer l'activité issue de la simple transcription et traduction de l'ADN transfecté de celle issue de la réplication virale, d'autres essais incluant le mutant défectif pour la réplication (TuMV-CGUS/VNN) furent effectués. Les plasmides p35TuNos-CGUS- Δ CP272, - Δ CP furent également inclus dans ces essais. De plus, chaque transfection fut exécutée en quadruplicata.

Les résultats obtenus à chacune des trois inoculations indépendantes furent toutefois incohérents. Alors que pour le témoin positif (TuMV-CGUS) des valeurs semblables étaient enregistrées, les données recueillies avec les TuMV mutants pour la capsid variaient énormément d'un réplikat à l'autre. Seule une très petite quantité de fluorescence aurait dû être observée avec le témoin négatif (TuMV-CGUS/VNN). Cependant, comme dans le cas des autres mutants, des valeurs aberrantes furent notées, allant de l'absence quasi totale de fluorescence à une quantité de beaucoup supérieure à celle rencontrée dans le cas du TuMV-CGUS.

Devant l'impossibilité d'obtenir de résultats qui soient reproductibles avec la technique des protoplastes, des essais en expression transitoire furent donc entamés avec la technique d'agroinfiltration.

3.2.2 Agroinfiltration de feuilles de *Nicotiana benthamiana*

Tous les mutants TuMV pour la capside, le motif VNN ou le gène *uidA* uniquement, clonés dans le vecteur binaire pGreenII0000, furent transformés dans *Agrobacterium tumefaciens*. Un essai en expression transitoire fut réalisé au cours duquel les quatre feuilles de deux jeunes plants (3 semaines) de *Nicotiana benthamiana* furent agroinfiltrées par une des suspensions bactériennes porteuses d'une construction à tester.

La réplication virale fut analysée par le biais de l'expression de l'enzyme GUS. Pour visualiser son activité, les feuilles infectées furent placées en présence d'un substrat chromogénique (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique). Différentes quantités de précipités bleus, témoins de l'activité de l'enzyme GUS, furent observées sur toutes les feuilles agroinfiltrées. Une feuille représentative de chaque agroinfiltration est présentée dans la figure 34.

Les résultats observés à partir des feuilles agroinfiltrées avec la construction p35TuNos-CGUS/VNN révélèrent de l'activité GUS. Ceci indique donc qu'une partie de l'activité GUS détectée sur toute feuille agroinfiltrée avec une construction ADN contenant le gène *uidA* doit être attribuée à la simple transcription et traduction de cet ADN. Les mutants TuMV-CGUS- Δ CP125, - Δ CP176, - Δ CP230, - Δ CP272 et - Δ CP semblent toujours capable de se répliquer malgré la séquence délétée.

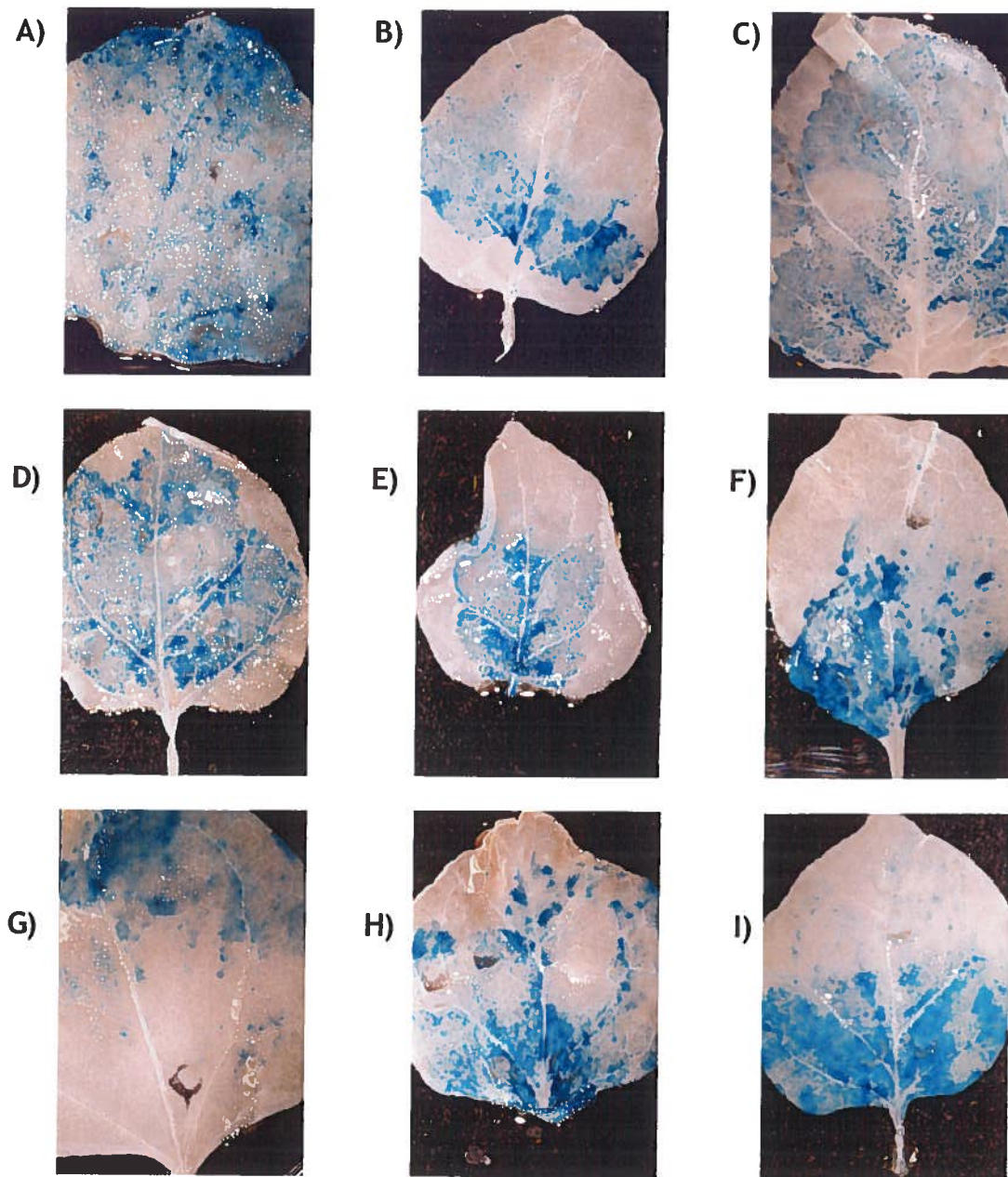


Figure 34 : Activité de la β -glucuronidase dans des feuilles agroinfiltrées par les TuMV mutants pour la capside, le motif VNN et le gène *uidA* uniquement.

Feuilles de *Nicotiana benthamiana* prélevées 48 hres suivant l'agroinfiltration et incubées 16 hres dans le substrat X-Glc. Elles furent décolorées à l'éthanol 70%. A) Témoin positif; TuMV-CGUS, B) Témoin négatif; TuMV-CGUS/VNN, C) TuMV-CGUS- Δ CP125, D) TuMV-CGUS- Δ CP176, E) TuMV-CGUS- Δ CP215, F) TuMV-CGUS- Δ CP230, G) TuMV-CGUS- Δ CP263, H) TuMV-CGUS- Δ CP272, I) TuMV-CGUS- Δ CP288.

Chapitre 4

Discussion

Plusieurs études ont démontré la possibilité d'introduire un gène étranger dans le génome d'un potyvirus. Le vecteur résultant, lorsque inoculé sur une plante susceptible, permettait une expression simultanée de la protéine étrangère et des protéines virales (Dolja et al. 1992; Guo et al. 1998; Fernandez-Fernandez et al. 1998; Choi et al. 2000; Masuta et al. 2000; German-Retana et al. 2000; Arazi et al. 2001b). L'amplification par le virus engendrait néanmoins la perte graduelle du gène d'intérêt (Dolja et al. 1992; Guo et al. 1998; Choi et al. 2000; German-Retana et al. 2000; Arazi et al. 2001b).

La réduction du nombre de cycles de réplication virale permettrait de minimiser ce problème d'instabilité génétique. Dans le but de conserver l'insert entier dans un maximum de copies virales, nous visons à intégrer l'ADNc du virus recombinant dans le génome de la plante. Chaque cellule agira en tant que source stable de transcrits complets et la durée de l'infection pourra être réduite au minimum. Par ailleurs, les séquences non essentielles à la survie du virus pourront être éliminées du réplicon pour ainsi faciliter son intégration dans le chromosome de l'hôte. La régénération des cellules transformées en plantules sera finalement rendue possible grâce à la présence d'un promoteur inductible qui contrôlera la transcription du réplicon.

1 Insertion de gènes rapporteurs

En utilisant une copie ADN du génome du virus de la mosaïque du navet (TuMV), notre équipe a d'abord réalisé deux premières constructions contenant le gène rapporteur *gfp* ou *uidA* inséré entre les cistrons *P1* et *HC-Pro*. Ce site s'était déjà avéré approprié pour l'expression d'un gène étranger chez les potyvirus TEV (Dolja et al. 1992), PPV (Guo et al. 1998), LMV (German-Retana et al. 2000) et CIYVV (Masuta et al. 2000). Les résultats préliminaires avec le TuMV ont révélé la bonne expression de GFP et de GUS (Beauchemin 2003). Un site d'insertion dans la région 3' de la séquence virale fut également reconnu adéquat pour l'expression d'un gène étranger chez d'autres potyvirus tel que le PPV (Fernandez-Fernandez et al. 1998) et le ZYMV (Arazi et al. 2001b) de même que chez un virus apparenté, le WSMV (Choi et al. 2000). Dans le but de déterminer la possibilité d'exploiter ce second site d'insertion chez le TuMV, les gènes rapporteurs *gfp* et *uidA* furent indépendamment clonés entre les gènes codant pour les protéines Pol et CP.

Le clonage fut réalisé sans entraîner de changement dans la séquence des protéines du virus afin de réduire les risques d'interférence avec les fonctions virales. La région Pol-CP de la polyprotéine encodée par p35TuNos-NgoMIV consiste en une protéine Pol intacte, mais dont le dernier acide aminé (alanine) (faisant partie du site de clivage naturel Pol-CP) est encodé par une séquence nucléotidique modifiée pour créer le site de restriction NgoMIV. Par ailleurs, le site de reconnaissance de la protéinase VPg-Pro qui fut ajouté à l'extrémité carboxy-terminale de chacun des gènes rapporteurs possède la même séquence en acides aminés que le site Pol-CP original, mais est encodé par une séquence dans laquelle le troisième nucléotide de chaque codon fut changé. Cette précaution fut prise dans le but d'éviter la duplication de séquences virales et ainsi, réduire les risques d'événements de recombinaison.

Les protéines étrangères furent donc bordées par les sites de clivage P1 et VPg-Pro lorsque présentes à l'extrémité amino-terminale de la polyprotéine

(Beauchemin 2003) et par deux sites de clivage VPg-Pro lorsque partie intégrante de l'extrémité carboxy-terminale de la polyprotéine.

Le potentiel infectieux de ces deux nouvelles constructions (p35TuNos-CGFP et -CGUS) fut ensuite vérifié en expression transitoire par bombardement particulaire. Mosaïque, déformation foliaire et retard de croissance furent autant de symptômes observés sur la majorité des plantes ayant été transfectées. L'insertion de séquences étrangères dans la région 3' n'a donc pas aboli la capacité du virus d'engendrer une infection systémique. L'intensité du pouvoir pathogène des TuMV recombinants fut toutefois altérée par les modifications apportées à la séquence du virus sauvage. En effet, certaines plantes bombardées ne développèrent aucun symptôme et ne révélèrent aucun signal lors de la recherche de capsid virale. La proportion des plantes n'ayant subi aucun préjudice suite à la transfection fut plus grande dans le cas du TuMV-CGUS que dans celui du TuMV-CGFP. Le gène *uidA* semble donc diminuer la virulence du vecteur viral de façon plus importante que ne le fait le gène *gfp*. Cette diminution de la virulence s'est également traduite chez les plantes infectées par un délai avant l'apparition des signes d'infection. Par ailleurs, plus le nombre de jours précédant la venue des premiers symptômes était grand, moins ces symptômes étaient prononcés.

Malgré la réduction de leur pouvoir pathogène, chacun des vecteurs TuMV permit l'expression d'une grande quantité de protéines fonctionnelles. Ainsi, il fut possible d'observer une fluorescence caractéristique de l'expression de la GFP à partir de feuilles infectées avec le TuMV-CGFP. Dans le même ordre d'idées, la protéine GUS exprimée via le vecteur TuMV-CGUS fut apte à hydrolyser le substrat chromogénique dans lequel les feuilles prélevées furent incubées.

C'est donc à partir de ces TuMV recombinants que l'expression simultanée de deux gènes étrangers fut tentée. Deux constructions additionnelles furent réalisées portant à chacun des sites d'insertion créés, un ou l'autre des gènes

rapporteurs. L'intérêt de produire simultanément deux protéines est la production éventuelle d'hétérodimères. La production via un vecteur TuMV faciliterait la formation de tels complexes puisque, étant membre de la polyprotéine virale, les deux peptides se retrouveraient en quantités équimolaires.

Tout comme dans le cas des constructions comportant un seul gène étranger, le pouvoir infectieux des constructions p35TuNos-GFP-GUS et -GUS-GFP fut testé en expression transitoire avec la technique de bombardement de microprojectiles. Des symptômes comparables à ceux déjà observés furent détectés sur les plantes transfectées, permettant d'affirmer que la présence des deux gènes rapporteurs n'invalide pas complètement le virus. Elle semble par contre accentuer la réduction de la virulence du TuMV. Alors qu'on obtint la même proportion de plantes infectées par le TuMV-GFP-GUS que par le virus n'exprimant que le gène *uidA*, ce pourcentage chuta dans le cas de du TuMV-GUS-GFP. L'ampleur des symptômes fut également diminuée par rapport à ceux rencontrés en présence d'un virus sauvage et plus de temps fut requis avant de pouvoir les observer. Néanmoins, chacun des deux nouveaux vecteurs TuMV parvinrent à produire des protéines GFP et GUS fonctionnelles.

La présence de virus fut confirmée par la détection en immunobuvardage de la capside virale, une protéine stable qui s'accumule en grande quantité. Cette dernière fut détectée après 8 jours d'infection dans le cas du virus sauvage alors qu'il fallut en attendre 15 avec les virus recombinants TuMV-CGFP, TuMV-CGUS et TuMV-GFP-GUS. La double insertion de gènes n'apparaît donc pas nuire outre mesure à la réplication virale. Tout au plus, dans le cas du TuMV-GUS-GFP, elle accentua les retards déjà rencontrés puisque 30 jours furent nécessaires avant de pouvoir détecter la protéine de la capside. Ainsi, tel que les délais précédant l'apparition des symptômes le laissaient supposer, l'insertion de *gfp* ou de *uidA* eut l'effet de retarder la réplication du TuMV.

Il est fort probable que la taille du gène inséré influence la capacité répliquative du virus. En effet, le gène *uidA* (~1 800 pb) semblait nuire de manière plus forte à la virulence du TuMV que le gène *gfp* (~740 pb). De la même façon, lorsque les deux gènes étaient insérés dans la séquence du virus, la force des symptômes était moindre. Des observations similaires furent enregistrées avec des vecteurs basés sur d'autres potyvirus (Guo et al. 1998; Choi et al. 2000; German-Retana et al. 2000; Fernandez-Fernandez et al. 2001; Arazi et al. 2001b). Néanmoins, le nombre de cas d'infection par le TuMV-CGUS et le TuMV-GFP-GUS fut comparable.

Est-il possible alors qu'en plus de la taille, la position de l'insert influence également le pouvoir répliquatif du vecteur ? Tel qu'il a été supposé par l'équipe de German-Retana (German-Retana et al. 2000), il se peut que les séquences additionnelles perturbent la structure tridimensionnelle de la polyprotéine. Ces changements pourraient ainsi altérer l'efficacité et/ou la vitesse de protéolyse de la polyprotéine et donc influencer la démarche de chacune des étapes du cycle viral. La position de la protéine étrangère dans la polyprotéine aurait alors un impact important. Dans cet ordre d'idées, le site d'insertion en position 3' de la séquence du TuMV supporte peut-être mieux l'ajout d'inserts de grandes tailles ou encore, empêche la formation de structure secondaire de l'ARN. Il a d'ailleurs été rapporté que l'insertion d'un gène étranger entre les cistrons *P1* et *HC-Pro* du ZYMV ne mène à aucune expression *in planta* (Arazi et al. 2001b).

Un troisième facteur pouvant influencer la capacité répliquative du vecteur TuMV est l'efficacité de la maturation de la polyprotéine virale. Les résultats obtenus démontrent que la présence du gène *uidA* affecte négativement la réplication du virus. Or, l'analyse de l'expression de ce gène en immunobuvardage révéla un signal supplémentaire de haut poids moléculaire. Ceci pourrait laisser supposer que le processus de maturation de la polyprotéine s'effectuerait dans ce cas de manière partielle. Les fonctions de la protéine en fusion avec GUS pourraient alors être entravées, ce qui pourrait en partie expliquer les différences observées au niveau de la virulence des vecteurs porteurs du gène *uidA*.

Afin de déterminer avec quelle protéine GUS serait en fusion, d'autres analyses en immunobuvardage devraient être effectuées où les protéines P1, HC-Pro, Pol et CP seraient tour à tour ciblées. Néanmoins, il ne serait pas étonnant de découvrir qu'il s'agisse des protéines virales situées immédiatement en aval de GUS dans la polyprotéine, soit HC-Pro ou CP selon le site d'insertion exploité. En effet, il est possible que le site artificiel de clivage ne soit pas aussi efficacement reconnu par la protéinase VPg-Pro.

D'un autre côté, il fut proposé que la nature des acides aminés situés à proximité d'un site de clivage puissent influencer le taux d'efficacité de la protéolyse (Dougherty & Parks 1989; Carrington et al. 1993; Riechmann et al. 1995; Schaad et al. 1996). Puisque la régulation de l'expression des gènes potyviraux ne semble pas survenir au niveau transcriptionnel, des chercheurs ont pensé déterminer si une telle régulation serait possible via un processus de maturation différentiel (Dougherty & Parks 1989; Merits et al. 2002). La modulation de la vitesse de clivage à la jonction des produits de différents gènes semble en effet être un mécanisme potentiel pour réguler la cinétique de la formation de ces mêmes produits. Aussi, ils démontrèrent que la présence ou l'absence de certains acides aminés à l'intérieur ou près d'un site de clivage affectait la protéolyse. La modification de la séquence en acides aminés du TuMV par l'insertion de la protéine GUS pourrait alors avoir eu un effet analogue.

D'autre part, tel que mentionné précédemment, il se pourrait que la présence de la protéine GUS ait simplement modifié la conformation de la polyprotéine, nuisant alors à la reconnaissance et/ou à la protéolyse des sites de clivage.

Dans un autre ordre d'idées, la stabilité des insertions fut vérifiée par la technique du RT-PCR. Le premier site d'insertion analysé fut celui entre les protéines P1 et HC-Pro. Le gène *gfp* qui y fut inséré parut avoir conservé sa séquence intacte, même après 30 jours d'infection. Lorsque ce fut le gène *uidA* qui y prit place, de l'instabilité fut observée 15 jours post-infection. À 30 jours post-infection, trois populations différentes d'ARN viral semblaient co-exister. La plus importante contenait le gène en entier tandis qu'une autre présentait une délétion atteignant pratiquement la moitié de la taille originale du gène. La dernière population paraissait avoir complètement perdu le gène en question. En effet, on observa une bande de taille inférieure à celle obtenue avec le vecteur vide (TuMV sauvage), suggérant que les variants délétés avaient également perdu une portion de la séquence virale. Des résultats comparables furent obtenus avec les vecteurs d'expression basés sur le TEV (Dolja et al. 1992) et le LMV (German-Retana et al. 2000), où des mutants portaient des délétions dans la séquence codant pour HC-Pro.

Le gène *gfp* inséré dans le second site d'insertion sembla tout aussi stable qu'en position 5' de l'ARN viral. Par ailleurs, tout comme lorsqu'inséré entre les cistrons P1 et HC-Pro, le gène *uidA* fut instable 15 jours post-infection. Encore une fois, plusieurs populations de variants furent observées et moins de 30 jours suffirent pour éliminer la majeure partie de la séquence du gène. Des résultats analogues furent obtenus lorsque ce gène fut cloné entre les gènes codant pour les protéines Pol et CP du ZYMV (Arazi et al. 2001b) ou du WSMV (Choi et al. 2000).

D'autre part, il est intéressant de noter que les travaux effectués avec le LMV (German-Retana et al. 2000) et le ZYMV (Arazi et al. 2001b) ont eux aussi démontré que le gène *gfp* présentait une plus grande stabilité génétique que le gène rapporteur *uidA*. Les deux équipes en sont venues aux mêmes conclusions malgré qu'elles exploitaient chacune un site d'insertion différent dans la polyprotéine potyvirale.

L'instabilité génomique pourrait donc être liée à la taille et à la séquence nucléotidique du gène inséré. Le mécanisme exact par lequel ces réarrangements surviennent demeure encore méconnu. L'ensemble des évidences disponibles supportent le modèle qui soutient qu'au cours de la réplication, l'ARN polymérase ARN dépendante marquerait des pauses et effectuerait quelques fois un changement spontané de matrice. Les analyses de séquences provenant de variants porteurs de délétions n'indiquent aucune similarité significative (Dolja et al. 1993; Guo et al. 1998). L'appariement de bases entre la matrice et l'ARN en synthèse ne semble pas essentiel dans ces événements de recombinaison. La dissociation et la réassociation de la polymérase paraissent donc se faire au hasard (Dolja et al. 1993). Toutefois, il fut suggéré que la présence de régions riches en A dans la séquence de *uidA* pourrait servir de site de pause pour la répliqueuse durant la synthèse du brin positif et ainsi faciliter le changement de matrice (Guo et al. 1998). Ces régions joueraient le rôle proposé pour les séquences riches en AU dans la recombinaison homologue. Selon toutes hypothèses, ces remaniements entraîneraient parfois des pertes de séquences virales. Seuls les variants n'ayant accumulé aucune délétion à l'intérieur de séquences vitales pourraient poursuivre leur cycle viral. Ainsi, puisque non essentiel à la survie du virus, les gènes étrangers seraient progressivement délévés ou modifiés suivant le nombre de répliquions impliquées dans le processus d'infection systémique de l'hôte (Porta & Lomonossoff 2002).

2 Insertions des gènes codants pour C5.1

Les résultats obtenus avec la double expression de gènes étrangers nous ont encouragé à vouloir tester la production d'anticorps par l'intermédiaire de notre vecteur. Les anticorps monoclonaux ont prouvé être d'une valeur inestimable pour le diagnostic, la prévention et le traitement de maladies, ainsi que dans différents usages en laboratoire et en industrie. Parmi ceux-ci, le C5.1 est un anticorps monoclonal spécifique pour les IgG humaines qui permet le dépistage d'anticorps anti-érythrocyte de faible affinité dans le sérum humain (St Laurent et al. 1993). Il fait partie des réactifs anti-globuline humaine (AHG) largement utilisés dans les banques de sang pour le typage des globules rouges et pour établir la compatibilité donneurs-receveurs. Compte tenu de l'importance de cet anticorps en milieu hospitalier, une production à grande échelle et à faible coût serait plus que profitable. L'expression de ce dernier fut déjà tentée avec succès dans des plantes transgéniques (Khouidi et al. 1999). Cette plateforme est maintenant exploitée par la compagnie Médicago et c'est en partenariat avec eux que nous avons entamé nos travaux.

Plusieurs autres équipes ont démontré que des plantes transgéniques pouvaient exprimer et assembler des immunoglobulines fonctionnelles (Hiatt et al. 1989; Zeitlin et al. 1998; Khouidi et al. 1999; Stoger et al. 2000; Valdes et al. 2003), incluant des molécules relativement complexes telles que des IgA sécrétoires composées de 4 chaînes polypeptidiques séparées (Ma et al. 1995). Des vecteurs basés sur le virus X de la patate (PVX) et le virus de la mosaïque du tabac (TMV) ont tous les deux été utilisés pour la production d'anticorps dans le tabac, incluant des fragments scFv (McCormick et al. 1999; Hendy et al. 1999; Roggero et al. 2001) et des immunoglobulines complètes (Verch et al. 1998). Dans le dernier cas, deux vecteurs TMV furent requis, un premier exprimant la chaîne lourde et le second exprimant la chaîne légère. La co-infection des plants de tabac avec chacun de ces virus fut nécessaire à l'assemblage adéquat de l'anticorps fonctionnel (Verch et al. 1998). L'exploitation des deux sites

d'insertion créés dans notre vecteur TuMV apporterait donc l'avantage de pouvoir exprimer les deux chaînes à partir d'une seule molécule d'ARN viral.

Lors de la construction du vecteur, le ciblage sub-cellulaire des chaînes légère et lourde fut considéré. L'environnement du réticulum endoplasmique (RE) favorise le repliement et l'assemblage adéquat des anticorps alors que la glycosylation survient dans le RE et l'appareil de Golgi. Des améliorations significatives dans les rendements d'anticorps recombinants produits dans des plantes transgéniques ont été observées lorsque les chaînes furent ciblées vers la voie de sécrétion au lieu de vers le cytosol (Conrad & Fiedler 1998). Afin de maximiser les rendements en anticorps fonctionnels, nous avons donc choisi de conserver la séquence signal originale à l'extrémité 5' des gènes *kappa* et *gamma*. Il fut démontré que le peptide signal correspondant permet de diriger efficacement vers la voie de sécrétion par une importation co-translationnelle dans le RE (Hiatt et al. 1989; Ma et al. 1994; Bruyns et al. 1996; Conrad & Fiedler 1998; Schillberg et al. 1999; Sharp & Doran 2001a).

C'est en fonction de la taille des gènes *kappa* (κ) et *gamma* (γ) que nous avons déterminé quel site d'insertion ils allaient occuper dans la séquence du TuMV. Puisque le virus recombinant TuMV-GFP-GUS fit preuve d'une virulence plus grande que celle du TuMV-GUS-GFP, le gène κ (~730pb) fut inséré entre les cistrons *P1* et *HC-Pro* et le gène γ (~1400pb), entre ceux de *Pol* et de *CP*. Chacun des gènes étrangers fut bordé par des sites de clivages afin d'assurer leur libération de la polyprotéine. Les constructions intermédiaires contenant soit les gènes *gfp* et γ , soit les gènes κ et *uidA* furent conservées. Le choix d'étudier également ces vecteurs intermédiaires fut fait advenant l'éventualité où aucune expression n'aurait été détectée avec le TuMV- κ - γ . De cette manière, nous aurions pu vérifier quelle insertion (κ ou γ) en aurait été responsable.

Le potentiel infectieux des constructions comportant une ou deux chaînes de l'anticorps fut confirmé en expression transitoire par la technique du bombardement particulaire. Dans tous les cas, la capacité de provoquer une

infection systémique fut conservée. L'intensité des symptômes fut néanmoins de beaucoup inférieure à celle observée en présence du TuMV sauvage. Alors que la virulence du TuMV-GFP- γ fut comparable à celle du TuMV-GFP-GUS, les deux autres vecteurs TuMV (TuMV- κ -GUS et TuMV- κ - γ) ont vu leur pouvoir pathogène grandement réduit. Une très faible proportion de plantes ayant été bombardées avec ces deux virus recombinants a développé une infection. Il est permis de croire que la nature du gène étranger puisse être un facteur supplémentaire influençant la virulence d'un virus chimérique. En effet, nous aurions pu nous attendre à ce que les vecteurs TuMV- κ -GUS et TuMV-GFP-GUS, dont la taille ne diffère que de 9 nucléotides, provoquent des infections comparables. De plus, malgré que le TuMV- κ - γ soit plus petit que ces derniers de ~ 440 nucléotides, il ne paraît pas s'en être trouvé avantage. Il semblerait donc que le gène *kappa* soit en lien avec la diminution du pouvoir pathogène du TuMV.

La production de chacune des chaînes fut alors étudiée par western blot. Il est bien de noter que dans la littérature, l'analyse en immunobuvardage de la production d'anticorps dans les plantes est généralement réalisée à partir de matériel purifié. Afin d'épargner temps et argent, nous avons plutôt choisi d'étudier la production à partir d'extraits bruts. Les protéines furent de plus analysées en absence et en présence de β -mercaptoéthanol. Ceci permit de soit conserver les ponts disulfures intacts et de voir si l'anticorps s'assemblait correctement, soit de briser ces ponts et de visualiser l'expression de chacune des chaînes produites.

En conditions non réductrices (sans β -mercaptoéthanol), les chaînes légères et lourdes produites par le TuMV- κ - γ semblèrent se retrouver majoritairement sous forme monomérique. Quelques chaînes montrèrent tout de même s'être assemblées en anticorps complet (H2L2) et en intermédiaires d'assemblage (H2L et H2). Des patrons d'assemblage comparables furent observés à partir de plants de tabac transgéniques pour les gènes *kappa* et *gamma* de deux IgG1 différentes (De Neve et al. 1993; Ma et al. 1994). Par

ailleurs, l'analyse en immunobuvardage des plantes ayant été co-infectées par l'ensemble de vecteurs TMV exprimant les chaînes d'un anticorps démontra des résultats tout aussi semblables (Verch et al. 1998). La faiblesse de ces ratios hétérodimères/monomères pourrait trouver une explication dans la présence de protéases le long de la voie de sécrétion dont le rôle est de dégrader les protéines étrangères (Sharp & Doran 2001b). Par ailleurs, il est possible que les protéines observées en conditions non réductrices au poids correspondant à chacun des monomères soient en fait des fragments d'anticorps dégradés. En effet, la technique du western blot ne permet pas de les différencier.

Pour sa part, le vecteur TuMV-GFP- γ produisit principalement des chaînes lourdes qui s'assemblèrent dans la forme dimérique (H2). Seule une petite proportion demeura sous forme de monomères. Puisqu'aucune bande ne fut détectée dans les extraits de plantes infectées par le TuMV, les bandes supplémentaires observées avec ces deux vecteurs représentent sans doute des fragments de protéolyse. Cette dégradation, aussi notée par d'autres équipes (Ma et al. 1994; Verch et al. 1998; Sharp & Doran 2001b), pourrait également être attribuable aux protéases présentes dans la plante ou encore, à celles libérées durant la procédure d'extraction.

En conditions réductrices (avec β -mercaptoéthanol), des patrons de migration presque identiques furent observés avec les échantillons issus de plantes infectées par le TuMV- κ - γ et le TuMV-GFP- γ . Alors que ces résultats semblent confirmer la production de chaînes lourdes, celle de chaînes légères pourrait être contestée. En effet, le TuMV-GFP- γ a révélé la présence d'un signal de forte intensité au poids correspondant à celui de la chaîne légère (~30 kDa). Il est fort possible qu'il s'agisse de fragments de protéolyse puisque des produits de dégradation similaires furent rapportés (Ma et al. 1994; Verch et al. 1998; Sharp & Doran 2001b). Néanmoins, le signal analogue détecté avec le TuMV- κ - γ pourrait aussi être de la dégradation et non de la chaîne légère. De plus, le TuMV- κ -GUS ne parut produire aucune chaîne légère lors d'analyses en conditions

non réductrices et seules des traces furent décelables lorsque les extraits protéiques furent placés en présence de β -mercaptoéthanol. Toutefois, un phénomène comparable fut rapporté dans le cas de plantes transgéniques pour le gène de la chaîne légère uniquement (Hiatt et al. 1989; Khoudi et al. 1999). Il est possible que les monomères de chaînes légères soient instables et se dégradent sans qu'une accumulation significative ne puisse être détectée. Dans les deux études, lorsque ces plantes furent croisées avec celles produisant la chaîne lourde, la chaîne légère put être détectée en conditions réductrices. En outre, rappelons que les assemblages H2L et H2L2 furent nettement visibles en conditions non-réductrices, il est donc permis de présumer de la présence de chaînes légères. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la chaîne légère uniquement (Exalpha Biologicals Inc. Catalogue #X1210P ou SouthernBiotech Catalogue #1050-04) ou encore, une purification sur colonne avec la protéine L (Pierce Catalogue #20510 ou Genomics One #CLBL201-0.5) nous permettrait de confirmer cette hypothèse. De plus, le séquençage de la portion amino-terminale des principales bandes détectées fournirait des renseignements précieux permettant de confirmer l'identification des protéines observées.

Rappelons par ailleurs les résultats obtenus lors de l'analyse en immunobuvardage de la protéine GUS. La bande de haut poids moléculaire observée à partir de tous les vecteurs porteurs du gène *uidA* laissait présumer que la maturation de la polyprotéine fut partielle. Il aurait donc été permis de supposer que les bandes ayant co-migré avec l'anticorps assemblé soit en fait des chaînes légères ou lourdes en fusion avec la ou les protéines adjacentes. Toutefois, dans le cas du TuMV- κ - γ , les résultats en conditions réductrices révèlent deux bandes uniques dont les poids permettent d'affirmer qu'il s'agit de chaînes légères et lourdes. Si des protéines étaient demeurées fusionnées, elles auraient également été détectées. Ces résultats confirment donc qu'il y a bien eu assemblage entre les chaînes légères et lourdes du C5.1.

D'un autre côté, le poids des chaînes individuelles fut légèrement supérieur à celui attendu. Ceci pourrait être attribuable aux acides aminés additionnels qui sont présents à chacune des extrémités des chaînes légères et lourdes. En effet, le clivage par les protéinases virales P1 et VPg-Pro a laissé les acides aminés Ser-Ala-Ala-Gly (SAAG) et Ala-Gly (AG) à l'extrémité amino-terminale des chaînes légère et lourde respectivement et les acides aminés Ala-Cys-Val-Tyr-His-Gln (ACVYHQ), à chacune des extrémités carboxy-terminale. Néanmoins, seule la dernière séquence devait faire partie de la protéine mature puisque la première aurait dû être éliminée avec l'amputation du peptide signal.

À la lumière de ces résultats, il est possible que le signal peptide présent à l'extrémité amino-terminale de la chaîne légère ait eu un rôle à jouer dans la diminution du pouvoir pathogène du vecteur et dans l'hétérogénéité des formes d'assemblages de l'anticorps produit. En effet, la présence d'un signal de translocation au sein de la polyprotéine virale aurait pu avoir un impact négatif sur la réplication virale. Considérons le cas du TuMV- κ - γ (Figure 35). Au cours de la traduction, il est assumé que la protéine P1 s'autoclave de la polyprotéine naissante, libérant le peptide signal présent à l'extrémité amino-terminal de la chaîne légère. Le processus de translocation permettrait alors à la chaîne peptidique du TuMV de s'introduire dans la lumière de RE. De cette façon, à l'exception de la protéine P1, toutes les protéines virales se verraient emprunter la voie de la sécrétion. Compte tenu que le génome et les protéines du complexe de réplication se retrouveraient en des lieux séparés, il deviendrait impossible pour le virus de se répliquer.

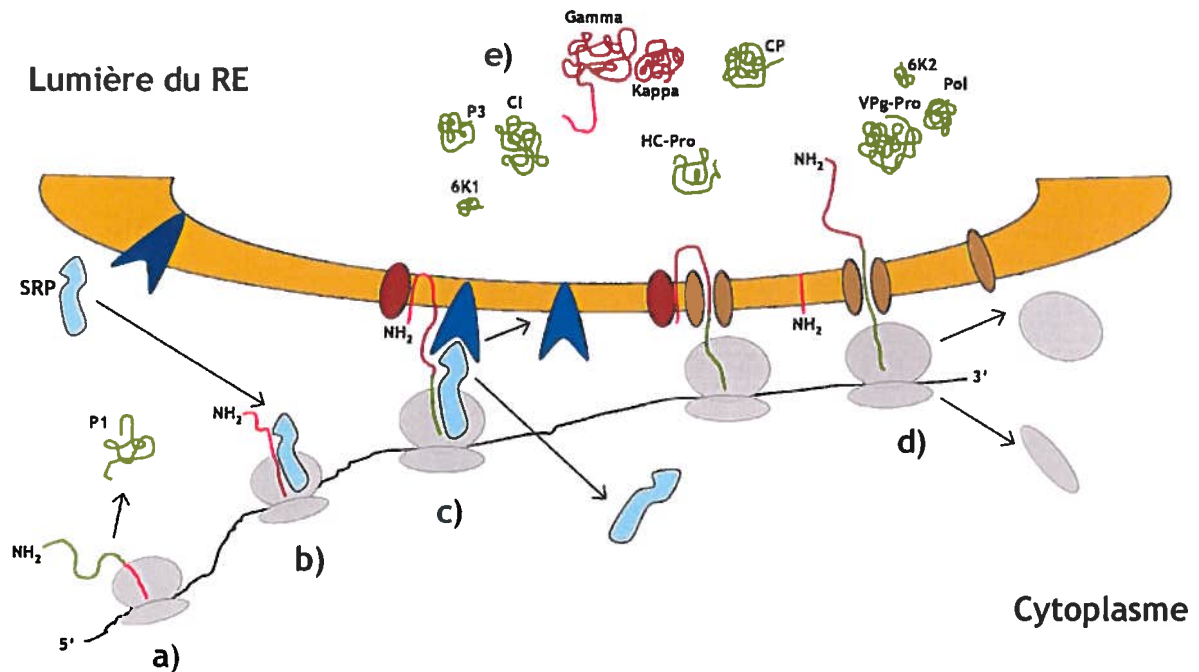


Figure 35 : Modèle hypothétique du déroulement du processus de translocation de la polyprotéine du TuMV-κ-γ.

L'ARNm issu de la transcription de l'ADNc du TuMV-κ-γ est traduit dans le cytoplasme d'une cellule transfectée. a) La protéine P1 s'auto-hydrolyse de la polyprotéine virale naissante b) permettant à une particule de reconnaissance du signal (SRP) de se lier au peptide signal (rouge clair) présent à l'extrémité amino-terminal de la chaîne légère. c) Le complexe SRP-polypeptide naissant- ribosome se lie alors à la membrane du RE par l'intermédiaire du récepteur du SRP (bleu foncé). Le peptide signal s'insère ensuite dans la membrane du RE en s'attachant à une protéine membranaire (rouge foncé). Un tunnel fait de protéines transmembranaires (brun) permet au polypeptide viral de traverser la bicouche phospholipidique. L'hydrolyse de GTP (omise dans la figure) permet à la particule SRP de se détacher du complexe ribosome-peptide et d'être relâché dans le cytosol. Le récepteur de SRP peut lui aussi être libéré. d) Une peptidase liée à la membrane dans la lumière du RE (omise dans la figure) vient exciser le peptide signal qui est rapidement dégradé. Au fur et à mesure que l'élongation se poursuit, la chaîne peptidique du TuMV s'introduit dans la lumière de RE, à travers le tunnel transmembranaire. e) Les protéines virales (sauf P1) et les chaînes légère et lourde du C5.1 traverseront alors la voie de la sécrétion. De plus, le peptide signal (rouge clair) présent à l'extrémité de la chaîne lourde ne sera probablement pas excisé et demeurera fusionné à la protéine. Adapté de (Lodish et al. 1997).

Or, malgré le fait que le taux de succès des infections par le TuMV- κ -GUS et TuMV- κ - γ aient été largement inférieurs à celui des autres vecteurs TuMV, il n'en demeure pas moins que 20 % des plantes transfectées ont développé des symptômes et révélé la présence de la capside virale. En outre, le caractère systémique de l'infection indique que les protéines de mouvement purent atteindre les plasmodesmes et ainsi permettre le transport du virus. L'activité de la β -glucuronidase put être observée dans le cas du TuMV- κ -GUS et les analyses en immunobuvardage indiquèrent la présence de chaînes légères et lourdes dans le cas du TuMV- κ - γ .

Il se peut que dans 80% des plantes ayant été transfectées par les constructions p35TuNos- κ -GUS et - κ - γ , la translocation de la polyprotéine virale se soit déroulée tel que notre modèle le suppose (Figure 35). Toutefois il se pourrait que dans les 20% de plantes ayant développé une infection, la protéine P1 ait vu son auto-hydrolyse retardée suffisamment longtemps pour que la protéine HC-Pro soit traduite et libérée de la polyprotéine. Selon cette nouvelle hypothèse (Figure 36), le processus de translocation aurait été bloqué et le peptide signal serait demeuré en fusion avec chacune des chaînes du C5.1. Ainsi, une vingtaine d'acides aminés supplémentaires seraient présents à cette extrémité. Ceci pourrait alors justifier la hausse de la mobilité électrophorétique de chacune des chaînes détectées en immunobuvardage. Le séquençage de l'extrémité amino-terminale de chacune des chaînes permettrait de vérifier l'état de la protéolyse du peptide signal. Ce modèle suppose également que toutes les protéines virales, incluant les chaînes du C5.1, auraient alors été exprimées dans le cytoplasme de la cellule hôte. Ceci permettrait la réplication et la dissémination du virus mais nuirait à l'assemblage de l'anticorps compte tenu de l'absence de chaperonines essentielles. Le déroulement en parallèle des deux modèles hypothétiques proposés pourrait alors apporter une explication supplémentaire à la faiblesse du ratio hétérodimère/monomère observés en western blot.

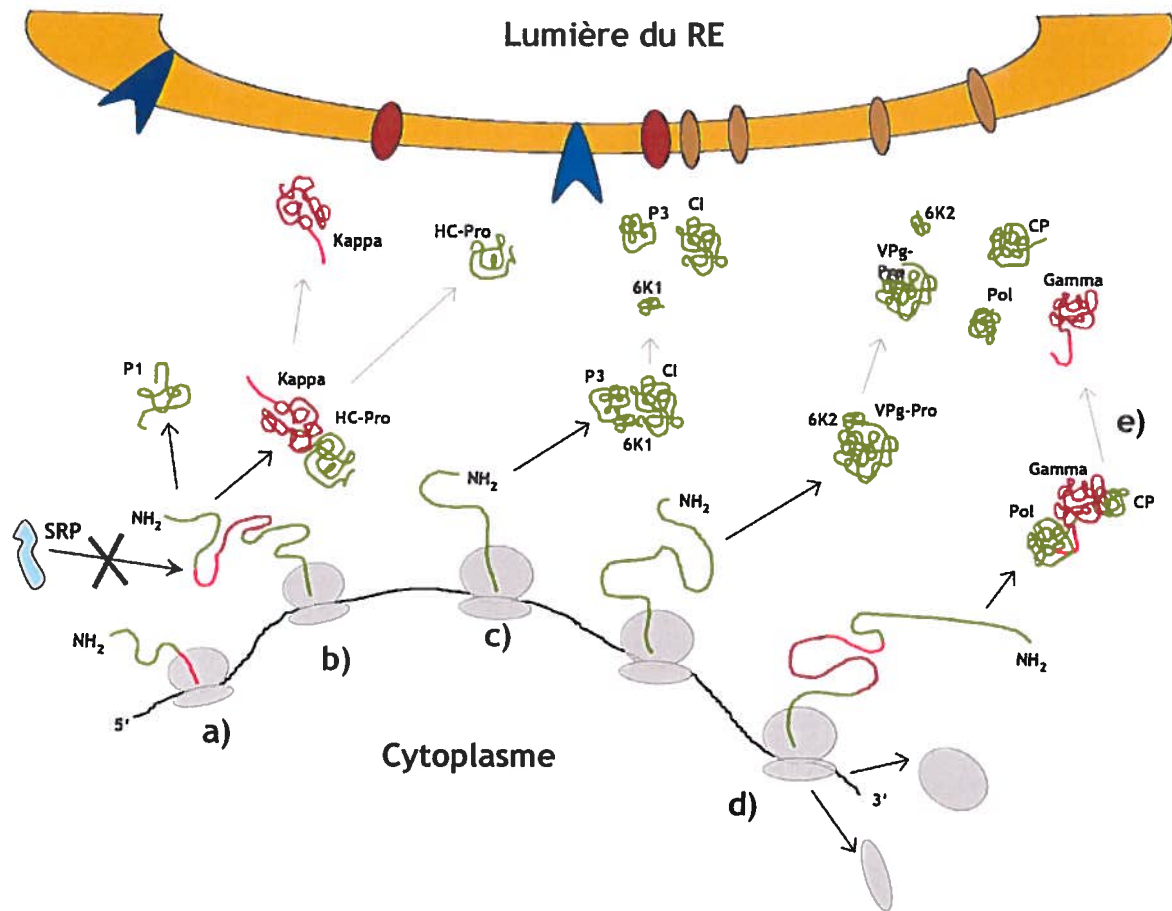


Figure 36 : Modèle hypothétique de la synthèse de la polyprotéine du TuMV-κ-γ dans le cas où le processus de translocation aurait été bloqué.

L'ARNm issu de la transcription de l'ADNc du TuMV-κ-γ est traduit dans le cytoplasme d'une cellule transfectée. a) La protéine P1 retarde son auto-clivage jusqu'à ce que la traduction ait dépassé le cistron *HC-Pro*. La particule de reconnaissance du signal (SRP) ne peut ainsi se lier au peptide signal (rouge clair) et stimuler la translocation du polypeptide vers la lumière du RE. b) Le domaine protéasique des protéines P1 et HC-Pro catalyse l'hydrolyse à la jonction des protéines P1 et Kappa et à la jonction des protéines HC-Pro et P3. Les protéines P1 et Kappa-HC-Pro sont alors libérées de la polyprotéine naissante. Le peptide signal (rouge clair) n'ayant pu être excisé par la peptidase du signal présente dans le RE demeurera fusionné à la chaîne légère. Les deux autres clivages se déroulant co-traductionnellement produiront les précurseurs P3-6K1-Cl et 6K2-VPg-Pro. d) L'expression des cistrons *Pol*, *gamma* et *CP* générera le troisième précurseur ; Pol-Gamma-CP. Tout comme celui présent à l'extrémité de Kappa, il est fort probable que le peptide signal (rouge clair) situé à l'extrémité de Gamma ne soit pas reconnu par la protéine SRP. En effet, le clivage à la jonction des protéines Pol et Gamma ne s'effectue par la protéinase VPg-Pro qu'une fois le processus de traduction complété (e). Le peptide signal (rouge clair) restera donc en fusion avec la chaîne lourde.

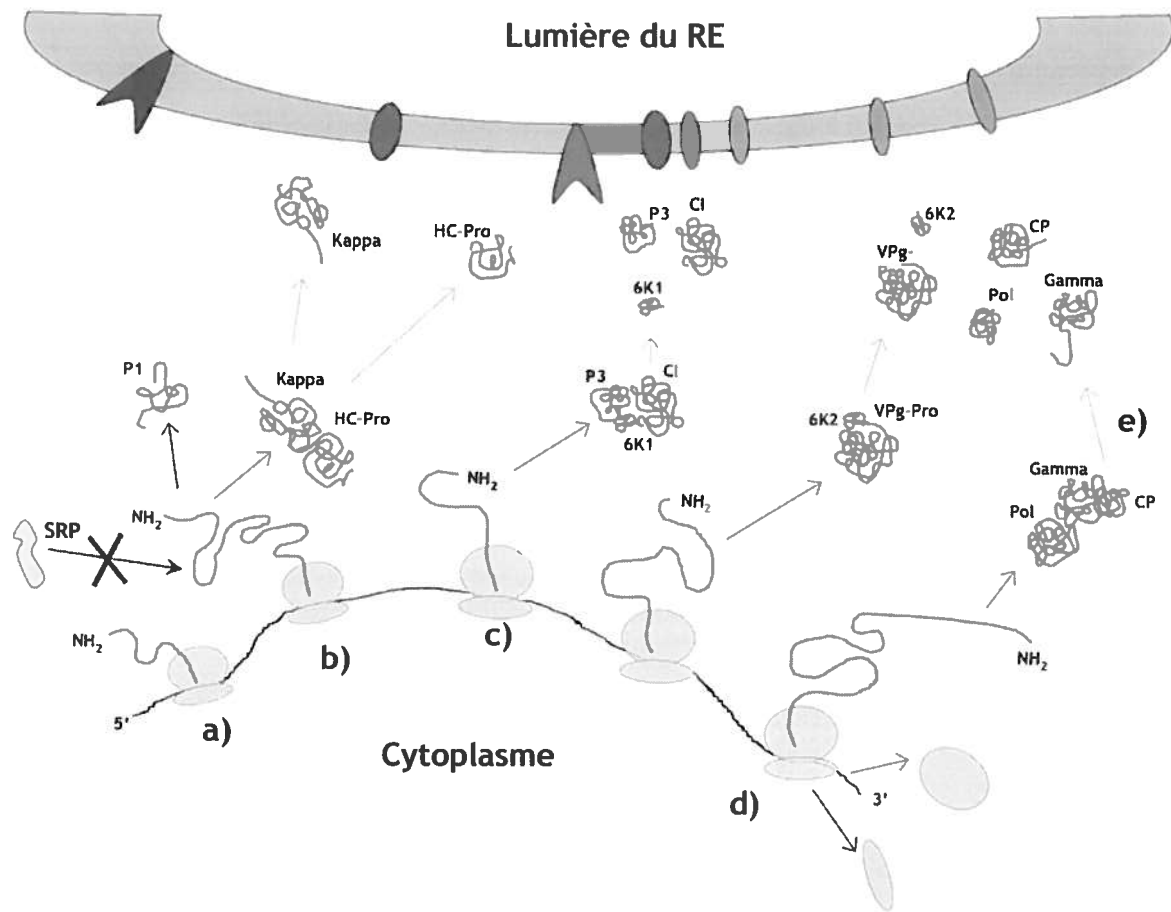


Figure 36 : Modèle hypothétique de la synthèse de la polyprotéine du TuMV-κ-γ dans le cas où le processus de translocation aurait été bloqué.

L'ARNm issu de la transcription de l'ADNc du TuMV-κ-γ est traduit dans le cytoplasme d'une cellule transfectée. a) La protéine P1 retarde son auto-clivage jusqu'à ce que la traduction ait dépassé le cistron *HC-Pro*. La particule de reconnaissance du signal (SRP) ne peut ainsi se lier au peptide signal (rouge clair) et stimuler la translocation du polypeptide vers la lumière du RE. b) Le domaine protéasique des protéines P1 et HC-Pro catalyse l'hydrolyse à la jonction des protéines P1 et Kappa et à la jonction des protéines HC-Pro et P3. Les protéines P1 et Kappa-HC-Pro sont alors libérées de la polyprotéine naissante. Le peptide signal (rouge clair) n'ayant pu être excisé par la peptidase du signal présente dans le RE demeurera fusionné à la chaîne légère. Les deux autres clivages se déroulant co-traductionnellement produiront les précurseurs P3-6K1-CI et 6K2-VPg-Pro. d) L'expression des cistrons *Pol*, *gamma* et *CP* génèrera le troisième précurseur ; Pol-Gamma-CP. Tout comme celui présent à l'extrémité de Kappa, il est fort probable que le peptide signal (rouge clair) situé à l'extrémité de Gamma ne soit pas reconnu par la protéine SRP. En effet, le clivage à la jonction des protéines Pol et Gamma ne s'effectue par la protéinase VPg-Pro qu'une fois le processus de traduction complété (e). Le peptide signal (rouge clair) restera donc en fusion avec la chaîne lourde.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'expression du C5.1 s'effectuerait dans le cytoplasme, il serait judicieux de localiser notre anticorps en immunofluorescence indirecte. Les protéines sécrétées se retrouvant normalement dans l'apoplaste (De Wilde et al. 1998), le patron d'accumulation de l'anticorps permettrait d'affirmer si oui ou non, les chaînes légères et lourdes traversent la membrane du RE.

Finalement, l'étude de la stabilité génétique révéla que le gène *kappa* compris dans la séquence du TuMV- κ -GUS et du TuMV- κ - γ fut stable même après 30 jours. De son côté, le gène *gamma* subit des délétions de taille plus ou moins importante. Deux populations de variants TuMV-GFP- γ furent rencontrées dans les échantillons après 30 jours d'infections. La première portait toujours le gène complet alors que la seconde perdit complètement la séquence du gène. Plusieurs populations de variants TuMV- κ - γ furent également observées portant diverses formes du gène allant de la séquence complète à une forme où 30% de la séquence fut éliminée. Ces données, combinés aux résultats recueillis lors de l'étude des vecteurs contenant un ou deux gènes rapporteurs, permettent de prétendre que la taille de l'insert, et non le site d'insertion, joue un rôle prépondérant dans la stabilité génétique. Il importe malgré tout de diminuer la rapidité avec laquelle les grands gènes insérés sont éliminés. En contournant le besoin de dissémination virale par l'intégration stable du vecteur dans le génome de la plante, le nombre de réplifications pourrait être réduit au minimum. De cette manière, toutes les cellules de l'hôte produiraient une copie complète du ou des gènes d'intérêt.

En somme, les analyses en immunobuvardages révélèrent que les chaînes légères et lourdes du C5.1 furent efficacement produites par le vecteur TuMV. En ce qui concerne son assemblage, à cette étape du projet dans lequel s'inscrivent ces travaux, seules des hypothèses peuvent être proposées. Il serait très intéressant de purifier le C5.1 produit à l'aide de ce vecteur sur colonne avec la protéine A/G (Pierce Catalogue #44902) et d'étudier sa fonctionnalité.

Des analyses ELISA permettraient de vérifier cet aspect et d'estimer les niveaux d'expression par rapport aux protéines totales solubles. De plus, la réactivité du C5.1 produit par le vecteur TuMV pourrait facilement être évaluée par le biais d'un test d'hémagglutination. Des C5.1 correctement assemblés mis en présence d'une suspension de globules rouges Rh(D)-positifs tapissés d'IgG anti-Rh(D) provoquerait l'agglutination des globules rouges.

Par ailleurs en industrie, les critères d'acceptation des protéines recombinantes exigent qu'elles soient le plus parfaitement identiques à la protéine originale. Or, la séquence codant pour le site de clivage reconnu par la protéinase VPg-Pro fut ajoutée à l'extrémité 3' de chacun des gènes insérés précédemment. Libérées de la polyprotéine virale, les protéines étrangères se voyaient toutes allongées de 6 acides aminés à leur extrémité carboxy-terminale. Une nouvelle stratégie d'insertion a donc été imaginée dans laquelle la séquence étrangère serait terminée par un codon d'arrêt.

3 Élaboration d'une nouvelle stratégie d'insertion

L'élimination du cistron *CP* permettrait de créer un nouveau site d'insertion ayant pour caractéristique d'être limité par un codon d'arrêt. De cette façon, il deviendrait possible de générer des protéines d'intérêt dont l'extrémité carboxy-terminale ne seraient pas modifiée. Toutefois, chez quelques virus autres que le TuMV, des séquences agissant en *cis* nécessaires à la réplication furent identifiées à l'intérieur du génome viral (Kim et al. 1993; Ball & Li 1993; Chang et al. 1995; Mahajan et al. 1996; Haldeman-Cahill et al. 1998).

Au cours des travaux réalisés par l'équipe de Mahajan, deux éléments *cis*-actifs furent identifiés dans la séquence codant pour la capsid du TEV, un potyvirus (Mahajan et al. 1996). Il semble en effet que le passage des ribosomes entre les codons 138 et 189 de la capsid du TEV soit stimulant pour l'amplification génomique. L'inhibition de la traduction de cette région par l'introduction en 5' d'un codon d'arrêt avait pour résultat un génome défectif pour l'amplification. Si par contre, la traduction était permise jusqu'au codon 189, les niveaux d'amplification atteignait 30 % de ceux rencontrés avec le TEV sauvage (Mahajan et al. 1996).

Néanmoins, chez d'autres mutants pour qui la séquence codant pour les codons 2 à 189 fut éliminée, les niveaux d'amplification ont atteint près de 90 % de ceux enregistrés par la souche sauvage (Mahajan et al. 1996). Lorsque la délétion s'étendait jusqu'au codon 210, des niveaux d'amplification encore très acceptables étaient observés (50 %). Ces niveaux chutaient de façon drastique lorsque l'élimination de la séquence ARN allait au-delà du 230^e codon. Pourtant, l'élimination de la séquence située entre les codons 246 et 262 de la capsid n'a pas engendré d'effet notable sur l'amplification du génome. Ceci indique que ni les 210 premiers acides aminés de la capsid ni la séquence ARN codant pour ces derniers n'est absolument nécessaire pour une amplification génomique efficace. Par contre, qu'elle soit traduite ou non, la séquence ARN comprise entre les codons 211 et 246 semble être nécessaire à l'amplification virale. Cette

séquence cis-active est située 243 à 347 nucléotides à partir de la queue poly (A) (Mahajan et al. 1996). Des modèles générés par ordinateur de la séquence codant pour la CP suggèrent que cette région forme une série de structures en boucle impliquant l'ARN des séquences codant pour la CP et la région non traduite en 3' (Haldeman-Cahill et al. 1998).

D'un autre côté, chez les premiers vecteurs viraux la séquence codant pour la capsid était entièrement remplacée par une séquence d'intérêt. Dans tous les cas, la délétion de la capsid abolissait la capacité du virus de se propager systématiquement dans la plante infectée. Cette méthode d'expression permit la production de protéines telles que la CAT (French et al. 1986; Takamatsu et al. 1987), l'INF- γ (Mori et al. 1993), GUS (Scholthof 1999) et la GFP (Cohen et al. 2000). Ces protéines n'étaient par contre disponibles qu'au site d'inoculation puisque ces vecteurs ne pouvaient qu'engendrer des lésions locales. À l'issue du projet de notre groupe, chacune des cellules de la plante hôte contiendra une copie complète de notre vecteur viral. Les gènes d'intérêt seront donc exprimés dans chacune des cellules où la transcription du vecteur aura été induite. De plus, il paraît inutile, voire néfaste, que le vecteur demeure apte à s'encapsider et ainsi être transmissible entre hôtes en présence de pucerons.

La possibilité que des séquences indispensables à la réplication du TuMV se retrouvent au niveau du cistron *CP* du TuMV devait donc être envisagée. Afin de visualiser la présence de telles séquences, une série de sept mutants porteurs de délétions au niveau de la séquence codant pour la capsid fut générée. Les délétions furent réalisées par PCR de façon progressive à partir du troisième codon jusqu'au codon d'arrêt de la polyprotéine. Ces délétions ont été menées sur le vecteur recombinant portant le gène rapporteur *uidA* entre les cistrons *Pol* et *CP*.

La capacité de réplication des cinq premiers mutants fut testée sur des protoplastes de *Nicotiana benthamiana*. Puisque l'enzyme GUS fit d'abord partie

de la polyprotéine virale, le dosage de son activité fut utilisé comme reflet de l'amplification génomique. Les résultats obtenus suggérèrent que l'élimination de la séquence comprise entre le 3^e et le 263^e codons n'inhibe pas complètement l'amplification virale. Bien qu'aucun témoin négatif autre qu'une simple inoculation d'eau ne fut inclut au cours de ces essais, les données recueillies justifiaient la poursuite des expérimentations et la construction des plasmides p35TuNos-CGUS-CP272 et - Δ CP.

La construction d'un vecteur incapable de se répliquer fut également planifiée. Il fut proposé que des substitutions dans la séquence codant pour la polymérase, changeant le motif conservé GDD pour VNN, suffirait à abolir le pouvoir réplcatif du virus (Li & Carrington 1995). Ce témoin négatif devait permettre de faire la distinction entre l'activité GUS issue de la simple transcription et traduction de l'ADN transfecté de celle issue de l'ARN répliqué par le complexe de la réplcase.

Des difficultés furent rencontrées avec la technique de transfection de protoplastes. En effet, il fut impossible d'obtenir des résultats qui soient cohérents et reproductibles. Malgré que le protocole ait été bien adapté aux plantes de *Nicotiana benthamiana*, le succès de cette technique délicate demeure dépendant de nombreux facteurs. Parmi ceux-ci, les conditions de croissance des plantes est le facteur critique principal pour la reproductibilité expérimentale. Il est possible que l'instabilité des paramètres tels que la température et le taux d'humidité relative de notre salle de croissance ait eu un rôle à jouer dans l'insuccès de ces essais. Par ailleurs, la présence de sels dans les préparations d'acides nucléiques (Qiagen) et l'absence de lumière au cours de l'incubation des protoplastes transfectés (incubateur à 26°C) sont d'autres aspects ayant pu nuire à la réussite des expériences. Compte tenu que plusieurs paramètres pouvaient être tenus responsables des échecs rencontrés, nous avons choisi d'essayer une technique de transfection moins laborieuse et beaucoup plus rapide.

La séquence ADN de chaque virus recombinants pour la capside, le motif VNN ou le gène *uidA* fut alors transférée dans un vecteur binaire afin de pouvoir agroinfiltrer des feuilles de plantes de *Nicotiana benthamiana*. Les limites de temps ne nous ont permis de réaliser qu'un seul exercice au cours duquel, les feuilles agroinfiltrées furent placées en présence d'un substrat chromogénique. Malgré que cette technique de dosage ne soit pas quantitative elle permet d'indiquer si les mutants testés étaient aptes à se répliquer. La quantité de précipités sur les feuilles agroinfiltrées avec les constructions des mutants pour la capside fut comparée avec la quantité de précipités sur les feuilles agroinfiltrées avec les constructions témoins. Bien que le témoin TuMV-CGUS/VNN soit incapable de réplication, les feuilles agroinfiltrées avec la construction p35TuNos-CGUS/VNN présentèrent une activité GUS. Ceci démontre qu'une très grande quantité d'ADN pénètre dans les cellules au moment de l'agroinfiltration et que cet ADN est alors transcrit et traduit. Ceci dut être pris en considération au moment de faire les comparaisons. Ainsi, il a semblé que les mutants TuMV-CGUS- Δ CP125, - Δ CP176, - Δ CP230, - Δ CP272 et - Δ CP soient demeurés capables de se répliquer. Cependant, il nous fut impossible d'établir si des séquences stimulant la réplication étaient présentes au niveau du cistron CP avec cette méthode.

Afin d'évaluer la capacité répliquative de manière plus précise, il serait préférable dans l'avenir de rechercher dans les feuilles agroinfiltrées, la présence d'ARN de polarité négative. La technique de Northern se prêtant bien à l'exercice, cet ARN, seul véritable témoin de la réplication virale, pourrait être comparé avec celui provenant des extractions d'ARN des témoins de réplication positif et négatif TuMV-GUS et TuMV-GUS-VNN.

4 Perspectives d'avenir

Nos résultats démontrent clairement qu'il est possible d'exprimer deux gènes d'intérêt à partir de notre vecteur TuMV. De plus, l'expression d'une protéine multimérique tel qu'un anticorps s'est révélée réalisable. Ainsi, une petite proportion d'immunoglobulines présentes dans la forme assemblée a pu être détectée à partir d'extraits bruts de protéines.

Les exemples retrouvés dans la littérature nous amènent à penser que la présence de nombreuses protéases le long de la voie de sécrétion et au niveau de l'espace apoplasmique a pu influencer la quantité détectée d'anticorps assemblés. Si tel est le cas, la réduction de l'exposition aux sites principaux d'activité protéasique pourrait réduire la fragmentation et augmenter les niveaux d'accumulation de C5.1. Pour y parvenir, la sécrétion des protéines devrait être inhibée et les anticorps devraient être conservés dans le réticulum endoplasmique. Les plus hauts rendements de production d'anticorps atteints à ce jour dans les plantes transgéniques furent effectivement associés à la présence d'un signal de rétention (Fischer et al. 2003). Le peptide KDEL est un signal utilisé par les cellules pour conserver une sous-population de protéines à l'intérieur du RE (Fiedler et al. 1997). Ce signal fait en sorte que les protéines de la voie sécrétoire soient récupérées dans l'appareil de Golgi et réimportées dans le RE. De cette manière, les risques que ces protéines soient perdues dans l'apoplaste ou dirigées vers les lysosomes pour y être dégradées sont minimisés. La combinaison des hauts niveaux de transcription du vecteur TuMV, le ciblage vers la voie de sécrétion et la réimportation dans le RE permettrait d'atteindre des rendements maximums de production d'anticorps.

Par ailleurs, comme nos analyses ne nous permettent pas de distinguer entre les fragments d'anticorps dégradés et les monomères de chaînes, une seconde hypothèse concernant la faible proportion observée d'immunoglobulines assemblées fut également considérée. Selon celle-ci, la translocation vers le RE n'aurait eu lieu que dans un certain nombre de cas. Ainsi, seule une minorité de

chaînes lourdes et légères se seraient vues repliées et assemblées en un anticorps complet. Advenant la véracité de cette supposition, la production d'une protéine ne nécessitant pas le besoin d'être glycosylée pourrait être envisagée. Dans cette optique, une avenue intéressante serait la production simultanée d'un monomère et de sa protéine chaperon. Bien que beaucoup de protéines dénaturées arrivent à se replier en retrouvant leur structure native, dans la plupart des cas, ce repliement n'aboutit qu'après des heures (Lodish et al. 1997). En exprimant dans le cytosol la chaperonine spécifique à cette protéine, nous favoriserions la production d'une grande quantité de protéine adéquatement repliée, lui assurant ainsi une plus haute stabilité.

L'ADNc du vecteur TuMV- κ - γ fut récemment cloné par un autre membre de notre équipe dans un vecteur binaire permettant l'agroinfiltration. Tel que nos résultats enregistrés avec les constructions porteuses de délétions au niveau de la capsid l'ont démontré, ce mode d'infection permettra d'obtenir très rapidement (en deux ou trois jours) de grandes quantités de vecteur *in planta*. En plus de minimiser les délais d'attente et de réduire les pertes d'expression associées à l'instabilité génétique, une plus forte concentration d'anticorps assemblés que celle qui aurait pu être purifiée à partir du matériel bombardé pourra alors être obtenue. La fonctionnalité de l'anticorps C5.1 recombinant sera analysée en ELISA et des tests d'hémagglutination pourront être effectués afin d'étudier sa réactivité.

D'un autre côté, bien que les essais concernant l'élimination du cistron codant pour la capsid virale n'en soit qu'à ses débuts, nous avons de bonnes raisons de croire que plus de 75 % de la partie amino-terminale de sa séquence puisse être éliminée. De plus, les 25 % restant opèrent sans doute en tant qu'élément *cis* actif au niveau de la réplication. Le produit de la traduction de cette portion du cistron ne serait donc pas requis pour la survie du virus. Un gène d'intérêt terminé par un codon d'arrêt pourrait alors remplacer la presque totalité de la séquence de la capsid du TuMV. En outre, puisqu'à l'issue de notre projet toutes les cellules de la plante hôte porteront une copie complète

du vecteur viral, les fonctions de propagation et d'encapsidation n'ont plus besoin d'être codées par le TuMV.

La suppression de ces séquences non essentielles à la réplication virale permettrait de minimiser la taille du réplicon et ainsi faciliter sa manipulation. Ces modifications atténueraient la virulence du virus favorisant ainsi une survie prolongée de la plante hôte. Elles apporteraient également l'avantage d'éviter la dissémination du virus recombinant dans l'environnement. On croit que les régions 5' et 3' non codantes du génome du TuMV sont les séquences *cis* actives principales et que l'hélicase, la VPg-Pro et la polymérase formeraient le module de réplication. De cette façon, en plus du cistron de la capsid virale, les séquences codant pour les protéines P1, HC-Pro et P3 pourraient sans doute être déléguées.

Finalement, notre projet pris dans son ensemble fournirait un outil innovateur pour l'étude fondamentale des virus de plantes. Le système d'induction mis au point par notre équipe a démontré pouvoir synchroniser la production du vecteur viral. Ceci pourrait permettre d'analyser en temps réel les relations hôte/virus. Un exemple passionnant est l'interaction entre la VPg du TuMV et le complexe de traduction étudiée par d'autres membres de notre laboratoire.

Chapitre 5

Conclusion

Plusieurs reconnaissent que les plantes constituent une alternative intéressante à l'utilisation de cellules en culture pour la production à grande échelle de protéines d'intérêt tels que les anticorps, les vaccins, les enzymes et autres produits thérapeutiques. Le principal facteur en faveur des systèmes utilisant les plantes est le faible coût de production de la biomasse en agriculture et le risque quasi-inexistant de contamination par des virus et autres pathogènes animaux. Actuellement, les principaux défis associés à la moléculature sont les faibles niveaux d'accumulation de protéines étrangères, le « gene silencing » et l'instabilité génétique.

Notre équipe a donc proposé de combiner le pouvoir répliatif des virus, l'intégration stable d'un transgène et une induction contrôlée dans le temps afin d'accroître considérablement la quantité de protéines d'intérêt produites et de solutionner le problème de l'instabilité génétique des vecteurs viraux. De plus, le réplicon serait apte à déjouer les défenses de la plante hôte en profitant de la présence d'inhibiteurs viraux de « gene silencing ».

La concrétisation de ce projet impliquait que l'on étudie la possibilité d'insérer plus d'un gène étranger dans la séquence du vecteur TuMV. Nous avons été les premiers à réussir une expression multiple de protéines hétérologues avec un vecteur viral en exploitant deux sites d'insertions différents. Nous avons également été les premiers à exprimer une protéine hétérodimérique complexe (un anticorps) avec un tel vecteur.

Tout d'abord, la possibilité d'insérer des gènes étrangers dans le génome d'un virus fut étudiée avec le virus de la mosaïque du navet (TuMV). Afin de faciliter l'observation de l'expression des gènes introduits, les gènes rapporteurs *gfp* et *uidA* furent choisis. Ils furent insérés entre les cistrons codant pour les protéines P1 et HC-Pro ou ceux codant pour Pol et CP. La technique du bombardement particulaire permet d'analyser *in planta* les capacités répliquatives du vecteur viral. Bien que la virulence du TuMV fut éprouvée par la double insertion de gènes dans son génome, les niveaux d'expression rencontrés demeurèrent hautement suffisants pour les besoins du projet.

Les gènes codant pour chacune des chaînes d'un anticorps furent par conséquent introduits individuellement dans un des sites d'insertion créés. L'anticorps a semblé s'assembler, par contre, plusieurs signaux de plus petits poids moléculaire furent également détectés en conditions non réductrices. La technique utilisée ne nous offrant pas la possibilité de faire la distinction entre les fragments d'anticorps dégradés et les monomères de chaînes, deux hypothèses furent avancées afin d'expliquer la faible quantité observée de C5.1 formé. La première suggère que la forte concentration de protéases dans la plante, au sein de la voie de sécrétion et dans l'espace extracellulaire (apoplaste), ait engendré la dégradation de l'anticorps recombinant. Dans la littérature, quelques exemples d'analyse en immunobuvardage d'anticorps exprimé dans des plantes viennent appuyer cette hypothèse. Par ailleurs, la seconde propose plutôt que le processus de la translocation vers la lumière du réticulum endoplasmique (RE) nuise à la capacité répliquative du virus et que seul un nombre réduit de protéines ait pu être transloqué. Les anticorps ne s'accumulant pas dans le cytosol dû à l'assemblage et au repliement incorrect ou incomplet de ses chaînes, les protéines se retrouveraient majoritairement sous la forme monomérique ou encore, seraient rapidement dégradées. Dans l'éventualité où cette hypothèse serait vérifiée, des efforts pourraient être accordés à la recherche d'une solution permettant d'augmenter le nombre d'événement de translocation vers la lumière du RE, sans entraver la répliqua-

du vecteur. Un exemple pourrait être l'exploitation d'un signal d'arrêt de translocation tel qu'utilisé dans le cas de protéine transmembranaires. De plus, puisque le vecteur TuMV a prouvé être capable d'exprimer efficacement au moins deux gènes étrangers, des protéines n'ayant pas besoin de visiter le RE pourrait être produites.

Par ailleurs, une nouvelle stratégie d'insertion fut élaborée. Celle-ci permettrait à des protéines produites par le vecteur TuMV de conserver leur extrémité carboxy-terminale intacte. L'intégration d'un codon d'arrêt au niveau du génome du virus exige qu'il soit situé après le tout dernier cistron essentiel à sa réplication. Une série de délétions au niveau de la capsid virale fut réalisée dans le vecteur TuMV exprimant le gène rapporteur *uidA*, ceci pour simplifier l'étude de son pouvoir réplcatif. La visualisation de l'activité enzymatique de GUS suggère que le virus soit toujours fonctionnel malgré les délétions apportées dans la séquence de la CP. Toutefois, d'autres essais doivent être réalisés dans lesquels la mesure de l'activité GUS se fera quantitativement. De plus, le dosage de la production de brins d'ARN de polarité négative nous indiquerait avec plus de précision où en est rendu la capacité réplcative du TuMV délété.

Finalement, nous gagnerions à approfondir notre compréhension de la biologie des virus et de leurs relations avec la plante hôte. Ainsi, nous serions plus apte à faire des changements moléculaires spécifiques qui affecteraient le les gènes codant pour les protéines afin de produire des vecteurs viraux « idéaux ». Ces souches atténuées se répliqueraient à de forts titres dans la plante et engendreraient de très faibles réductions dans le rendement des cultures et de leur qualité. De plus, ces virus n'infecteraient ni les fleurs ni les graines et ne seraient pas transmissibles par les insectes. Il serait envisageable de produire des plantes transgéniques génériques porteuses des facteurs agissant en *trans* nécessaire à la réplication virale. De cette façon, tout gène flanqué des séquences agissant en *cis* pourrait être exprimé à l'échelle agricole.

Bibliographie

Arakawa T, Chong DK, Langridge WH (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol* 16: 292-7

Arazi T, Lee Huang P, Huang PL, Zhang L, Moshe Shibolet Y, Gal-On A, Lee-Huang S (2002) Production of antiviral and antitumor proteins MAP30 and GAP31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AGII. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 441-8

Arazi T, Shibolet Y, Gal-On A (2001a) A nonviral peptide can replace the entire N terminus of zucchini yellow mosaic potyvirus coat protein and permits viral systemic infection. *J Virol* 75: 6329-36

Arazi T, Slutsky SG, Shibolet Y, Wang Y, Rubinstein M, Barak S, Yang J, Gal-On A (2001b) Engineering zucchini yellow mosaic potyvirus as a non-pathogenic vector for expression of heterologous proteins in cucurbits. *J Biotechnol* 87: 67-82

Atreya PL, Lopez-Moya JJ, Chu M, Atreya CD, Pirone TP (1995) Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J Gen Virol* 76 (Pt 2): 265-70

Awram P, Gardner RC, Forster RL, Bellamy AR (2002) The potential of plant viral vectors and transgenic plants for subunit vaccine production. *Adv Virus Res* 58: 81-124

Azzoni AR, Kusnadi AR, Miranda EA, Nikolov ZL (2002) Recombinant aprotinin produced in transgenic corn seed: extraction and purification studies. *Biotechnol Bioeng* 80: 268-76

Ball LA, Li Y (1993) cis-acting requirements for the replication of flock house virus RNA 2. *J Virol* 67: 3544-51

Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke M, Matzke A (1986) The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol* 6: 347-57

Beauchemin C (2003) Développement d'un réplicon viral inductible dans les plantes à l'aide du virus de la mosaïque du navet (TuMV) portant un gène rapporteur. Université du Québec INRS-IAF: Mémoire #781

Belanger H, Fleysh N, Cox S, Bartman G, Deka D, Trudel M, Koprowski H, Yusibov V (2000) Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB J* 14: 2323-8

Benvenuto E, Ordas RJ, Tavazza R, Ancora G, Biocca S, Cattaneo A, Galeffi P (1991) 'Phytoantibodies': a general vector for the expression of immunoglobulin domains in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 17: 865-74

Bevan M (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12: 8711-21

Blanc S, Ammar ED, Garcia-Lampasona S, Dolja VV, Llave C, Baker J, Pirone TP (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J Gen Virol* 79 (Pt 12): 3119-22

Blanc S, Lopez-Moya JJ, Wang R, Garcia-Lampasona S, Thornbury DW, Pirone TP (1997) A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231: 141-7

Boothe JG, Sonnichsen FD, de Beus MD, Johnson-Flanagan AM (1997) Purification, characterization, and structural analysis of a plant low-temperature-induced protein. *Plant Physiol* 113: 367-76

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54

Brennan FR, Bellaby T, Helliwell SM, Jones TD, Kamstrup S, Dalsgaard K, Flock JI, Hamilton WD (1999a) Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice. *J Virol* 73: 930-8

Brennan FR, Jones TD, Gilleland LB, Bellaby T, Xu F, North PC, Thompson A, Staczek J, Lin T, Johnson JE, Hamilton WD, Gilleland HE Jr (1999b) *Pseudomonas aeruginosa* outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiology* 145 (Pt 1): 211-20

Brennan FR, Jones TD, Longstaff M, Chapman S, Bellaby T, Smith H, Xu F, Hamilton WD, Flock JI (1999c) Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. *Vaccine* 17: 1846-57

Bruyns AM, De Jaeger G, De Neve M, De Wilde C, Van Montagu M, Depicker A (1996) Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. *FEBS Lett* 386: 5-10

Buratti E, McLain L, Tisminetzky S, Cleveland SM, Dimmock NJ, Baralle FE (1998) The neutralizing antibody response against a conserved region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 (amino acid residues 731-752) is uniquely directed against a conformational epitope. *J Gen Virol* 79 (Pt 11): 2709-16

Burkhardt PK, Beyer P, Wunn J, Kloti A, Armstrong GA, Schledz M, von Lintig J, Potrykus I (1997) Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J* 11: 1071-8

Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, Zamorano PI, Sadir AM, Gomez N, Salinas J, Escribano JM, Borca MV (1998) Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J Virol* 72: 1688-90

Carrington JC, Haldeman R, Dolja VV, Restrepo-Hartwig MA (1993) Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus in vivo. *J Virol* 67: 6995-7000

Castanon S, Marin MS, Martin-Alonso JM, Boga JA, Casais R, Humara JM, Ordas RJ, Parra F (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol* 73: 4452-5

Chakraborty S, Chakraborty N, Datta A (2000) Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3724-9

Chang YC, Borja M, Scholthof HB, Jackson AO, Morris TJ (1995) Host effects and sequences essential for accumulation of defective interfering RNAs of cucumber necrosis and tomato bushy stunt tombusviruses. *Virology* 210: 41-53

Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D (1992) Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J* 2: 549-57

Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants *Molecular Breeding* 11: 287-93

Choi IR, Stenger DC, Morris TJ, French R (2000) A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals. *Plant J* 23: 547-55

Chong DK, Langridge WH (2000) Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Res* 9: 71-8

Cleveland SM, Buratti E, Jones TD, North P, Baralle F, McLain L, McInerney T, Durrani Z, Dimmock NJ (2000) Immunogenic and antigenic dominance of a nonneutralizing epitope over a highly conserved neutralizing epitope in the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: its deletion leads to a strong neutralizing response. *Virology* 266: 66-78

Cohen Y, Gisel A, Zambryski PC (2000) Cell-to-cell and systemic movement of recombinant green fluorescent protein-tagged turnip crinkle viruses. *Virology* 273: 258-66

Conrad U, Fiedler U (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol Biol* 38: 101-9

Cramer CL, Weissenborn DL, Oishi KK, Grabau EA, Bennett S, Ponce E, Grabowski GA, Radin DN (1996) Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann N Y Acad Sci* 792: 62-71

Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC, Carrington JC (1995) Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7: 549-59

Dalsgaard K, Uttenthal A, Jones TD, Xu F, Merryweather A, Hamilton WD, Langeveld JP, Boshuizen RS, Kamstrup S, Lomonossoff GP, Porta C, Vela C, Casal JI, Meloen RH, Rodgers PB (1997) Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat Biotechnol* 15: 248-52

Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001a) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* 311: 1001-9

Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001b) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6: 219-26

De Neve M, De Loose M, Jacobs A, Van Houdt H, Kaluza B, Weidle U, Van Montagu M, Depicker A (1993) Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res* 2: 227-37

De Wilde C, De Rycke R, Beeckman T, De Neve M, Van Montagu M, Engler G, Depicker A (1998) Accumulation pattern of IgG antibodies and Fab fragments in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Cell Physiol* 39: 639-46

DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H (2001) Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol* 127: 852-62

Dieryck W, Pagnier J, Poyart C, Marden MC, Gruber V, Bournat P, Baudino S, Merot B (1997) Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature* 386: 29-30

Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC (1994) Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J* 13: 1482-91

Dolja VV, Herndon KL, Pirone TP, Carrington JC (1993) Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *J Virol* 67: 5968-75

Dolja VV, McBride HJ, Carrington JC (1992) Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10208-12

Donson J, Kearney CM, Hilf ME, Dawson WO (1991) Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7204-8

Dougherty WG, Carrington JC, Cary SM, Parks TD (1988) Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. *EMBO J* 7: 1281-7

Dougherty WG, Parks TD (1989) Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays. *Virology* 172: 145-55

Durrani Z, McInerney TL, McLain L, Jones T, Bellaby T, Brennan FR, Dimmock NJ (1998) Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J Immunol Methods* 220: 93-103

Edelbaum O, Stein D, Holland N, Gafni Y, Livneh O, Novick D, Rubinstein M, Sela I (1992) Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. *J Interferon Res* 12: 449-53

Fernandez-Fernandez MR, Martinez-Torrecuadrada JL, Casal JI, Garcia JA (1998) Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Lett* 427: 229-35

Fernandez-Fernandez MR, Mourino M, Rivera J, Rodriguez F, Plana-Duran J, Garcia JA (2001) Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology* 280: 283-91

Fiedler U, Phillips J, Artsaenko O, Conrad U (1997) Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3: 205-16

Fischer R, Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res* 9: 279-99

Fischer R, Twyman RM, Schillberg S (2003) Production of antibodies in plants and their use for global health. *Vaccine* 21: 820-5

Fitchen J, Beachy RN, Hein MB (1995) Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine* 13: 1051-7

Francisco JA, Schreiber GJ, Comerreski CR, Mezza LE, Warner GL, Davidson TJ, Ledbetter JA, Siegall CB (1997) In vivo efficacy and toxicity of a single-chain immunotoxin targeted to CD40. *Blood* 89: 4493-500

French R, Janda M, Ahlquist P (1986) Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus - efficient expression in monocotyledonous plant cells. *Science* 231: 1294-97

German-Retana S, Candresse T, Alias E, Delbos RP, Le Gall O (2000) Effects of green fluorescent protein or beta-glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking Lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 316-24

Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. *Curr Opin Biotechnol* 12: 450-4

Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 18: 1151-5

Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, Catala R, Martinez-Torrecuadrada JL, Casal I, Salinas J, Borca MV, Escribano JM (2001) High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett* 488: 13-7

Gomez N, Carrillo C, Salinas J, Parra F, Borca MV, Escribano JM (1998) Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology* 249: 352-8

Guo HS, Lopez-Moya JJ, Garcia JA (1998) Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric plum pox potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *Virus Res* 57: 183-95

Haldeman-Cahill R, Daros JA, Carrington JC (1998) Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *J Virol* 72: 4072-9

Hamamoto H, Sugiyama Y, Nakagawa N, Hashida E, Matsunaga Y, Takemoto S, Watanabe Y, Okada Y (1993) A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. *Biotechnology (N Y)* 11: 930-2

Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714-6

Hendy S, Chen ZC, Barker H, Santa Cruz S, Chapman S, Torrance L, Cockburn W, Whitelam GC (1999) Rapid production of single-chain Fv fragments in plants using a potato virus X episomal vector. *J Immunol Methods* 231: 137-46

Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342: 76-8

Higo K, Saito Y, Higo H (1993) Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1477-81

Huang Z, Dry I, Webster D, Strugnelli R, Wesselingh S (2001) Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 19: 2163-71

James EA, Wang C, Wang Z, Reeves R, Shin JH, Magnuson NS, Lee JM (2000) Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expr Purif* 19: 131-8

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-7

Joelson T, Akerblom L, Oxelfelt P, Strandberg B, Tomenius K, Morris TJ (1997) Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J Gen Virol* 78 (Pt 6): 1213-7

Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 13: 1796-9

Kasschau KD, Carrington JC (1995) Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* 209: 268-73

Kasschau KD, Carrington JC (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-70

Kasschau KD, Cronin S, Carrington JC (1997) Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228: 251-62

Khoudi H, Laberge S, Ferullo JM, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemieux R , Vezina LP (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol Bioeng* 64: 135-43

Kim YN, Jeong YS, Makino S (1993) Analysis of cis-acting sequences essential for coronavirus defective interfering RNA replication. *Virology* 197: 53-63

Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11539-44

Koo M, Bendahmane M, Lettieri GA, Paoletti AD, Lane TE, Fitch JH, Buchmeier MJ, Beachy RN (1999) Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7774-9

Koprowski H, Yusibov V (2001) The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19: 2735-41

Kumagai MH, Turpen TH, Weinzettl N, della-Cioppa G, Turpen AM, Donson J, Hilf ME, Grantham GL, Dawson WO, Chow TP, et al (1993) Rapid, high-level expression of biologically active alpha-trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 427-30

Kusnadi AR, Hood EE, Witcher DR, Howard JA, Nikolov ZL (1998) Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol Prog* 14: 149-55

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5

Laliberte JF, Nicolas O, Chatel H, Lazure C, Morosoli R (1992) Release of a 22-kDa protein derived from the amino-terminal domain of the 49-kDa NIa of turnip mosaic potyvirus in *Escherichia coli*. *Virology* 190: 510-4

Langeveld JP, Brennan FR, Martinez-Torrecuadrada JL, Jones TD, Boshuizen RS, Vela C, Casal JI, Kamstrup S, Dalsgaard K, Meloen RH, Bendig MM, Hamilton WD (2001) Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. *Vaccine* 19: 3661-70

Larrick JW, Yu L, Naftzger C, Jaiswal S, Wycoff K (2001) Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomol Eng* 18: 87-94

Lawerence SD, Novak NG (2001) A rapid method for production and characterization of recombinant insecticidal proteins in plants *Molecular Breeding* 8: 139-46

Lee RW, Strommer J, Hodgins D, Shewen PE, Niu Y, Lo RY (2001) Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infect Immun* 69: 5786-93

Leonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF (2000) Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* 74: 7730-7

Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab Eng* 4: 67-79

Li WX, Ding SW (2001) Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol* 12: 150-4

Li XH, Carrington JC (1995) Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 457-61

Lodish , Baltimore , Berk , Zipursky , Matsudaira , Darnell (1997) *Biologie moléculaire de la cellule*. DeBoeck Université

Lopez-Moya JJ, Pirone TP (1998) Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *J Gen Virol* 79 (Pt 1): 161-5

Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268: 716-9

Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, Hein MB, Lehner T (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 4: 601-6

Ma JK, Lehner T, Stabila P, Fux CI, Hiatt A (1994) Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. *Eur J Immunol* 24: 131-8

Mahajan S, Dolja VV, Carrington JC (1996) Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *J Virol* 70: 4370-9

Mahajan SK, Chisholm ST, Whitham SA, Carrington JC (1998) Identification and characterization of a locus (RTM1) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14: 177-86

Maia IG, Haenni A, Bernardi F (1996) Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J Gen Virol* 77 (Pt 7): 1335-41

Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP (2003) Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol* 51: 459-69

Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I (2001) Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75: 8434-9

Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5335-40

Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16: 1336-43

Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11745-9

Masuta C, Yamana T, Tacahashi Y, Uyeda I, Sato M, Ueda S, Matsumura T (2000) Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene-expression system for legume species. *Plant J* 23: 539-46

Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol* 27: 1163-72

Matsumura T, Itchoda N, Tsunemitsu H (2002) Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Arch Virol* 147: 1263-70

McCormick AA, Kumagai MH, Hanley K, Turpen TH, Hakim I, Grill LK, Tuse D, Levy S, Levy R (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 : 703-8

McCormick AA, Reini SJ, Cameron TI, Vojdani F, Fronefield M, Levy R, Tuse D (2003) Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti-idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig. *J Immunol Methods* 278: 95-104

McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H, Michaels FH (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology (N Y)* 13: 1484-7

McLain L, Porta C, Lomonosoff GP, Durrani Z, Dimmock NJ (1995) Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies raised to a glycoprotein 41 peptide expressed on the surface of a plant virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 327-34

Merits A, Rajamaki ML, Lindholm P, Runeberg-Roos P, Kekarainen T, Puustinen P, Makelainen K, Valkonen JP, Saarma M (2002) Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J Gen Virol* 83: 1211-21

Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K, Hooper DC, Koprowski H, Yusibov V (1998) Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2481-5

Mori M, Zhang GH, Kaido M, Okuno T, Furusawa I (1993) Efficient production of human gamma interferon in tobacco protoplasts by genetically engineered brome mosaic virus RNAs. *J Gen Virol* 74 (Pt 7): 1255-60

Nemchinov LG, Liang TJ, Rifaat MM, Mazyad HM, Hadidi A, Keith JM (2000) Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus. *Arch Virol* 145: 2557-73

Nicolas O, Laliberte JF (1992) The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *J Gen Virol* 73 (Pt 11): 2785-93

Ohya K, Matsumura T, Ohashi K, Onuma M, Sugimoto C (2001) Expression of two subtypes of human IFN-alpha in transgenic potato plants. *J Interferon Cytokine Res* 21: 595-602

Parmenter DL, Boothe JG, van Rooijen GJ, Yeung EC, Moloney MM (1995) Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol Biol* 29: 1167-80

Peng YH, Kadoury D, Gal-On A, Huet H, Wang Y, Raccah B (1998) Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J Gen Virol* 79 (Pt 4): 897-904

Pogue GP, Lindbo JA, Dawson W. O. , Turpen TH (1998) Tobamovirus transient expression vectors : tools for plant biology and high-level expression of foreign proteins in plants abstract no. Dordrecht: Kluwer). *Plant Molecular Biology Manual Edition* SB Gelvin, RA Schilperoot: 1-27

Pogue GP, Lindbo JA, Garger SJ, Fitzmaurice WP (2002) Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annu Rev Phytopathol* 40: 45-74

Porta C, Lomonossoff GP (2002) Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants. *Biotechnol Genet Eng Rev* 19: 245-91

Porta C, Spall VE, Loveland J, Johnson JE, Barker PJ, Lomonossoff GP (1994) Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* 202: 949-55

Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* 18: 1167-71

Riechmann JL, Cervera MT, Garcia JA (1995) Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *J Gen Virol* 76 (Pt 4): 951-6

Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73 (Pt 1): 1-16

Roggero P, Ciuffo M, Benvenuto E, Franconi R (2001) The expression of a single-chain Fv antibody fragment in different plant hosts and tissues by using Potato virus X as a vector. *Protein Expr Purif* 22: 70-4

Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL, Lucas WJ (1997) Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins . *Virology* 237: 283-95

Ruggiero F, Exposito JY, Bournat P, Gruber V, Perret S, Comte J, Olganier B, Garrone R, Theisen M (2000) Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett* 469: 132-6

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanchez F, Martinez-Herrera D, Aguilar I, Ponz F (1998) Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Res* 55: 207-19

Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Osadjan MD, Buetow DE (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res* 9: 127-35

Sardana RK, Alli Z, Dudani A, Tackaberry E, Panahi M, Narayanan M, Ganz P, Altosaar I (2002) Biological activity of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with seed glutelin peptide. *Transgenic Res* 11: 521-31

Schaad MC, Haldeman-Cahill R, Cronin S, Carrington JC (1996) Analysis of the VPg-proteinase (Nla) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* 70: 7039-48

Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16: 4049-59

Schillberg S, Fischer R, Emans N (2003) 'Molecular farming' of antibodies in plants. *Naturwissenschaften* 90: 145-55

Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, Fischer R (1999) Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Res* 8: 255-63

Scholthof HB (1999) Rapid delivery of foreign genes into plants by direct rub-inoculation with intact plasmid DNA of a tomato bushy stunt virus gene vector. *J Virol* 73: 7823-9

Scholthof KB, Mirkov TE, Scholthof HB (2002) Plant virus gene vectors: biotechnology applications in agriculture and medicine. *Genet Eng (N Y)* 24: 67-85

Sharp JM, Doran PM (2001a) Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells. *Biotechnol Bioeng* 73: 338-46

Sharp JM, Doran PM (2001b) Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol Prog* 17: 979-92

Siemering KR, Golbik R, Sever R, Haseloff J (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr Biol* 6: 1653-63

Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (N Y)* 8: 217-21

Soumounou Y, Laliberte JF (1994) Nucleic acid-binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. *J Gen Virol* 75 (Pt 10): 2567-73

St Laurent M, Marcil A, Verrette S, Lemieux R (1993) Functional cooperation among human IgG-specific murine monoclonal antibodies for the detection of weak blood group antibodies in routine agglutination tests. *Vox Sang* 64: 99-105

Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 18: 333-8

Stoger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P, Fischer R (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol* 42: 583-90

Sugiyama Y, Hamamoto H, Takemoto S, Watanabe Y, Okada Y (1995) Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett* 359: 247-50

Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, Tocchi M, Sardana R, Altosaar I, Ganz PR (1999) Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine* 17: 3020-9

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* 4: 607-9

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ (2000) Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 182: 302-5

Takamatsu N, Ishikawa M, Meshi T, Okada Y (1987) Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA *EMBO Journal* 6: 307-11

Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3358-61

Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 31: 1174-9

Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L, Nagy E (2000) Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine* 18: 2023-8

Turpen T (1989) Molecular cloning of a potato virus Y genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. *J Gen Virol* 70 (Pt 8): 1951-60

Turpen TH, Reinl SJ, Charoenvit Y, Hoffman SL, Fallarme V, Grill LK (1995) Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Biotechnology (N Y)* 13: 53-7

Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* 74: 157-75

Usha R, Rohll JB, Spall VE, Shanks M, Maule AJ, Johnson JE, Lomonossoff GP (1993) Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* 197: 366-74

Valdes R, Gomez L, Padilla S, Brito J, Reyes B, Alvarez T, Mendoza O, Herrera O, Ferro W, Pujol M, Leal V, Linares M, Hevia Y, Garcia C, Mila L, Garcia O, Sanchez R, Acosta A, Geada D, Paez R, Luis Vega J, Borroto C (2003) Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 94-100

Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S, Fischer R (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11128-33

Vaquero C, Sack M, Schuster F, Finnern R, Drossard J, Schumann D, Reimann A, Fischer R (2002) A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. *FASEB J* 16: 408-10

Verch T, Yusibov V, Koprowski H (1998) Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J Immunol Methods* 220: 69-75

Verchot J, Carrington JC (1995) Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *J Virol* 69: 1582-90

Verchot J, Koonin EV, Carrington JC (1991) The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185: 527-35

Vine ND, Drake P, Hiatt A, Ma JK (2001) Assembly and plasma membrane targeting of recombinant immunoglobulin chains in plants with a murine immunoglobulin transmembrane sequence. *Plant Mol Biol* 45: 159-67

Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC (1999) Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 772-7

Wigdorovitz A, Perez Filgueira DM, Robertson N, Carrillo C, Sadir AM, Morris TJ, Borca MV (1999) Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology* 264: 85-91

Wittmann S, Chatel H, Fortin MG, Laliberte JF (1997) Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234: 84-92

Woodard SL, Mayor JM, Bailey MR, Barker DK, Love RT, Lane JR, Delaney DE, McComas-Wagner JM, Mallubhotla HD, Hood EE, Dangott LJ, Tichy SE, Howard JA (2003) Maize (*Zea mays*)-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnol Appl Biochem* 38: 123-30

Yu J, Langridge WH (2001) A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotechnol* 19: 548-52

Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper DC, Koprowski H (1997) Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5784-8

Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, Co MS, Martinell BJ, Paradkar VM, Russell DR, Queen C, Cone RA, Whaley KJ (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat Biotechnol* 16: 1361-4

Zhang GG, Rodrigues L, Rovinski B, White KA (2002) Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol Biotechnol* 20: 131-6

