

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Développement d'un réplicon viral inductible dans les plantes à l'aide du virus de
la mosaïque du navet (TuMV) portant un gène rapporteur

Par
Chantal Beauchemin

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	François Shareck
Examineur externe	Louise Brisson
Directeur de recherche	Jean-François Laliberté

Mai 2003

Résumé

Les potyvirus sont des vecteurs intéressants pour la fabrication de protéines d'intérêt pharmaceutique dans les plantes. Leur génome formé d'un ARN monocaténaire est traduit en une seule polyprotéine et toutes les protéines virales sont présentes en quantité équimolaire dans la cellule infectée. Toutefois, les gènes étrangers au génome viral ont tendance à être délétés suite à une propagation prolongée dans une plante.

Notre hypothèse de travail est que l'introduction d'une copie silencieuse de l'ADNc viral dans le génome de la plante (*Nicotiana tabacum*) réduirait les risques de délétion du gène d'intérêt au cours de la croissance de la plante. Au moment opportun, la transcription du virus serait induite; à ce moment, les protéines virales et d'intérêt seraient produites.

Pour démontrer notre hypothèse, nous avons utilisé deux espèces de plantes différentes : *Brassica perviridis* et *Nicotiana tabacum*. Nous avons infecté ces plantes par le bombardement particulaire afin d'effectuer des études d'expression transitoire. Les constructions plasmidiques fixées sur des microparticules d'or contenaient l'ADNc viral modifié.

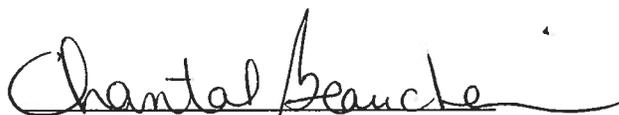
Nous avons d'abord montré que l'introduction d'un gène rapporteur dans l'ADNc du TuMV entre les gènes codant pour P1 et HC-Pro affecte peu l'infectivité du virus chez *B. perviridis*. En effet, nous avons obtenu des symptômes systémiques suite au bombardement avec les constructions p35Tunos/GFP et p35Tunos/GUS où la transcription de l'ADNc du TuMV se trouve sous le contrôle du promoteur constitutif 35S. De plus, nous avons observé l'expression des gènes rapporteurs dans les plantes infectées.

Nous avons ensuite rendu inductible la transcription de l'ADNc du TuMV. Le promoteur choisi a été le promoteur Top10 (P_{Top10}) inductible au dexaméthasone et la construction associée était pTopTunos. La transcription a été possible en présence de l'activateur de transcription TGV et de l'inducteur le dexaméthasone (dx). Mais en

absence de l'inducteur et du facteur de transcription TGV, une transcription est tout de même effectuée puisque des symptômes d'infection systémique ont été visibles sur quelques plantes.

Afin de réduire les risques de transcription spontanée chez les plantes transgéniques de *N. tabacum* exprimant le TuMV chimérique, nous avons développé un système de complémentation. Une mutation pour obtenir les acides aminés « VNN » de la polymérase virale dans le motif GDD abolirait sa fonction. La polymérase serait complétementée en *trans* par une polymérase fonctionnelle inductible se trouvant sur une autre construction. Cette polymérase fonctionnelle se trouverait dans le génome de la plante sous le contrôle du P_{Top10} . Des essais d'expression transitoire sur des feuilles de *N. tabacum* avec les différentes constructions TuMV/GFP-VNN ou TuMV/GUS-VNN complétementées avec la polymérase ont montré que le système est réalisable. En effet, nous avons observé l'expression des gènes rapporteurs dans les feuilles bombardées.

Nous avons alors plusieurs évidences qui supportent notre hypothèse voulant qu'il soit possible d'introduire un gène étranger dans le génome du TuMV et de rendre son expression inductible.


Chantal Beauchemin


Jean-François Laliberté,
directeur de recherche

Table des matières

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Chapitre 1.....	1
Introduction.....	1
1 La moléculture.....	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Exemples de plantes productrices de protéines pharmaceutiques.....	3
1.3 Création de plantes transgéniques.....	8
1.3.1 Processus de transformation.....	8
1.3.2 Caractéristiques des constructions géniques.....	10
1.3.3 Les promoteurs inductibles naturels.....	11
1.3.4 Les promoteurs inductibles synthétiques.....	12
1.3.5 P _{Top10} : Grands principes de fonctionnement.....	13
2 Les vecteurs viraux.....	16
2.1 Exemples d'utilisation des vecteurs viraux.....	16
2.2 Les potyvirus.....	19
2.2.1 Généralités.....	19
2.2.2 Propriétés génomiques.....	20
2.2.3 Caractéristiques des protéines.....	20
2.2.4 Les potyvirus comme vecteur viral.....	23
2.3 Avantages et inconvénients du vecteur viral.....	24
3 Hypothèse et objectifs de travail.....	28
3.1 Insertion d'un gène rapporteur.....	28
3.2 Système inductible.....	29
3.3 La complémentation.....	29
Chapitre 2.....	31
Matériel et Méthodes.....	31
1 Milieu de croissance des cellules.....	31
2 Souches.....	32
3 Vecteurs.....	32
3.1 p35Tunos.....	32
3.2 pBinHygTopFree _{mod} et pBinTGV.....	32
3.3 pBin <i>m-gfp5</i> -ER.....	33
3.4 pBI221.....	33
4 Méthodes de clonage.....	34
4.1 Mutagenèse dirigée par PCR.....	34
4.2 Ligation.....	34
4.3 Transformation.....	34
4.3.1 Choc thermique.....	37
4.3.2 Électroporation.....	37

4.4	Hybridation <i>in situ</i>	37
4.5	Extraction d'ADN	38
5	Transfection de cellules végétales	39
5.1	Bombardement particulaire	39
5.1.1	Préparation des billes d'or	39
5.1.2	Bombardement de plantes de <i>Brassica perviridis</i>	40
5.1.3	Bombardement de feuilles de <i>Nicotiana tabacum</i>	40
5.1.4	Cellules de <i>Nicotiana tabacum</i>	42
5.2	Transfection chimique de protoplastes.....	42
5.3	Induction de l'expression virale	44
6	Observation de l'expression des gènes rapporteurs	45
6.1	Protéine de fluorescence verte	45
6.2	β -Glucuronidase.....	45
6.3	Immunobuvardage.....	46
6.4	Stabilité des gènes rapporteurs	47
Chapitre 3	49
Résultats	49
1	Insertion d'un gène rapporteur dans le plasmide infectieux p35Tunos.....	49
1.1	Construction de p35Tunos/GFP et de p35Tunos/GUS.....	49
1.2	Infection systémique de <i>B. perviridis</i> avec p35Tunos/GFP et p35Tunos/GUS	53
1.3	Observation de l'expression des gènes rapporteurs	56
1.3.1	La Protéine de fluorescence verte	56
1.3.2	La β -Glucuronidase	56
1.3.3	Analyse de la stabilité de l'insert	59
2	Élaboration d'un système d'induction.....	61
2.1	Construction de pTopTunos et ses dérivés	61
2.2	Infection de <i>Brassica perviridis</i> avec pTopTunos et ses dérivés.....	61
2.3	Observation de l'expression des gènes rapporteurs.....	63
3	Système inductible par la complémentarité de la polymérase virale.....	66
3.1	Constructions de p35Tunos/GFP-VNN et de p35Tunos/GUS-VNN	66
3.2	Expression transitoire sur <i>Nicotiana tabacum</i>	68
3.2.1	Cellules de tabac BY-2	68
3.2.2	Bombardement de feuilles sur <i>Nicotiana tabacum</i> /TGV.....	70
Chapitre 4	75
Discussion	75
1	Insertion d'un gène rapporteur	75
2	Système d'expression inductible	80
3	Perspectives d'avenir	85
Conclusion	86
Remerciements	88
Bibliographie	89

Liste des figures

Figure 1 : Transformation de cellules végétales.	9
Figure 2 : Fonctionnement du promoteur P _{Top10}	15
Figure 3 : Cycle de réplication des phytovirus à ARN monocaténaire de polarité positive.	17
Figure 4 : Stratégie d'expression des protéines des potyvirus.	22
Figure 5 : Emplacements connus pour l'ajout de gènes d'intérêt.	22
Figure 6 : Schématisation de l'instabilité génétique d'un gène étranger dans le génome viral.	27
Figure 7 : Hypothèse de travail à long terme.	30
Figure 8 : Bombardement particulaire.	41
Figure 9 : Position des gènes rapporteurs dans TuMV/GFP et TuMV/GUS.	50
Figure 10 : Cartes de restriction de p35Tunos et de p35Tunos/SacII.	51
Figure 11 : Cartes de restriction de p35Tunos/GFP et de p35Tunos/GUS.	52
Figure 12 : Plantes de <i>Brassica perviridis</i> saine et infectée au TuMV.	55
Figure 13 : Détection de la protéine de la capsidite et de la protéine de fluorescence verte.	57
Figure 14 : Fluorescence de la GFP sur des feuilles de <i>B. perviridis</i> non-infectée et infectée avec TuMV/GFP.	57
Figure 15 : Feuilles de <i>B. perviridis</i> non-infectées et infectées avec TuMV/GUS.	58
Figure 16 : Détection des protéines de la capsidite et de la β -glucuronidase.	58
Figure 17 : Analyse par RT-PCR de la stabilité des inserts dans le TuMV.	60
Figure 18 : Cartes de restriction de p35Tunos/StuI et de pBinHygTopFree _{mod}	62
Figure 19 : Détection de la protéine de la capsidite sur des plantes de <i>B. perviridis</i> bombardées avec pTopTunos.	64
Figure 20 : Feuille de <i>B. perviridis</i> bombardée avec pTopTunos/GUS.	65
Figure 21 : Carte de restriction de p35Tunos/GFP-VNN.	67
Figure 22 : Détection de la protéine de la capsidite sur des feuilles de <i>N. tabacum</i> /TGV suite à la complémentation de TuMV/GFP-VNN par la RdRp fonctionnelle.	73
Figure 23 : Feuilles de <i>N. tabacum</i> /TGV suite au bombardement avec TuMV/GUS-VNN complétement avec la RdRp.	74

Liste des tableaux

Tableau I : Production de vaccins dans les plantes transgéniques.....	5
Tableau II : Production d'anticorps dans les plantes transgéniques	6
Tableau III : Production de produits pharmaceutiques dans les plantes transgéniques	7
Tableau IV : Promoteurs inductibles synthétiques.....	15
Tableau V : Protéines d'intérêt médical ou agricole exprimées dans les plantes via les vecteurs viraux	18
Tableau VI : Amorces utilisées pour ajouter un gène rapporteur entre P1 et HC- Pro.....	35
Tableau VII : Amorces utilisées pour changer le promoteur de p35Tunos et pour insérer la mutation VNN dans la polymérase.	36
Tableau VIII : Résultats obtenus suite à la transfection par bombardement particulaire de plantes de <i>B. perviridis</i> par p35Tunos, p35Tunos/SacII, p35Tunos/GFP et p35Tunos/GUS.	54
Tableau IX : Résultats obtenus suite à la transfection par bombardement particulaire de plantes de <i>B. perviridis</i> par pTopTunos, pTopTunos/GFP et pTopTunos/GUS.....	64
Tableau X : Comparaison de la fluorescence obtenue suite au bombardement de cellules BY-2 avec p35Tunos/GFP ou p35Tunos/GFP-VNN.....	69
Tableau XI : Comparaison de la fluorescence obtenue suite à la transfection chimique de protoplastes BY-2 avec p35Tunos/GFP ou p35Tunos/GFP-VNN69	
Tableau XII : Résultats obtenus 48 heures après le bombardement particulaire de feuilles de <i>N. tabacum</i> /TGV par p35Tunos/GFP, pTopTunos/GFP, p35Tunos/GFP-VNN et p35Tunos/GFP-VNN	69
Tableau XIII : Comparaison de l'activité enzymatique de la β -glucuronidase représentée par la quantité de plages bleues sur des feuilles de <i>N.</i> <i>tabacum</i> /TGV bombardées avec le TuMV/GUS et incubées 16 heures dans le X-Gluc.	73

Chapitre 1

Introduction

1 La moléculaire

1.1 Généralités

La population vieillissante requiert une plus grande quantité de médicaments à moindre coût. Les pays en développement ont aussi un besoin criant de traitements à prix abordables. Il est alors important de développer de nouvelles stratégies de synthèse de produits bio-pharmaceutiques plus efficaces et économiques que les procédés actuels.

En ce moment, les protéines recombinantes d'intérêt bio-pharmaceutique telles l'insuline ou l'érythropoïétine sont généralement produites dans des cellules de mammifères, d'insectes, de champignons ou de procaryotes (Giddings et *al.*, 2000). L'avantage majeur des cultures de cellules de mammifères et de tissus d'insecte est la synthèse et la modification post-traductionnelle adéquate de la protéine d'intérêt. Par contre, les niveaux d'expression sont généralement faibles et les coûts de production sont élevés. De plus, les cellules de mammifères sont très sensibles aux conditions de culture tels la variation de température, le pH, l'oxygène et certains métabolites qui peuvent affecter significativement la fermentation et la pureté du produit. D'autre part, les cellules de procaryotes et de champignons offrent un système d'expression moins exigeant et une production plus élevée que les cellules de mammifères ou d'insectes. Cependant, la synthèse et la conformation de ces produits ne sont pas toujours appropriées à cause de différences dans les voies métaboliques, dans les modifications des protéines, dans l'usage de codons et dans la formation de corps d'inclusion. Finalement, la purification de produits bio-pharmaceutiques à partir d'un système de

culture cellulaire est très coûteuse et la présence de contaminants dangereux pour la santé humaine est un risque possible.

La moléculature est la production de protéines recombinantes dans les plantes et les animaux (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 1998). La production de protéines bio-pharmaceutiques dans les plantes présente des avantages par rapport aux méthodes utilisées actuellement et mentionnées ci-dessus (Giddings et *al.*, 2000; Raskin et *al.*, 2002). Par exemple, les plantes ont l'avantage de respecter les modifications post-traductionnelles eucaryotiques comme l'assemblage multimérique et certaines étapes de la glycosylation. La synthèse de protéines d'intérêt peut être localisée dans des organes précis de la plante, ce qui permet de simplifier la purification de ces protéines. L'étape de purification peut aussi être éliminée en exprimant le gène dans des parties comestibles de la plante. De plus, le taux de synthèse de protéines recombinantes est parfois élevé : des rendements de 1mg/g de poids sec ont déjà été obtenus pour une expression cytosolique. Aussi, les risques de contamination avec des endotoxines et des microorganismes pathogènes pour les humains sont diminués puisque les humains ne seraient pas des hôtes potentiels pour la plupart des phytopathogènes. Finalement, comme les infrastructures nécessaires à la production à grande échelle de plantes agricoles sont déjà en place, les coûts de production seraient alors diminués.

En laboratoire, *Nicotiana sp.* est le modèle de plante le plus souvent utilisé et les premiers anticorps recombinants à être exprimés dans les plantes ont été produits dans *N. tabacum* en 1988 (During, 1988). Ces plantes sont connues et faciles à transformer et à étudier. Mais, puisque ces plantes ne sont pas comestibles, leur utilisation en moléculature nécessite des étapes de purification de la protéine recombinante. D'autres espèces telles la tomate ou la pomme de terre ont par la suite été étudiées pour servir de manufacture à médicament comestibles.

1.2 Exemples de plantes productrices de protéines pharmaceutiques

Plusieurs compagnies et laboratoires ont développé des stratégies intéressantes pour la confection de plantes pouvant exprimer des vaccins contre des maladies humaines et animales (Tableau I), des anticorps qui pourraient conférer une protection à court terme contre des agents infectieux (Tableau II) ainsi que des protéines thérapeutiques (Tableau III) (Giddings et *al.*, 2000). En ce moment, les plantes productrices de protéines bio-pharmaceutiques ne sont pas encore sur le marché (Raskin et *al.*, 2002). Seulement quelques produits sont en phase clinique.

Dans cette section, deux exemples de production de vaccin contre le virus de l'hépatite B sont présentés. Dans le premier cas, l'antigène de surface du virus humain de l'hépatite B (HBsAg) est synthétisé par une plante de tabac tandis que dans le deuxième exemple, le vaccin est comestible puisqu'il a été développé dans la pomme de terre.

Actuellement, la production de vaccins contre le virus de l'hépatite B est coûteuse et n'est pas facilement accessible pour les pays en développement. Il est produit à partir d'une culture de levure exprimant le HBsAg. Le rHBsAg est extrait et doit être traité chimiquement pour retrouver sa conformation initiale en particule « virus-like » (VLP) afin d'être efficace (Kong et *al.*, 2001).

L'équipe de Mason et Arntzen (Mason et *al.*, 1992; Thanavala et *al.*, 1995) a développé une plante de tabac (*Nicotiana tabacum*) transgénique exprimant HBsAg (Tableau I). Le rHBsAg synthétisé par les plantes de tabac ont des caractéristiques similaires à l'antigène sauvage : il est retrouvé dans les feuilles sous forme VLP d'environ 22nm, il a des propriétés physiques similaires aux HBsAg dérivés de sérum humain et il est reconnu par des anticorps monoclonaux contre le HBsAg. Les protéines purifiées des feuilles de tabac exprimant le rHBsAg ont été injectées à des souris. Celles-ci ont développé une réponse immunitaire qualitativement similaire à celle obtenue avec le vaccin commercial dérivé de la levure. Les IgM et toutes les sous-classes spécifiques des IgG ont été retrouvés dans le sérum des souris vaccinées avec le rHBsAg de tabac, tout

comme avec le rHBsAg commercial de levure. Aussi, les souris ont développé une réponse spécifique des cellules T au HBsAg. Ces cellules qui ont été en contact avec le rHBsAg dérivé du tabac pouvaient par la suite être stimulées *in vitro* par le rHBsAg dérivé du tabac ou de la levure (commercial) ainsi que par un peptide synthétique représentant une région spécifique du HBsAg (déterminant *a* localisé dans la région S du HBsAg). Il a donc été démontré que les épitopes reconnus des cellules B et T spécifiques au HBsAg ont été préservés lors de l'expression de l'antigène dans une plante transgénique.

Cette même équipe a aussi développé un vaccin comestible contre le virus de l'hépatite B dans les pommes de terre (*Solanum tuberosum*) (Richter et *al.*, 2000; Kong et *al.*, 2001). Ce type de vaccin pourrait être efficace afin d'augmenter l'immunité dans les muqueuses, comme c'est le cas des maladies entériques, respiratoires ou celles transmises sexuellement. Des souris ont été nourries une fois par semaine pendant trois semaines avec 5 g de tubercules pelés et crus contenant une dose d'environ 42 µg de rHBsAg. Ces tubercules étaient enrobés d'un adjuvant. Les souris ont développé une réponse humorale efficace. Aussi, une dose de rappel injectée avec le rHBsAg commercial de levure a montré que les souris étaient dotées de cellules mémoires. Selon cette étude, l'antigène se situerait dans les cellules des tubercules, attaché aux vésicules sous forme de VLP. Ainsi, la cellule jouerait un rôle de biocapsule en protégeant l'antigène de la dégradation dans l'intestin. Le vaccin comestible pourrait donc être une alternative intéressante aux vaccins traditionnels. Il est de plus en plus évident que les plantes offrent des avantages pour la production de protéines recombinantes. Il est à prédire que leur utilisation sera répandue dans les années à venir.

Tableau I : Production de vaccins dans les plantes transgéniques

Application potentielle	Plantes	Protéine	Références
Virus de l'hépatite B	Tabac/ Pomme de terre	rHBsAg	Ma et Hiatt, 1996 Tacket et Mason, 1999; Richter et <i>al.</i> , 2000; Kong et <i>al.</i> , 2001
Carie dentaire	Tabac	Protéine de surface SpaA de <i>Streptococcus mutans</i>	Tacket et Mason, 1999
Choléra et diarrhée causée par <i>E. coli</i>	Tabac/Pomme de terre	Entérotoxine LT-B labile à la chaleur de <i>E. coli</i>	Tacket et Mason, 1999
Choléra	Pomme de terre	Sous-unités des toxines CtoxA et CtoxB de <i>V. cholerae</i>	Fischer et <i>al.</i> , 2000
Diarrhée due au Virus de Norwalk	Tabac/Pomme de terre	Protéine de la capsid du Virus de Norwalk	Dixon et Arntzen, 1997
Rage	Tabac/Épinard	Glycoprotéine du virus de la rage	McGarvey et <i>al.</i> , 1995
SIDA	Tabac/fève noire (blackeyed bean)	Épitope du VIH (gp120)	Doran, 2000;

Adapté de l'article de Giddings et *al.*, 2000

Tableau II : Production d'anticorps dans les plantes transgéniques

But	Plantes	Protéine	Références
Immunoglobuline			
Synthèse d'Ig sécrétoires pour le traitement de la carie dentaire	Tabac	Hybride spécifique sIgA-G pour antigène II de <i>S. mutans</i>	Smith et Glick, 2000; Ma et Hiatt, 1996
Synthèse de IgG1	Tabac	IgG spécifique pour protéine de surface de <i>S. mutans</i> (SA I/II)	Hiatt et <i>al.</i> , 1989; Ma et Hiatt, 1996
Assemblage et sécrétion de IgG	Tabac	IgG spécifique pour la créatine kinase humaine	Conrad et <i>al.</i> , 1998
Fragment Fv à chaîne unique			
Accumulation et entreposage de protéines dans les tubercules	Pomme de terre	scFv lié au phytochrome	Conrad et <i>al.</i> , 1998; Hamamoto et <i>al.</i> , 1993
Traitement de lymphome non-Hodgkinien	Tabac	scFv de IgG de cellules B de lymphome de souris	McCormick et <i>al.</i> , 1999
Production d'antigène marqueur associé aux tumeurs	Céréales	scFvT84.66 contre les antigènes carcinoembryogéniques	Stoger et <i>al.</i> , 2000

Adapté de l'article de Giddings et *al.*, 2000.

Tableau III : Production de produits pharmaceutiques dans les plantes transgéniques

Application potentielle	Plantes	Protéine	Références
Anticoagulant			
Voie de synthèse de la protéine C	Tabac	Protéine C humaine	Cramer, 1996
Inhibiteurs indirects de thrombine	Tabac, colza, moutarde	variant 2 de l'hirudine humaine	Parmenter, 1995; Boothe et <i>al.</i> , 1997
Protéines/hormones recombinantes			
Neutropénie	Tabac	Facteur de stimulation de colonie de granulocyte-macrophage humain	Ganz et <i>al.</i> , 1996; Goddijn et Pen, 1995
Anémie	Tabac	Erythropoïétine humaine	Ganz et <i>al.</i> , 1996; Goddijn et Pen, 1995
Réparation de blessures/ contrôle prolifération cellulaire	Tabac	Facteur de croissance épidermal humain	Ganz et <i>al.</i> , 1996; Goddijn et Pen, 1995
Traitement de l'hépatite B et C	Riz, navet	Interféron- α humain	Ganz et <i>al.</i> , 1996; Goddijn et Pen, 1995
Cirrhose du foie	Pomme de terre, tabac	Albumine de sérum humain	Ganz et <i>al.</i> , 1996; Goddijn et Pen, 1995; Sijmons et <i>al.</i> , 1990
Substituts du sang	Tabac	Hémoglobine humaine	Halling-Sørensen et <i>al.</i> , 1998
Collagène	Tabac	Collagène-1 homotrimérique humain	Halling-Sørensen et <i>al.</i> , 1998
Inhibiteurs de Protéines/Peptides			
Inhibiteur de trypsine pour la transplantation	Maïs	Aprotinine humaine	Zhong et <i>al.</i> , 1999
Hypertention	Tabac, tomate	Enzyme angiotensine-1-convertant	Hamamoto et <i>al.</i> , 1993
Thérapie du VIH	<i>Nicotiana benthamiana</i>	α -trichosanthine de la protéine de capsid de TMV-U1	Kumagai et <i>al.</i> , 1993
Enzymes recombinantes			
Maladie de Gaucher	Tabac	Glucocérébrosidase	Cramer, 1996; Cramer et <i>al.</i> , 1999
Nutraceutiques			
Déficience en provitamine A	Riz	Daffodil phytoène synthase	Burkhardt et <i>al.</i> , 1997
Déficience en acides aminés	Pomme de terre	Albumine de graine Ama1 de <i>Amaranthus hypochondiracus</i>	Chakraborty et <i>al.</i> , 2000

Adapté de l'article de Giddings et *al.*, 2000.

1.3 Création de plantes transgéniques

1.3.1 Processus de transformation

Dans les exemples décrits précédemment, la transformation des plantes de tabac et de pomme de terre pour leur transférer le gène codant pour le HBsAg dans leur génome a été réalisée par l'agroinfection médiée par *Agrobacterium tumefaciens*. D'autres méthodes existent, tel le bombardement particulaire. Ces deux méthodes de transformation sont présentées ci-dessous.

A. tumefaciens est une bactérie Gram négative phytopathogène qui vit dans le sol. Elle renferme le plasmide Ti (tumor-inducing) en plus de son chromosome bactérien (www.colostate.edu; Snyder et Champness, 1997). Ce plasmide Ti contient un fragment d'ADN, l'ADN-T (~20kb), qui est transféré dans la cellule de la plante en processus d'infection. Le plasmide Ti contient aussi une série de gènes de virulence (*vir*) qui dirigent le processus d'infection et permettent le transfert de l'ADN-T du plasmide Ti au génome végétal. L'intégration de l'ADN-T dans le génome des cellules végétales se fait de façon aléatoire. Dans la nature, *A. tumefaciens* cause le développement de tumeurs chez la plante infectée. En laboratoire, les gènes de l'ADN-T qui causent ces tumeurs sont remplacés par les gènes d'intérêt. *A. tumefaciens* qui porte un plasmide Ti modifié transfère les gènes d'intérêts dans le génome de cellules infectées (Figure 1A). Généralement, cette bactérie infecte les cellules de plantes dicotylédones, tels les plantes de tabac et de pomme de terre (<http://dragon.zoo.utoronto.ca>).

Le bombardement particulaire consiste à fixer de l'ADN linéaire ou circulaire portant le gène d'intérêt sur des microparticules d'or ou de tungstène. Ces billes sont par la suite projetées à une vitesse élevée sur un disque foliaire (Figure 1B). La force de l'impact doit permettre aux microparticules de pénétrer dans le noyau de quelques cellules du disque foliaire. L'ADN y est libéré et intégré au génome de la plante de façon aléatoire. Cette technique est utilisée principalement pour transformer les cellules de plantes monocotylédones, comme le maïs et le riz (<http://dragon.zoo.utoronto.ca>).

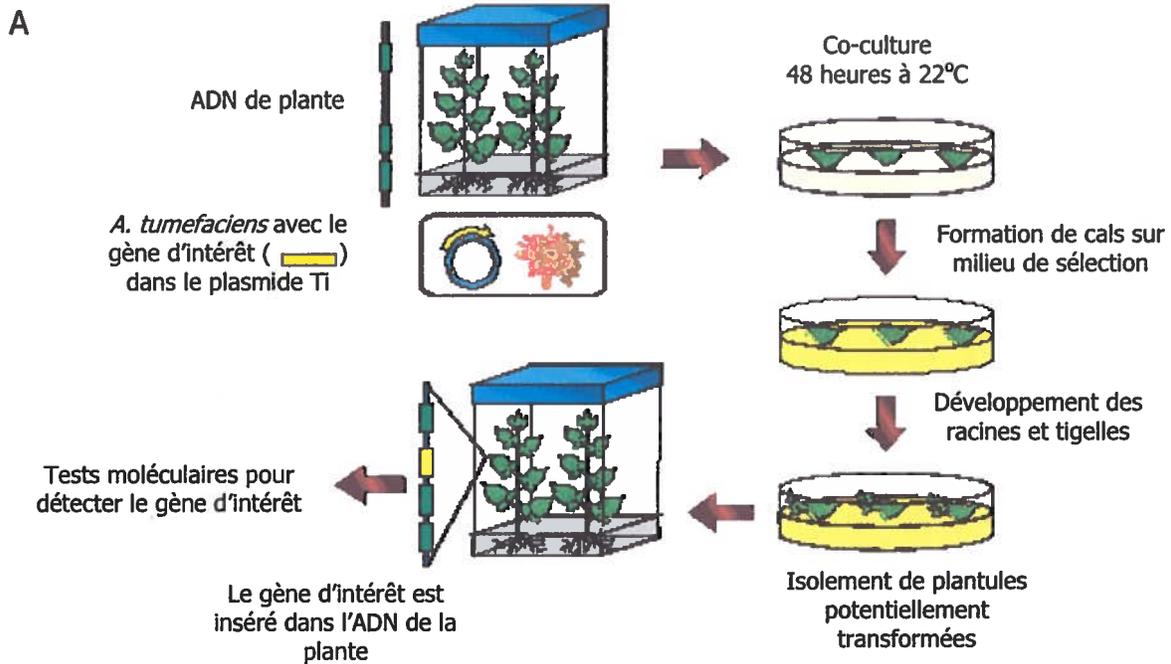
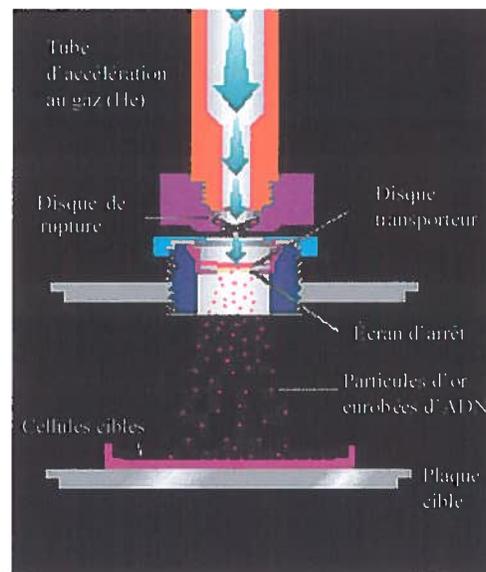
**B**

Figure 1 : Transformation de cellules végétales.

A) Agrobioinfection. *Agrobacterium tumefaciens* portant un gène d'intérêt (ADN-T) dans son plasmide Ti est mise en présence de disques foliaires pour une co-culture de 48 heures. Les disques foliaires sont ensuite transférés sur un milieu de culture contenant un agent de sélection pour la régénéscence des cellules transformées (cals). Les plantules transformées avec le gène d'intérêt montrent la croissance de racines et de tiges et sont cultivées dans un milieu adéquat pour la régénéscence d'une plante complète (Adapté de www.cipotato.org).

B) Bombardement particulaire. Les billes d'or enrobées d'ADN sont déposées sur un disque transporteur. Les billes sont pulvérisées 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 cibles ainsi que d'empêcher le disque transporteur de se retrouver sur la plaque cible (Adapté de www.mgk.hu/inst/wheat/image17.jpg). Comme pour l'agrobioinfection, les cellules cibles sont ensuite transférées sur un milieu de culture contenant un agent de sélection pour la régénéscence des cellules transformées.

1.3.2 Caractéristiques des constructions géniques

Puisque ce ne sont que quelques cellules végétales qui intègrent le gène d'intérêt dans leur génome lors de la transformation, il est nécessaire d'introduire un gène de sélection en même temps que le gène d'intérêt. Ceci favorisera dès le départ la croissance des cellules transformées. Pour l'agroinfection, ce gène de sélection est inséré dans l'ADN-T. Pour le bombardement particulaire, il peut être sur le même plasmide que le gène d'intérêt ou dans une autre construction qui se trouvera sur la même particule d'or. Ce gène de sélection est souvent un gène de résistance à un antibiotique comme la kanamycine (Snyder et Champness, 1997).

Afin d'assurer la transcription du gène d'intérêt, une séquence promotrice y est ajoutée en amont. La plupart des promoteurs utilisés dans les plantes transgéniques sont constitutifs, comme le promoteur 35S ($P_{CaMV\ 35S}$) provenant du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) (Aoyama et Chua, 1997; Böhner et Gatz, 2001; www.colostate.edu). Dans bien des cas de transformation, que ce soit à l'aide de l'agroinfection ou du bombardement particulaire, le gène d'intérêt se trouve sous le contrôle de ce promoteur car il résulte généralement en un degré très élevé d'expression dans les plantes (Mori et *al.*, 2001). Ce promoteur mène à une synthèse constante du produit ciblé et permet une expression non spécifique à un tissu.

Par contre, des études ont montré que les rendements des protéines d'intérêt synthétisées à partir du $P_{CaMV\ 35S}$ ne sont pas suffisants pour une production massive de produits bio-parmaceutiques; parfois la production est très faible. Par exemple, l'accumulation d'albumine de sérum humain est de 0,02% des protéines solubles totales (PST) et la protéine C humaine est de 0,001%. Alors, il peut être nécessaire de restreindre l'expression dans un organe de la plante, comme les graines en utilisant le promoteur adéquat, P_{Gt3} par exemple.

Il n'est pas toujours approprié d'exprimer les protéines d'intérêt en tout temps (Zuo et Chua, 2000). Dans certains cas, l'expression constante des gènes choisis pourrait avoir des effets nuisibles sur la plante, voire toxique et bloquer la régénération de la plante. Ces effets létaux peuvent d'une certaine façon être contournés en utilisant un promoteur tissu-spécifique. Mais les systèmes d'expression inductible offrent une solution plus générale et flexible. Deux grandes catégories de promoteurs inductibles existent : les promoteurs naturels et les promoteurs synthétiques.

1.3.3 Les promoteurs inductibles naturels

Certains promoteurs inductibles naturels utilisés en biotechnologie sont endogènes (Gatz et Lenk, 1998). Ces promoteurs répondent naturellement à des stimuli spécifiques rencontrés par les plantes. Par exemple, le promoteur PR-1a est naturellement induit par l'attaque de pathogènes, le stress oxydatif et la sénescence des feuilles. Il répond aussi au benzothiadiazole (BTH) (Gorlach et *al.*, 1996). Ce composé peut être appliqué de façon à obtenir une expression locale des gènes d'intérêt.

Plusieurs promoteurs inductibles naturels proviennent d'autres organismes (Gatz et Lenk, 1998). Ceux-ci permettent de mieux contrôler dans le temps l'expression des gènes d'intérêt étant donné que les inducteurs ne sont pas présents naturellement dans la plante. Le gène de régulation du promoteur doit aussi être exprimé dans la plante transgénique en plus du gène d'intérêt. Certains de ces promoteurs ont été trouvés chez les procaryotes, comme le promoteur Tet. Ce promoteur contrôle l'expression du gène de résistance à la tétracycline et est régulé par cet antibiotique. Un autre type de promoteur rencontré est le promoteur Gal4 de la levure qui est régulé par la présence du galactose.

1.3.4 Les promoteurs inductibles synthétiques

Les promoteurs inductibles synthétiques remplacent de plus en plus les promoteurs naturels. La construction des promoteurs synthétiques est généralement basée sur des composantes de promoteurs naturels. Plusieurs modifications de séquences améliorent la spécificité de l'induction et la puissance de l'expression. En général, le site du promoteur qui lie le facteur de transcription est répété en de multiples copies en tandem (Zuo et Chua, 2000). De plus, ce tandem est fusionné à un promoteur minimal, tel le promoteur tronqué P_{CaMV 35S}. Ce dernier contient entre autre la boîte TATA nécessaire à la transcription dans la plante.

Afin d'obtenir un meilleur contrôle de la transcription du gène d'intérêt, le facteur de transcription est chimérique et se trouve sous sa forme inactive dans le cytoplasme (Zuo et Chua, 2000). Généralement, il est composé d'un domaine de liaison à l'ADN qui reconnaît le promoteur inductible, du transactivateur VP16 du virus *Herpes simplex* ainsi que d'un récepteur d'hormone stéroïdienne. Les mécanismes de régulation des récepteurs d'hormones animaux sont très bien documentés. En absence du ligand, le récepteur est séquestré en un monomère dans le cytosol par un complexe de protéines de régulation cellulaire, dont une protéine de choc à la chaleur (hsp). En présence du ligand, les protéines de régulation sont relâchées, le récepteur se dimérise et est transporté au noyau. Quelques promoteurs synthétiques développés pour l'induction de gènes d'intérêt dans les plantes sont présentés dans le tableau IV.

L'expression du gène d'intérêt dans les plantes transgéniques est très variable (van Leeuwen et al., 2001). Cette variabilité a été observée au sein d'une même plante et aussi entre des plantes transformées de façon indépendante. L'activité de promoteurs différents peut être une cause de cette variation entre les plantes. Par contre, lorsque le nombre de copies et la nature du transgène sont identiques, plusieurs autres facteurs peuvent influencer la régulation temporelle de l'expression du gène d'intérêt. Le site d'intégration du transgène (effet de positionnement) ainsi que l'âge des cellules sont les principaux facteurs en cause dans les variations de l'expression du transgène. L'effet de

positionnement est une conséquence due à la structure de la chromatine entourant le transgène qui diffère selon le locus dans lequel il a été intégré. Les variations dans le temps entre les cellules au sein d'une plante ou d'une feuille sont aussi des conséquences de la structure de la chromatine qui peut être modifiée dans le temps selon les gènes environnants; la distribution des facteurs de transcription diffère aussi selon l'âge des cellules. Ces phénomènes pourraient faire en sorte qu'il y ait une variabilité dans l'accessibilité des facteurs de transcription selon le site d'intégration dans le génome de la plante et l'âge des cellules.

1.3.5 P_{Top10} : Grands principes de fonctionnement

Le promoteur P_{Top10} est un promoteur synthétique inductible (Böhner et *al.*, 1999; Böhner et Gatz, 2001) (Tableau IV). Il est constitué de sept opérateurs *tet* en amont de la séquence minimale du P_{CaMV 35S} (de -48 à +1). L'expression du gène d'intérêt peut être régulée par plusieurs facteurs de transcription différents selon l'activité recherchée.

Le facteur de transcription TetR seul permet une dé-répression de l'expression du gène d'intérêt en présence de la tétracycline (Gatz et *al.*, 1992; Gatz, 1997; Gatz et Lenk, 1998). Il est constitué du domaine de liaison à l'ADN *Tn10* codant pour le répresseur procaryotique Tet (TetR). TetR lie les opérateurs *tet* avec une grande affinité en absence de la tétracycline. L'application de l'antibiotique relâche le facteur de transcription, relevant la répression. Le répresseur TetR peut être converti en activateur (tétracycline transactivateur, tTA) par sa fusion avec la séquence d'activation de la protéine VP16 du virus *herpes simplex* (Weinmann et *al.*, 1994). L'abolition de la liaison du tTA aux opérateurs *tet* par l'application de tétracycline empêche l'expression du gène d'intérêt.

Finalement, le facteur de transcription chimérique TGV permet un contrôle plus raffiné de l'expression (Böhner et *al.*, 1999; Böhner et Gatz, 2001). La structure de TGV est basée sur celle du tTA. Il est constitué du domaine TetR; la liaison peut donc être efficacement abolie en présence de tétracycline. TetR est fusionné au domaine de liaison

à l'hormone du récepteur de glucocorticoïde de rat (GR). Ce domaine permet la séquestration du facteur de transcription dans le cytoplasme en absence de l'inducteur et le transport vers le noyau pour en présence d'une hormone stéroïdienne telle le dexaméthasone (Figure 2). Finalement, tout comme tTA, TGV contient le domaine d'activation de VP16 qui permet de débiter la transcription suite à la liaison du facteur de transcription au promoteur spécifique P_{Top10} .

L'utilisation du facteur de transcription TGV est plus avantageuse que TetR et tTA (Böhner et *al.*, 1999; Böhner et Gatz, 2001). La régulation de l'expression des gènes d'intérêt par TetR et tTA nécessitent un apport constant de tétracycline pour dé-réprimer ou pour inactiver la transcription respectivement. La demi-vie de la tétracycline dans les plantes est courte alors que la quantité de dexaméthasone nécessaire pour l'activation de la transcription par le TGV est moindre. De plus, TGV a un double contrôle : la transcription peut être activée par le dexaméthasone et inactivée par la tétracycline. Il est aussi à noter que le contrôle de la transcription à l'aide du TGV est plus serré étant donné la séquestration de ce facteur de transcription dans le cytoplasme en absence de l'inducteur.

Le promoteur P_{Top10} offre donc plusieurs possibilités de contrôle de l'expression du gène d'intérêt. Sa flexibilité permet son utilisation dans les plantes pour de nombreuses fins.

Tableau IV : Promoteurs inductibles synthétiques

Promoteur	Système	Facteur de transcription	Inducteur	Références
Top10	De-répression	TetR	Tétracycline	Gatz et <i>al.</i> , 1992
	Inactivation	tTA	Tétracycline	Weinmann et <i>al.</i> , 1994
	Inactivation et activation	TGV	Tétracycline et dexaméthasone	Böhner et <i>al.</i> , 1999
GAL4 UAS	Activation	GVG	Dexaméthasone	Aoyama et Chua, 1997
GAL4 UAS	Activation	GRvH	Ecdysone RH5992	Martinez et <i>al.</i> , 1999
LexA	Activation	XVE	β -estradiol	Zuo et <i>al.</i> , 2001

Adapté des articles Gatz et Lenk, 1998 et Zuo et Chua, 2000.

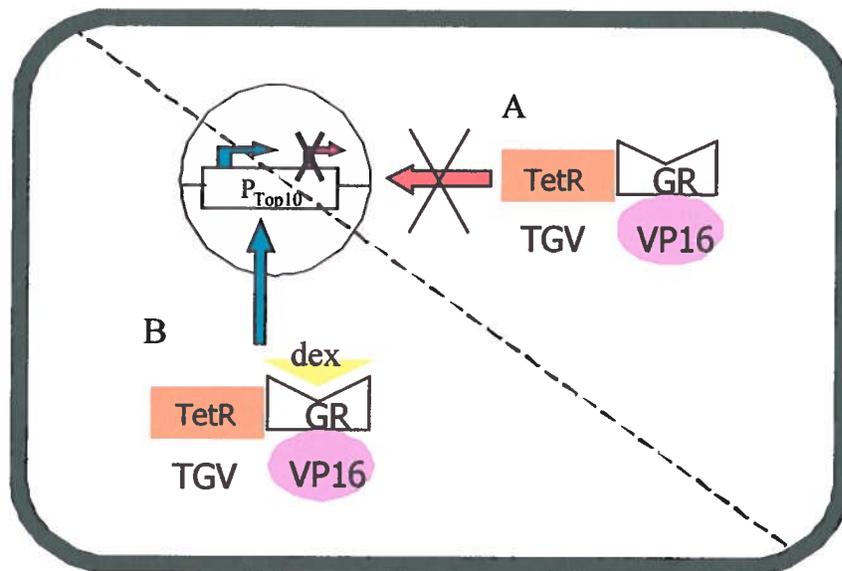


Figure 2 : Fonctionnement du promoteur P_{Top10} .

A) En absence de l'inducteur, le facteur de transcription TGV est séquestré dans le cytoplasme de la cellule. Il n'y a donc pas de transcription à partir de P_{Top10} .

B) L'ajout de l'inducteur, qui se lie au domaine de liaison GR, permet au TGV d'être transporté dans le noyau et de se lier au promoteur P_{Top10} par le domaine *Tn10* (TetR). Cette liaison mène à la transcription du gène d'intérêt grâce au transactivateur VP16.

(Adapté de Böhner et *al.*, 1999 et de Böhner et Gatz, 2001).

2 Les vecteurs viraux

Une autre approche utilisée pour la production de protéines d'intérêt est l'utilisation de vecteurs viraux (Giddings et *al.*, 2000). Les virus choisis sont manipulés afin qu'un gène étranger soit ajouté dans le génome viral. À la suite de l'inoculation des plantes par le virus chimérique, le gène d'intérêt est alors répliqué et traduit en même temps que le génome viral par la cellule hôte (Figure 3). Le virus se propage d'une cellule à l'autre jusqu'à ce qu'il se répande dans la plante entière. L'infection d'une plante par un vecteur viral résulte souvent en des niveaux d'expression vraiment élevés du gène d'intérêt qui sont rarement atteignables par l'expression inductible ou constitutive du transgène (Pogue et *al.*, 2002).

2.1 Exemples d'utilisation des vecteurs viraux

Plusieurs vecteurs viraux ont été étudiés (Tableau V), entre autres le *tobacco mosaic virus* (TMV), le *brome mosaic virus* (BMV), le *tobacco etch virus* (TEV) et le *cow pea mosaic virus* (CPMV) (Pogue et *al.*, 2002). Dans certains vecteurs viraux, la stratégie adoptée a été de remplacer un gène viral, telle la séquence codante pour la capsid (CP) par le gène d'intérêt. Cette procédure peut par contre affecter le mouvement cellule-cellule ou systémique du virus, comme il a été le cas avec le BMV et le TMV respectivement. Pour bien des vecteurs, le gène d'intérêt est intégré dans le génome sans éliminer de séquences virales. De tels vecteurs ne sont donc pas limités dans leur cycle de réplication et de propagation dans la plante susceptible. Dans ce cas, le gène d'intérêt peut être ajouté de façon à être libre dans la cellule ou en fusion avec une protéine virale. Cette dernière méthode peut alors être utilisée dans la confection de vaccins où un épitope est fusionné à la capsid, ce qui fait en sorte que le virus présente l'antigène d'intérêt à sa surface.

Infection par un puceron, le mouvement viral ou par inoculation volontaire

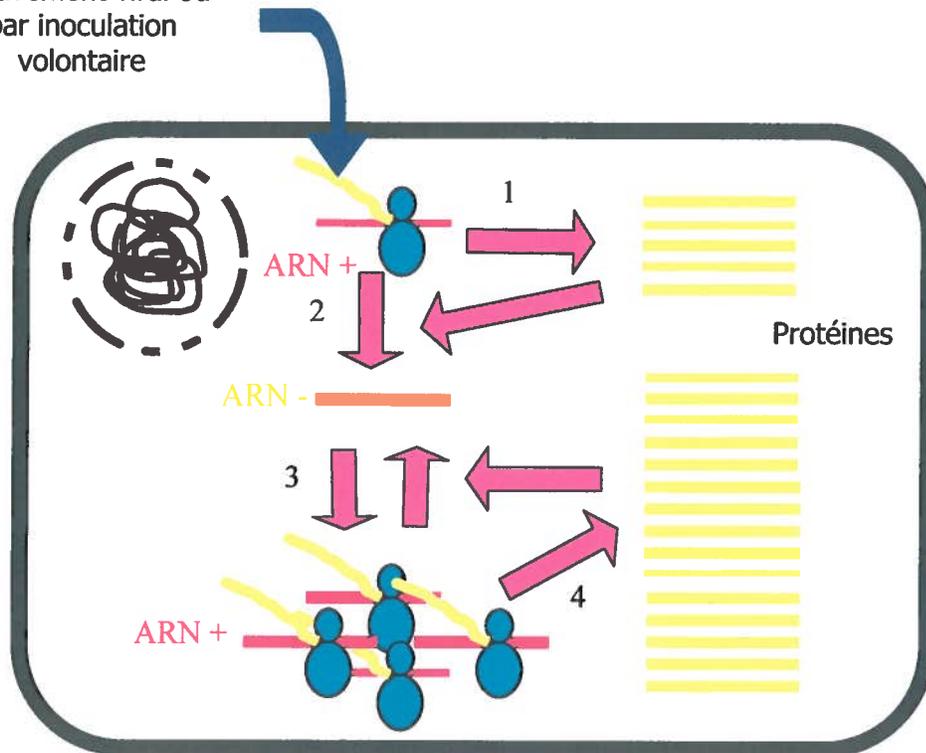


Figure 3 : Cycle de réplication des phytovirus à ARN monocaténaire de polarité positive.

Chez les phytovirus, le génome est souvent un ARN de polarité positive. L'ARN génomique, une fois à l'intérieur de la cellule, est traduit par la machinerie cellulaire (1) 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.

Tableau V : Protéines d'intérêt médical ou agricole exprimées 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	Peptide gp41 du VIH-1	Buratti et al., 1998; Durrani et al., 1998; McLain et al., 1995; McLain et al., 1996.
		Épitope gp120 du VIH	Mushegian et Shepherd, 1995
		Épitope HR14 du rhinovirus humain	Tacket et Mason, 1999
		Protéine de liaison à la fibronectine (FnBP) de <i>Staphylococcus aureus</i>	Brennan et al., 1999a; Brennan et al., 1999b
		Épitope VP1 du virus de la fièvre aphteuse	Usha et al., 1993; Beachy et al., 1996; Tacket et Mason, 1999
Potex	PVX	Épitope VP2 du parvovirus canin	Langeveld et al., 2001
		Protéines insecticides : WIN3	Lawerence et Novak, 2001
		Peptide gp41 du VIH-1	Marusic et al., 2001
Potyvirus	CIYVV	Protéine de liaison à la fibronectine (FnBP) de <i>Staphylococcus aureus</i>	Brennan et al., 1999a
		Glutamine synthase	Masuta et al., 2000
	PPV	VP60 de la maladie du virus hémorragique du lapin (RHDV)	Fernández - Fernández et al., 2001
		Peptide VP2 du parvovirus canin	Fernández - Fernández et al., 1998
	TEV	Herbicide bar dans <i>Arabidopsis</i>	Whitham et al., 1999
	ZYMV	Interféron- α 2	Arazi et al., 2001
		Protéines antitumorales MP30 et GAP32	Arazi et al., 2002
Tobamovirus	TMV	Peptide GP3 du virus de la rage	Yusibov et al., 1997; Modelska et al., 1998
		Peptide du VIH-1	Yusibov et al., 1997
		α -galactosidase A humaine	Pogue et al., 1998
		VP1 du virus de la fièvre aphteuse	Wigdorovitz et al., 1999
		Épitope hémagglutinine du virus de Influenza	Sugiyama et al., 1995; Beachy et al., 1996
		Peptide du parasite de la Malaria	Tacket et Mason, 1999; Turpen et al., 2001
		Peptide du virus de l'hépatite murin	Koo et al., 1999; Beachy et al., 1996
		c-Myc	Beachy et al., 1996
		Peptide du virus de l'hépatite C	Nemchinov et al., 2000
Tombusvirus	TBSV	Peptide gp120 du VIH-1	Joelson et al., 1997

Abbreviations : BMV (Brome mosaic virus), CIYVV (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 des articles de Giddings et al., 2000 et Pogue et al., 2002.

La production de vaccin est un exemple à l'étude pour bien des vecteurs viraux (Tableau V). Les études de Brennan et *al.* (1999b) montrent qu'il est possible de produire un vaccin intra-nasal contre *Staphylococcus aureus* où un virus de plante est utilisé comme transporteur de peptides immunogéniques au système immunitaire mucosal. Le phytovirus que cette équipe a utilisé est le Cow pea mosaic virus (CPMV). Dans la séquence codante pour la protéine de la capsid S du CPMV, ils ont ajouté les nucléotides codant pour 30 acides aminés du domaine D2 de la protéine B de liaison à la fibronectine (FnBP) de *Staphylococcus aureus*. Comme chaque particule virale contient 60 unités de capsid, autant de copies de l'antigène D2 seront produites. Les particules virales extraites des plantes de niébé ou dolique (pois à vache, Cow pea) infectées avec le CPMV chimérique ont été administrées dans le museau de souris. Des anticorps spécifiques au CPMV et au domaine D2 du FnBP ont été retrouvés en grande quantité dans le sérum de ces souris. De plus, les fluides intestinaux, vaginaux et des bronches contenaient des IgA sécrétoires spécifiques à l'antigène. Ce vaccin semblerait donc posséder les caractéristiques permettant une immunisation sécuritaire et efficace contre des pathogènes des muqueuses.

2.2 Les potyvirus

Comme mentionné au tableau V, plusieurs exemples de vecteurs utilisant les potyvirus ont été étudiés. Le virus de la mosaïque du nevet (TuMV) faisant partie de ce groupe et étant l'objet de notre recherche, nous porterons ici une attention particulière à ces virus.

2.2.1 Généralités

Le groupe des potyvirus contient le plus grand nombre de virus de plantes et cause les plus grandes pertes économiques (Maia et *al.*, 1996; Nicolas et Laliberté, 1992; Sánchez et *al.*, 1998; Dolja et *al.*, 1993; Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001). De plus, ces virus peuvent infecter un grand spectre d'hôtes dans toutes les régions climatiques, que ce soit chez les monocotylédons ou les dicotylédons. Ils sont les plus répandus chez les crucifères tels le chou de Bruxelles, le canola et le chou-fleur.

2.2.2 Propriétés génomiques

Les potyvirus font partie de la superfamille des Picornaviridae (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001). Les virions sont de longues particules flexibles et filamenteuses non enveloppées (Maia et *al.*, 1996; Sánchez et *al.*, 1998). Leur génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 10kb (Figure 4). L'extrémité 5' est liée de façon covalente à la protéine virale VPg alors que l'extrémité 3' est polyadénylée. L'ARN viral ne possède qu'un cadre de lecture (ORF) qui est traduit en une seule polyprotéine de plus de 3000 acides aminés (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001).

2.2.3 Caractéristiques des protéines

La polyprotéine est co- et post-traductionnellement hydrolysée en au moins dix protéines par trois protéinases virales (Figure 4). Les protéines résultantes sont multifonctionnelles, et même les protéinases possèdent d'autres fonctions nécessaires à la virulence. Aussi, toutes les protéines virales sont impliquées à divers degrés dans la réplication et la propagation du génome.

P1 est la protéine à l'extrémité amino-terminale de la polyprotéine. Elle possède une activité protéasique en *cis* à son extrémité carboxy-terminale (Verchot et Carrington, 1995) (Figure 4). Les autres fonctions de P1 ne sont pas très connues mais il a été mentionné qu'elle lie l'ARN de façon non-spécifique et serait peut-être impliquée dans l'amplification génique et le mouvement viral (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001; Klein et *al.*, 1994).

Tout comme P1, HC-Pro (Helper-Component proteinase) clive la polyprotéine en *cis* à son extrémité carboxy-terminale (Figure 4). HC-Pro est aussi impliquée dans le mouvement viral de longue distance. Il a été proposé que cette protéine serait responsable de l'entrée et de la sortie du virion dans le système vasculaire de la plante hôte (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001). De plus, le maintien de la réplication virale, la transmission par les pucerons et la suppression du mécanisme de résistance naturelle

des plantes contre les virus sont d'autres fonctions importantes attribuées à HC-Pro (Kasschau et *al.*, 1997; Kasschau et Carrington, 2001; Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001).

P3 est normalement associée à la protéine 6K1 (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001). Ces deux protéines ne lient pas l'ARN directement mais participent à la réplication en interagissant avec l'hélicase virale (CI). Leur fonction précise n'est pas encore élucidée.

La CI (protéine d'Inclusion Cytoplasmique) s'accumule dans le cytoplasme en structures coniques où plusieurs répliques de l'ARN viral y seraient associés (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001). La CI possède une activité hélicase et cette protéine participerait donc à la réplication en se liant à l'ARN viral pour le dérouler. La CI est également présente à l'entrée des plasmodesmes et contribuerait au mouvement cellule-cellule.

La protéine 6K2 possède un domaine hydrophobique central flanqué de résidus chargés. Ceci fait d'elle une protéine intégrale des membranes dérivées du réticulum endoplasmique (RE) (Schaad et *al.*, 1997). La protéine 6K2, lorsque liée à la VPg-Pro, permettrait d'ancrer le complexe de réplication viral aux membranes du réticulum endoplasmique. Aussi, cette association empêcherait l'accumulation de la VPg-Pro dans le noyau cellulaire (Schaad et *al.*, 1997; Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001).

La VPg-Pro est responsable de la maturation du deux-tiers carboxy-terminal de la polyprotéine (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001; Laliberté et *al.*, 1992) (Figure 4). Ce processus de clivage par la VPg-Pro est très contrôlé afin d'obtenir des produits intermédiaires et matures qui possèdent tous des fonctions bien définies. Les sites de clivage diffèrent entre eux par la vitesse de leur hydrolyse. La VPg-Pro s'autoclive en deux domaines, soit le domaine VPg et le domaine Pro. La VPg-Pro et ses sous-produits (VPg et Pro) sont requis pour réaliser différentes fonctions, entre autres dans la réplication et dans la liaison à l'ARN viral. Aussi, la VPg a un rôle prédominant dans la traduction de l'ARN viral (Léonard et *al.*, 2000; Wittmann et *al.*, 1997). Elle lie le facteur de traduction de la cellule hôte eIF(iso)4E pour former le complexe de traduction.

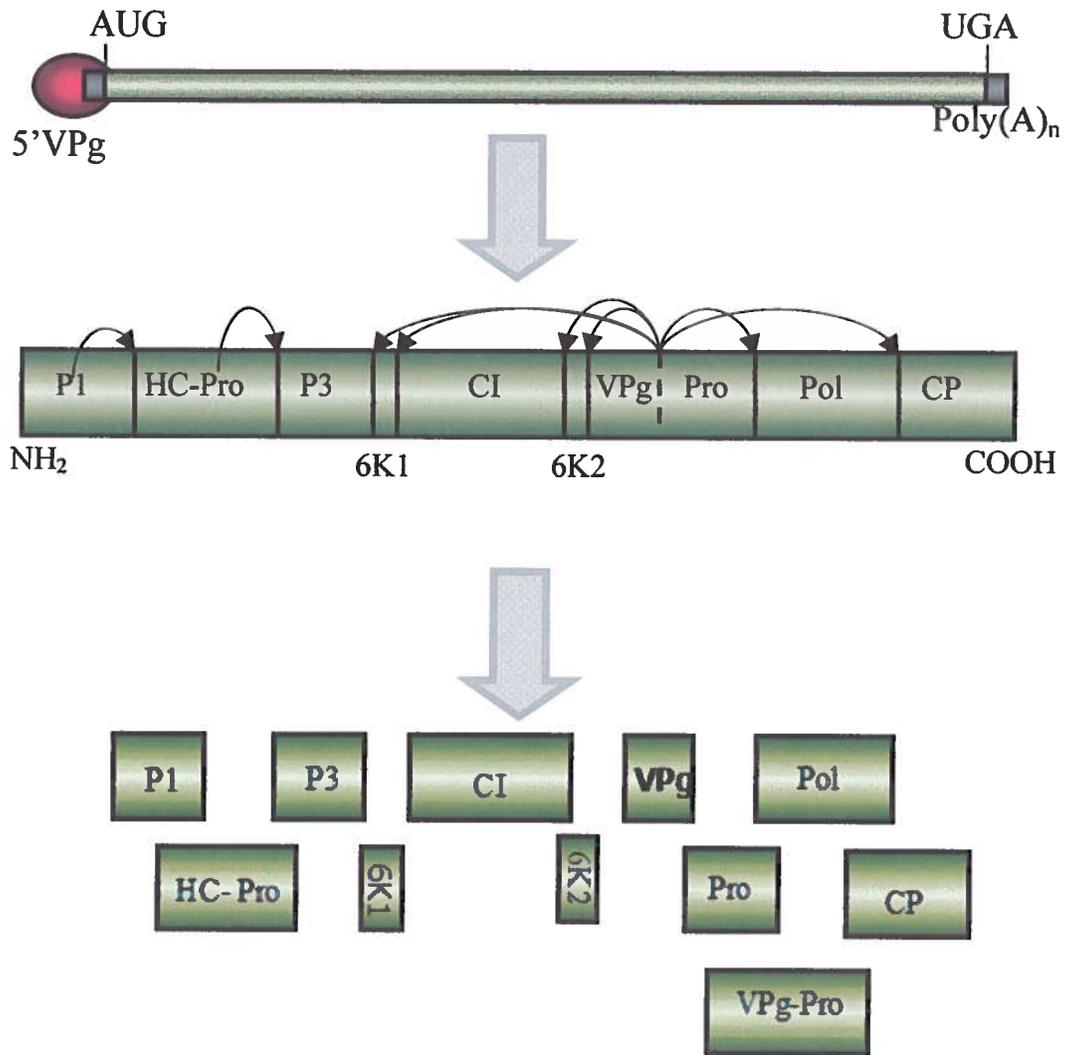


Figure 4 : Stratégie d'expression des protéines des poliovirus.

L'ARN de polarité positive est traduit en une seule polyprotéine. Cette polyprotéine est autoclivée en dix protéines matures par trois protéinases virales : P1, HC-Pro et VPg-Pro.

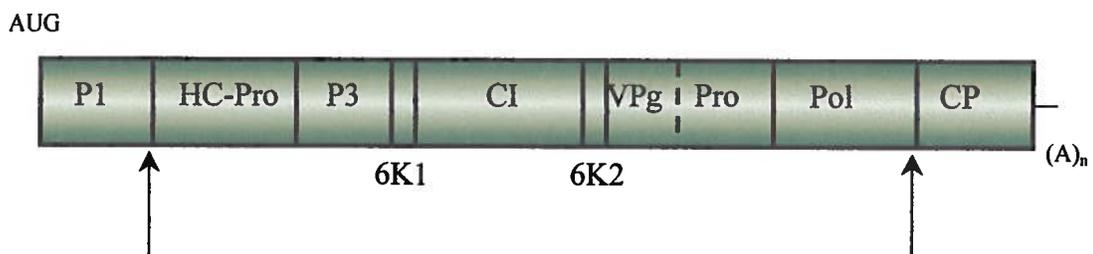


Figure 5 : Emplacements connus pour l'ajout de gènes d'intérêt. Les sites rapportés sont identifiés par des flèches

eIF(iso)4E est la protéine de liaison à la coiffe des ARNm et joue un rôle essentiel dans l'initiation de la traduction. La VPg-Pro est aussi nommée dans la littérature NIa pour Nuclear Inclusion a (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001). La VPg-Pro est accumulée dans le noyau cellulaire et, pour certains potyvirus, y forme des corps d'inclusion. Son association avec 6K2 ralentirait l'accumulation de la protéine dans le noyau cellulaire. Le rôle de la VPg-Pro dans cet organite n'est pas défini.

La polymérase virale (Pol) possède le motif conservé GDD caractéristique des ARN polymérases dépendantes d'ARN (RdRp) (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001). La Pol lie les domaines VPg et Pro ainsi que la protéine de liaison à la queue de Poly(A) (PABP) de la cellule hôte. Ainsi, la traduction et la réplication seraient des étapes fortement liées. Elle est aussi nommée NIb car elle forme des corps d'inclusion nucléaire pour certains virus, tout comme la VPg-Pro. Les fonctions de la polymérase dans le noyau ne sont pas définies.

La protéine de la capsid (CP) sert à protéger l'ARN viral. Elle est aussi impliquée dans la transmission par les pucerons, le mouvement cellule-cellule et systémique ainsi qu'à la régulation de l'amplification de l'ARN viral (Urcuqui-Inchima et *al.*, 2001).

2.2.4 Les potyvirus comme vecteur viral

Les potyvirus sont des vecteurs d'expression intéressants (Guo et *al.*, 1998). La forme filamenteuse hélicoïdale de la particule virale ne pose pas de limite quant à la taille du génome à être encapsidé. Ceci permet donc l'ajout de longues séquences étrangères au génome viral. De plus, l'organisation génomique permet la traduction des gènes d'intérêt à partir du même ARN que les gènes viraux. Cette caractéristique importante fait en sorte que la protéine d'intérêt est synthétisée en quantité équimolaire avec les protéines virales. Puisque chaque particule virale d'un potyvirus est formée d'environ 2000 unités de protéines de la capsid (CP), la protéine d'intérêt se retrouvera en grand nombre dans chaque cellule infectée (Fernández-Fernández et *al.*, 2001).

Au moins deux sites existent pour l'ajout de gènes étrangers. Le premier emplacement étudié se trouve entre les gènes qui codent pour les protéines P1 et HC-Pro (Dolja et *al.*, 1992). Le gène d'intérêt peut être également inséré entre les gènes codant pour la polymérase et la protéine de la capsid (Fernández-Fernández et *al.*, 2001) (Figure 5).

Une application potentielle du vecteur viral de potyvirus est, une fois de plus, la production de vaccins (Tableau V). Une équipe a montré qu'il est possible d'immuniser des lapins contre le virus de la maladie de l'hémorragie du lapin (RHDV) à l'aide d'un *Plum pox virus* (PPV) chimérique (Fernández-Fernández et *al.*, 2001). Dans cette étude, la protéine structurale VP60 du RHDV a été introduite entre la polymérase et la capsid du PPV. Le gène d'intérêt a été bordé par deux séquences codant pour le site de clivage de VPg-Pro afin que la protéine soit libre et non en fusion avec une protéine du PPV. Trois feuilles par plantes de *Nicotiana clevelandii* ont été inoculées avec l'ADNc du PPV chimérique qui était inséré sous le contrôle du $P_{CaMV 35S}$. L'ADNc viral est alors transcrit dans quelques cellules transfectées, ce qui mène à la production d'ARN du PPV. Cet ARN peut alors se répliquer et se propager dans la plante entière de *N. clevelandii*. La protéine VP60 a été détecté dans les plantes 15 jours post-inoculation et une accumulation maximale a été atteinte après 21 jours. L'extrait protéique de *N. clevelandii* infectée avec le virus chimérique a été injecté à des lapins. Les lapins ont développé une réponse immunitaire humorale efficace et ils étaient protégés contre une dose létale du RHDV (Fernández-Fernández et *al.*, 2001). Ce système d'expression de vaccin à l'aide d'un potyvirus chimérique est donc très efficace et a un avenir prometteur.

2.3 Avantages et inconvénients du vecteur viral

L'avantage majeur d'utiliser un vecteur viral est la production élevée de la protéine d'intérêt. Par exemple, il a été montré que la capsid virale peut constituer environ 1% des protéines totales provenant de feuilles infectées (Dolja et *al.*, 1992). Donc la protéine d'intérêt pourrait être produite en aussi grande quantité dans chaque cellule. Cependant, les données de la littérature ne sont pas très précises quant aux quantités obtenues dans les faits. Souvent, les rendements sont exprimés en unités

enzymatiques et rarement en mg par unité de poids. Un autre avantage est l'intervalle de temps restreint pour la production de la protéine. Avec les plantes transgéniques, on peut compter sur plusieurs mois pour la sélection et la croissance de la plante. Avec les vecteurs viraux, quelques jours seulement sont nécessaires pour inoculer et prélever la protéine d'intérêt. Finalement, le vecteur viral étant un véhicule épisomal, il y a peu ou pas de variation dans l'expression de la protéine d'intérêt d'une plante à l'autre. L'effet de positionnement du transgène dans le génome de la plante n'est pas un facteur critique comme pour les plantes transgéniques.

L'inconvénient majeur des vecteurs viraux est l'instabilité génétique (Pogue et al., 2002). À brève échéance, le gène d'intérêt est conservé intact, mais si l'infection se poursuit sur plusieurs semaines, il y a un risque que le gène disparaisse. Par exemple, des études avec le TEV ont montré que le gène *uidA* (environ 1,8 kb) inséré entre les gènes P1 et HC-Pro était progressivement délété au cours de l'infection (Dolja et al., 1993). Ces délétions avaient des tailles variant de 1 741 à 2 074 nucléotides et plusieurs types de délétions pouvaient se retrouver dans la même plante. Le même phénomène a été observé pour le gène codant pour la protéine VP16 du RHDV inséré entre les gènes Pol et CP du PPV (Fernández-Fernández et al., 2001). Ces délétions ont eu lieu à la suite d'une infection prolongée (trois à quatre semaines). L'insertion du gène *gfp* dans le LMV (Lettuce mosaic Potyvirus) entre P1 et HC-Pro ou dans le PPV entre Pol et CP mène cependant à une plus grande stabilité de l'insert que *uidA* (German-Retana et al., 2000; Fernández-Fernández et al., 2001). Ce gène rapporteur est plus petit que *uidA* (750 nucléotides). Il est donc possible que la longueur de l'insert soit en cause dans l'instabilité génétique. L'instabilité génétique est également observée pour tous les vecteurs viraux, que ce soit le TMV, le BMV et les autres (Pogue et al., 2002).

Le mécanisme proposé pour expliquer l'instabilité génétique des inserts est la recombinaison illégitime ou non-homologue (Figure 6) (Dolja et al., 1993; Guo et al., 1998). Durant la réplication, l'ARN polymérase virale ferait des pauses et aurait tendance à changer de matrice spontanément. Ceci entraînerait parfois des pertes de séquences virales. Dans le cas de séquences essentielles, cette perte conduit à la production d'un génome défectif. Dans le cas de séquences non-essentielles, tels les gènes d'intérêt, leur

délétion n'affecte en rien le processus de réplication et de propagation. Les recombinants sélectionnés pour la propagation virale seraient donc ceux qui auraient perdu des éléments non-essentiels pour la réplication et le mouvement. Ce phénomène aurait été observé pour d'autres virus tel le poliovirus. Cette instabilité génétique limite donc l'usage des vecteurs viraux et des solutions doivent être trouvées pour minimiser ce problème.

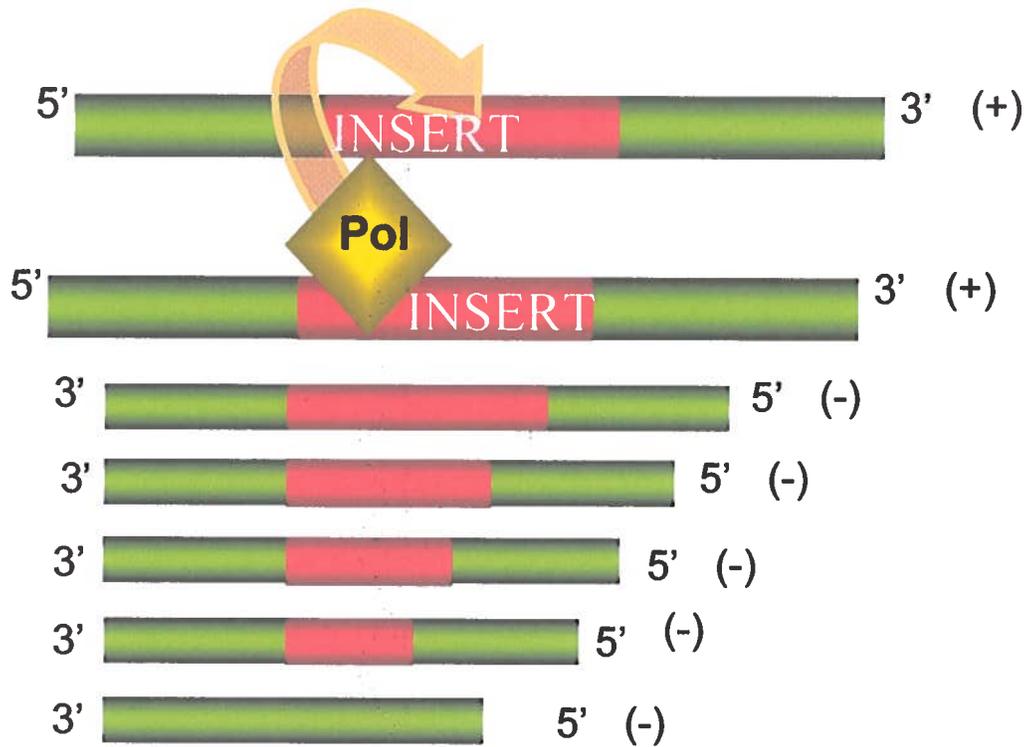


Figure 6 : Schématisation de l'instabilité génétique d'un gène étranger dans le génome viral.

Lors de la synthèse du brin d'ARN négatif au cours de la réplication, la polymérase aurait tendance à changer de matrice. Ceci mènerait à la délétion progressive et aléatoire de l'insert.

3 Hypothèse et objectifs de travail

Actuellement, les protéines recombinantes dans les plantes sont obtenues soit par transformation de la plante avec le gène d'intérêt et son promoteur ou par infection par un virus chimérique. Par contre, ces deux procédés présentent chacun des inconvénients importants : 1) l'accumulation de la protéine d'intérêt n'est pas assez élevée dans la plante transgénique; 2) le gène d'intérêt est instable à long terme dans le génome du virus chimérique.

Nous proposons donc d'obtenir des plantes transgéniques de tabac contenant dans leur génome l'ADNc du TuMV chimérique. Notre hypothèse de travail est qu'une source stable de transcrits permettra de conserver l'insert dans le maximum de copies virales possibles. Ceci améliorera la stabilité et l'accumulation de la protéine d'intérêt. L'expression de ce virus doit être inductible afin de permettre la croissance des plantes jusqu'au stade adéquat avant d'enclencher la production virale.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous débuterons ce projet par l'élaboration d'un virus chimérique, basé sur le TuMV, dont l'expression sera contrôlable et qui sera étudié en expression transitoire. Nos objectifs de travail seront d'insérer un gène rapporteur dans le génome viral ainsi que de rendre l'expression de l'ADNc du TuMV inductible.

3.1 Insertion d'un gène rapporteur

Les gènes codants respectivement pour la protéine de fluorescence verte (GFP) ou pour la β -glucuronidase (GUS) seront ajoutés entre les séquences codantes pour P1 et HC-Pro. Ceci permettra de visualiser plus facilement l'infection virale tout en vérifiant la possibilité d'ajouter des gènes étrangers au génome viral. Afin que la protéine d'intérêt soit libre, le gène sera ajouté à la suite de la séquence du site de clivage de P1. De plus, une séquence codant pour un site de reconnaissance en *trans* de la VPg-Pro sera ajoutée après du gène rapporteur.

3.2 Système inductible

Dans le plasmide infectieux p35Tunos, l'ADN complémentaire du virus de la mosaïque du navet (TuMV) est sous le contrôle du promoteur $P_{CaMV\ 35S}$. Cependant, l'expression constitutive du TuMV dans des plantes transgéniques entraînerait des problèmes de régénération due à l'activité des protéines virales sur le système de traduction de la cellule hôte. Alors, le promoteur du vecteur infectieux p35Tunos sera remplacé par le promoteur inductible P_{Top10} . Ainsi, il sera possible d'induire l'expression du virus au stade de croissance adéquat de la plante à l'aide de l'inducteur, le dexaméthasone. À ce moment, le virus pourra effectuer son cycle de réplication naturel tout en synthétisant la protéine d'intérêt en quantité équimolaire aux protéines virales.

3.3 La complémentation

Il est à prévoir que le promoteur inductible P_{Top10} ne soit pas complètement silencieux en absence du dexaméthasone. Afin de s'assurer que la réplication virale n'ait lieu seulement qu'en présence de l'inducteur, une mutation de la polymérase virale abolira sa fonction. Cette mutation se situera dans le motif conservé GDD et consistera en sa modification par les acides aminés VNN (Li et Carrington, 1995). La réplication sera rétablie en temps voulu par l'expression de la polymérase fonctionnelle dont le gène viral sera inséré sous le contrôle du promoteur P_{Top10} . Selon Li et Carrington (1995), cette polymérase fonctionnelle peut compléter en *trans* la mutation « VNN » du vecteur viral. Dans ce système d'expression, l'ADNc du TuMV pourra être sous le contrôle du $P_{CaMV\ 35S}$ puisque la mutation empêchera la réplication virale (Figure 7).

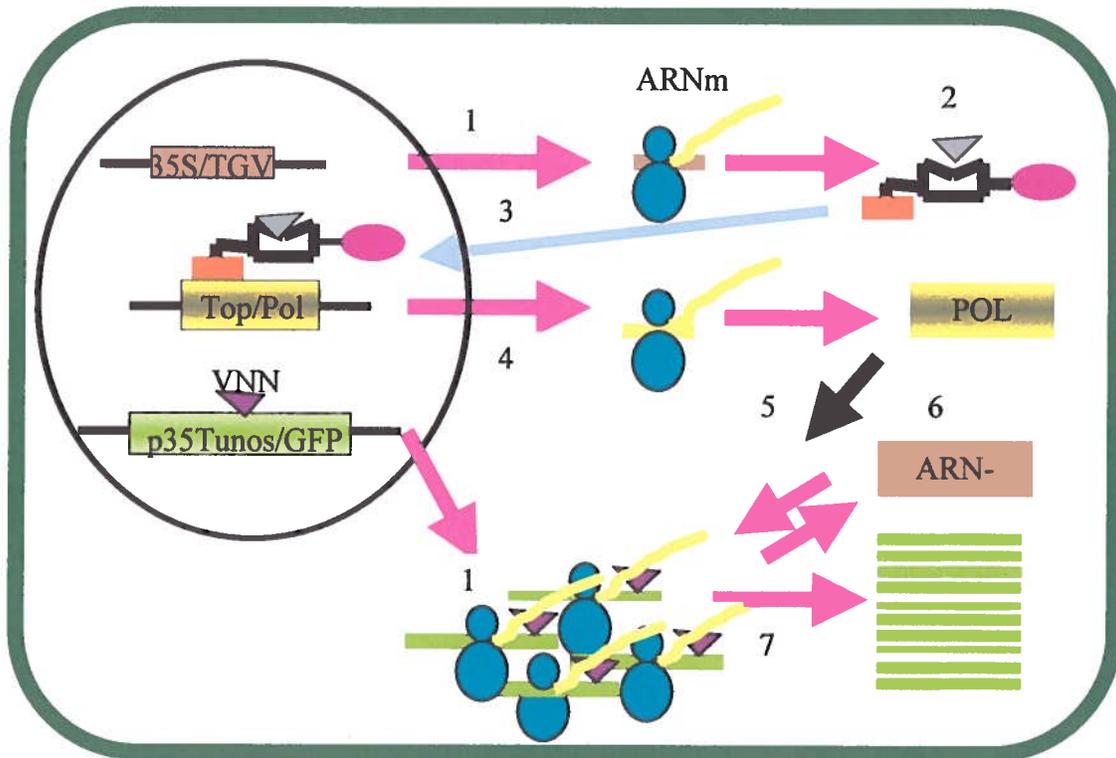


Figure 7 : Hypothèse de travail à long terme.

Chaque cellule d'une plante transgénique de *N. tabacum* contiendra dans son génome une copie de l'ADNc viral non répliquatif contenant un gène rapporteur telle la *gfp* (p35Tunos/GFP-VNN), le facteur de transcription TGV ainsi que la polymérase fonctionnelle. Le vecteur viral et le facteur de transcription étant sous le contrôle du $P_{CaMV\ 35S}$, ils seront exprimés de façon constitutive (1). Au temps voulu, le dexaméthasone appliqué sur la plante se liera au facteur de transcription TGV (2). Cette liaison permettra le transport de TGV au noyau (3) pour activer la transcription de la polymérase à partir du P_{Top10} (4). La polymérase nouvellement synthétisée pourra compléter *in trans* la réplication virale (5) en produisant d'abord un brin négatif d'ARN (6) qui servira de matrice pour la production de brins positifs. Ces derniers permettront la synthèse massive de protéines virales ainsi que la protéine d'intérêt, la GFP (7).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1 Milieu de croissance des cellules

La croissance de *Escherichia coli* (*E. coli*) a été faite dans un milieu LB (Milieu Luria-Bertani) solide ou liquide contenant 1% de tryptone, 0.5% d'extrait de levure et 1% de NaCl. Le pH a été ajusté à 7.0 avec de NaOH 5N. Pour le milieu solide, 1.5% agar a été ajouté.

Les antibiotiques utilisés pour sélectionner les clones positifs ont été l'ampicilline ou la kanamycine selon le cas. L'ampicilline a été ajoutée dans les milieux de culture avec une concentration de 100 µg/mL et la kanamycine, de 50µg/mL.

Les bactéries ont été incubées à 37°C ou 30°C selon le plasmide.

Les cellules BY-2 de tabac en suspension ont été incubées à la noirceur à 22°C avec une agitation constante dans un milieu NT KC liquide (Sullivan et Green, 1996). Ce milieu est composé de 4.3 g/l de milieu de culture MS salt (sels Murashige et Skoog), 30 g/l de sucrose, 2.55 mM de MES (acide 2(N-Morpholino) éthanesulfonique) pH 5.7 (ou 5% d'une solution 20X 0.44 mM), 3 µM thiamine et 0.555 mM myo-inositol (ou 1% de la solution B1-inositol contenant 0.3 mM thiamine et 55.5 mM myo-inositol), 1.32 mM KH₂PO₄ (ou 0.3% de la solution Miller's I contenant 0.44 M de KH₂PO₄) et 1 µM acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, le pH a été ajusté à 5.7 avec du NaOH 1N.

2 Souches

E. coli DH5 α : *supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96*
thi-1 *relA1*

E. coli XL1-Blue : *supE44* *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA46* *thi* *relA1* *lac*⁻
F' [*proAB*⁺ *lacI*^r *lacZ* Δ M15 Tn.10(*tet*)]

3 Vecteurs

3.1 p35Tunos

L'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARN viral de l'isolat britannique (UK) du TuMV a été obtenu de l'équipe du Dr Fernando Ponz en Espagne (Sánchez et *al.*, 1998). Cet ADNc est sous le contrôle du promoteur P_{CaMV 35S} dans le vecteur pUC12. À la suite de l'ADNc du TuMV, une queue de poly(A) a été ajoutée suivit du terminateur de la nopaline synthase (tnos). Le vecteur résultant possède le gène de résistance à l'ampicilline pour sa sélection dans *E. coli*.

3.2 pBinHygTopFree_{mod} et pBinTGV

pBinHygTopFree_{mod} est un plasmide de 14kb. Il contient le promoteur P_{Top10} qui est constitué de sept opérateurs *tet* (tetOp) en tandem. Les tetOp sont fusionnés à une version tronquée du promoteur constitutif 35S contenant la boîte TATA (-48 à +1). Le promoteur est suivi d'un site de multiclonaage. pBinHygTopFree_{mod} est un vecteur pouvant se répliquer dans *E. coli* et dans *Agrobacterium tumefaciens*. Il contient le gène de résistance à la kanamycine pour la sélection dans *E. coli* et le gène de résistance à l'hygromycine pour la sélection dans la plante. Le facteur de transcription chimérique du P_{Top10}, TGV, se trouve dans le plasmide pBin19. La construction résultante, pBinTGV,

peut aussi être utilisé pour l'agroinfection puisqu'il contient le gène de résistance à la kanamycine pour la sélection dans les plantes. Ces plasmides nous ont été fournis par la Dr C. Gatz.

3.3 pBin *m-gfp5-ER*

Le plasmide pBin *m-gfp5-ER* est dérivé du vecteur pBI121 (Jefferson et *al.*, 1987). Pour obtenir pBin *m-gfp5-ER*, le fragment codant pour le gène rapporteur GUS de pBI121 a été remplacé par le gène *m-gfp5-ER*. Le vecteur réplcatif (pBIN19) possède le gène de résistance à la kanamycine. Le gène *gfp* original provient de la méduse *Aequorea victoria*. Plusieurs modifications de cette *gfp* ont été effectuées afin d'adapter l'expression du gène chez la plante et pour améliorer les maxima d'excitation de la GFP. Par exemple, un intron cryptique d'*Arabidopsis* a été éliminé, quelques nucléotides ont été substitués et un signal de compartimentalisation au réticulum endoplasmique, HDEL, a été ajouté à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine. En amont du gène *m-gfp5-ER*, se trouvent un site de liaison au ribosome procaryotique (RBS) et une séquence de contexte d'initiation de traduction de plante (TICS). La GFP a deux maxima d'excitation, soit à 395nm et à 473nm. Ce plasmide a été obtenu du Dr Armand Séguin (Centre de foresterie des Laurentides).

3.4 pBI221

pBI221 de Clontech est un dérivé de pBI121. La cassette contenant le gène *uidA* et son promoteur P_{CaMV 35S} de pBI121 a été inséré dans le site de multiclonaage de pUC19. Cette cassette exprime l'enzyme β -glucuronidase (GUS). pBI221 possède le gène de résistance à l'ampicilline.

4 Méthodes de clonage

4.1 Mutagenèse dirigée par PCR

Les modifications dans l'ADNc du TuMV ont été réalisées par mutagenèse de sites spécifiques par extension de chevauchements (Sambrook et Russel, 2000). Les amplifications ont eu lieu dans un volume total de 100 μ L contenant 50 ng de la matrice, 100 pmol de chacune des amorces, 2.5 U de Pwo polymérase (Roche), 10 μ L de tampon *Pwo* 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.85, 250 mM KCl, 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 20 mM MgSO_4) et 0.2 mM de dNTP. Les conditions utilisées ont été les suivantes : les deux premiers cycles à 94°C 1 minute, 37°C 30 secondes et 72°C 2 minutes; les 32 cycles suivants à 94°C 1 minutes, 50°C 30 secondes et 72°C 2 minutes par kb; un cycle final de 7 minutes à 72°C. Les amorces utilisées sont décrites dans les tableaux VI et VII.

4.2 Ligation

Les ligations ont été basées sur le protocole de Sambrook et Russel (2000). Environ 20U de Ligase, 0.75 à 1X de tampon de ligation (10X : 500 mM Tris-Cl, 100 mM MgCl_2 , 100 mM DTT, 10 mM ATP, 25 μ g/mL BSA, pH 7.5) et 1 mg/mL d'ARNt ont été ajoutés à 200 ng d'ADN. La solution de ligation a été incubée 16 heures à 16°C ou 64 heures à 4°C.

4.3 Transformation

Pour transformer *E. coli* avec les produits de ligation, deux méthodes ont été utilisées : la transformation par choc thermique ou l'électroporation.

Tableau VI : Amorces utilisées pour ajouter un gène rapporteur entre P1 et HC-Pro

Utilité	Matrice	Nom de l'amorce*	Séquence 5' → 3'
Ajout du site de restriction <i>SadI</i> entre P1 et HC-Pro	pTopTunos Δ <i>NsiI</i>	JFP1 <i>HpaI</i>	TAC TCG GGA AGA GAG CAC AGC
		FTHC <i>SadI</i>	GTT GGC TCC CGC GGC ACT AAA GTG <u><i>SadI</i></u>
		JFHC <i>SadI</i>	CAC TTT AGT GCC GCG GGA GCC AAC <u><i>SadI</i></u>
		FTHC <i>XhoI</i>	GTT CTG TTC TTC AGG TAT CGT
Ajouter site <i>SadI</i> de part et d'autre de <i>gfp</i>	pBin <i>m-gfp5-ER</i>	JFGFP <i>SadI</i>	TTA TCC TCC GCG GGA ATG AGT AAA G <u><i>SadI</i></u> , codon d'initiation de la traduction
		FTGFP <i>SadI</i>	CCT CCGC GGC TGC CTG GTG ATA GAC ACA AGC TTTGTATAG TTC ATC CAT <u><i>SadI</i></u> et site de clivage VPg-Pro
Ajouter site <i>SadI</i> de part et d'autre de <i>uidA</i>	pBI221	JFGUS <i>SadI</i>	TTA TCC TCC GCG GGA ATG TTA CGT CCT GTA GA <u><i>SadI</i></u> et Site d'initiation de la traduction
		FTGUS <i>SadI</i>	CCT CCGC GGC TGC CTG GTG ATA GAC ACA AGC TTG TTT GCC TCC CTGC <u><i>SadI</i></u> et site de clivage de VPg-Pro
Vérifier la présence du gène rapporteur	ADNc du TuMV	JFHC2300	CC AGC GAC TCC TTG ACA TTT

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

Tableau VII : Amorces utilisées pour changer le promoteur de p35Tunos et pour insérer la mutation VNN dans la polymérase.

Utilité	Matrice	Nom de l'amorce*	Séquence 5' → 3'
Ajout du site <i>StuI</i> à la suite de la boîte TATA de P35S	P35Tunos	« RV » de pUC18	TCG CCT ATT GTT AAA GTG TGT CC'
		FT35S <i>StuI</i>	ATGA AAT GAA <u>AGG CCT</u> TAT ATAG <i>StuI</i>
		JF35S <i>StuI</i>	CTAT ATA <u>AGG CCT</u> TTCATT TCAT <i>StuI</i>
		« FW » de pUC18	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG'
Modifier le motif GDD de la polymérase par les acides aminés VNN	pSK/TuMV <i>ClaI</i>	JFVPg6900	TCC AAA CCA AGA GCA TAA CGA
		FTPoIVNN	TAG CAG TAA ATT GTT AAC GTT GAC GAA <i>HpaI</i> , VNN
		JFPoIVNN	TTC GTC AAC GTT AAC AAT TTA CTG CTA <i>HpaI</i> , VNN
		T3	ATT AAC CCT CAC TAA AG
Fusionner la séquence 5'NTR à la séquence de la polymérase	p35TunosΔ <i>StuI</i>	« RV » de pUC18	TCG CCT ATT GTT AAA GTG TGT CC
		FTNTRPol	TAC CCA CCG ATT CTG CTG <u>GGC CAT</u> <u>GGG</u> GTT TGC TGT TGG TGA <i>NcoI</i>
	p35TunosΔ <i>EcoRV</i>	JFNTRPol	TCA CCA ACA GCA AAC <u>CCC ATG</u> <u>GCC CAG</u> CAG AAT CGG TGG ATG <i>NcoI</i>
		FTPoI <i>PsfI</i>	TGC ATC AAG CGC <u>TGC AGC</u> CTA CTG GTG ATA <i>PsfI</i> et codon stop

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

4.3.1 Choc thermique

La transformation de cellules XL1-Blue ou DH5 α chimiquement compétentes a été effectuée selon le protocole de transformation de cellules de *E. coli* utilisant le chlorure de calcium défini dans Sambrook et Russell, 2000.

4.3.2 Électroporation

La solution de ligation a été précipitée à l'éthanol 95%, rincée avec l'éthanol 70% et resuspendue dans 10 μ L d'eau. La moitié de la solution de ligation a servi pour la transformation. Les conditions de l'électroporation ont été les suivantes : 200 Ω de résistance, 1.6 kV, 25 μ FD d'impédance et le temps de choc doit se situer autour de 4.5 msec. L'appareil utilisé a été le Pulse Controller de BioRad.

4.4 Hybridation *in situ*

Les colonies ont été repiquées sur un milieu LB-Amp 100 μ g/mL et incubées pendant 20 heures à 30°C. Chaque gélose contenait 100 colonies dont un contrôle négatif et un contrôle positif de l'insert. Le transfert des colonies sur une membrane de nitrocellulose, l'hybridation et la détection immunologique de la sonde marquée ont été réalisés selon le protocole défini par Boehringer Mannheim. La sonde marquée à la digoxigénine (DIG) qui correspondait au fragment inséré dans la construction plasmidique a été synthétisée selon les spécifications du fabricant (Boehringer Mannheim/Roche). La sonde fixée aux plasmides sur la membrane de nitrocellulose contenant ce fragment d'ADN a été détectée grâce aux anticorps anti-DIG conjugués à la phosphatase alcaline (Anti-DIG-AP). L'activité enzymatique a été révélée avec une solution contenant 0.34 mg/mL de sel nitrobleu tétrazolium (NBT) et de 0.175 mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (X-phosphate ou BCIP).

4.5 Extraction d'ADN

Les colonies obtenues suite à la transformation ont été repiquées dans 3 mL de milieu LB ainsi que sur un milieu LB-Agar. La suspension bactérienne a été utilisée pour effectuer un isolement de plasmide traditionnel par lyse alcaline avec SDS (Sambrook et Russel, 2000) afin d'identifier les colonies contenant le bon produit de ligation. 100 µL de TEG (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) a été ajouté au culot obtenu suite à la centrifugation de 1.5 mL de la suspension bactérienne incubées préalablement 16 à 20 heures à 37°C ou 30°C respectivement. Après une incubation de 5 minutes sur glace, 200 µL de la solution de lyse fraîche (0.2 N NaOH, 1% SDS) ont été ajoutés. 150 µL de la solution d'arrêt (3 M K, 5 M acétate) sont ensuite ajoutées 5 minutes plus tard suivi d'une incubation de 5 minutes sur la glace. La solution a été centrifugée pendant 5 minutes Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et 2 volumes d'éthanol 95% ont été ajoutés. Une centrifugation de 5 minutes a été suivie du lavage du culot d'ADN avec 1 mL d'éthanol 70%. Finalement, le culot a été resuspendu dans 30 µL ou 50 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) contenant 20 µg/mL de RNase A pancréatique exempte de DNase (DNase-free RNase A).

Le plasmide des clones positifs a été extrait à l'aide de la trousse « Plasmid Midi » de la compagnie QIAGEN selon les spécifications du fabricant.

5 Transfection de cellules végétales

La nature infectieuse des différentes constructions a été vérifiée par infection mécanique à l'aide de la méthode du bombardement particulaire sur des plantes de *Brassica perviridis* ainsi sur que des feuilles ou des cellules de *Nicotiana tabacum*. La transfection chimique de protoplastes a aussi été une méthode utilisée pour vérifier l'efficacité de la complémentation.

5.1 Bombardement particulaire

5.1.1 Préparation des billes d'or

Les billes ont été préparées de la façon suivante : 30 mg de billes d'or de 0,6 μm de diamètre ont d'abord été suspendues dans 500 μL d'éthanol 100%. Les billes ont été mélangées pendant 1 minute et incubées à la température de la pièce pendant 30 minutes. Elles ont ensuite été centrifugées pendant 15 secondes et lavées deux fois avec 250 μL d'éthanol 100%, avec une centrifugation de 15 secondes entre chaque lavage. Les billes ont été resuspendues dans 250 μL d'eau stérile. Par la suite, les billes ont été mélangées et « soniquées » durant 5 minutes et 12.5 μL ont été ajoutés à 2.5 μg d'ADN. 25 μL de CaCl_2 0.25 M et 10 μL de spermidine 0.1 M ont par la suite été ajoutés en « vortexant ». Après une centrifugation rapide, le surnageant a été enlevé et les billes ont été nettoyées avec 100 μL d'éthanol 100%. Les billes ont ensuite été resuspendues dans 25 μL d'éthanol 100% après une centrifugation rapide. 5 μL d'une dilution 1 : 5 de billes enrobées d'ADN ont été utilisés par bombardement.

Le bombardement particulaire a été fait avec l'appareil PSD-9000 de BIORAD (Figure 7B). Une pression d'hélium de 900 psi et un vide de 26.5 pouces de mercure (Hg) ont été utilisés pour ce qui est des feuilles de *B. perviridis* ou de *N. tabacum*. Dans le cas des cellules BY-2, les billes d'or utilisées avaient 1 μm de diamètre. Différentes conditions ont été étudiées pour bombarder ces cellules : 2.5 μg d'ADN préparé et un

vide de 10 pouces de Hg ou 15 pouces de Hg; 5 µg d'ADN préparé et un vide de 10 pouces de Hg.

Les différentes constructions ont été bombardées soit sur des plantes de *B. perviridis*, sur des feuilles de *N. tabacum* transgéniques pour l'activateur de transcription TGV (*N. tabacum*/TGV) ou sur des cellules BY-2 de tabac.

5.1.2 Bombardement de plantes de *Brassica perviridis*

Les plantes de *B. perviridis* utilisées pour le bombardement particulaire avaient environ trois semaines. Elles ont été mises à la noirceur pendant 24 heures avant le bombardement. Lors du bombardement particulaire, la plante a été introduite entièrement à l'intérieur de l'appareil (Figure 7A). La feuille à bombarder a été déposée sur un morceau de plastique recouvert d'un papier filtre humide, le tout étant soutenu par un tube collé au fond de l'appareil. Le tube et la feuille doivent se trouver environ au centre de l'appareil.

5.1.3 Bombardement de feuilles de *Nicotiana tabacum*

Les graines récoltées de plantes de *N. tabacum* transformées avec l'activateur de transcription TGV (*N. tabacum*/TGV) ont été stérilisées avec de l'éthanol 95% pendant 30 minutes avec agitation. Une fois séchées, ces graines ont été semées dans des pots Magenta contenant le milieu de culture MS-agar. Les plantes ont été incubées dans un incubateur à 23°C avec 8 heures de luminosité. La veille du bombardement, les feuilles ont été coupées et déposées sur un milieu MS-agar afin de les acclimatées. Lors du bombardement, les feuilles ont été déposées sur un nouveau Pétri contenant du milieu MS-agar. Ce Pétri a été déposé sur la plaque cible à l'intérieur de l'appareil à bombardement de BioRad. Les feuilles ont ensuite été incubées dans un incubateur à 23°C avec 8 heures de luminosité par jour.

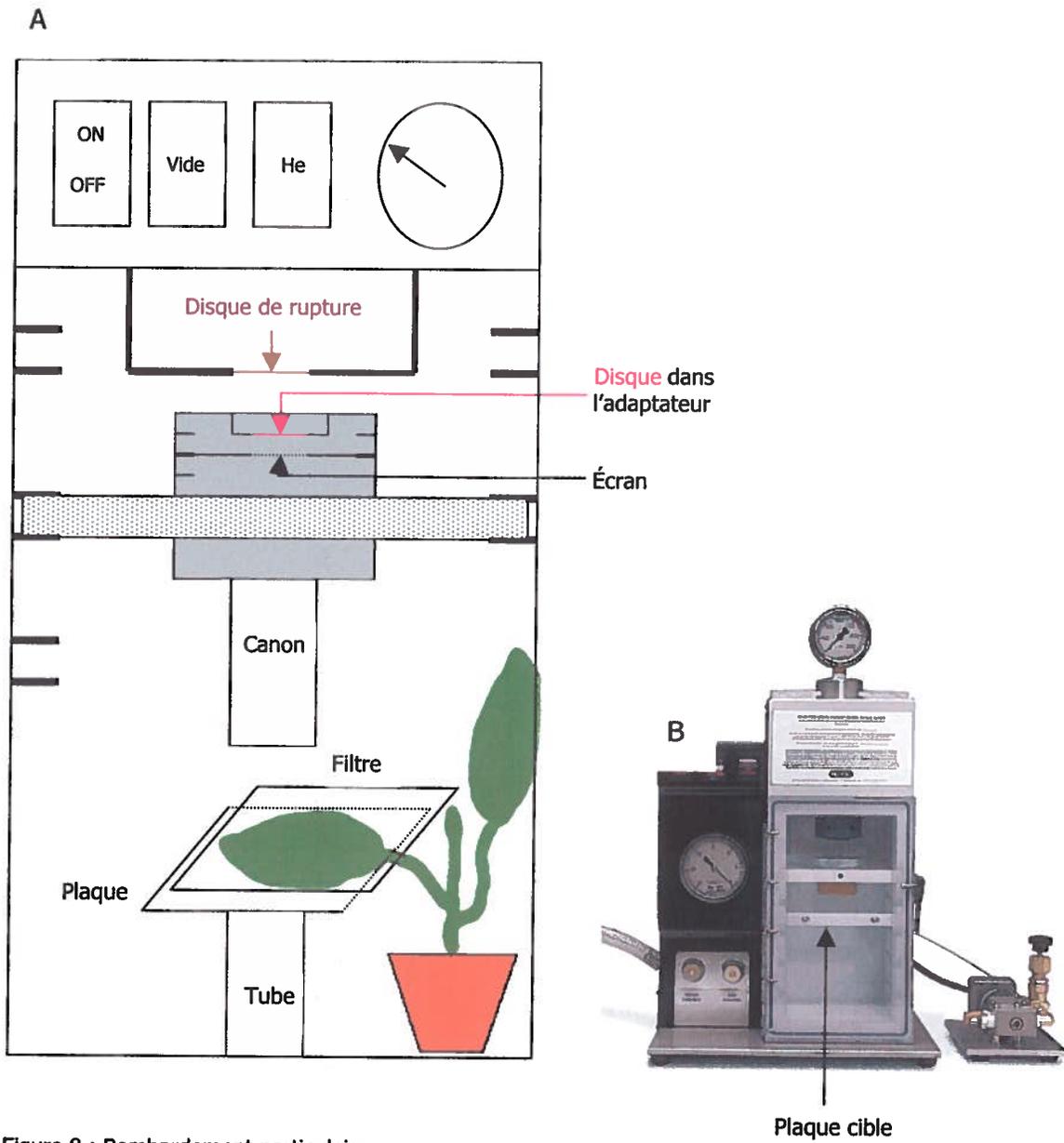


Figure 8 : Bombardement particulaire.

A) Exemple de bombardement particulaire avec *Brassica perviridis*.

B) L'appareil de BioRad PSD-9000.

5.1.4 Cellules de *Nicotiana tabacum*

Les cellules BY-2 de *N. tabacum* ont été fournies par le laboratoire du Dr Armand Mourras de l'Institut National de Recherche en Agronomie (INRA; Équipe de recherche en biologie cellulaire et biotechnologie végétales, Bordeaux, France). Ces cellules en suspension ont été incubées à la noirceur à 22°C avec agitation constante dans un milieu NT KC liquide (voir section 1 de ce chapitre) contenant 100 µg/mL de kanamycine. À chaque semaine, 5% de la suspension a été transférée dans un nouveau milieu NT KC liquide. Deux jours plus tard, 50 mL de la suspension a été centrifugée pendant 10 minutes à 600 *xg* et le culot a été resuspendu dans 5 mL du milieu de culture NT KC liquide. 750 µL de cette suspension ont été étalés sur un milieu NT KC-Agar et les Pétri ont été incubés à 22°C à la noirceur. Les cellules étalées ont été acclimatées deux jours avant le bombardement.

5.2 Transfection chimique de protoplastes

Les protoplastes ont été obtenus selon le protocole de Roland Bilang et Martin Schrott adapté pour les cellules en suspension par le Dr Michel Hernould de l'INRA (Équipe de recherche en biologie cellulaire et biotechnologie végétales, Bordeaux, France). 25 mL d'une sous-culture de 3 jours de cellules en suspension de BY-2 de tabac ont été divisés en deux tubes. À chaque tube a été ajouté la solution W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl et 5 mM glucose; pH ajusté à 5.8-6.0 avec du KOH) jusqu'à l'obtention d'un volume de 50 mL environ (~37.5 mL) afin de diminuer la densité de la solution. La suspension a été centrifugée 20 minutes à 415*xg*. Le surnageant a été enlevé et 10 mL d'une solution K3 (Macro-éléments : 2500 mg/l KNO₃, 250 mg/l NH₄NO₃, 900 mg/l CaCl₂·2H₂O, 250 mg/l MgSO₄·7H₂O, 250 mg/l (NH₄)₂SO₄, 150 mg/l NaH₂PO₄·H₂O; Micro-éléments : 74.6 mg/l Na₂EDTA, 27.0 mg/l FeCl₃·6H₂O, 3.0 mg/l H₃BO₃, 0.75 mg/l KI, 10.0 mg/l MnSO₄·H₂O, 2.0 mg/l ZnSO₄·7H₂O, 0.025 mg/l CuSO₄·5H₂O, 0.25 mg/l Na₂MoO₄·2H₂O, 0.025 mg/l CoCl₂·6H₂O; Carbohydrates : 102.69 g/l sucrose, 0.25 g/l xylose et 0.1 g/l m-inositol; hormones : 0.1 mg/l acide 2,4-Dichlorophenoxyacétique, 1.0 mg/l acide 1-naphthylacétique, 0.2 mg/l 6-benzylaminopurine; vitamines et autres organiques : 1.0 mg/l biotine, 10.0 mg/l

pyridoxine HCl, 1.0 mg/l nicotinamide, 2.0 mg/l vitamine B12) (Nagy et Maliga, 1976) contenant 1% de cellulase Onozuka R-10 et 0,1% de pectolyase Y-23 (Kato et Esaka, 2000) a été ajoutée au culot. La paroi des cellules a ainsi été digérée pendant environ 16 heures à 27°C à la noirceur dans un Pétri scellé avec du Parafilm.

Les cellules ont ensuite été filtrées avec un filtre métallique de 140 µm et 5 mL de la solution K4 (solution K3 avec 0.4 au lieu de 0.3 M de sucrose) ont été ajoutés au filtrat. 1 mL de la solution W5 a ensuite été ajoutée délicatement et les cellules ont été centrifugées à 80xg pour 10 minutes. Les protoplastes qui se trouvaient dans l'interphase entre les solutions K4 et W5 ont été transférés dans un tube contenant 5 mL de W5. Les cellules ont été incubées à 8°C pendant 30 minutes. 100 µL de cette suspension de protoplastes ont été utilisés pour compter les cellules avec un hématocytomètre. Le reste des protoplastes a par la suite été centrifugé à 70xg pendant 5 minutes. Le culot a finalement été resuspendu dans un volume suffisant de la solution MMM (15 mM MgCl₂, 0.1% w/v MES et 0.5 M mannitol) afin d'obtenir 600 000 cellules par échantillon de 250 µL à transférer.

À 6 µg d'ADN (plasmides infectieux du TuMV contenant le gène codant pour la GFP par exemple) dissout dans 20 µL d'eau stérile, 250 µL de protoplastes en suspension dans la solution MMM ont délicatement été ajoutés, suivi par 250 µL de la solution PEG (40% w/v PEG 4000 (polyéthylène glycol), 0.4 M mannitol, 0.1 M Ca(NO₃)₂, pH ajusté à 8-9 avec KOH). Les cellules ont été incubées durant 5 minutes à la température de la pièce avant d'ajouter 2 fois 250 µL et neuf fois 1 mL de la solution W5. Les cellules ont délicatement été mélangées entre chaque ajout. Les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 70xg et le culot a été resuspendu dans 3 mL de la solution riche 3H (mélange 1 :1 des solutions K3 et H; pH 5.8 à 6; filtrer pour stériliser) (milieu H tiré de Potrykus et Shillito, 1986) afin de régénérer la paroi cellulaire. Les cellules ont finalement été déposées dans un Pétri et incubées à 27°C à la noirceur jusqu'à l'observation au microscope à fluorescence (deux jours) pour vérifier l'état des cellules et la fluorescence due à la GFP.

5.3 Induction de l'expression virale

Les feuilles de *B. perviridis* qui ont été bombardées avec des vecteurs inductibles ont été badigeonnées avec du dexaméthasone 30 μM . Une solution concentrée de 30 mM a d'abord été obtenue par la dissolution du dexaméthasone dans l'éthanol 95%. Ensuite, une solution 30 μM a été effectuée en diluant la solution concentrée dans une solution Tween-20 0,01% (Aoyama et Chua, 1997). Une autre méthode utilisée pour dissoudre le dexaméthasone a été de préparer une solution concentrée de 360 μM dans le DMSO. Une solution 30 μM a été effectuée en diluant le dexaméthasone dans une solution Tween-20 0,05% (Böhner et Gatz, 2001).

Les feuilles de *N. tabacum*/TGV bombardées avec des vecteurs inductibles ont été déposées sur un milieu MS-agar contenant 30 μM de dexaméthasone. Ces feuilles ont été incubées sur ce milieu de culture jusqu'à leur observation, soit 48 heures, 72 heures, 4 jours ou 10 jours.

Le lendemain du bombardement des cellules BY-2 étalées sur un milieu NT KC solide, le dexaméthasone à une concentration finale de 10 μM a été ajouté au milieu de culture. L'observation des cellules a été faite un ou deux jours après l'induction.

6 Observation de l'expression des gènes rapporteurs

6.1 Protéine de fluorescence verte

Les plantes de *B. perviridis* bombardées avec les vecteurs exprimant la GFP ont été observées sous une lampe UV portative, sous un binoculaire ou un microscope à fluorescence. Le binoculaire à fluorescence Nikon SNZ-1500 du laboratoire du Dr Armand Séguin au Service Canadien des Forêts (Québec) a été utilisé avec le mode d'excitation vert H 546, 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 SMZ1500 a aussi été utilisé avec les filtres d'excitation de 480/40 nm, deux BA de 535/50 et un DM de 505. Les feuilles de *N. tabacum*, cellules BY-2 et les protoplastes ont été observés avec ce dernier appareil.

6.2 β -Glucuronidase

Une feuille des plantes de *B. perviridis* et les feuilles de *N. tabacum*/TGV bombardées avec les vecteurs exprimant GUS ont été observées au binoculaire Wild photomakroskop M400 Heerbrugg après une incubation de 16 heures à 37°C dans une solution contenant du X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique). 0.1256 g de X-Gluc ont d'abord été dissouts dans 8 mL de DMSO. 24 mL de tampon d'incubation (10 mM Na₂EDTA, 0.1% Triton X-100 et 100 mM NaPO₄) ont été ajoutés à la solution de X-Gluc pour obtenir une solution 5X. Pour obtenir une solution de X-Gluc 1X, la solution 5X a été diluée avec le tampon d'incubation. Après la réaction enzymatique, les feuilles ont été décolorées dans de l'éthanol 70% afin de mieux visualiser les précipités bleus.

6.3 Immunobuvardage

Les feuilles ont été broyées dans l'azote liquide et ont été homogénéisées dans 100 µL de tampon de Laemmli 1X (tampon 2X : 100 mM Tris-Cl pH 6.8, 4% w/v SDS, 0.2% w/v bleu de bromophenol, 20% v/v glycérol) contenant 100 mM de β-mercaptoéthanol. Les homogénats ont été bouillis 3 minutes avant d'être centrifugés pendant 3 minutes à la température de la pièce à la vitesse maximale. 10 µL des surnageants ont été déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide 12% contenant 0.1% de SDS (SDS-PAGE). Les échantillons ont migré dans un courant de 200 V dans un tampon de course (running buffer : 3 g/l Tris-base, 14.4 g/l glycine et 8.64 g/l SDS) avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose pendant une heure à 100 V (tampon de transfert : 25 mM Tris-base, 193 mM glycine et 20% méthanol) selon la méthode proposée par Sambrook et Russel, 2000.

La détection des protéines a été réalisée selon deux méthodes : soit avec le substrat chromogénique DAB (3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride) ou avec le substrat chemiluminescent. Pour ce qui est du substrat chromogénique DAB, la membrane a été bloquée pendant une heure avec une solution PBS-lait 5%. Ensuite, 0.02% de NaN₃ (azoture de sodium) ainsi que le premier anticorps dirigé contre la capsid virale à la dilution appropriée ont été ajoutés à ce mélange. La membrane a été ainsi incubée pendant 16 heures à température de la pièce. Ensuite, la membrane a été lavée trois fois avec une solution PBS-Triton 0.5% puis une fois avec une solution contenant 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 et 150 mM NaCl. Le deuxième anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la peroxydase a été incubé durant une heure à la température de la pièce dans une solution 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl et lait 5%. La membrane a été par la suite lavée quatre fois avec la solution Tris-NaCl avant d'être mise en contact avec le substrat chromogénique. Le contact de la membrane avec le substrat chromogénique a été faite dans une solution contenant 9 mM de Tris-HCl pH 7.5, 0.03% de CoCl₂, 0.03% H₂O₂ et 1.6 mM de DAB.

Afin d'obtenir une détection plus sensible, le substrat chemiluminescent luminol provenant de la trousse ECL (Amersham Pharmacia) a aussi été utilisé. Pour révéler la protéine voulue, le protocole de la trousse a été suivi. Les anticorps primaires ont été dirigés soit contre la protéine de la capsidie ou contre les protéines d'intérêt GFP (Clontech) et GUS (Sigma).

6.4 Stabilité des gènes rapporteurs

Trois échantillons de feuilles (prélevés avec un poinçon) de trois plantes infectées ont été congelés dans le même tube et broyés à froid. Environ 400 mg de broyat a été utilisé pour extraire l'ARN total avec la trousse RNeasy® Plant Mini Kit de QIAGEN et selon les spécifications du fabricant. L'état de l'ARN extrait a été rapidement vérifié en déposant 1.5 µg d'ARN, contenant le tampon de chargement de gel d'ARN (6X : 95% (v/v) formamide déionisé, 0.025% (w/v) bleu de bromophénol, 0.025% (w/v) xylène cyanol FF, 5 mM EDTA pH 8.0, 0.025% (w/v) SDS), dans un puits d'un gel d'agarose 1% préparé avec le tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 1mM EDTA). Les cuvettes et les peignes ont été préalablement nettoyés avec une solution contenant 0.1 M de NaOH et 1 mM EDTA.

La réaction de transcriptase inverse a été réalisée avec 1 µg d'ARN. Le protocole utilisé a été celui recommandé par le manufacturier de la trousse ProStar Ultra HF (Stratagene). Brièvement, dans un premier temps, 1 µg d'ARN est incubé avec 6 ng d'une amorce aléatoire (10 ng/µL) pendant 5 minutes à 65°C suivi de 10 minutes à la température de la pièce. Ensuite, 25 U de Stratascript RT Polymérase, 1 µL tampon Stratascript RT 10X (0.5 M Tris-HCl pH 8.3, 0.75 M KCl et 0.03 M MgCl₂), 8 U de RNase Block Ribonuclease Inhibitor, 0.1 mM de chaque dNTP ont été ajoutés pour obtenir un volume final de 10 µL. La réaction de transcriptase inverse a été faite à 42°C durant 1 heure, suivie d'une incubation de 5 minutes à 95°C pour inactiver l'enzyme.

La réaction d'amplification suivant celle de la transcriptase inverse a été réalisée avec la Taq DNA polymérase Gold (2.5 U) (GeneSys Ltd) et le tampon 1X associé (10X : 750 mM Tris-HCl pH 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, et 0.1% v/v Tween 20) selon le

protocole décrit à la section 4.1 mais 25 mM de $MgCl_2$ a été ajouté à la solution d'amplification ainsi qu'un μL de DMSO. 1 μL de la solution d'ADNc a été utilisé pour l'amplification. Les amorces utilisées ont été JFP1*HpaI* et FTHC2300 (tableau VI) qui se fixent respectivement dans les séquences codant pour P1 et HC-Pro. Le volume total de la solution d'amplification a été de 50 μL . Les conditions d'amplification ont été les mêmes qu'à la section 4.1. mais l'étape d'élongation à 55°C a été de 6 minutes.

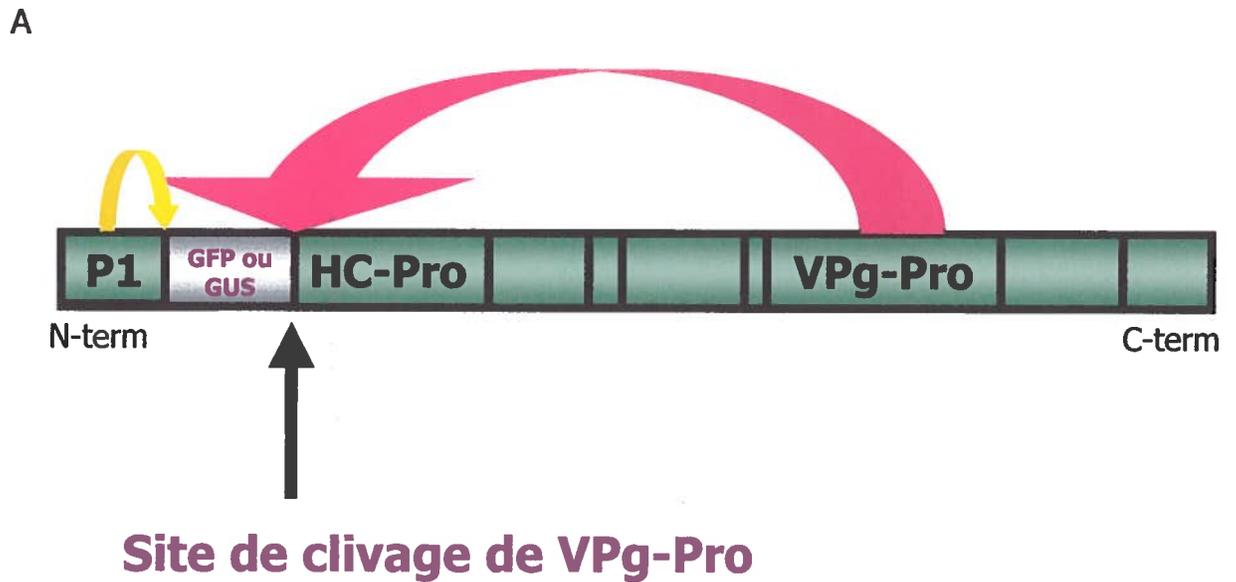
Chapitre 3

Résultats

1 Insertion d'un gène rapporteur dans le plasmide infectieux p35Tunos

1.1 Construction de p35Tunos/GFP et de p35Tunos/GUS

Les gènes rapporteurs *gfp* et *uidA* ont été insérés entre les gènes codant pour P1 et HC-Pro du TuMV. Ils contenaient les séquences codantes pour le clivage par P1 et VPgPro (Figure 9A et B). Le plasmide p35Tunos a été employé pour ce travail (Sánchez et al., 1998) (Figure 10A). Pour ce faire, le site de restriction *Sac*II a d'abord été ajouté par mutagénèse dirigée à la jonction des deux gènes viraux, et plus précisément après la séquence codant pour le site de clivage reconnu par P1 (Figure 10B). Ce même site de restriction a aussi été ajouté par PCR en amont et en aval des gènes *gfp* et *uidA* provenant des plasmides pBin m-*gfp5*-ER et pBI221 respectivement (Figure 9B). De plus, la séquence codant pour un site de clivage en *trans* reconnu par la VPg-Pro a été ajoutée à la suite du gène rapporteur en même temps que les sites de restriction (Figure 9B). Cette séquence code pour le site de protéolyse efficace qui se trouve entre la polymérase et la capsid du TuMV (Nicolas et Laliberté, 1992). Les gènes *gfp* et *uidA* ont finalement été insérés dans le site de restriction *Sac*II de p35Tunos/*Sac*II (Figure 11A et B). Les clones contenant les gènes d'intérêt ont été détectés par la méthode d'hybridation *in situ*. Les étapes critiques de l'assemblage des constructions p35Tunos/*Sac*II, p35Tunos/GFP et p35Tunos/GUS ont été vérifiées par séquençage.



B

gfp :

```

AAG ATT GTG CAC TTT AGT GCC GCG GGA ATG AGT AAA ... CTA TAC AAA GCT TGT GTC TAT CAC CAG GCA GCC GCG GGA
K  LVHFS  A A G  M S K  L Y K  A C V Y H Q  A A A G

```

uidA :

```

AAG ATT GTG CAC TTT AGT GCC GCG GGA ATG TTA CGT ... GGC AAA CAA GCT TGT GTC TAT CAC CAG GCA GCC GCG GGA
K  LVHFS  A A G  M L R  G K Q  A C V Y H Q  A A A G

```

Figure 9 : Position des gènes rapporteurs dans TuMV/GFP et TuMV/GUS.

A) Position de la protéine d'intérêt (GFP ou GUS) dans la polyprotéine du TuMV. La protéine d'intérêt est bordée par les sites de clivage de P1 et de VPg-Pro.

B) Séquence nucléotidique en 5' et en 3' de *gfp* et *uidA* (encadrés) marquant les emplacements des séquences des sites de restriction *Sac*I (souligné), des sites de reconnaissance de P1 (double souligné) et de VPg-Pro (gras) ajoutés par mutagenèse dirigée. Les liens peptidiques clivés par les protéases sont indiquées par des flèches verticales. Les gènes d'intérêts sont bordés par les gènes codant pour P1 et HC-Pro.

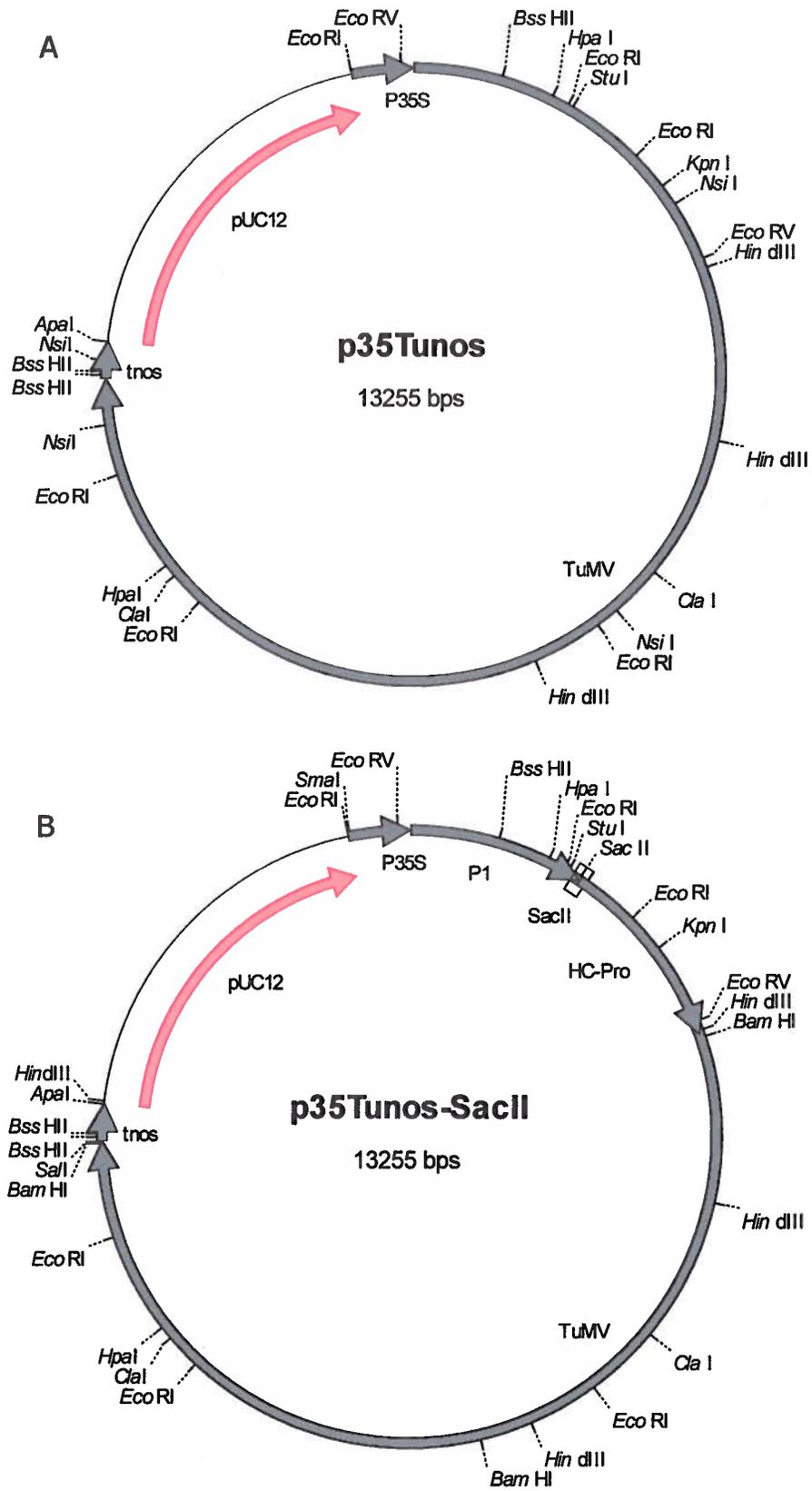


Figure 10 : Cartes de restriction de p35Tunos et de p35Tunos/SacII

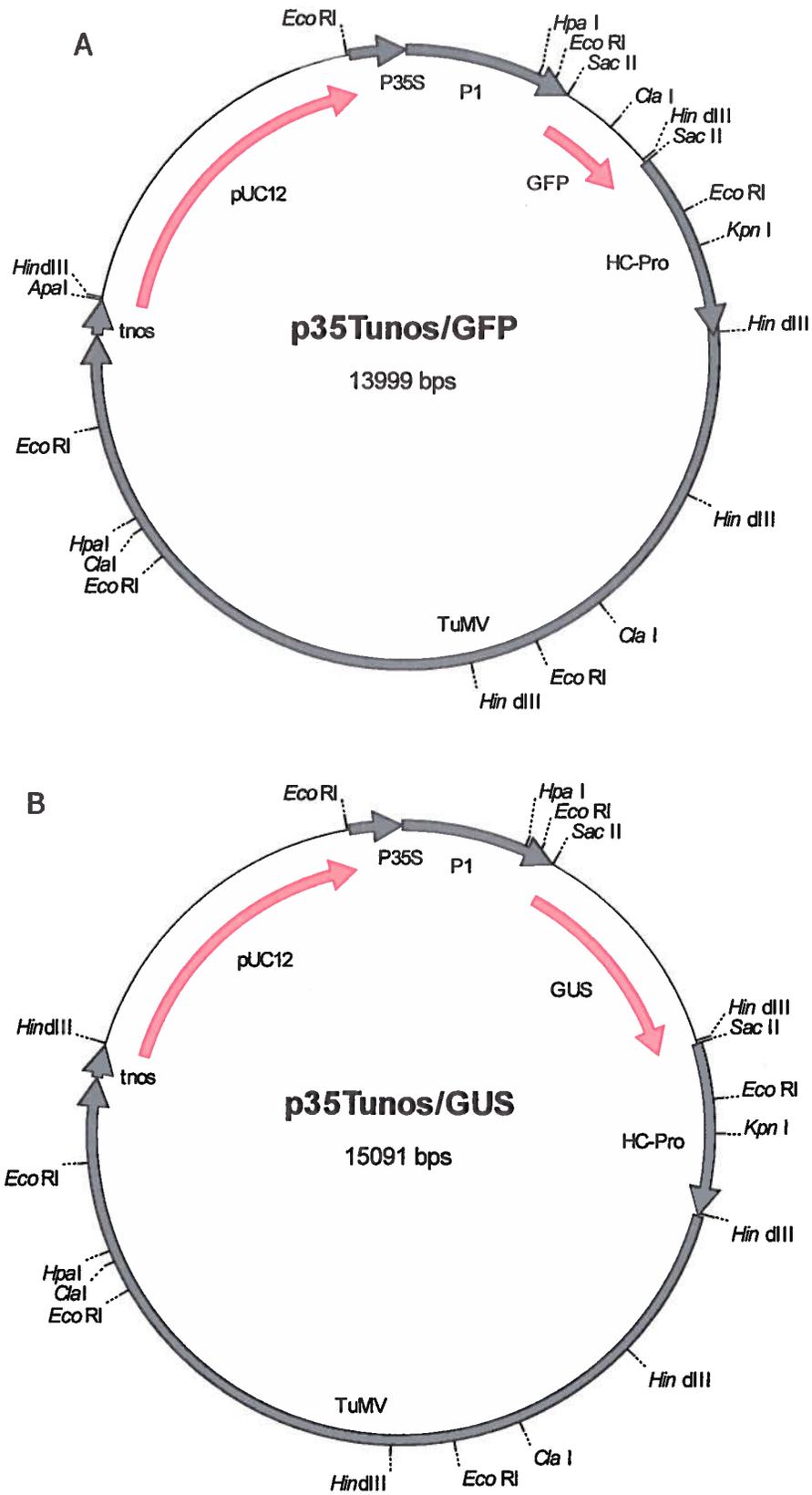


Figure 11 : Cartes de restriction de p35Tunos/GFP et de p35Tunos/GUS.

1.2 Infection systémique de *B. perviridis* avec p35Tunos/GFP et p35Tunos/GUS

Cinq plantes de *B. perviridis* ont été infectées par bombardement particulaire avec les constructions p35Tunos (témoin positif d'infection), p35Tunos/SacII (témoin positif de modification de nucléotides), p35Tunos/GFP et p35Tunos/GUS afin d'obtenir une infection systémique par le virus. De plus, un témoin sans ADN a été fait.

Trois essais indépendants ont été effectués avec p35Tunos et les constructions contenant les gènes rapporteurs, un seul avec p35Tunos/SacII. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VIII. L'infection de *B. perviridis* par TuMV, TuMV/SacII, TuMV/GFP et TuMV/GUS a mené à l'apparition de symptômes caractéristiques d'une infection au TuMV. Les premiers symptômes visibles étaient la déformation des feuilles, les retards de croissance ainsi que les mosaïques. Ces mosaïques étaient caractérisées par des plages vertes pâles sur fond de vert plus foncé (Figure 12).

Un léger retard a été remarqué dans l'apparition des symptômes pour les plantes infectées avec TuMV/GFP tandis qu'une infection avec TuMV/GUS a été marquée d'un retard plus considérable (Tableau VIII). La présence de virus a été confirmée par immunobuvardage avec un sérum de lapin dirigé contre la protéine de la capsid (CP). (Figure 13A et 16A). Le signal n'était pas observé pour les plantes non-infectées.

Tableau VIII : Résultats obtenus suite à la transfection par bombardement particulaire de plantes de *B. perviridis* par p35Tunos, p35Tunos/SacII, p35Tunos/GFP et p35Tunos/GUS.

Constructions	% de plantes infectées	Nombre de jours nécessaires pour l'apparition des symptômes
Non-infectée	0%	s/o
p35Tunos	50 à 100%	8 à 16 jours
p35Tunos/SacII	80%	12 à 19 jours
p35Tunos/GFP	20 à 100%	12 à 20 jours
p35Tunos/GUS	40 à 70%	14 à 26 jours

s/o, sans objet



Figure 12 : Plantes de *Brassica perviridis* saine et infectée au TuMV
A) Non-infectée et B) infectée par bombardement particulaire avec le plasmide infectieux p35Tunos.

1.3 Observation de l'expression des gènes rapporteurs

1.3.1 La Protéine de fluorescence verte

La production de GFP fonctionnelle a été vérifiée en soumettant les plantes aux rayons UV. Une fluorescence caractéristique de l'expression de la GFP a été observée dans les feuilles infectées avec TuMV/GFP de 20 jusqu'à au moins 35 jours post-infection (Figure 14). Cette fluorescence était absente dans les feuilles et les zones non-infectées ou infectées avec TuMV sauvage.

La synthèse et le processus de maturation de la GFP dans les feuilles infectées depuis 8, 15 et 30 jours par le TuMV/GFP a été vérifiée par immunobuvardage avec un sérum de lapin dirigé contre GFP. La protéine détectée avait un poids moléculaire d'environ 30 kDa (Figure 13B), comme attendu, et indiquait que la protéolyse par P1 et VPg-Pro avait effectivement eu lieu.

1.3.2 La β -Glucuronidase

L'activité de la β -glucuronidase a été dosée en incubant une feuille dans une solution contenant du X-Gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique) pendant 16 heures. Un précipité bleu a révélé la présence dans les feuilles infectées de l'activité de l'enzyme sur son substrat (Figure 15). Cette activité était absente dans les feuilles saines.

La synthèse et le processus de maturation de GUS dans les feuilles infectées par le TuMV/GUS 8, 15 et 30 jours post-infection a été vérifiée par immunobuvardage avec un sérum de lapin dirigé contre GUS. La protéine détectée avait un poids moléculaire d'environ 68k Da (Figure 16B), comme attendu, et indiquait que la protéolyse par P1 et VPg-Pro avait effectivement eu lieu. Cependant, une bande de plus haut poids moléculaire était également observée, suggérant que la maturation n'était pas toujours complète.

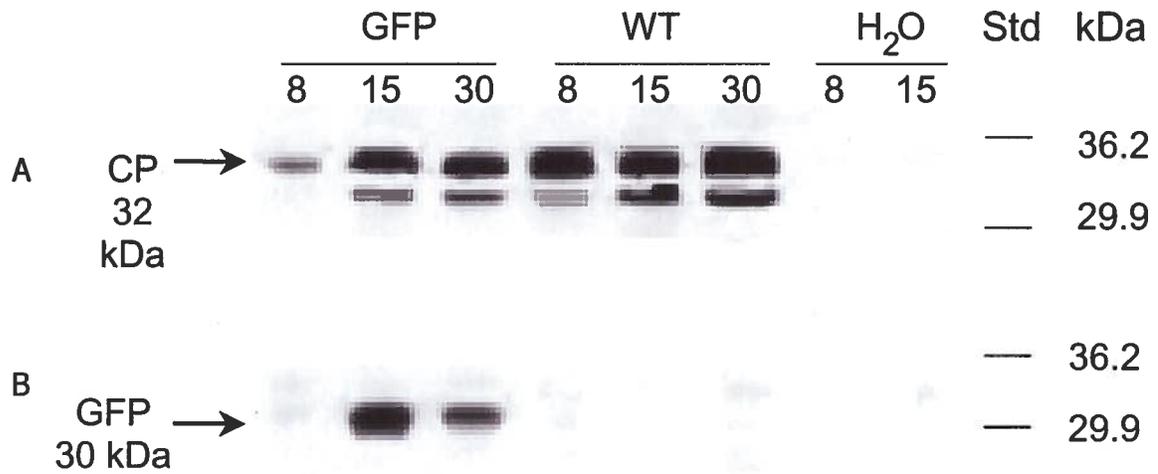


Figure 13 : Détection de la protéine de la capsid et de la protéine de fluorescence verte.
 Immunobuvardage sur des feuilles de *B. perviridis* non-infectées (H₂O), bombardées avec p35Tunos ou p35Tunos/GFP récoltées à 8, 15 et 30 jours post-infection avec des anticorps dirigés contre A) la capsid (CP) et B) la protéine de fluorescence verte (GFP). std : standard de poids moléculaire

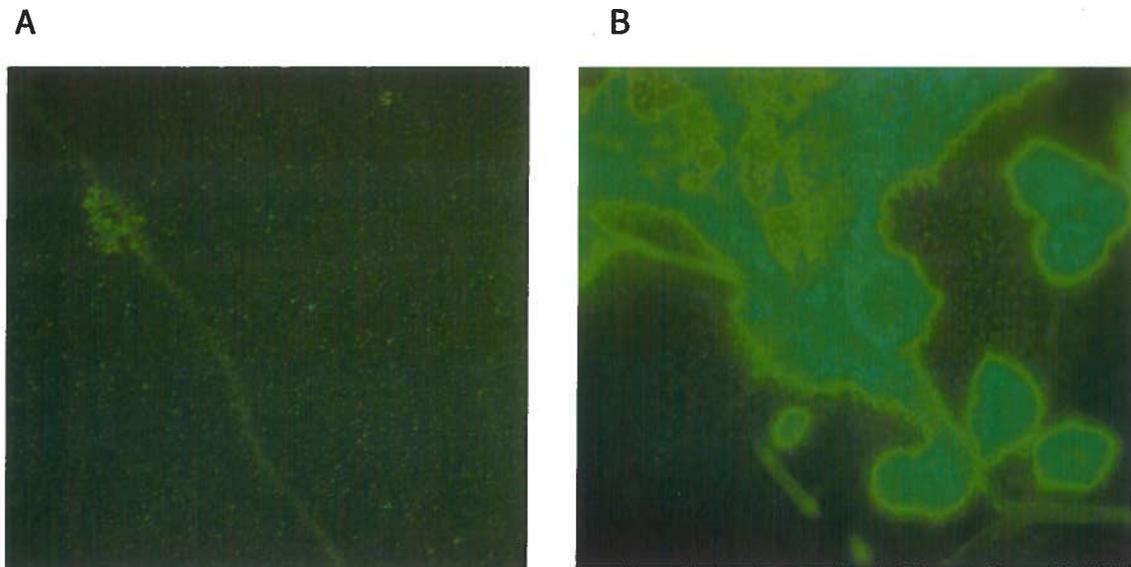


Figure 14 : Fluorescence de la GFP sur des feuilles de *B. perviridis* non-infectée et infectée avec TuMV/GFP
 Observation au microscope à fluorescence de feuilles de *B. perviridis* récoltées 35 jours après le bombardement avec des billes recouvertes A) d'eau (non-infectée) ou de B) p35Tunos/GFP.

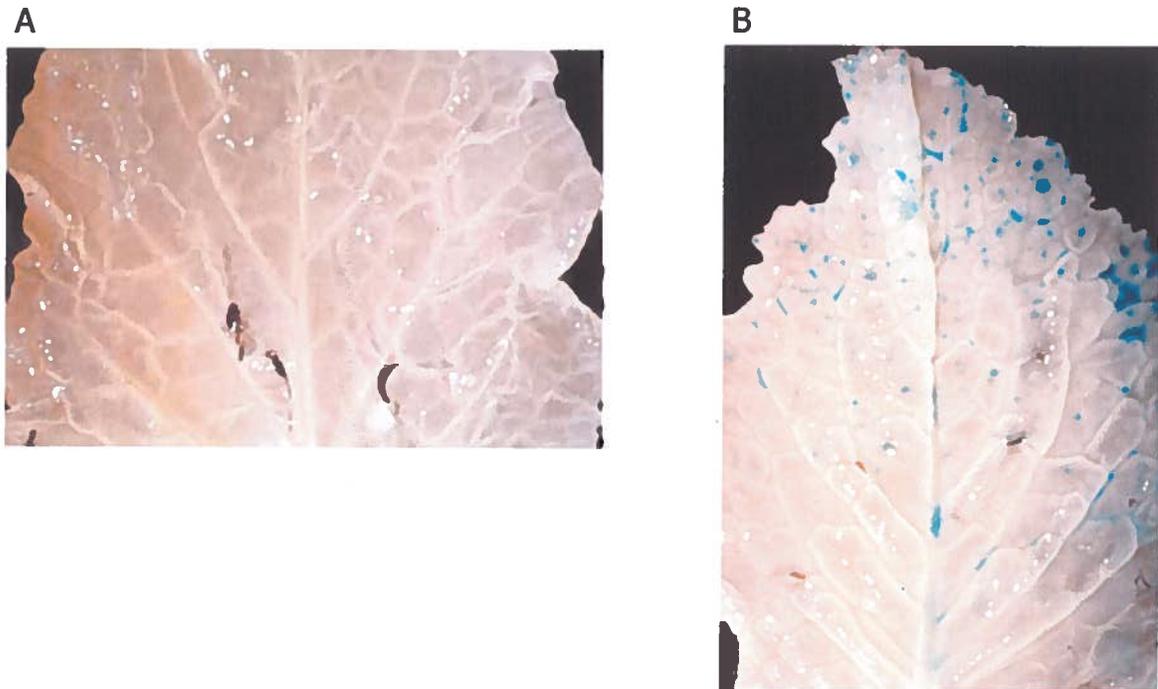


Figure 15 : Feuilles de *B. perviridis* non-infectées et infectées avec TuMV/GUS

Les feuilles ont été prélevées à 20 jours post-infection de plantes bombardées avec des billes enrobées A) d'eau (non-infectées) et B) de p35Tunos/GUS. Les feuilles ont été incubées 16 heures dans le substrat X-Gluc de la β -glucuronidase avant d'être décolorées dans de l'éthanol 70%.

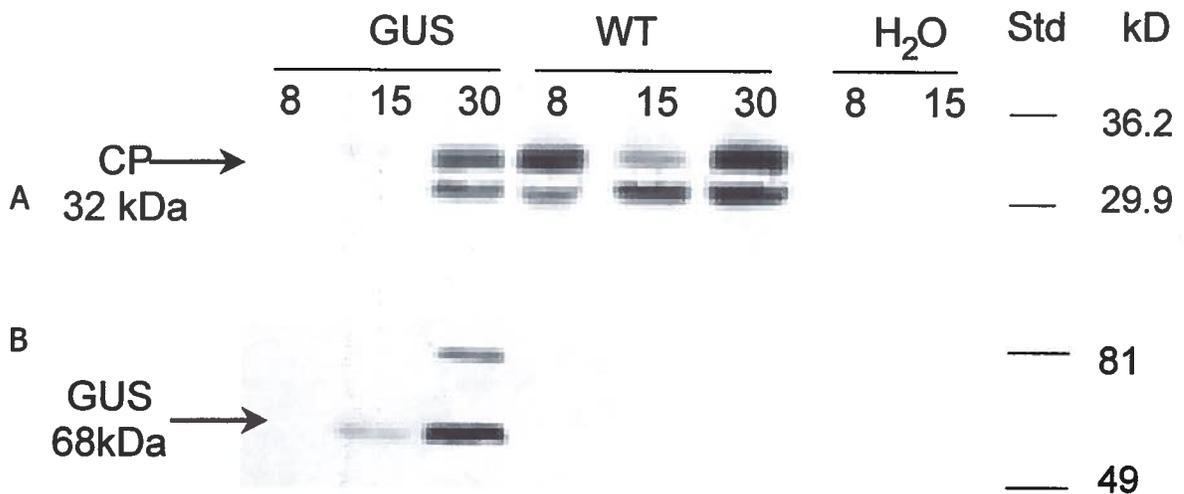


Figure 16 : Détection des protéines de la capsidite et de la β -glucuronidase.

Les feuilles bombardées avec p35Tunos, p35Tunos/GUS ou de l'eau ont été récoltées à 8, 15 et 30 jours post-infection pour effectuer un immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre A) la protéine de la capsidite et B) de la β -glucuronidase. Std : standard de poids moléculaire

1.3.3 Analyse de la stabilité de l'insert

La stabilité de l'insert dans le TuMV a été étudiée par RT-PCR. L'amorce utilisée pour la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN total a été une amorce aléatoire. Ensuite, la région où se trouve le gène d'intérêt a été amplifiée par PCR avec des amorces se trouvant de part et d'autre du gène d'intérêt, soit dans les gènes P1 et HC-Pro. La réaction de RT-PCR a été réalisée sur des poinçons de jeunes feuilles de *B. pervidiris* infectées par bombardement avec p35Tunos, p35Tunos/GFP ou p35Tunos/GUS, et ce, 15 et 30 jours post-infection (Figure 17).

La région amplifiée de p35Tunos/GFP a montré une bande de 2.1 kb qui correspondait à la taille prévue pour un insert contenant *gfp*. La présence d'une bande unique jusqu'à 30 jours indiquait que le gène était inséré de façon stable. Dans le cas de p35Tunos/GUS, une très faible bande de 3.2 kb correspondant à la taille prévue pour un insert contenant *uidA* a été observée après 15 jours. Afin de bien voir cette bande, six volumes de la solution d'amplification par rapport aux autres échantillons ont été déposés dans le puits du gel d'agarose. L'ARN viral était bien présent dans les feuilles infectées puisque l'amplification au niveau de la région de la polymérase et de la capsid a mené à une bande forte de la taille attendue (donnée non montrée). Par contre, cette bande disparaissait progressivement après 15 jours, pour être remplacée par d'autres bandes de plus petite taille, se rapprochant de celle obtenue avec le TuMV sauvage. Au moins quatre bandes distinctes étaient visibles, se situant entre 2,1 kb et 1,6 kb. Ceci dénotait l'instabilité du gène *uidA* dans le génome du TuMV, qui pouvait conduire jusqu'à son élimination presque complète après 30 jours post-infection.

Malgré la possibilité d'instabilité de l'insert, il est possible du moins à court terme d'exprimer un gène étranger dans le TuMV. Ce gène semble être synthétisé en grande quantité et être actif dans les plantes infectées.

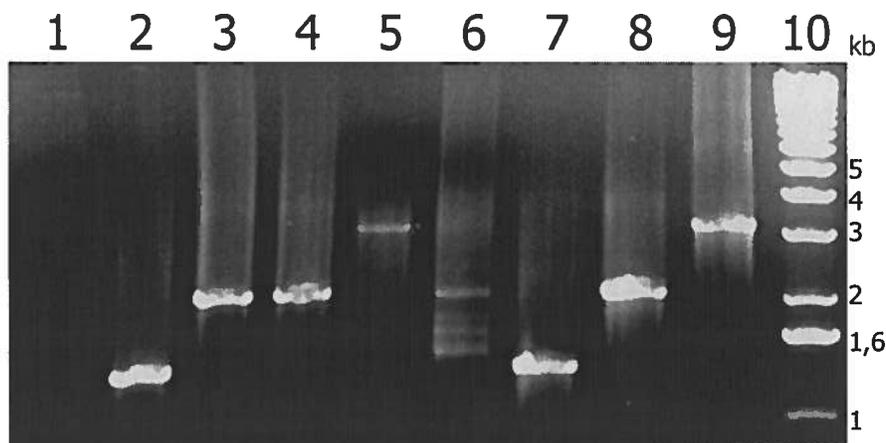


Figure 17 : Analyse par RT-PCR de la stabilité des inserts dans le TuMV

1 à 6) RT-PCR sur l'ARN total de plantes de *B. perversidis* bombardées avec 1) de l'eau, 2) p35Tunos, 3) p35Tunos/GFP 15 jours post-infection, 4) p35Tunos/GFP 30 jours post-infection, 5) p35Tunos/GUS 15 jours post-infection et 6) p35Tunos/GUS 30 jours post infection. 7 à 8) PCR contrôles avec les plasmides 7) p35Tunos, 8) p35Tunos/GFP et 9) p35Tunos/GUS. 10) Standard de poids moléculaire 1Kb de Gibco.

2 Élaboration d'un système d'induction

2.1 Construction de pTopTunos et ses dérivés

Le promoteur inductible P_{Top10} a été inséré en amont de l'ADNc de TuMV à la place de $P_{CaMV 35S}$. Le changement de promoteur a été effectué sur une version tronquée du plasmide original, soit p35Tunos Δ . Cette construction a été déléetée de 8,9 kb entre les sites de restrictions *Hpa*I et *Bam*HI situés aux positions 970 et 9894 respectivement. Ensuite, le site de restriction *Stu*I a été ajouté en aval de la boîte TATA du $P_{CaMV35S}$ par mutagénèse dirigée (Figure 18A). Ce site de restriction a permis par la suite d'enlever le $P_{CaMV 35S}$ par les enzymes de restriction *Eco*RI et *Stu*I et d'y insérer le P_{Top10} provenant de pBinHygTopFree_{mod} (Figure 18B). Finalement, la construction pTopTunos Δ a été assemblée par l'insertion d'un fragment de 9,3 kb provenant de p35Tunos entre les sites de restriction *Bss*HII (positions 604, 9936 et 9960). Cet assemblage final a entraîné la perte d'un fragment de 24 pb dans le terminateur de la nopaline synthase (tnos). L'insertion des gènes rapporteurs *gfp* et *uidA* dans pTopTunos a été réalisée comme pour la construction de p35Tunos/GFP et p35Tunos/GUS à la section 1.1. Les portions modifiées des constructions pTopTunos, pTopTunos/GFP et pTopTunos/GUS ont été vérifiées par séquençage.

2.2 Infection de *Brassica perviridis* avec pTopTunos et ses dérivés

Comme la transcription du TuMV dans la construction pTopTunos nécessite un facteur de transcription exogène, les plasmides pTopTunos et pBinTGV ont été fixés sur les mêmes billes pour effectuer un co-bombardement. L'infektivité des constructions contenant les gènes rapporteurs *gfp* et *uidA* a aussi été vérifiée par la même méthode. De plus, nous avons étudié la possibilité de transcription à partir du P_{Top10} sans l'induction au dexaméthasone ou en l'absence du facteur de transcription TGV. Cinq à quinze plantes de *B. perviridis* ont été bombardées avec chacune de ces constructions. Plusieurs expériences ont été réalisées et le tableau IX donne les résultats d'une expérience représentative.

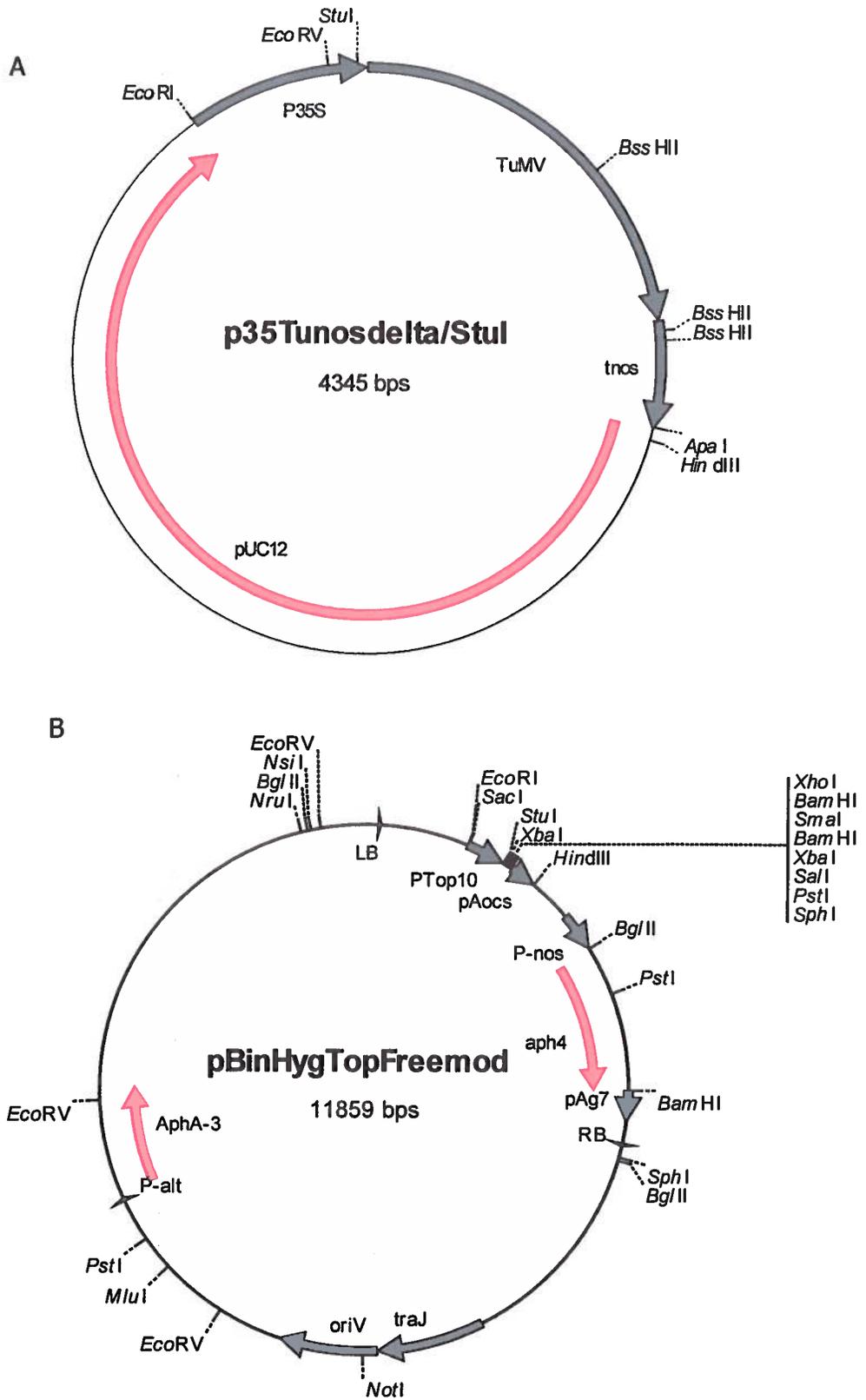


Figure 18 : Cartes de restriction de A) p35Tunos/StuI et de B) pBinHygTopFree_{mod}

Le bombardement de plantes de *B. perviridis* avec les constructions pTopTunos, pTopTunos/GFP et pTopTunos/GUS a mené à l'apparition de symptômes caractéristiques à l'infection au TuMV. Ces résultats ont été obtenus en présence ou non du facteur de transcription et de l'inducteur. Mais la présence de l'inducteur et du facteur de transcription semble avoir un effet positif sur l'expression virale puisqu'en général une plus grande quantité de ces plantes présentaient des symptômes. Nous avons remarqué que les symptômes des plantes bombardées avec ces constructions avaient tendance à apparaître un peu plus tard que les plantes bombardées avec p35Tunos et ses dérivés. La présence du TuMV dans les plantes infectées par le vecteur inductible a été vérifiée par immunobuvardage. La capsidie a été détectée avec des anticorps de lapin dirigés contre cette protéine. La capsidie n'a pas été détectée pour les plantes saines (Figure 19).

2.3 Observation de l'expression des gènes rapporteurs

L'activité de la GFP et celle de GUS ont été visibles sur toutes les feuilles infectées avec TuMV/GFP et TuMV/GUS (Figure 20). Les méthodes utilisées ont été les mêmes que celles décrites à la section 1.3.

L'expression virale a été possible à partir du P_{Top10} même en absence d'induction ou du facteur de transcription chez *B. perviridis*. Ce système nécessite donc des modifications afin d'obtenir une induction plus rigoureuse.

Tableau IX : Résultats obtenus suite à la transfection par bombardement particulaire de plantes de *B. perviridis* par pTopTunos, pTopTunos/GFP et pTopTunos/GUS.

Constructions	% de plantes infectées			Nombre de jours nécessaires pour l'apparition des symptômes
	Sans TGV	Avec TGV		
		Sans dx	Avec dx	
pTopTunos	60%	43%	75%	nd
pTopTunos/GFP	nd	nd	40%	19 à 22 jours
pTopTunos/GUS	nd	50%	0%	15 jours

nd, non déterminé

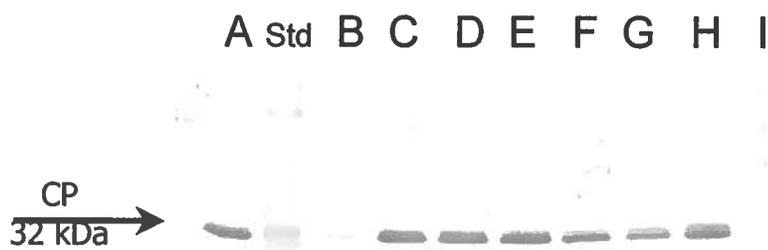


Figure 19 : Détection de la protéine de la capsid sur des plantes de *B. perviridis* bombardées avec pTopTunos

Immunobuvardage contre la protéine de la capsid à partir de poinçons de feuilles de *B. perviridis* qui ont été récoltées onze jours après le bombardement avec A) p35Tunos; B et C) p35Tunos/BssHII; D) pTopTunos seul; E et F) pTopTunos + pBinTGV induit au dexaméthasone, G et H) pTopTunos + pBinTGV non-induit au dexaméthasone et I) non-infecté.

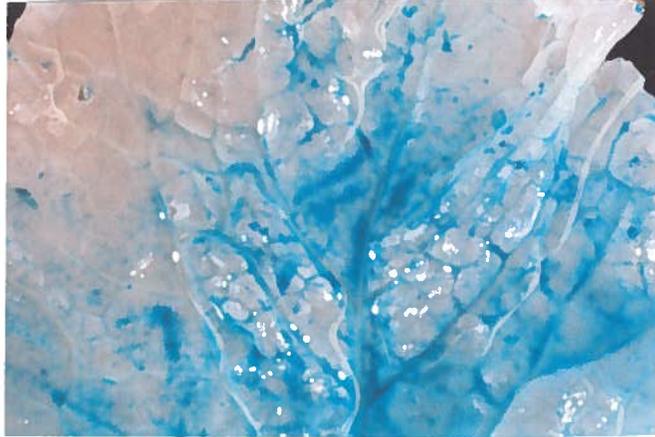


Figure 20 : Feuille de *B. perviridis* bombardée avec pTopTunos/GUS.

La feuille a été récoltée 20 jours après le bombardement avec pTopTunos/GUS et a été incubée dans le X-Gluc pendant 16 heures et décolorées dans l'éthanol 70%.

3 Système inductible par la complémentation de la polymérase virale

Afin d'éviter les fuites potentielles du P_{Top10} , un système rigoureux d'induction de l'expression virale a été créé. Ce système est basé sur la complémentation de la polymérase (RdRp) non-fonctionnelle dans le vecteur viral par une RdRp se trouvant sous le contrôle du promoteur inductible sur une autre construction génique (Figure 7).

3.1 Constructions de p35Tunos/GFP-VNN et de p35Tunos/GUS-VNN

Dans un premier temps, la mutation pour les acides aminés VNN a été créée pour remplacer le motif GDD de la polymérase dans p35Tunos/GFP (Figure 21) (Li et Carrington, 1995). Ce changement d'acides aminés rend la polymérase inactive. Les nucléotides correspondants ont été modifiés de façon à retrouver un site de restriction *HpaI* dans la mutation et faciliter le repérage de la modification. Le plasmide p35Tunos/GUS-VNN a été assemblé en transférant le fragment *KpnI/ApaI* de 8,2kb contenant la mutation « VNN » de p35Tunos/GFP-VNN à la construction p35Tunos/GUS non-mutée.

Le plasmide pTop/5'NTR-Pol code pour la polymérase fonctionnelle sous le contrôle du promoteur inductible P_{Top10} . Pour ce faire, nous avons fusionné la séquence 5'NTR virale à celle de la polymérase fonctionnelle par PCR. Ce produit d'amplification a ensuite été introduit en aval du promoteur inductible P_{Top10} dans le vecteur pBinHygTopFree_{mod}. La séquence 5'NTR a été ajoutée pour augmenter les taux de traduction des ARNm (Basso et al., 1994) et ainsi obtenir une plus grande quantité de protéine. Un contrôle de complémentation avec une expression constitutive de la polymérase a été réalisé en insérant la séquence 5'NTR-Pol en aval du $P_{CaMV 35S}$. Les étapes critiques de l'assemblage des constructions p35Tunos/GFP-VNN, p35Tunos/GUS-VNN, pTop/5'NTR-Pol et p35/5'NTR-Pol ont été vérifiées par séquençage.

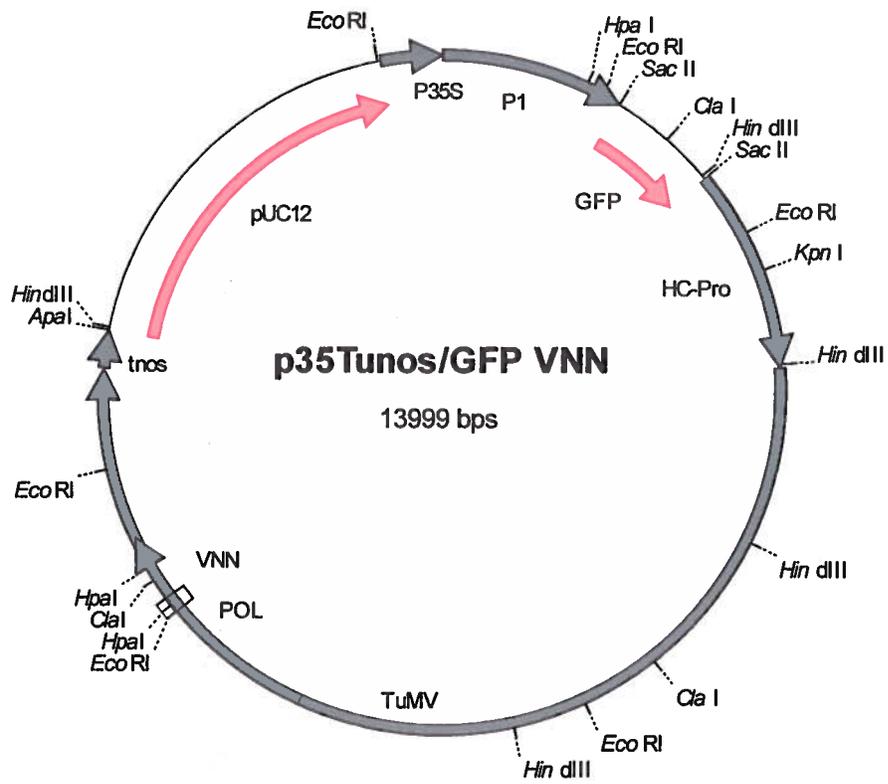


Figure 21 : Carte de restriction de p35Tunos/GFP-VNN

3.2 Expression transitoire sur *Nicotiana tabacum*

La complémentation a été vérifiée avec l'espèce *N. tabacum*. Des cellules de tabac BY-2 ont été bombardées et des protoplastes de la même espèce ont été transfectés chimiquement avec les différents plasmides nécessaires pour observer la complémentation. Ces plasmides étaient p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + pBinTGV et la transfection a été suivie par l'addition ou non de l'inducteur, le dexaméthasone, dans le milieu de culture. Aussi, des feuilles de *N. tabacum* transgéniques pour le facteur de transcription TGV ont été bombardées avec les mêmes plasmides.

3.2.1 Cellules de tabac BY-2

Les cellules acclimatées pendant deux jours sur un milieu de culture MS solide ont été bombardées avec p35Tunos/GFP, p35Tunos/GFP-VNN avec ou sans pTop/5'NTR-Pol et pBINTGV. Un témoin négatif sans ADN a aussi été effectué. Les cellules bombardées ont été observées au microscope à fluorescence un à trois jours post-infection. Le tableau X montre les résultats obtenus. Aucune fluorescence significative n'a été observée avec p35Tunos/GFP-VNN ainsi qu'avec p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + pBinTGV sans induction au dexaméthasone. Par contre, quelques cellules fluorescentes ont été observées avec p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + pBinTGV induites avec 10 μ M de dexaméthasone. Peu de cellules bombardées avec le témoin positif P35Tunos/GFP émettaient de la fluorescence et moins de 1% des cellules auraient été transfectées. Il était parfois difficile de faire la distinction entre une fluorescence véritable due à la GFP ou à une fluorescence causée par des débris cellulaire.

Tableau X : Comparaison de la fluorescence obtenue suite au bombardement de cellules BY-2 avec p35Tunos/GFP ou p35Tunos/GFP-VNN

Constructions	Fluorescence
Non-infecté	-
p35Tunos/GFP	+/-
p35Tunos/GFP-VNN	-
p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + pBinTGV sans dx	-
p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + pBinTGV + dx	+

Tableau XI : Comparaison de la fluorescence obtenue suite à la transfection chimique de protoplastes BY-2 avec p35Tunos/GFP ou p35Tunos/GFP-VNN

Constructions	Fluorescence
Non-infecté	-
p35Tunos/GFP	-
p35Tunos/GFP-VNN	+/-
p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + pBinTGV + dx	+

Tableau XII : Résultats obtenus 48 heures après le bombardement particulaire de feuilles de *N. tabacum*/TGV par p35Tunos/GFP, pTopTunos/GFP, p35Tunos/GFP-VNN et p35Tunos/GFP-VNN

Constructions	Fluorescence	
	Sans induction	Avec induction
Non-infecté	-	-
p35Tunos/GFP	+++	s/o
pTopTunos/GFP	+	++
p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol	+/-	+
p35Tunos/GFP-VNN + p35/5'NTR-Pol	+	s/o
p35Tunos/GFP-VNN	+/-	s/o

s/o, sans objet

Des protoplastes de cellules de tabac BY-2 ont aussi été transfectées avec 6 µg d'ADN. Les constructions p35Tunos/GFP, p35Tunos/GFP-VNN et p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + pBinTGV ont servi pour cette transfection. Peu de fluorescence a été observée sous la lumière UV pour chacune des transfactions. Même le témoin positif de fluorescence, p35Tunos/GFP, n'avait pas semblé exprimer la GFP car 1% ou moins des cellules semblaient vertes sous la lumière UV du microscope à fluorescence. Une estimation de 1 à 3% de cellules fluorescentes ont été visualisées pour la transfection de protoplastes avec p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + pBinTGV en présence de dexaméthasone (Tableau XI).

Ces expériences ont donc montré la limite du bombardement particulaire sur des cellules en suspension et de la transfection chimique de protoplastes, à tout le moins avec les conditions que nous avons choisies.

3.2.2 Bombardement de feuilles sur *Nicotiana tabacum*/TGV

Pour cette expérience, des morceaux de feuilles de *N. tabacum* exprimant le facteur de transcription TGV (*N. tabacum*/TGV) ont été utilisés. Cinq morceaux de feuilles ont été bombardés avec p35Tunos/GFP, pTopTunos/GFP ou p35Tunos/GFP-VNN avec ou sans la polymérase fonctionnelle (p35/5'NTR-Pol ou pTop/5'NTR-Pol). Un témoin de bombardement sans ADN a aussi été effectué (deux feuilles). Une fois bombardées, les feuilles ont été déposées sur un milieu MS-agar avec ou sans 30 µM de dexaméthasone. Ces Pétri ont été incubés à 25°C avec 16 heures de luminosité par jour.

48 et 72 heures post-infection, deux feuilles de chaque essai ont été observées sous microscope à fluorescence afin de visualiser l'expression de la GFP. De la fluorescence distribuée de façon uniforme a été observée à la pointe des trichomes (« poils ») de chaque feuille. Plus en profondeur dans la feuille, d'autres cellules isolées et distribuées principalement dans une zone couvrant environ le tiers des feuilles ont été observées. Plusieurs de ces cellules étaient difficiles à voir car elles se situaient dans les couches internes de la feuille, sous l'épiderme. Par contre, nous avons observé une nette

différence entre la quantité de cellules fluorescentes chez les feuilles bombardées avec les constructions exprimant le TuMV/GFP comparé aux feuilles bombardées avec les billes d'or seulement (témoin négatif de GFP).

Les résultats après 48 et 72 heures étaient similaires et un sommaire est présenté au tableau XII. Nous avons observé que les feuilles de *N. tabacum*/TGV bombardées avec les plasmides p35Tunos/GFP et pTopTunos/GFP présentaient plusieurs cellules isolées visibles. L'induction au dexaméthasone des feuilles bombardées avec pTopTunos/GFP a permis l'expression de la GFP dans plus de cellules qu'en absence d'induction. Aussi, les feuilles bombardées avec p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol en présence de l'inducteur ou avec les plasmides p35Tunos/GFP-VNN + p35/5'NTR-Pol montrent plusieurs cellules fluorescentes bien visibles. De plus, quelques cellules fluorescentes étaient présentes sur les feuilles bombardées avec le plasmide p35Tunos/GFP-VNN ou p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol sans induction mais ces cellules étaient beaucoup moins nombreuses et visibles que les autres échantillons étudiés. Quelques cellules fluorescentes ont même été observées sur le témoin négatif sans infection. Les cellules nécrosées suite au bombardement particulière étaient difficilement différenciées des cellules exprimant la GFP.

Des cinq feuilles de *N. tabacum*/TGV bombardées avec les constructions contenant la GFP, une a été utilisée pour effectuer un immunobuvardage. Cet immunobuvardage a été réalisé avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine de la capsid. La protéine de la capsid a été révélée seulement sur une feuille 48 heures suite au bombardement avec p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol induite au dexaméthasone. La présence de la capsid des autres échantillons de feuilles (non-infectée, p35Tunos, p35Tunos/GFP, p35Tunos/GFP-VNN, p35Tunos/GFP-VNN + p35Tunos, p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol non-induit, pTopTunos/GFP induit et non-induit) n'a pas été détectée (Figure 22).

Puisqu'il a été ardu d'observer la fluorescence de GFP, nous avons donc choisi de répéter l'expérience mais cette fois-ci avec GUS parce que son activité enzymatique est plus facile à visualiser.

Les plasmides p35Tunos/GUS, pTopTunos/GUS ou p35Tunos/GUS-VNN avec ou sans la polymérase fonctionnelle (p35/5'NTR-Pol ou pTop/5'NTR-Pol) ont été bombardés chacun sur 5 morceaux de feuilles de *N. tabacum*/TGV. Des témoins de bombardement avec pBI221 (3 feuilles) et sans ADN (2 feuilles) ont aussi été effectués. Ces feuilles ont été déposées sur un milieu MS avec ou sans 30 µM de dexaméthasone selon le cas. Elles ont été incubées à 25°C environ dans des Pétri avec 16 heures de luminosité par jour. À quatre et dix jours post-infection, une feuille de chaque témoin et deux feuilles bombardées avec les vecteurs viraux ont été prélevées et incubées pendant 16 heures dans la solution d'incubation contenant le X-Gluc. Des plages bleues de différentes grosseurs sont apparues sur les feuilles, dues à l'activité enzymatique de GUS sur son substrat (Figure 23).

La comparaison des plages bleues visualisées au binoculaire est présentée dans le tableau XIII. Les feuilles témoins bombardées avec pBI221 ont montré une centaine de plages bleues à 4 et 10 jours post-infection. Ces plages étaient minuscules et difficilement visibles à l'œil nu. Les plages visualisées sur les feuilles bombardées avec le virus répliatif (p35Tunos/GFP ou pTopTunos/GFP + dx) étaient plus grosses qu'avec pBI221 et quelques-unes étaient mêmes énormes (Figure 23). L'absence d'induction des feuilles bombardées avec pTopTunos/GUS a été marquée par une faible expression de GUS. Autant de plages bleues ont été visualisées sur les feuilles bombardées avec p35Tunos/GUS qu'avec p35Tunos/GUS-VNN + pTop/5'NTR-Pol + dx mais ces dernières plages étaient beaucoup plus petites. L'expression de GUS était moindre sur les feuilles bombardées avec p35Tunos/GUS-VNN + pTop/5'NTR-Pol sans induction. Peu ou pas de plages ont été observées sur les feuilles bombardées avec pTopTunos/GUS sans induction, p35Tunos/GUS-VNN ou p35Tunos/GUS-VNN + p35/5'NTR-Pol.

Bien que des variations aient été observées dans l'expression virale, il semble qu'il est possible d'obtenir une répliation contrôlée par la complémentation de la mutation VNN avec l'induction au dexaméthasone de la transcription de la polymérase fonctionnelle. Ce système devra par contre être vérifié dans des plantes transgéniques de *N. tabacum*.



Figure 22 : Détection de la protéine de la capside sur des feuilles de *N. tabacum*/TGV suite à la complémentation de TuMV/GFP-VNN par la RdRp fonctionnelle

Immunobuvardage dirigé contre la capside dont les feuilles de *N. tabacum*/TGV ont été récoltées 48 heures après de le bombardement avec 1) de l'eau, 2) p35Tunos/GFP, 3) p35Tunos/GFP-VNN, 4) p35Tunos/GFP-VNN + p35Tunos, 5) p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol, 6) p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + dx et 7) pTopTunos/GFP.

Tableau XIII : Comparaison de l'activité enzymatique de la β -glucuronidase représentée par la quantité de plages bleues sur des feuilles de *N. tabacum*/TGV bombardées avec le TuMV/GUS et incubées 16 heures dans le X-Gluc.

Constructions	4 jours post-infection	10 jours post-infection
Non-infectée	-	-
pBI221	+++	+++
p35Tunos/GUS	+/-	+++
pTopTunos/GUS	+/-	-
pTopTunos/GUS + dx	+	++
p35Tunos/GUS-VNN	+	+
p35Tunos/GUS-VNN + p35/5'NTR-Pol	-	+/-
p35Tunos/GUS-VNN + pTop/5'NTR-Pol	+	++
p35Tunos/GUS-VNN + pTop/5'NTR-Pol + dx	+/-	+++

Une feuille a été observée à 4 ou 10 jours post-infection pour le bombardement sans ADN (non-infectée) et avec pBI221. Deux feuilles ont été observées à 4 ou 10 jours post-infection pour les autres bombardements avec le TuMV.

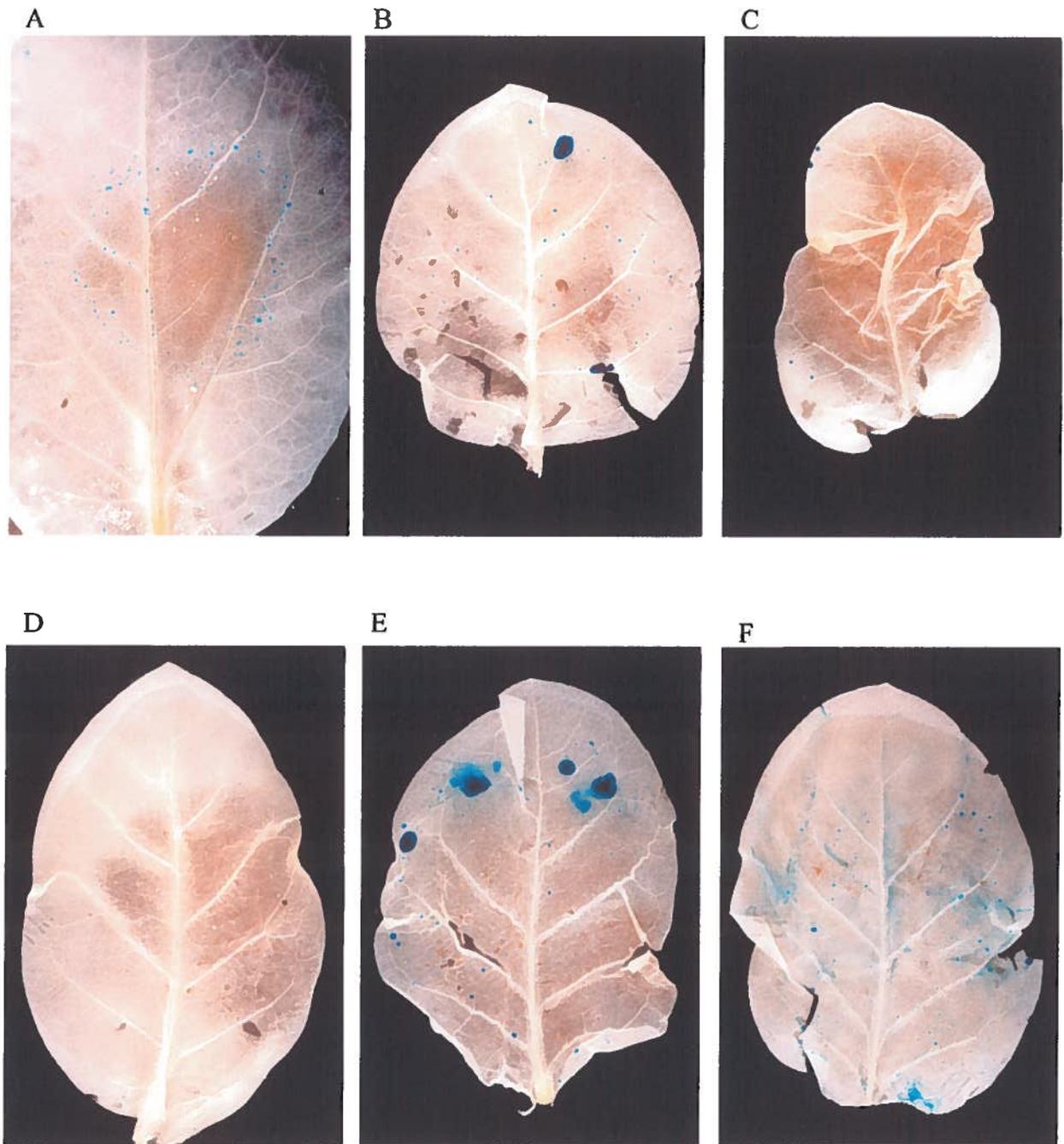


Figure 23 : Feuilles de *N. tabacum*/TGV suite au bombardement avec TuMV/GUS-VNN complémenté avec la RdRp

Les feuilles ont été récoltées et mises dans le X-Gluc 10 jours suite au bombardement avec des billes enrobées de A) pBI221, B) p35Tunos/GUS, C) p35Tunos/GUS-VNN, D) pTopTunos/GUS, E) pTopTunos/GUS + dx et F) p35Tunos/GUS-VNN + pTop/5'NTR-Pol + dx.

Chapitre 4

Discussion

Plusieurs études ont montré qu'il est possible d'introduire un gène étranger dans le génome d'un potyvirus. Ce virus chimérique inoculé sur une plante susceptible permet l'expression de la protéine étrangère simultanément avec les protéines virales. (Arasi et *al.*, 2002; Dolja et *al.*, 1992; Dolja et *al.*, 1998; Fernández - Fernández et *al.*, 2001; German-Retana et *al.*, 2000; Giddings et *al.*, 2000; Guo et *al.*, 1998). Mais au cours de la propagation virale, le gène d'intérêt a tendance à être délété (Dolja et *al.*, 1993; Fernández - Fernández et *al.*, 2001; German-Retana et *al.*, 2000; Guo et *al.*, 1998). Afin de minimiser la délétion de l'insert, il nous faudra introduire dans le génome de la plante l'ADNc viral ainsi que de développer un système où l'expression virale serait inductible. Ceci permettrait de contourner ce problème.

1 Insertion d'un gène rapporteur

Dans un premier temps, deux gènes rapporteurs ont été insérés dans le génome du TuMV, soit *gfp* ou *uidA*. L'avantage de la GFP est de visualiser son expression sans requérir de substrat ni de co-facteur pour former la molécule fluorescente (German-Retana et *al.*, 2000). La propagation des virus de plantes durant le processus d'infection peut donc être étudiée par cette technique non-destructrice en observant la plante sous rayons UV. Pour sa part, l'observation de l'activité enzymatique de GUS demande obligatoirement de sacrifier des feuilles. Cependant, le précipité bleu obtenu lorsque l'enzyme est en présence de l'un de ses substrats, le X-Gluc, ne peut être confondu avec d'autres phénomènes naturels. Les zones bleues sont facilement visibles à l'œil suite à une incubation d'environ 16 heures à 37°C dans le tampon contenant le X-Gluc.

La fluorescence et le précipité bleu dus à l'expression de la GFP et de GUS respectivement, tout comme les mosaïques, apparaissent d'abord près des veines principales de la feuille infectée. Ce phénomène montre que le virus se réplique dans les cellules entourant le phloème/xylème lors de son entrée dans une nouvelle feuille. Il se propage ensuite de cellule en cellule par les plasmodesmes à partir de cette zone (Carrington et *al.*, 1996).

Les gènes rapporteurs ont été ajoutés entre les gènes viraux P1 et HC-Pro qui sont situés à l'extrémité 5' de l'ARN viral. Il a été rapporté que ce site est approprié pour l'expression d'un gène étranger chez d'autres potyvirus tels le TEV (Dolja et *al.*, 1992), le PPV (Guo et *al.*, 1998) et le LMV (German-Retana et *al.*, 2000). Pour obtenir une protéine libre et pour ne pas nuire à la fonction de HC-Pro, une séquence codant pour un site de reconnaissance en *trans* de la VPg-Pro a été insérée entre le gène rapporteur et HC-Pro. De cette façon, la protéine d'intérêt est bordée par deux sites de clivage dans la polyprotéine : les sites de clivage de P1 et de VPg-Pro.

Comme le bombardement particulaire peut être utilisé en tant que moyen efficace d'infection mécanique de plantes par des virus, cette méthode sera préconisée pour les études d'expression transitoire. Des symptômes d'infection systémique ont été observés pour plusieurs plantes de *B. perviridis* bombardées par p35Tunos/GFP ou p35Tunos/GUS. L'infectivité du TuMV a donc été conservée suite à l'insertion d'un gène d'intérêt. Par contre, un faible retard a été observé dans l'apparition des symptômes pour TuMV/GFP et nous avons constaté une apparition encore plus tardive pour TuMV/GUS. L'apparition des symptômes a été comparée avec les témoins p35Tunos original et p35Tunos/SacII. Cette dernière construction a seulement le site de restriction *Sac*II entre P1 et HC-Pro. Simplement l'ajout du site de restriction *Sac*II ne semble pas avoir modifié le cycle viral du TuMV : TuMV/SacII cause toujours une infection systémique chez *B. perviridis* de façon similaire à p35Tunos. Ces résultats sur l'introduction d'un gène d'intérêt tels *gfp* et *uidA* concordent avec ceux décrits par German-Retana et *al.* (2000) pour le LMV-GUS. Par contre cette équipe a remarqué une atténuation des symptômes pour les virus chimériques portant les gènes rapporteurs *gfp* ou *uidA*. Nous n'avons pas observé une telle atténuation. Dans cet article de German-

Retana et *al.* (2000), il a été proposé que la longueur et/ou la nature du gène *uidA* serait probablement en cause dans ce retard des symptômes. Il est possible que les séquences additionnelles perturbent la structure tri-dimensionnelle de la polyprotéine et augmentent les temps à chaque étape du cycle viral, entre autres au cours de la maturation de la polyprotéine et de la réplication. Il est aussi possible que le fait que l'extrémité N-terminale de HC-Pro ait été modifiée par un acide aminé supplémentaire puisse perturber une ou plusieurs des fonctions de HC-Pro, particulièrement en présence de GUS (Guo et *al.*, 1998). Ceci pourrait aussi nuire à la réplication virale.

L'observation des symptômes dus à TuMV/GFP et TuMV/GUS corrélait avec l'expression de la capsid virale et du gène rapporteur. Les protéines d'intérêt étaient fonctionnelles puisque leur activité a été observée sur les plantes infectées. De plus, la présence du virus et des protéines d'intérêt a été confirmée par immunobuvardage. La CP a été choisie car elle est représentative de l'ensemble des protéines virales. Par contre le doublet de capsid détecté pour la plupart des échantillons a souvent été observé mais nous ne pouvons pas expliquer l'origine de ce phénomène. L'activité des protéines d'intérêt se reflétait aussi dans l'immunobuvardage. Les protéines de la taille appropriée ont été détectées pour les plantes infectées avec TuMV/GFP ou TuMV/GUS. La maturation aux sites d'hydrolyse par P1 et VPg-Pro de chaque côté de la protéine d'intérêt a donc été effectuée correctement lors de la maturation de la polyprotéine. Par contre, une bande supplémentaire de poids moléculaire supérieur à GUS a aussi été détectée en plus petite quantité. Ceci nous suggère que le processus de maturation de GUS n'est peut-être pas complet. Il est possible que la β -glucuronidase nuise à la maturation en modifiant la conformation de la polyprotéine. À ce moment, la fusion de GUS à sa protéine voisine, HC-Pro probablement, pourrait possiblement entraver les fonctions de la protéine virale. Ce processus incomplet ou retardé de la maturation de la polyprotéine pourrait avoir un lien avec les retards observés dans l'apparition des symptômes de TuMV/GUS. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer un immunobuvardage avec les mêmes échantillons de feuilles infectées avec TuMV/GUS et utiliser des anticorps dirigés contre HC-Pro. Il serait alors possible de déterminer si une bande supplémentaire est détectée au même poids moléculaire.

La stabilité des gènes d'intérêt *gfp* et *uidA* a été vérifiée par RT-PCR. La *gfp* semble intacte même 30 jours post-infection. Un résultat similaire a été obtenu par German-Retana et *al.* (2000) avec le LMV-GFP. Par contre, le gène *uidA* semble être délété tôt au cours de l'infection virale. Moins de 30 jours ont été nécessaires pour obtenir des délétions dans les plantes de *B. perviridis* bombardées avec p35Tunos/GUS. Ces délétions ont d'ailleurs été rapportées où un (Dolja et *al.*, 1993) à quatre mois (German-Retana et *al.*, 2000) suffisaient pour obtenir des délétions spontanées dans les virus chimériques. Il a été proposé que lors de la réplication virale, l'ARN polymérase change de matrice. Plusieurs mécanismes différents ont été proposés pour expliquer l'instabilité des inserts. Deux seront exposés.

Dans une étude (Dolja et *al.*, 1993), le mécanisme proposé est la recombinaison non-homologue lors de la synthèse du brin négatif d'ARN viral. Cette hypothèse est basée sur le fait que la polymérase des virus à ARN monocaténaire changent spontanément de matrice lors de la synthèse de l'ARN négatif; ce phénomène aurait été proposé aussi pour les poliovirus qui font partie de la famille des Picornaviridea, tout comme les potyvirus. Le biais apparent pour les délétions pourraient être simplement dû à une dissociation et une réassociation aléatoire de la Pol de la matrice. Ce changement de matrice serait ensuite suivi par une sélection des variants viables ou avantageux. Les variants ayant des délétions à l'intérieur de séquences essentielles, comme des séquences virales, seraient fort probablement défectifs et ne pourraient poursuivre le cycle viral. Cependant, les variants ayant des délétions plus ou moins importantes dans les régions non-essentielle comme le gène étranger, peuvent poursuivre l'infection virale et se propager dans la plante susceptible. Ces variants peuvent même posséder des avantages par rapport aux virus non-délétés et ainsi être favorisés lors de la propagation virale.

Un autre mécanisme serait la dissociation de la RdRp de la matrice au niveau de l'insert due à la présence non-habituelle de structures primaires ou secondaires (Dolja et *al.*, 1993). Une équipe a suggéré que des séries de adénine dans la séquence de *uidA* seraient peut-être la cause d'une telle dissociation au cours de la synthèse du brin positif d'ARN (Guo et *al.*, 1998). Ces séries de A joueraient un rôle similaire à la région AU-riche

de la recombinaison homologue. Ces séquences favoriseraient donc le changement de matrice de la polymérase. Il est à noter que ce mécanisme ne serait probablement pas l'unique raison de la dissociation de la polymérase puisque ces séries de A ne sont pas toujours présentes au point de jonction de délétion des variants observés (Guo et *al.*, 1998). De plus, ce mécanisme est en contradiction avec les observations sur les poliovirus et décrites précédemment.

Un autre membre de notre équipe a aussi étudié l'insertion de *gfp* et *uidA* entre les séquences codant pour la polymérase (Pol) et la capsid (CP). Quelques études (Choi et *al.*, 2000; Fernández-Fernández et *al.*, 2001) ont montré que ce site est aussi approprié pour l'insertion d'un gène d'intérêt. Comme deux sites d'insertion sont disponibles, il est possible de les utiliser en même temps avec un gène rapporteur différent dans chaque site. Nos études ont montré que ces constructions sont toujours infectieuses chez *B. perviridis* mais l'infection est marquée d'un retard dans l'apparition des symptômes encore plus important qu'avec TuMV/GUS. Des résultats similaires à ceux décrits précédemment ont été obtenus avec ces constructions, soit l'observation de la présence et de l'activité des gènes rapporteurs, l'instabilité de *uidA* et la stabilité de *gfp* 30 jours post-infection.

En conclusion, nos résultats corroborent ceux obtenus par d'autres équipes (German-Retana et *al.*, 2000; Dolja et *al.*, 1993; Guo et *al.*, 1998). Il est donc possible d'insérer et d'exprimer un gène d'intérêt dans le génome du TuMV entre P1 et HC-Pro. Un gène aussi gros que *uidA* (1,8 kb) peut être ajouté à cet endroit dans le TuMV sans éliminer de gènes viraux. La protéine d'intérêt résultante est active et sa maturation s'effectue correctement. Il sera intéressant de doser la quantité de protéines d'intérêt produites lors d'une infection par un virus chimérique comme TuMV/GFP et TuMV/GUS.

Cependant, l'instabilité génétique de l'insert est rapide dans le cas d'un long gène tel *uidA*. Il est donc nécessaire de diminuer le nombre de cycle de réplication virale dans chaque cellule. Nous proposons donc d'insérer dans le génome de la plante une copie inductible du virus chimérique.

2 Système d'expression inductible

L'élaboration d'un système d'expression viral inductible a été de changer le promoteur constitutif $P_{CaMV\ 35S}$ par le promoteur inductible au dexaméthasone P_{Top10} . Selon Böhner et *al.* (1999), une expression minimale a été observée avec le P_{Top10} en absence de l'inducteur. Ils ont introduit dans le génome de plantes de *N. tabacum* la séquence codant pour la luciférase qui se trouvait sous le contrôle du P_{Top10} . En absence d'induction, l'activité de la luciférase se trouvait sous ou près du seuil limite de détection.

L'infection de plantes de *B. perviridis* par le bombardement de pTopTunos a montré que le virus est toujours infectieux malgré le changement du promoteur. Lors de cette permutation des promoteurs, nous avons dû prendre soin que le transcrite issu de l'action du promoteur contienne le moins possible de séquence non-virale. En effet, il a été démontré que la présence de ces nucléotides rendaient le transcrite non-infectieux (Sánchez et *al.*, 1998). Par ailleurs, l'assemblage de l'ADNc viral à l'aide de l'enzyme de restriction *Bss*HI a éliminé 24 nucléotides dans le terminateur de la nopaline synthase (tnos). Selon Sánchez et *al.* (1998), la présence du tnos n'est pas obligatoire pour la transcription efficace du virus. À la fin de l'ADNc du TuMV, une séquence de 56 résidus A a été ajoutée afin d'assurer la stabilité de l'ARNm. Cette queue de poly(A) seule est probablement suffisante pour arrêter la transcription et assurer la survie de l'ARNm.

La présence du TuMV dans les plantes de *B. perviridis* qui présentaient des symptômes de mosaïque a été confirmée par immunobuvardage. Les marques de mosaïque, de déformation, de retard de croissance ainsi que l'activité des gènes rapporteurs corrélaient donc avec la présence de la capsid du virus.

Il a été par contre remarqué que quelques plantes de *B. perviridis* bombardées avec pTopTunos présentaient des symptômes d'infection systémique malgré l'absence d'induction et du facteur de transcription TGV. Cette situation était prévisible puisque nous avons utilisé un modèle très sensible à l'infection par le TuMV : *Brassica perviridis*. Pour les plantes bombardées avec pTopTunos, un seul événement de transcription dans une seule cellule bombardée peut être suffisant pour obtenir une infection systémique

puisqu'elle est susceptible à la réplication virale ainsi qu'aux mouvements cellule-cellule et longue distance du TuMV.

L'apparition de symptômes d'infection systémique dans *B. perviridis* par le bombardement de pTopTunos nous a donc montré que la construction a été effectuée correctement et que ce changement n'a pas affecté l'infectivité virale. Par contre, le phénomène de « fuites » du promoteur inductible n'est pas à négliger. Un système d'induction encore plus rigoureux est nécessaire pour mener à terme ce projet.

L'espèce qui sera utilisée pour la production de plantes transgéniques est *N. tabacum* puisqu'elle n'est pas susceptible aux infections systémiques au TuMV. Mais cette plante permet la réplication virale et le mouvement cellule-cellule. Dans le système inductible, la propagation virale suite à un événement de transcription à partir de P_{Top10} sera limité à cette cellule et à ses voisines. Nos travaux d'expression transitoire par le bombardement sur des feuilles de *N. tabacum*/TGV ont montré que le système d'induction semblait bien fonctionner. Peu ou pas d'activité β -glucuronidase était observée en absence d'induction avec le dexaméthasone, alors qu'une activité appréciable était obtenue après l'application de dexaméthasone. Ainsi, même si des fuites se produisaient occasionnellement, il est envisageable de penser que la production de virus restera confinée que dans quelques cellules. Ce confinement pourrait réduire l'impact de l'activité virale pour la transformation et la régénération des plantes transgéniques. Un membre de l'équipe a donc entrepris la transformation de *N. tabacum*/TGV avec pTopTunos. Cependant il a constaté que les cellules de *N. tabacum*/TGV transformées avec pTopTunos se régénèrent difficilement. Les quelques « fuites » du P_{Top10} en sont fort probablement responsables.

Afin de limiter la réplication virale dans les cellules en absence d'induction, la fonction de polymérase virale a été abolie par une mutation dans son motif conservé GDD (Li et Carrington, 1995). Ce motif serait en partie responsable de l'activité de la polymérase. Au moment opportun de la croissance de la plante, la réplication virale déficiente pourrait être rétablie avec une polymérase fonctionnelle. Li et Carrington (1995) ont montré que la mutation « VNN » de la polymérase virale déficiente présente

dans le génome de la plante peut être complémentée en *trans* par une polymérase fonctionnelle faisant partie d'une autre construction. Dans notre projet, la séquence non-traduite en 5' (5'NTR) du TuMV fusionnée à la séquence codante pour la polymérase fonctionnelle ont été ajoutées à la suite du promoteur P_{Top10} dans le vecteur pBinHygTopFree_{mod}. Le 5'NTR permettra une traduction plus efficace de l'ARNm : cette séquence contient des sites d'entrée interne des ribosomes qui sont nécessaires à la traduction efficace de l'ARN viral (Basso et *al.*, 1994).

Afin de vérifier l'efficacité de la complémentation, trois systèmes différents ont été utilisés : le bombardement de cellules de tabac BY-2 et de feuilles de *N. tabacum*/TGV ainsi que la transfection chimique de protoplastes BY-2. Les plasmides utilisés étaient p35Tunos/GFP-VNN + pTop/5'NTR-Pol + pBinTGV sur les mêmes billes. Malheureusement, les cellules BY-2 et les protoplastes n'ont pas été facilement transfectés. Observés au microscope à fluorescence, ils semblaient exprimer peu de GFP, que ce soit pour les études de complémentation ou seulement pour les cellules témoins transfectées avec p35Tunos/GFP. En effet, les cellules qui exprimaient la GFP étaient difficilement différenciables des cellules auto-fluorescentes ou des cellules mortes. Les cellules mortes ou endommagées peuvent émettre une fluorescence verte semblable à la fluorescence de la GFP sous les UV. Aussi, sur les feuilles de *N. tabacum*/TGV, la fluorescence naturelle des trichomes (« poils ») rendait la tâche plus ardue de l'observation de l'expression de la GFP. De plus, l'épaisseur de la feuille limitait l'observation des cellules fluorescentes.

Puisqu'il a été ardu d'obtenir des résultats significatifs à l'aide de l'expression de la GFP, nous avons utilisé la construction p35Tunos/GUS-VNN pour la complémentation sur des feuilles de *N. tabacum*/TGV. Il a alors été plus facile de visualiser l'activité enzymatique. Plusieurs plages bleues étaient observées suite au bombardement avec pBI221, ce qui reflétait les zones de cellules transfectées. Par contre, d'énormes plages bleues ont été révélées sur les feuilles bombardées avec pTopTunos/GUS induit au dexaméthasone, tout comme le témoin p35Tunos/GUS. L'enzyme GUS était donc active dans plusieurs cellules avoisinantes l'impact de la bille d'or recouverte d'ADN. Ces zones reflétaient la réplication et le mouvement cellule-cellule du virus à partir d'une cellule cible.

Aussi, la complémentation semble avoir eu lieu. L'activité enzymatique de GUS sur les feuilles bombardées avec p35Tunos/GUS-VNN + pTop/5'NTR-Pol et induites au dexaméthasone était supérieure à celle observée sans induction de la transcription au dexaméthasone.

La grosseur des plages était différente entre le virus sauvage et le mutant VNN complémenté. La réplication naturelle de TuMV semble donc être plus efficace que celle de la complémentation par une polymérase fonctionnelle. Il est possible que la polymérase inductible ne soit pas présente en quantité suffisante pour maintenir la réplication de TuMV/VNN aux niveaux aussi élevés que le TuMV sauvage. De plus, dans ce système, le TuMV/VNN peut se répliquer par complémentation dans la cellule originalement infectée si la polymérase fonctionnelle se trouvait sur la même bille d'or bombardée. Dans ce cas, le virus peut se déplacer dans les cellules voisines, mais l'absence de polymérase fonctionnelle dans ces cellules y empêcherait la réplication. Les plages marquant l'activité de GUS sont alors moins nombreuses et moins grosses qu'avec le virus répliatif.

Le système d'expression transitoire utilisé pour étudier la complémentation amène beaucoup de variabilité puisqu'il n'est pas assuré que le vecteur viral et la polymérase seront sur la même bille d'or lors du bombardement. Ces résultats montrent tout de même que la complémentation semble être un système potentiellement efficace pour l'induction de la réplication virale. Ces travaux confirment aussi ceux de Li et Carrington (1995) indiquant que la complémentation de la mutation VNN de la polymérase dans le génome viral est possible grâce à une polymérase fonctionnelle.

Ces expériences ont donc démontré que le système de complémentation inductible était envisageable pour la création de plantes transgéniques. Le système d'induction par complémentation a donc été réalisé par un autre membre de notre équipe dans les plantes transgéniques de *N. tabacum* exprimant le facteur de transcription TGV et la polymérase fonctionnelle (*N. tabacum*/TGV-Pol). Dans cette plante, l'expression de la polymérase est contrôlée par l'application du dexaméthasone. Des études préliminaires d'expression transitoire ont montré que le système fonctionne

comme prévu. Des plantes transgéniques de *N. tabacum* exprimant le TGV, la Pol et 35Tunos/GFP-VNN sont actuellement en cours de production.

3 Perspectives d'avenir

Les résultats obtenus au cours de ce projet indiquent 1) qu'un gène d'intérêt peut être ajouté au génome viral et 2) que le système d'induction de la réplication virale serait possible dans des plantes transgéniques de *N. tabacum*. Ces plantes contiendraient dans leur génome le virus chimérique non-répliatif 35STunos/GFP-VNN ou 35TuMV/GUS-VNN, le facteur de transcription TGV et la polymérase inducible Top/5'NTR-Pol. L'induction de la réplication se ferait au moment opportun de la croissance de la plante avec l'application du dexaméthasone.

Il sera encore plus intéressant d'insérer un gène autre qu'un gène rapporteur. Comme deux emplacements sont connus pour l'insert d'un gène d'intérêt, il sera possible d'introduire deux gènes différents dans un seul vecteur viral. Ces gènes pourront exprimer des protéines d'une chaîne enzymatique ou d'un hétérodimère tel un anticorps.

D'autres applications technologiques seront possibles grâce à ce système d'induction de l'expression virale. Ce système permettra une production synchronisée des vecteurs viraux. Un tel concept n'a pas encore été obtenu pour l'étude fondamentale des virus de plantes. Il sera alors possible d'analyser *in planta* les interactions virus/hôte, tels les interactions entre la VPg et le facteur de traduction eIF4E étudié par d'autres membres du laboratoire.

Conclusion

Les plantes sont des organismes intéressants pour la production de masse de produits biopharmaceutiques. Ils sont cultivables à faibles coûts sur de grandes surfaces. L'introduction de gènes d'intérêt dans le génome de la plante n'est pas suffisante pour produire en grande quantité les protéines biopharmaceutiques. Une alternative à la production de plantes transgéniques est l'infection systémique des plantes cibles par un virus chimérique. Ce virus contient dans son génome un gène d'intérêt. Par contre, il a été rapporté que le gène d'intérêt est délété avec le temps. Nous proposons un système intermédiaire où le virus chimérique, le TuMV, serait intégré au génome de la plante. Son expression serait inductible afin de diminuer les risques de délétions spontanées du gène d'intérêt. Dans un premier temps, nous avons inséré un gène rapporteur dans le génome viral, soit les gènes *gfp* ou *uidA*. Nous avons ensuite rendu inductible la réplication virale par complémentation.

Dans ce projet, nous avons effectué des études d'infection systémique et d'expression transitoire avec les différentes constructions du TuMV. Le bombardement particulaire a été la technique principalement utilisée pour infecter les plantes.

Il a été montré qu'un gène peut être inséré dans le génome viral sans modifier significativement l'infectivité virale dans *B. perviridis*. Ce gène, *gfp* ou *uidA*, a été inséré entre les gènes codant pour P1 et HC-Pro de l'ADNc du TuMV. TuMV/GFP et TuMV/GUS ont conservé leur infectivité car leur propagation a été marquée par l'apparition des symptômes systémiques. Un gène aussi gros que *uidA* (1,8 kb) semble pouvoir être inséré dans le génome du TuMV sans même éliminer des gènes viraux. Par ailleurs, l'instabilité de l'insert à 30 jours post-infection a été montrée par la réaction de transcription inverse. Il est donc primordial d'obtenir une source stable de TuMV chimérique dans chaque cellule de la plante thérapeutique.

L'expression transitoire du TuMV a été réalisée sur des feuilles de *N. tabacum*. Les études d'induction de l'expression virale par la complémentation ont été facilitées par l'insertion de *uidA* dans le TuMV. La visualisation de l'activité enzymatique de GUS

suggère que la polymérase fonctionnelle, sous le contrôle du promoteur P_{Top10} , peut compléter en *trans* la mutation VNN insérée dans le TuMV. Cependant, la complémentation semble diminuer l'efficacité de la réplication virale. Il est donc important de développer une méthode efficace d'induction de la transcription à partir du promoteur P_{Top10} avec le dexaméthasone.

Finalement, des plantes transgéniques sont présentement en cours dans notre laboratoire afin de vérifier que l'apport de transcrits stables du TuMV chimérique non-réplicatif complémenté par la polymérase fonctionnelle inductible au dexaméthasone permet de conserver le gène d'intérêt plus longtemps.

Il est donc de plus en plus évident que dans un avenir plus ou moins rapproché, les vaccins, les anticorps recombinants et les autres produits biopharmaceutiques seront synthétisés à grande échelle par des plantes dans des champs ou des serres. Plusieurs de ces produits pharmaceutiques pourront être comestibles et ainsi éviter les étapes de purification de la protéine d'intérêt.

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, Jean-François Laliberté, qui m'a transmis les connaissances, le dynamisme et le soutien nécessaire à la réussite de mes études de deuxième cycle. Il m'a aussi donné l'occasion d'effectuer un stage mémorable à l'INRA, en France.

Je remercie aussi mes collègues de travail passés et présents pour leurs encouragements et leur appui. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux.

Je remercie aussi l'équipe d'Olivier LeGall pour m'avoir accueillie un mois dans leur laboratoire, à l'INRA.

Je remercie le FCAR pour leur soutien financier.

Un gros merci à mes parents qui m'ont encouragés et soutenus dans la poursuite de mes études supérieures. Je leur en serai reconnaissante toute ma vie.

Finalement, je remercie particulièrement celui qui partage ma vie, Jonathan, pour m'avoir épaulé et encouragé tout au long de ce merveilleux périple.

Bibliographie

- Agriculture et Agroalimentaire Canada, Communiqué, « Pleins feux sur le visage non traditionnel de l'agriculture » Toronto, 4 novembre 1998
- Aoyama T et Chua NH (1997). « A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants ». Plant Journal, 11(3) : 605-612.
- Arazi T, Lee Huang P, Lin Huang P, Zhang L, Shibolet Y, Gal-On A et Lee-Huang S (2002). « Production of antiviral and antitumor proteins MAP30 and GAP31 in cucurbits using the plant virus vector ZYMV-AGII ». Biochemical and Biophysical Research Communications, 292 : 441-448.
- Arazi T, Slutsky SG, Shibolet Y, Wang Y, Rubinstein M, Barak S, Yang J et Gal-On A (2001). « Engineering *zucchini yellow mosaic potyvirus* as a non-pathogenic vector for expression of heterologous proteins in cucurbits ». Journal of Biotechnology, 87 : 67-82.
- Basso J, Dallaire P, Charest PJ, Devantier Y et Laliberté JF (1994). « Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of *Turnip Mosaic Potyvirus* RNA ». Journal of General Virology, 75 : 3157-3165.
- Beachy RN, Fitchen JH et Hein MB (1996). « Use of plant viruses for delivery of vaccine epitopes ». In Engineering plants for commercial products and applications, Collins GB et Sheperd RJ, Editions New York Academy of Sciences, NY, p. 43-49.
- Böhner S, Lenk I, Rieping M, Herold M et Gatz C (1999). « Transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression », Plant Journal, 19(1) : 87 - 95.
- Böhner S et Gatz C (2001). « Characterisation of novel target promoters for the dexamethasone-inducible/tetracycline-repressible regulator TGV using luciferase and isopentenyl transferase as sensitive reporter genes ». Molecular and General Genetics, 264 : 860 - 870.
- Boothe JG, Permenter DL et Saponja JA (1997). « Molecular farming in plants : oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins ». Drug Development Research, 42 : 172-181.
- Brennan FR, Jones TD, Longstaff M, Chapman S, Bellaby T et al. (1999a). « Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin-binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses ». Vaccine 17 : 1846-1857.
- Brennan FR, Bellaby T, Helliwell SM, Jones TD, Kamstrup S, Dalsgaard K, Flock JI, et Hamilton WDO. (1999b). « Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic mucosal immune responses in mice ». Journal of Virology, 73 : 930-938.

- Buratti E, McLain L, Tisminetzky S, Cleveland SM, Dimmock NJ et 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 ». Journal of General Virology, 79 : 2709-2716.
- Burkhardt PK, Beyer P, Wunn J, Kloti A, Armstrong GA, Schledz M, von Lintig J et Potrykus I (1997). « Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis ». Plant Journal, 11 : 1071-1078.
- Carrington JC, Kasschau K.D., Mahajan S.K. et Schaad M.C. (1996). « Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants ». The Plant Cell, 8 : 1669-1681.
- Chakraborty S, Chakraborty N et Datta A (2000). « Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus* ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97 : 3724-3729.
- Choi IR, Stenger DC, Jack Morris T et French R (2000). « A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals ». Plant Journal, 23(4) : 547-555.
- Conrad U, Fiedler U, Artsaenko O et Phillips J (1998). « High-level and stable accumulation of single-chain Fv antibodies in plant storage organs ». Journal of Plant Physiology, 152 : 708-711.
- Cramer CL et al. (1996). « Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco ». In Engineering plants for commercial products and applications. Collins GB et Shepherd RJ, Éditions New York Academy of Sciences, NY. p. 62-71.
- Cramer C, Boothe JC et Oishi KK (1999). « Transgenic plants for therapeutic proteins : linking upstream and downstream strategies ». Current Topics in Microbiology and Immunology, 240 : 95-118.
- Dixon RA et Arntzen CJ (1997). « Transgenic plant technology is entering the era of metabolic engineering ». Trends in Biotechnology, 15 : 441-444.
- Dolja VV, McBride HJ et Carrington JC (1992). « Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of β -glucuronidase into the viral polyprotein ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 89 : 10 208 - 10 212.
- Dolja VV, Kerri LH, Pirone TP et Carrington JC (1993). « Spontaneous mutagenesis of a plant Potyvirus genome after insertion of a foreign gene ». Journal of Virology, 67(10) : 5968-5975.

- Dolja VV, Peremyslov VV, Keller KE, Martin RR et Hong J (1998). « Isolation and stability of histidine-tagged proteins produced in plants via potyvirus gene vectors ». Virology, 252 : 269-274.
- Doran PM (2000). « Foreign protein production in plant tissue cultures ». Current Opinions in Biotechnology, 11 : 199-204.
- During K (1988). « Wundinduzierbare expression und sekretion von T4 lysozym und monoklonalen antikörpern in *Nicotiana tabacum* ». Doctoral
- Durrani Z, McInerney TL, McLain L, Jones T, Bellaby T, Brennan FR et 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 ». Journal of Immunological Methods, 220 : 93-103.
- Fernández - Fernández MR, Martínez-Torrecuadrada JL, Casal JI, et Garcia JA (1998). « Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus ». FEBS Letters, 427 : 229-235.
- Fernández-Fernández MR, Mourino M, Rivera J, Rodríguez F, Plana-Duran J et 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(2) : 283 – 91.
- Fischer R, Hoffmann K, Schillberg S et Emans N (2000). « Antibody production by molecular farming in plants ». Journal of Biological Regulators of Homeostatic Agents, 14 : 83-92.
- French R, Janda M et Ahlquist P (1986). « Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus : efficient expression in monocotyledonous plant cells ». Science, 231 : 1294-1297.
- Ganz PR et al. (1996). « Expression of human blood proteins in transgenic plants : the cytokine GM-CSF as a model protein ». In Transgenic plants : a production system for industrial and pharmaceutical proteins, Owen MRL et Pen J, Editions John Wiley et Sons, London UK.
- Gatz C, Froberg C et Wendenburg R (1992). « Stringent repression and homogenous de-repression by tetracycline of a modified CaMV35S promoter in intact transgenic tobacco plants ». Plant Journal, 2 : 397-404.
- Gatz C (1997). « Chemical control of gene expression ». Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48 : 89-108.

- Gatz Cet Lenk I (1998). « Promoters that respond to chemical inducers ». Trends in plant science, 3(9) : 352 - 358.
- German-Retana S, Candresse T, Alias E, Delbos RP et LeGall 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(3) : 316 - 24.
- Giddings G., Allison G., Brooks D. et Carter A. (2000). « Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals ». Nature Biotechnology, 18 : 1151-1155.
- Goddijn OJM et Pen J (1995). « Plants as bioreactors ». Trends in Biotechnology, 13 : 379-387.
- Gorlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H et Ryals J (1996). « Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat ». Plant Cell, 8 : 629-643.
- Guo HS, Lopez-Moya JJ et Garcia JA (1998). « Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric *Plum Pox Potyvirus* genome after insertion of a foreign gene ». Virus Research, 57 : 183-195.
- Halling-Sørensen B, Nors Nielson S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC et Jørgensen SE (1998). « Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review ». Chemosphere, 36 : 357-394.
- Hamamoto A, Sugiyama Y, Nakagawa N, Hashida E, Matsunaga Y, Takemoto S, Watanabe Y et Okada Y (1993). « A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systematic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato ». Bio/Technology, 11 (8) : 930-932.
- Hiatt AC, Cafferkey R et Bowdish K. (1989). « Production of antibodies in transgenic plants ». Nature, 342 : 76-78.
- Jefferson RA, Kavanagh TA et Bevan MW (1987). « GUS fusions : β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants ». EMBO Journal, 6(13) : 3901-3907.
- Joelson T, Akerblom L, Oxelfelt P, Strandberg B, Tomenius K et Morris TJ (1997). « Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus ». Journal of General Virology, 78 : 1213-1217.
- Kasschau KD, Cronin S et Carrington JC (1997). « Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of *Tobacco Etch Potyvirus* Helper Component-Proteinase ». Virology, 228 : 251-262.

- Kasschau KD et Carrington JC (2001). « Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro ». Virology, 285 : 71-81.
- Kato N et Esaka M (2000). « Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts ». Planta, 210 : 1018-1022.
- Klein PG, Klein RR, Rodriguez-Cerezo E, Hunt AG et Shaw JG (1994). « Mutational analysis of the Tobacco Vein Mottling Virus genome ». Virology, 204(2) : 759-69
- Kong Q, Richter L, Yang Y-F, Arntzen CJ, Mason HS, et Thanavala Y. (2001). « Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 98 (20) : 11539–11544.
- Koo M, Bendahmane M, Lettieri GA, Paoletti AD, Lane TE, Fitchen JH, Buchmeier MJ et 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 ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 96 : 7774-7779.
- Kumagai MH, Turpen TH, Weinzettl N, della-Cioppa G, Turpen AM, Donson J, Hilf ME, Grantham GL, Dawson Wo et Chow TP (1993). « Rapid, high-level expression of biologically active alpha-trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 90 : 427-430.
- Laliberte J-F, 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(1) : 510-514.
- Langeveld JP, Brennan FR, Martinez-Torrecuadrada JL, Jones TD, Boshuizen RS et al. (2001). « Inactivated recombinant plant virus protects fogs from a lethal challenge with canine parvovirus ». Vaccine, 19 : 3661-1670.
- Lawrence SD et Novak NG (2001). « A rapid method for production and characterization of recombinant insecticidal proteins in plants ». Molecular Breeding, 8 : 139-146.
- Léonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG et Laliberté JF (2000). « Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity ». Journal of Virology, 74 (17) : 7730 – 7737.
- Li XH et Carrington JC (1995). « Complementation of *Tobacco Etch Potyvirus* mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 92 : 457-461.

- Ma JKC et Hiatt A. (1996). «Expressing antibodies in plants for immunotherapy ». In Transgenic plants : a production system for industrial and pharmaceutical proteins, Editions Owen MRL et Pen P, auteurs John Wiley et Sons, London UK, p. 229-243.
- Maia IG, Haenni AL et Bernardi F (1996). « Potyviral HC-Pro : a multifunctional protein ». Journal of General Virology, 77 : 1335-1341.
- Marathe R, Smith TH, Anandalakshmi R, Bowman LH, Fagard M., Mourrain P, Vaucheret H et Vance VB (2000). « Plant viral suppressors of post-transcriptional silencing do not suppress transcriptional silencing ». Plant Journal, 22(1) : 51-59.
- Martinez A, Sparks C, Drayton P, Thompson J, Greenland A et Jepson I (1999). « Creation of ecdysone receptor chimeras in plants for controlled regulation of gene expression ». Molecular and General Genetics, 261 : 546-552.
- Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M et al. (2001). « Development of *Clover yellow vein virus* as an efficient, stable gene-expression system for legume species ». Plant Journal, 23 : 539-546.
- Mason HS, Man-Kit Lam D et Arntzen CJ (1992). « Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 89 : 11745-11749.
- Masuta C, Yamana T, Tacahashi Y, Uyeda I, Sato M, Ueda S et Matsumura T (2000). « Development of *clover yellow vein virus* as an efficient, stable gene-expression system for legume species ». Plant Journal, 23(4) : 539-546.
- 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 ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 96 : 703-708.
- McGarvey PB, Hommond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H et Micheals FH (1995). « Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes ». Bio/Technology, 13 (13) : 1484-1487.
- McLain L, Durrani Z, Wisniewski LA, Porta C, Lomonosof GP et Dimmock NJ (1996). « Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus ». Vaccine, 14 : 799-810.
- McLain L, Porta C, Lomonosof GP, Durrani Z et 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 Research of Human Retroviruses, 11 : 327-334.

- Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, Fu ZF, Steplewski K et al. (1998). « Immunization against rabies with plant-derived antigen ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95 : 2481, 2485.
- Mori M, Zhang GH, Kaido M, Okuno T et Furusawa I (1993). « Efficient production of human gamma interferon in tobacco protoplasts by genetically engineering brome mosaic virus RNAs ». Journal of General Virology, 74 : 1255-1260.
- Mori M, Fujihara N, Mise K et Furusawa I (2001) « Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants ». Plant Journal, 27(1) : 79-86.
- Mushegian AR et Shepherd RJ (1995). « Genetic elements of plant viruses as tools for genetic engineering ». Microbiological Research, 59 : 548-578.
- Nagy JI et Maliga P (1976). « Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris* ». Z. Pflanzenphysiol, 78 : 453-455.
- Nemchinov LG, Liang TJ, Rifaat MM, Nazyad HM, Hadidi A et Keith JM (2000). « Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus ». Archive Virology, 145 : 2557-2573.
- Nicolas O et Laliberté JF (1992). « The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of *Turnip Mosaic Potyvirus* ». Journal of Virological Methods, 32 : 57-66.
- Parmenter DL, Boothe JG, van Rooijen GJ, Yeung EC et Moloney MM (1995). « Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning ». Plant Molecular Biology, 29 : 1167-1180.
- Pietrzak M, Shillito RD, Hohn T et Potrykus I (1986). « Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplasts transformation with a new plant expression vector ». Nucleic acids Research, 14 (14) : 5857-5868.
- Pogue GP, Lindbo JA, Dawson WO et Turpen TH (1998). « Tobamovirus transient expression vectors : tools for plant biology and high-level expression of foreign proteins in plants ». Plant Molecular Biology Manual, Gelvin SB et Schilperoot RA, Éditions Dordrecht Kluwer, p. 1-27.
- Pogue GP, Lindbo JA, Garger SJ et Fitzmaurice WP (2002). « Making an ally from an enemy : plant virology and the new agriculture ». Annual Review in Phytopathology, 40 : 45-74.
- Potrykus I et Shillito RD (1986). « Protoplasts : Isolation, culture, plant regeneration ». Method in Enzymology, 118 : 549-578.

- Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I et Fridlender B (2002). « Plant and human health in the twenty-first century ». Trends in Biotechnology, 20 : 522-531.
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ et Mason HS (2000). « Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization ». Nature Biotechnology, 18 : 1167-1171.
- Sambrook J et Russell DW (2000). « Molecular Cloning : A Laboratory Manual ». 3e Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez F, Martínez-Herrera D, Aguilar I et Ponz F (1998). « Infectivity of *Turnip Mosaic Potyvirus* cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts ». Virus Research, 55 : 207-219.
- Schaad MC, Jensen PE et Carrington JC (1997). « Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes : role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein ». EMBO Journal, 16(13) : 4049-4059.
- Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJM et Hoekema A (1990). « Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants ». Bio/Technology, 8 : 217-221.
- Smith MD et Glick BR (2000). « The production of antibodies in plants ». Biotechnology Advances, 18 : 85-89.
- Snyder S et Champness W (1997). « Molecular Genetics of Bacteria ». Éditions ASM Press, Washington D.C., 1504 pages.
- Stoger E et 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 of Molecular Biology, 42 : 583-590.
- Sugiyama Y, Hamamoto H, Takemoto S, Watanabe Y et Okada Y (1995). « Systemic production of foreign peptides on the particule surface of tobacco mosaic virus ». FEBS Letters, 359 : 247-250.
- Sullivan ML et Green PJ (1996). « Mutational analysis of the DST element in tobacco cells and transgenic plants : identification of residues critical for mRNA instability ». RNA, 2(4) : 308-315.
- Tacket CO et Mason HS (1999). «A review of oral vaccination with transgenic vegetables ». Microbes and Infection, 1 : 777-783.

- Thanavala Y, Yang Y-F, Lyon P, Mason HS et Arntzen CJ (1995). « Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 92 : 3358-3361.
- Turpen TH, Garger SJ, CcCulloch MJ, Cameron TI, Samonek-Potter ML et Holtz RB (2001). « Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus ». Bio/Technology, 13 : 53-57.
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL et Bernardi F (2001). « Potyvirus proteins : a wealth of functions ». Virus Research, 74 (1-2) : 157 - 175.
- Usha R, Rohll JB, Spall VE, Shanks M, Maule AJ et al. (1993). « Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle ». Virology, 197 : 366-374.
- van Leeuwen W, Ruttink T, Borst-Vrens AW, van der Plas LH et van der krol AR (2001). « Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants ». Journal of Experimental Botany, 52(358) : 949-959.
- Verchot J et Carrington JC (1995). « Debilitation of plant Potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modification ». Journal of Virology, 69(3) : 1582-1590.
- Weinmann P, Gossen M, Hillen W, Bujard H et Gatz C (1994). « A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants ». Plant Journal, 5 : 559-569.
- Whitham SA, Yamamoto ML, et Carrington JC (1999). « Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana* ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 96 : 772-777.
- Wigdorovitz A, Filgueira DMP, Robertson N, Carrillo C, Sadir AM et al. (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 et Laliberté 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.
- Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, Agakdjanyan M, Weiner D et al. (1997). « Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1 ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 94 : 5784-5788.

Zhong G-Y, Peterson D, Delaney DE, Bailey M, Witcher DR, Register III JC, Bond D, Li C-P, Marshall L, Kulisek E, Ritland D, Mayer T, Hood EE et Howard JA (1999). « Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds ». Molecular Breeding, 5 : 345-356.

Zuo J et Chua NH (2000). « Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes ». Current Opinion in Biotechnology, 11 : 146-151.

Zuo J, Niu QW, Moller SG et Chua NH (2001). « Chemical-regulated, site specific DNA excision in transgenic plants ». Nature Biotechnology, 19 : 157-161.

<http://dragon.zoo.utoronto.ca>

www.cipotato.org/market/Belgtech/breakthr.htm

www.colostate.edu/programs/lifesciences/transgenicCrop/how.html

www.mgki.hu/inst/wheat/image17.jpg

