

INRS-Institut Armand Fappier

Réactivation d'un virus TuMV inactif intégré dans le génome de *Arabidopsis thaliana* par l'utilisation d'un système inductible Cre/LoxP

Par
Arianne Tremblay

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (ph.D.)
en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Rolf Morosoli, IAF

Examineurs externes

Dominique Michaud,
Phytologie, Université Laval

Carole Beaulieu,
Biologie, Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Jean-François Laliberté, IAF

Co-directeur de recherche

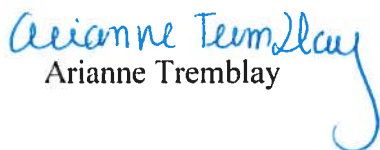
Armand Séguin, CFL

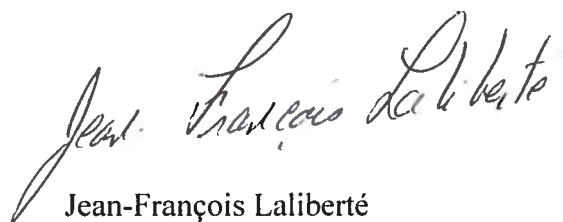
RÉSUMÉ

Les plantes représentent une plate-forme intéressante pour la production de protéines recombinantes. C'est dans cette optique que les recherches effectuées ont été orientées dans le but d'élaborer un système de production de protéines recombinantes hautement efficace. Dans ce sens, les méthodes de transgénèse et d'expression à l'aide d'un vecteur viral ont été couplées. Une copie d'ADNc du *virus de la mosaïque du navet* (TuMV) rendue inactive a été introduite dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*. L'inactivité de cette copie du virus était due à l'introduction d'un signal de terminaison de la traduction bordé par deux sites *loxP* entre les séquences codantes pour les protéines P1 et HcPro. Ce signal de terminaison de la traduction n'empêchait pas la transcription du génome viral mais provoquait un arrêt prématuré de la traduction empêchant la production des protéines impliquées dans la réplication du virus, ce qui le rendait inactif. La réactivation de ce virus était possible par recombinaison spécifique aux sites *loxP* uniquement en présence de la recombinase Cre. Cette recombinaison entraîne l'élimination de la séquence entre les deux sites soit le signal de terminaison de la traduction ainsi qu'un des deux sites *loxP*. Trois approches ont été utilisées pour introduire la recombinase Cre dans les plantes. La Cre a été produite suite à l'infiltration d'une suspension d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le gène codant pour Cre, sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Elle a également été produite par l'entremise d'un vecteur viral autre que le TuMV dans les feuilles des plantes. Finalement, l'introduction d'une cassette recombinase sous le contrôle d'un promoteur inductible dans le génome des plantes transgéniques pour le TuMV inactif a été un autre moyen d'exprimer la recombinase dans les plantes. L'expression de la recombinase dans les plantes permettait au virus de se répliquer à nouveau considérant l'apparence de ces plantes. La présence d'un seul site *loxP* dans la séquence virale suivant la recombinaison n'affectait donc ni la réplication ni la traduction du virus puisqu'autant de protéines de capsid du virus pouvaient être détectées dans ces plantes comparativement à des plantes infectées avec le TuMV sauvage.

III

Une infection avec ce virus dit loxé a permis aux plantes infectées de croître plus facilement que lors d'une infection avec le virus de type sauvage sans toutefois ressembler à des plantes non-infectées. HcPro étant la protéine modifiée par la présence de ce site *loxP* et puisque celle-ci est impliquée dans la suppression du « gene silencing », une caractérisation détaillée de cette fonction par le TuMV-lox a été effectuée. Des analyses de synergisme entre le TuMV-lox et le PVX montraient que l'activité de suppression du « gene silencing » était affectée par la présence du site *loxP*. Par contre, l'expression des microARN dans les plantes infectées avec TuMV-lox ne semblait pas modifiée dans les plantes infectées avec TuMV-lox.


Arianne Tremblay


Jean-François Laliberté

AVANT-PROPOS

Suite aux nombreux défis que m'a permis de relever ce projet d'envergure économique, je tiens à remercier sincèrement le Dr Jean-François Laliberté, mon directeur de recherche, qui m'a privilégiée en me donnant ma chance pour la mise en œuvre de ce grand projet. Malgré la distance, j'ai toujours senti qu'il était présent. Présent pour me donner des petits trucs fort utiles mais surtout pour m'encourager lorsque les embûches se pointaient; et dieu seul sait que nous en avons affrontées plusieurs. Grâce à lui, j'ai appris à ne pas prendre les petits succès à la légère mais plutôt à les voir comme le début d'une grande victoire.

Je remercie également le Dr Armand Séguin, mon co-directeur de recherche, qui, de par sa proximité, était souvent le juge de première ligne de tous mes résultats et présentations. Malgré la grande famille qu'il doit gérer, il a toujours réussi à trouver un peu de temps pour répondre à mes interrogations et me prodiguer quelques conseils qui m'ont toujours été d'une très grande importance.

Je dois absolument faire mention de la merveilleuse équipe de laboratoire dans laquelle j'ai pu évoluer. Plusieurs compagnes et compagnons de travail m'ont été d'une grande aide grâce à leur expertise particulière dans plusieurs domaines. Je ne veux pas oublier Chantal Beauchemin qui était toujours prête à m'envoyer du matériel le plus vite possible et à me donner de précieux conseils suite à une demande.

Les encouragements de mes parents, Esther et Clermont, m'ont permis de continuer à avancer malgré les difficultés et découragements. Leur fierté m'aura souvent servi de remontant. Sans eux, ces dernières cinq années aurait été encore plus ardue.

Un gros merci à Martin qui m'endure depuis maintenant six ans. Le mot endurer n'est pas trop fort puisque faire un doctorat ça ne donne pas toujours bon caractère.

Finalement, merci à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration et à l'avancement de ce projet.

TABLE DE MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
AVANT-PROPOS	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII

CHAPITRE I PRODUCTION DE PROTÉINES RECOMBINANTES, VECTEURS VIRAUX ET SYSTÈME INDUCTIBLE CHIMIQUEMENT

1. INTRODUCTION.....	p. 1
2. REVUE DE LITTÉRATURE	p. 4
2.1 La production de protéines recombinantes	p. 4
2.1.1 Les bioréacteurs	p. 4
2.1.1.1 Les bactéries	p. 4
2.1.1.2 Les levures	p. 6
2.1.1.3 Les cellules d'insectes	p. 7
2.1.1.4 Les cellules animales	p. 8
2.1.1.5 Les animaux	p. 9
2.1.1.6 Les plantes	p. 10
2.2 Les vecteurs viraux	p. 18
2.2.1 L'instabilité génétique	p. 23
2.2.2 Les vecteurs viraux de deuxième génération	p. 25
2.3 La génération de plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> transgéniques pour un système de réplicon inductible	p. 29
2.3.1 Le virus de la mosaïque du navet	p. 29
2.3.1.1 Les hôtes et la symptomatologie	p. 30
2.3.1.2 Le génome	p. 31
2.3.1.3 Les protéines virales.....	p. 31
2.3.2 La transgénèse du réplicon TuMV	p. 36
2.3.3 Les systèmes d'expression inductible	p. 36
2.3.3.1 Le système de dé-répression de la transcription	p. 37
2.3.3.2 Le système d'inactivation de la transcription	p. 40
2.3.3.3 Le système d'activation de la transcription	p. 40
2.3.3.4 Les systèmes à double contrôle	p. 44
3. LES OBJECTIFS DE RECHERCHE	p. 47
3.1 L'objectif général	p. 47
3.2 Les objectifs spécifiques	p. 47
3.3 Les sous-objectifs	p. 50

CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. LA CONSTRUCTION DES PLASMIDES	p. 51
1.1 Clonage dans pGreen	p. 53
1.1.1 Les plasmides pGreen	p. 53
1.1.2 Digestion enzymatique	p. 54
1.1.3 Déphosphorylation	p. 54
1.1.4 Ligation	p. 54
1.1.5 Électroporation de cellules d' <i>Escherichia coli</i> et d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	p. 56
1.1.5.1 Préparation de cellules d' <i>Escherichia coli</i> électrocompétentes	p. 56
1.1.5.2 Préparation de cellules d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> électrocompétentes	p. 56
1.1.5.3 Électroporation	p. 57
2. LA RECOMBINAISON <i>in vitro</i>	p. 58
3. LE SYSTÈME DE TRANSFORMATION D' <i>Arabidopsis thaliana</i> ET DE <i>Nicotiana tabacum</i>	p. 58
3.1 La transformation stable d' <i>A. thaliana</i> et de <i>N. tabacum</i>	p. 58
3.2 L'agro-infection d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et l'agro-infiltration de <i>Nicotiana Benthamiana</i>	p. 60
4. ANALYSE MOLÉCULAIRE DES PLANTES TRANSGÉNIQUES	p. 61
4.1 Analyse de type PCR	p. 61
4.1.1 Extraction d'ADN génomique	p. 61
4.1.2 Dosage de l'ADN génomique	p. 61
4.1.3 Réaction en chaînes de la polymérase	p. 61
4.1.4 Analyse sur gel d'agarose	p. 62
4.2 Analyse de type Southern	p. 63
4.2.1 Extraction de l'ADN génomique	p. 63
4.2.2 Digestion de l'ADN génomique	p. 63
4.2.3 Électrophorèse et transfert sur membrane de l'ADN	p. 64
4.2.4 Préparation de la sonde marquée au P ³²	p. 64
4.2.5 Hybridation des membranes d'ADN génomique	p. 65
4.2.6 Exposition des membranes et développement des autoradiogrammes	p. 65
4.3 Analyse de type PCR en temps réel	p. 65
4.3.1 Extraction de l'ARN total	p. 65
4.3.2 Réaction de transcription inverse	p. 66
4.3.3 Réaction en chaînes de la polymérase	p. 66
4.4 Analyse histochimique pour l'expression β -glucuronidase	p. 67
5. INDUCTION DES PLANTES TRANSGÉNIQUES XVE-Cre/TuMV-flox	p. 68
5.1 Extraction des protéines totales solubles	p. 68
5.2 Immunobuvardage	p. 69
5.2.1 Séparation des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide	p. 69
5.2.2 Immunorévélation après transfert	p. 69

VII

6. ANALYSE DE PUCES À ADN	p. 70
7. ANALYSE DE TYPE NORTHERN	p. 71
7.1 Extraction d'ARN total	p. 71
7.2 Électrophorèse et transfert sur membrane de l'ARN	p. 71
7.3 Préparation de la sonde marquée au P ³²	p. 72
7.4 Hybridation des membranes d'ARN	p. 72
7.5 Exposition des membranes et développement des autoradiogrammes...	p. 74

CHAPITRE III RÉSULTATS

PRODUCTION D'*Arabidopsis thaliana* TRANSGÉNIQUES POUR UN SYSTÈME DE RÉPLICON BASÉ SUR LE *virus de la mosaïque du navet*

1. Construction des vecteurs	p. 75
2. Recombinaison <i>in vitro</i> de TuMV-flox	p. 77
3. Recombinaison <i>in planta</i> de TuMV-flox	p. 82
4. Production de plantes de <i>Nicotiana tabacum</i> et d' <i>Arabidopsis thaliana</i> transgéniques pour XVE/Cre et TuMV-flox	p. 82
5. Restauration de la réplication virale	p. 88

CHAPITRE IV RÉSULTATS

CARACTÉRISATION DE LA FORME TuMV-lox

1. Réaction de synergisme dans des plantes infectées avec les deux formes du TuMV et un virus non apparenté	p. 91
2. Identification des gènes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> différentiellement régulés lors d'une infection avec les deux formes du TuMV	p. 95
3. Régulation par les microARN	p. 105

CHAPITRE V DISCUSSION

1. DÉVELOPPEMENT DU RÉPLICON VIRAL	p. 112
1.1 Recombinaison <i>in vitro</i>	p. 113
1.2 Recombinaison <i>in planta</i>	p. 114
1.3 Transformation des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et de <i>Nicotiana tabacum</i>	p. 115
1.4 Évaluation de l'état transgénique des plantes transformées	p. 115
1.5 La réactivation de la réplication virale dans les plantes transgéniques ..	p. 116
1.6 Conclusion	p. 120
2. CARACTÉRISATION DU TuMV-lox	p. 120
2.1 Le PTGS et le synergisme	p. 121
2.2 Les MicroARN	p. 122
2.3 Expression des gènes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> lors d'une infection avec le	

VIII

TuMV-lox	p. 123
2.3.1 Gène impliqué dans la floraison	p. 124
2.3.2 Gène impliqué dans la réponse au calcium	p. 125
2.3.3 Gène impliqué dans la réponse à l'auxine	p. 126
2.3.4 Gène impliqué dans le cycle de production des terpènes	p. 127
2.4 Conclusion	p. 128
3. PERSPECTIVES	p. 128
4. CONTRIBUTION	p. 130
BIBLIOGRAPHIE	p. 131

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Production d'un vecteur viral recombinant.....	p. 19
Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme de réplication virale d'un virus à ARN simple brin de polarité positive.....	p. 24
Figure 3 : Mécanisme de « gene silencing » post-traductionnel.....	p. 26
Figure 4 : Représentation schématique du génome du TuMV.....	p. 32
Figure 5 : Représentation schématique d'un système de dé-répression de la transcription A) en absence et B) en présence d'un inducteur.....	p. 39
Figure 6 : Représentation schématique d'un système d'inactivation de la transcription A) en absence et B) en présence d'un inducteur.....	p. 41
Figure 7 : Représentation schématique d'un système d'activation de la transcription de type récepteur stéroïdien A) en absence et B) en présence d'un inducteur.....	p. 43
Figure 8 : Représentation schématique du système d'activation/recombinaison, CLX, A) avant induction et B) après induction.....	p. 46
Figure 9 : Représentation schématique du vecteur TuMV-flox ainsi que l'expression de celui-ci A) avant et B) après recombinaison.....	p. 49
Figure 10 : Représentation des cartes de restriction A) du plasmide pGreen 0000 et B) de son plasmide pSoup faisant partie du système binaire pGreenII.....	p. 55
Figure 11 : Représentation schématique des constructions de vecteurs.....	p. 76
Figure 12 : Séquence en acides nucléiques de TuMV-flox et TuMV-lox.....	p. 78
Figure 13 : Plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> suivant la transfection avec les formes flox et lox du TuMV.....	p. 80
Figure 14 : Recombinaison <i>in planta</i>	p. 83
Figure 15 : Caractérisation moléculaire des plantes de <i>Nicotiana tabacum</i> et d' <i>Arabidopsis thaliana</i> transformées avec pGreenXVE-Cre et pGreenTuMV-flox.....	p. 85
Figure 16 : Réactivation de la réplication virale dans les plantes transgéniques....	p. 90
Figure 17 : Synergisme dans des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	p. 93

Figure 18 : Graphiques des intensités d'expression normalisées résultants de l'analyse de puces de plantes infectées avec TuMV sauvage et TuMV-lox..... p. 97

Figure 19 : Quantification absolue des transcrits MYB-like1, HIS1-3 et NAM dans les plantes *d'Arabidopsis thaliana* infectées avec le TuMV sauvage et le TuMV-lox.. p. 106

Figure 20 : Analyse de l'accumulation du miARN 167 et 171 dans les plantes *d'A. thaliana* infectées avec le TuMV sauvage et le TuMV-lox.....p. 109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des diverses méthodes de production de protéines et les facteurs qui peuvent jouer sur la difficulté et/ou le coût de production.....	p. 5
Tableau 2 : Exemples de protéines produites dans les plantes transgéniques.....	p. 12
Tableau 3 : Exemples de protéines recombinantes produites dans des plantes à partir de vecteurs viraux.....	p. 20
Tableau 4 : Les protéines potyvirales, leurs tailles respectives ainsi que leurs fonctions connues et anticipées.....	p. 33
Tableau 5 : Liste des systèmes inductible chimiquement utilisés dans les plantes.....	p. 38
Tableau 6 : Amorces utilisées pour les différents clonages, PCR et PCR en temps réel.....	p. 52
Tableau 7 : Séquences des miARN et des sondes miARN.....	p. 73
Tableau 8 : Les gènes sur ou sous exprimés, montrant une différence supérieure à 200 et un ratio supérieur à 2 dans les signaux d'expression associés aux gènes, dans les plantes d' <i>A. thaliana</i> infectées avec TuMV-lox comparativement à celles infectées avec TuMV sauvage.....	p. 99
Tableau 9 : Les gènes sur ou sous exprimés dans les plantes d' <i>A. thaliana</i> infectées avec TuMV-lox.....	p. 104

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

8K : Protéine de mouvement de PVX faisant partie du « triple gene block »
 12K : Protéine de mouvement de PVX faisant partie du « triple gene block »
 25K : Protéine de mouvement de PVX faisant partie du « triple gene block »
 166K : Polymérase du PVX
 6 : Protéine de TEV de 6 kDa
 35 : Protéine de TEV de 35 kDa
 50 : Protéine de TEV de 50 kDa
 % : Pourcentage
 A : Adénosine
 AD : « Activation domain »
 ADN : Acide déoxyribonucléique
 ADNase I: Deoxyribonucléase I
 ADNc : ADN complémentaire
 AMV : *Alfalfa mosaic virus*
 AOX1 : Alcool oxydase 1
 ARF : « auxin responsive factor »
 ARN : Acide ribonucléique
 ARNa : ARN aberrant
 ARNc : ARN complémentaire
 ARNdb : ARN double brin
 ARNm : ARN messenger
 ATP : Adénosine triphosphate
 BMV : *Brome mosaic virus*
 BSMV: *Barley stripe mosaic virus*
 BYV : *Beet yellow virus*
 C : Cytosine
 C58/pMP90 : Souche d'*A. tumefaciens*
 CaMV : *Cauliflower mosaic virus*
 CAT : Chloramphenicol acetyltransferase
 CBL : « Calcineurine B-like »
 CHO : Chinese hamster ovary
 CI : Protéine d'inclusion cylindrique de TuMV
 CIPK : « CBL-induced protein kinase »
 cm : Centimètre
 CO : Facteur de transcription CONSTANS
 CP : Protéine de capsid
 CPMV : *Cowpea mosaic virus*
 Cre: Recombinase Cre
 CTAB : Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide
 dATP : Déoxyadénine triphosphate
 DBD : « DNA binding domain »
 DCL : « DICER-like »
 dCTP : Déoxycytidine triphosphate
 DH5 α : Souche d'*E. coli*
 DMSO: Diméthylsulfoxyde

D.O. : Densité optique
 DTT: Dithiothréitol
 EDTA : Hexadecyltrimethyl-ammonium
 ER : « Estrogen receptor »
 FMDV: *Foot-and-mouth disease virus*
 FT : « Flowering locus T »
 g : Gramme
 G : Guanine
 G₁₀₋₉₀ : Promoteur constitutif fort
 GFP : Gène rapporteur codant pour la « Green fluorescent protein »
 GS : « Gene silencing »
 GUS : β -Glucuronidase
 GV3101 : Souche d'*A. tumefaciens*
 HCl: Chlorure d'hydrogène
 HcPro : « Helper component-proteinase »
 HIS : Histone
 HIV-1: *Human immunodeficiency virus* type 1
 HRV: *Human rhinovirus*
 HSP : « Heat shock protein »
 HSV: *Herpes simplex virus*
 IFN : Interféron
 Ig : Immunoglobuline
 IPTG : Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
 KAN : Kanamycine
 Kb : Kilobase
 KCl : Chlorure de potassium
 kDa : KiloDalton
 KH₂PO₄ : Dihydrogène-orthophosphate de potassium
 KV : Kilovolts
 L : Litre
 LacZ : Gène rapporteur codant pour la β -Galactosidase
 LB : « Left border »
 LB : Milieu de culture Luria Bertani
 LBA4404 : Souche d'*A. tumefaciens*
 LSC : « Long single chain »
 Luc : Gène codant pour la luciférase
 LUP1 : lupéole synthase 1
 mA : Milliampère
 miARN : microARN
 mg : milligramme
 MgCl₂ : Chlorure de magnésium
 MgSO₄ : Sulfate de magnésium
 ml : millilitre
 mm : Millimètre
 mM : Millimolaire
 M : Molaire

MS : Milieu de culture de Murashige & Skoog
 MYB : Famille de facteurs de transcription
 NaCl : Chlorure de sodium
 NaH_2PO_4 : Phosphate de sodium monobasique
 Na_2HPO_4 : Phosphate de sodium dibasique
 NAM : « No apical mersitem »
 NaOAc : Acétate de sodium
 ng : Nanogramme
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Sulfate d'ammonium
 NI : Non-infecté
 NIa : Protéine d'inclusion nucléaire a
 Nlb : Protéine d'inclusion nucléaire b
 NLS : « Nuclear localisation signal »
 nm : Nanomètre
 No. : Numéro
 nos : Gène codant pour lanopaline synthase
npII : Gène de sélection codant pour la néomycine phosphotransférase II
 nts : Nucléotides
 °C : Degré Celcius
 ORF : « Open reading frame »
 ori : Origine de répliation
 P1 : Protéase du TuMV
 P3 : Protéase du TuMV
 P^{32} : Phosphore-32
 p6X-GFP : Vecteur binaire exprimant GFP suite à une recombinaison induite par l'estradiol
 PABP : Protéine de liaison à une séquence de polyadénylation
pBI101 : Vecteur binaire de clonage exprimé dans les végétaux
 PCR : « Polymerase chain reaction »
 pCR2.1 : Vecteur de clonage exprimé dans les bactéries
 PEG : Polyéthylène glycol
 pGR106 : Vecteur pGreen transformé avec un réplicon PVX
 pGreen : Série de vecteurs binaires exprimé dans les végétaux
 pH : Potentiel hydrogène
 PLRV : *Potato leafroll virus*
 pmoles : Picomoles
 PNKinase : Polynucléotide kinase
 Pol : Polymérase
 Pro : Protéase
 pRT106 : Vecteur de clonage exprimé dans les bactéries
 pSa : Origine de répliation du vecteur pGreen
 pSoup : Vecteur dit « helper » pour la répliation des vecteurs pGreen
 PTGS : « Post-transcriptional gene silencing »
 pUC12 : Vecteur de clonage exprimé dans les végétaux
 PVC : *Potato virus C*
 PVX : *Potato virus X*
 PVX+ : Brin de polarité positive du génome de PVX

PVX- : Brin de polarité négative du génome de PVX
 PVY : *Potato virus Y*
 qRT-PCR : « Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction »
 RB : « Right border »
rbcS E9 : Gène de *Pisum sativum* contenant une séquence de polyadénylation
rbcS 3A : Gène de *Pisum sativum* codant pour une sous-unité de la ribulose-bisphosphate carboxylase
 RdRp : « RNA-dependent RNA polymerase »
RepA : Gène de la réplicase du vecteur pSoup
rgsCaM : « Repressor gene silencing calmodulin-like »
RHDV : *Rabbit hemorrhagic disease virus*
 RISC : « RNA-induced silencing complex »
 RNAi : RNA interférence
 RNase A : Ribonucléase A
 RPM : Révolution par minute
 SAP : « Shrimp alkaline phosphatase »
 SAR : « Scaffold attachment region »
 scFv : « Single chain fragment variable »
 SDS : Sodium dodécyl sulphate
 slg : Forme sécrétée d'un immunoglobuline
 siRNA : « Small interfering RNA »
 SOB : Milieu de culture pour les bactéries
 SOC : Milieu de culture pour les bactéries
 SOC1 : « Suppressor of overexpression of CONSTANS 1 »
 SSC : Sel citrique de sodium
 T : Thymine
 TBSV : *Tomato bushy stunt virus*
 TEV : *Tobacco etch virus*
 Ti : « Tumor-inducing »
 T_m : « Melting temperature »
 TMV : *Tobacco mosaic virus*
 Tn : Transposon
 TRV : *Tobacco ringspot virus*
 TSWV : *Tomato spotted wilt virus*
 TuMV : *Turnip mosaic virus*
 TuMV+ : Brin de polarité positive du génome du TuMV
 TuMV- : Brin de polarité négative du génome du TuMV
 TVMV : *Tobacco vein mottling virus*
 µg : Microgramme
uidA : Gène codant pour GUS
 µl : Microlitre
 µM : Micromolaire
 UTR : « Untranslated region »
 VIGS : « Virus-induced gene silencing »
vir : Gènes de virulence contenus sur le génome d'*A. tumefaciens*
 VPg : Protéine en 5' de certains génomes viraux

WNV: *West Nil virus*

WSMV : *Wheat streak mosaic virus*

XVE: Facteur de transcription chimérique composé d'un DBD du répresseur bactérien LexA, d'un AD de la protéine VP16 du virus de l'Herpes simplex et d'un ER humain

YEP : Milieu de culture « Yeast Extract/Peptone broth »

ZYMV: *Zucchini yellow mosaic virus*

CHAPITRE I

INTRODUCTION

La production de protéines recombinantes dans le but d'une utilisation thérapeutique est de plus en plus exploitée par l'industrie pharmaceutique. C'est pourquoi plusieurs laboratoires de recherche s'attaquent à l'amélioration des procédés déjà existants mais aussi à l'élaboration de nouvelles techniques plus rapides et moins coûteuses. L'utilisation des plantes comme plate-forme de production de protéines recombinantes fait partie de la nouvelle génération de ces procédés. La transgénèse des plantes est un moyen fort efficace pour produire des protéines recombinantes mais cette méthode n'est pas à l'abri des inconvénients. L'utilisation de vecteurs viraux représente une percée prometteuse pour contrer un des inconvénients majeurs associé à la transgénèse soit le faible rendement en protéines recombinantes. Le vecteur viral possède lui aussi ses désavantages mais lorsque couplé à la transgénèse, l'importante instabilité du transgène introduit dans le génome viral est contournée.

Que la technique utilisée soit la transgénèse, l'utilisation d'un vecteur viral ou les deux techniques combinées, un autre problème potentiel peut être appelé à être résolu. Il est possible que la protéine recombinante à être produite présente une certaine toxicité pour les plantes l'exprimant. Cette toxicité peut ainsi empêcher la croissance et le développement normal de la plante et par le fait même compromettre la production en protéines recombinantes. Pour empêcher que la toxicité de certaines protéines recombinantes affecte la croissance et le développement de la plante, différents promoteurs existent. Il y a les promoteurs spécifiques à un tissu qui permettent de cibler l'expression des gènes sous leur contrôle dans un compartiment où la toxicité du produit de ces gènes ne pourrait être dommageable (graine). Il y a également les promoteurs inductibles que ce soit par un stimulus biotique ou abiotique qui permettent de contrôler dans le temps l'expression des gènes sous leur contrôle. L'utilisation de ce type de promoteurs limite les effets toxiques du gène d'intérêt puisque celui-ci peut être exprimé

seulement lorsque la plante a atteint une certaine maturité. Ces promoteurs permettent également, dans le cas de l'utilisation de vecteurs viraux, de minimiser les effets néfastes d'une infection virale sur les plantes. Par la combinaison de plusieurs de ces techniques, il est possible de construire un système d'expression de protéines recombinantes hautement efficace. Mes études de doctorat portent sur l'élaboration d'un de ces systèmes. La combinaison de la transgénèse, des vecteurs viraux et des promoteurs inductibles nous a permis d'élaborer un système d'expression de protéines recombinantes possédant toutes les caractéristiques essentielles d'un bon système d'expression.

Par la transgénèse nous avons introduit dans le génome d'une plante d'*Arabidopsis thaliana* une copie d'ADNc du *virus de la mosaïque du navet* (TuMV) inactif. Pour inactiver le virus, un système de recombinaison Cre/loxP a été utilisé. Ce système comprend la protéine de recombinaison nommée Cre qui provient du bactériophage P1 et qui effectue une recombinaison spécifique aux sites nommés *loxP*. Ces sites *loxP* comportent 34 paires de bases. Ceux-ci correspondent à deux répétitions exactes de treize paires de bases, sur lesquelles la recombinaison homologue s'effectue, séparées par huit paires de bases. L'inactivité du virus provient de l'incorporation d'un signal de terminaison de la traduction bordé de deux sites *loxP* en répétition directe entre les séquences codant pour deux protéinases virales retrouvées à l'extrémité 5' de la séquence génomique du virus nommées P1 et HcPro. P1 est nommée comme tel puisqu'elle correspond à la première protéinase codée par le virus et HcPro provient de l'appellation anglaise « helper-component proteinase ». La séquence virale dans le génome végétal est alors transcrite au même titre que le génome de la plante mais ce transcrit ne peut être traduit complètement en raison de la présence du signal de terminaison de la traduction rencontré dès le début de la traduction. Cet arrêt prématuré de la traduction empêche la production des protéines impliquées dans la réplication virale. La présence du virus incapable de se répliquer permet à la plante de croître et de se développer normalement. Le signal de terminaison de la traduction est éliminé à un moment opportun par l'expression en *trans* de la protéine Cre qui opère une recombinaison spécifique aux sites *loxP*. L'orientation directe de ces deux sites dans le génome viral provoque l'élimination de la séquence entre eux-ci (signal de terminaison de la traduction) ainsi qu'un site *loxP*

suite à la recombinaison. Différentes façons d'exprimer la recombinaise Cre dans les plantes transgéniques sont possibles. Le gène de la recombinaise Cre, sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du *virus de la mosaïque du chou-fleur* (CaMV 35S) a été introduit dans le T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le gène de la recombinaise Cre a également été introduit dans le *virus X de la pomme de terre* (PVX) puis dans le T-DNA d'*A. tumefaciens*. Les suspensions bactériennes résultantes ont été infiltrées directement dans les feuilles des plantes. Le gène de la recombinaise Cre peut aussi être placé sous le contrôle d'un promoteur inductible. Cette construction est introduite comme deuxième transgène. Le système inductible que nous avons choisi est le système XVE. Celui-ci consiste en deux unités de transcription. La première comprend un facteur de transcription chimérique composé d'un domaine de liaison à l'ADN provenant de la protéine LexA bactérienne, d'un domaine de trans activation de la transcription provenant de la protéine VP16 du virus de l'*Herpes simplex* et d'un domaine de réception de l'estrogène provenant d'une protéine humaine. Ce facteur de transcription est sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort. La deuxième unité de transcription consiste au gène codant pour la recombinaise Cre sous le contrôle d'un promoteur inductible composé du promoteur minimal 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur combiné à huit copies d'un opérateur LexA bactérien. La présence de l'inducteur estrogène permet au facteur de transcription d'être transporté du cytoplasme vers le noyau de la cellule végétale et ainsi de se lier au promoteur inductible pour favoriser l'expression du gène Cre.

La réactivation du virus par la recombinaison a amené une modification au génome viral. En effet, la présence d'un site *loxP* dans le génome viral suite à la recombinaison modifie la séquence génomique. Cette modification n'a pas semblé affecter l'accumulation des protéines virales. Cependant, un changement dans le phénotype des plantes infectées avec le virus modifié a été observé. L'introduction d'un site *loxP* a eu comme conséquence l'ajout de quatorze acides aminés à l'extrémité N-terminale de HcPro. De multiples fonctions sont associées à la protéine HcPro, notamment celle d'être un inhibiteur du « gene silencing ». Nous avons alors vérifié si cette fonction était affectée sur la protéine modifiée.

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 La production de protéines recombinantes

Plusieurs bioréacteurs sont utilisés pour la production de protéines recombinantes, tel les bactéries, les levures, les cellules d'insectes, animales ou végétales voire même un animal ou une plante entière (Tableau 1). Le choix d'un bioréacteur dépend de plusieurs facteurs dont : la taille, la structure, la stabilité, les besoins en modifications post-traductionnelles et le rendement associé à la synthèse de la protéine d'intérêt. Le coût global relié à la mise en place d'un système d'expression de protéines recombinantes est également un facteur déterminant dans le choix d'un bon système (Jonasson *et al.*, 2002).

2.1.1 Les bioréacteurs

2.1.1.1 Les bactéries

Les bactéries furent les premiers organismes utilisés dans la production de protéines recombinantes. La majorité de bactéries utilisées pour la production de protéines recombinantes sont des bactéries Gram négatives. Par exemple, l'interféron, l'interleukine, différentes hormones et facteurs de croissance (insuline) ainsi que l'albumine sérique de bœuf sont produits dans *Escherichia coli*. Ces bactéries possèdent plusieurs avantages et certains inconvénients. Leur taux de croissance rapide (environ vingt minutes pour doubler le nombre de cellules) représente une des caractéristiques les plus intéressantes. Elles ont aussi la capacité d'exprimer fortement des protéines hétérologues de l'ordre de 30% des protéines endogènes (Kane et Hartley, 1988). Par contre, les protéines ont tendance à s'accumuler dans des corps d'inclusion. Les protéines ainsi produites sont plus difficiles à purifier (Nilsson *et al.*, 1997; Stevens, 2000). Le

Tableau 1 Comparaison des diverses méthodes de production de protéines et les facteurs qui peuvent jouer sur la difficulté et/ou le coût de production.

Bioréacteurs	Coûts du milieu de croissance	Coûts des équipements	Production des protéines d'intérêt	Purification	Sensibilité aux conditions de croissance^a	Traitements Post-traductionnels^b
Bactéries	Modérés	Modérés	Élevé	Facile à Modérée	Modérée	Pauvres
Cellules Insectes	Modérés à Élevés	Modérés	Modéré à Élevé	Facile à Modérée	Modérée	Modérés
Cellules Animales	Élevés	Élevés	Faible	Modérée à Difficile	Élevée	Excellents
Cellules Levures	Modérés	Modérés	Élevé	Facile à Modérée	Modérée	Modérés à Excellents
Plantes	Faibles	Faibles	Faible	Modérée à Difficile	Faible	Modérés

Adapté de Awram *et al.*, 2002

^a Forces partagées, pH, température, oxygène

^b Quand on exprime une protéine animal

développement de nouvelles souches bactériennes favorisant la formation de protéines sous leur forme soluble ou sécrétée ont été élaborées afin de contrecarrer ce désavantage. Mais le problème majeur associé à l'utilisation de ce vecteur réside en l'impossibilité des organismes procaryotes à effectuer des modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation, acétylation, carboxyméthylation, clivage, etc). Lorsqu'une protéine doit subir certaines de ces modifications, ce système d'expression n'est évidemment pas le meilleur. Finalement, la fréquence d'usage des codons n'est pas la même chez les procaryotes et les eucaryotes. Ceci complique l'expression adéquate de protéines recombinantes. Cette technologie reste tout de même très efficace pour l'expression de petites protéines de structures simples.

2.1.1.2 Les levures

Les levures sont aussi utilisées pour la production de protéines recombinantes. Celles-ci possèdent des avantages marqués comparativement aux bactéries. Puisqu'elles sont des organismes eucaryotes, non seulement la transcription et la traduction des protéines s'effectuent de la même manière que pour les humains mais de plus elles possèdent la capacité de procéder à des modifications post-traductionnelles. Par contre, toutes ces modifications ne sont pas nécessairement effectuées de la même manière qu'il s'agisse de levures ou de mammifères. Une de ces modifications post-traductionnelle très importante est certainement la glycosylation et celle-ci s'effectue très différemment chez les levures et chez les mammifères. Chez les levures, une hyperglycosylation est régulièrement observée ce qui peut avoir une conséquence sur l'activité biologique de la protéine. Malgré la possibilité d'hyperglycosylation, la majorité des protéines recombinantes produites dans les levures montrent des activités biologiques correspondantes aux activités de la protéine native. Cet avantage supplante le faible rendement en protéines d'intérêt fourni par ce système. *Saccharomyces cerevisiae* représente une des premières levures utilisées dans un système d'expression de protéines recombinantes. La superoxide dismutase est produite dans *S. cerevisiae* à hauteur de 25 à 30% des protéines cellulaires totales (Marino, 1989). D'autres levures sont utilisées. *Pichia pastoris* possède la capacité

d'exprimer fortement des protéines hétérologues pouvant atteindre jusqu'à 35% des protéines solubles (Van Brunt, 1986). Dans le cas du fragment C de la toxine du tétanos, douze grammes par litre de protéines sont produites (Clare *et al.*, 1991) et dans celui de l' α -amylase bactérienne, deux grammes et demi par litre de protéines sécrétées (Paifer *et al.*, 1994). Cette capacité est directement reliée à la densité de croissance de *P. pastoris* qui peut atteindre cent grammes par litre, niveau difficilement atteint par *S. cerevisiae* (Cregg, Vedvick et Raschke, 1993). Cette densité de croissance est maintenue par le mode de croissance préféré de *P. pastoris*, la respiration au détriment de la fermentation. Ceci évite l'accumulation de produits de fermentation (éthanol et acide acétique) toxiques. *P. pastoris* est également une levure méthylotropique, ce qui signifie qu'elle possède le gène AOX1 (alcohol oxidase 1) inductible par le méthanol et réprimé en absence de cette source de carbone. La production de protéines recombinantes peut alors être mieux contrôlée, un avantage lorsque celle-ci est toxique pour la levure.

2.1.1.3 Les cellules d'insecte

Lorsque l'on parle d'un système d'expression de protéines d'intérêt chez les insectes, on fait principalement référence à l'utilisation d'un vecteur baculovirus (Kitt et Posse, 1993). L'expression dans des cellules d'insecte à partir d'un baculovirus montre plusieurs avantages. Les cellules d'insectes sont peu coûteuses à cultiver comparativement aux cellules animales, et leur taux de division est relativement élevé. Les modifications post-traductionnelles et le transport des protéines hétérologues sont similaires à celles observées dans les cellules de mammifères. Le baculovirus atteint un haut titre, et ce rapidement (13 à 18 jours), avec comme conséquence une production en grande quantité de protéines recombinantes solubles (e.g. entre un et 500 mg/L de cellules d'insecte). L'infection virale par contre peut provoquer différents effets dans les cellules hôtes. Par exemple, elle peut compromettre la sécrétion des protéines.

Des techniques de transformation stable de cellules d'insectes ont été établies pour contrer ces divers problèmes (McCarroll et King, 1997). Les vecteurs contiennent le gène

d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur de gènes précoces d'un baculovirus ou encore de promoteurs de drosophile, ainsi qu'un marqueur de sélection. La transformation est effectuée par des techniques standards telles l'électroporation, la coprécipitation au phosphate de calcium ou l'internalisation par des liposomes. Dépendant de la protéine à produire, la production est plus ou moins efficace comparativement à celle faisant intervenir les baculovirus.

Plusieurs antigènes ont été récemment produits dans des cellules d'insecte à partir d'un système d'expression baculovirus (Gallardo *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2005). Entre autres, la protéine NS1 du *virus du Nil Occidental* (WNV) a été générée dans des cellules d'insecte SF9. L'injection de cette protéine recombinante dans des souris permet la production d'anticorps monoclonaux hautement efficaces contre une infection létale subséquente avec le WNV (Chung *et al.*, 2006).

2.1.1.4 Les cellules animales

L'utilisation de cellules de mammifères peut régler certains des problèmes lorsqu'on parle de production de protéines d'intérêt thérapeutiques. En effet, elles sont les seules capables de produire toutes les modifications post-traductionnelles nécessaires à rendre active une protéine d'origine animale. La glycosylation est le meilleur exemple de modifications post-traductionnelles. Les organismes procaryotes ne possèdent pas cette capacité de glycosylation et les protéines aglycosylées sont biologiquement inactives. Les organismes eucaryotes inférieurs tels les levures et les insectes qui permettent la glycosylation le font souvent avec des sucres atypiques chez les mammifères. Ceci affecte négativement la demi-vie des protéines produites (Gerngross, 2004). Les cellules animales principalement utilisées dans les systèmes d'expression sont les « Chinese Hamster Ovary » (CHO) mais la production de protéines recombinantes avec ces cellules reste très limitée (10-50 mg/L). Un nombre relativement limité de cellules sont produites en bioréacteurs, principalement à cause des conditions métaboliques non optimales. Pour augmenter le rendement en protéines, l'utilisation de bioréacteurs à haute capacité est

nécessaire, ce qui augmente le coût de production. Dans le cas de la production de protéines recombinantes à usage humain, la possibilité de contamination des cellules animales et du produit protéique final par des agents pathogènes humains causent également problèmes.

Malgré tout, ce système demeurant très efficace, plusieurs équipes de recherche travaillent à améliorer les techniques de production de protéines recombinantes dans les cellules CHO dans le but d'améliorer leur rendement. Récemment, Kuwae *et al.* (2005) sont arrivés à augmenter le rendement de production de l'antithrombine humaine, protéine de régulation de la coagulation sanguine, à un gramme par litre comparativement à des rendements maximum de 120 mg/L obtenus précédemment.

2.1.1.5 Les animaux

La première souris transgénique, datant du début des années 1980 (Palmiter *et al.*, 1982), exprimait une protéine de fusion métallothionéine-hormone de croissance. Un autre exemple revient aux équipes de Clark et de Hennighausen (Simons, McClenaghan et Clark, 1987; Gordon *et al.*, 1987) qui démontrent que le lait de souris transgéniques peut contenir de la β -lactoglobuline ovine (23 mg/ml) et l'activateur plasminogène de tissus humain respectivement. Aujourd'hui plus de cent protéines sont produites dans différents organes de plusieurs espèces animales. Les protéines sont produites dans le lait, le sang, le blanc d'œufs, l'urine, le plasma séminal et les cocons d'insectes. Le lait demeure un des emplacements les plus couramment utilisés pour exprimer les protéines recombinantes (Houdebine, 1994; Colman, 1996; Clark, 1998; Wall, 1999; Rudolph, 1999). Ce système semble être à tous points de vue le plus approprié pour la production de protéines thérapeutiques.

2.1.1.6 Les plantes

De plus en plus les plantes représentent une plate-forme efficace et économique dans la production de protéines recombinantes. Une culture de cellules végétales ou une plante entière peut être utilisée dans le but de produire des protéines d'intérêt. Les modifications post-traductionnelles sur les protéines produites s'effectuent adéquatement, même si les règnes végétal et animal sont relativement distants (Kusnadi, Nikolov et Howard, 1997). Il existe d'autres avantages à l'utilisation des plantes, notamment la réduction dans les coûts de production, les manipulations techniques et les problèmes de contamination. Pour sélectionner une lignée transgénique, celle-ci doit avoir été très bien caractérisée pour entre autres éviter l'inactivation du gène d'intérêt par des événements de « gene silencing ». L'utilisation d'une lignée transgénique inappropriée peut être à l'origine d'une perte économique importante. L'obtention des protéines recombinantes prend donc plus de temps mais en contrepartie, la quantité de biomasse obtenue est de plus grande importance. Ce système d'expression est très approprié dans le cas où certains tissus comme le fruit, le tubercule, etc, peuvent être utilisés pour emmagasiner la protéine d'intérêt. Dans ces cas, le développement de vaccins oraux, souvent produits chez la pomme de terre ou d'autres plantes comestibles, est simplifié (Mason *et al.*, 1998). Si la protéine recombinante se retrouve dans les cellules du phloème par exemple, la purification de celle-ci peut s'avérer une étape complexe et cette étape de purification est souvent la plus coûteuse. La conservation à long terme des protéines recombinantes, avec une perte minimale d'activité, se trouve aussi facilitée dans un système de production de protéines recombinantes dans les plantes puisque leur expression peut être ciblée à un organe bien précis tel la graine dans lequel la protéine est protégée. (Fischer *et al.*, 1999). La première culture de cellules végétales en était une de tabac transformée avec le gène CAT (chloramphenicol acetyltransferase) (Hogue, Lee et An, 1990). Dix-sept unités de protéine CAT y ont été produites par millilitre de culture. Pour la production de protéines recombinantes, la plante entière est utilisée. La première plante utilisée pour produire une protéine d'intérêt fût le tabac produisant un anticorps avec un rendement de l'ordre de un pourcent des protéines solubles totales de la plante (Hiatt, Cafferkey et Bowdish, 1989). Depuis ce temps, plusieurs autres protéines ont été produites dans diverses plantes et avec

des rendements variables. Récemment, l'interleukine-12 provenant de la souris a été exprimée avec succès dans des plants de tomate au niveau des feuilles et du fruit (Gutiérrez-Ortega *et al.*, 2005). La protéine était active dans ces deux tissus ouvrant la voie vers une possible administration orale du produit. La demande croissante d'anticorps recombinants avantage l'utilisation des plantes comme plate-forme de production. Alors, plusieurs équipes de recherche travaillent à cette production (Fischer, Twyman et Schillberg, 2003; Peeters *et al.*, 2001). Dernièrement, Makvandi-Nejad *et al.* (2005) ont produits un scFv actif contre *Salmonella enterica* dans des plantes de tabac. Le tableau 2 fait mention des premiers succès dans le domaine de l'expression de protéines à usage humain dans différentes espèces de plante. Ces protéines sont de tailles variables. Il est possible d'exprimer des épitopes aussi petits que 0,6 kilodalton (kDa) ainsi que des protéines complètes pouvant être aussi volumineuses que 80 kDa. Le taux de production varie lui aussi allant de 0,007% à 14% des protéines solubles retrouvées dans les feuilles. Le taux moyen se situe entre 0,1% et 1%. La production de protéines dans les chloroplastes par exemple peut permettre d'augmenter le taux de production à plus de 10% des protéines solubles dans les feuilles.

La transformation stable des plantes date de 1983 (Fraley *et al.*, 1983). Diverses méthodes de transfert d'ADN ont été élaborées mais les principales sont la transformation par *Agrobacterium* et la biolistique (Potrykus, 1990). *Agrobacterium tumefaciens*, bactérie gram-négative phytopathogène et terricole, possède une capacité naturelle de transférer une partie de son matériel génétique au génome de l'organisme infecté. Cette bactérie transfère une portion bien spécifique (T-DNA) de son matériel génétique portée sur un plasmide nommé Ti (tumor-inducing plasmid). Ce T-DNA est transféré au noyau cellulaire de l'organisme infecté et s'intègre au hasard de façon stable dans le génome causant ainsi des tumeurs chez la plante (Nester *et al.*, 1984; Binns et Thomashaw, 1988). Cette région T-DNA est flanquée par deux courtes régions répétées de 25 paires de bases nommées RB et LB (right et left borders) agissant en tant qu'éléments *cis* dans le signal de transfert de l'ADN. Le T-DNA contient des gènes codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse des phytohormones, telles l'auxine et la cytokinine, et des opines. La production incessante des hormones provoque la formation de cellules

Tableau 2 Exemples de protéines produites dans les plantes transgéniques.

Protéines	Origine	Hôte	Niveau d'expression	Références
Protéines et hormones de croissance				
Hormone de croissance (somatotropine)	Truite Humain	Tabac Tournesol	7% PST ^a 0,1% PS ^b feuilles	Staub <i>et al.</i> , 2000; Bosch <i>et al.</i> , 1994; Barta <i>et al.</i> , 1986
Facteur de stimulation de colonie de granulocyte-macrophage Érythropoïétine	Humain Humain	Tabac Tabac	Non mentionné <0,01%PST 0,0026% PS	Giddings <i>et al.</i> , 2000; Ganz <i>et al.</i> , 1996; Goddijin & Pen, 1995 Kusnadi <i>et al.</i> , 1997; Matsumoto <i>et al.</i> , 1995; Ganz <i>et al.</i> , 1996; Goddijin & Pen, 1995
Facteur de croissance épidermique	Humain	Tabac	<0,01%PST	Cramer <i>et al.</i> , 1999; Ganz <i>et al.</i> , 1996; Goddijin & Pen, 1995
Albumine sérique	Humain	Pomme de terre, tabac	0,02% PST	Fernandez-San <i>et al.</i> , 2003; Ganz <i>et al.</i> , 1996; Goddijin & Pen, 1995; Sijmons <i>et al.</i> , 1990
Interféron- α	Humain	Riz, navet	Non mentionné	Cramer <i>et al.</i> , 1999; Ganz <i>et al.</i> , 1996; Goddijin & Pen, 1995; Zhu <i>et al.</i> , 1994
Interféron β	Humain	Tabac	<0,01% PF ^c	Kusnadi <i>et al.</i> , 1997
Hémoglobine α et β	Humain	Tabac	0,05% protéines des graines	Cramer <i>et al.</i> , 1999
Collagène	Humain	Tabac	<0,01% PF	Merle <i>et al.</i> , 2002; Rugglero <i>et al.</i> , 2000; Halling <i>et al.</i> , 1998
Encéphaline	Humain	<i>Arabidopsis</i> , canola	0,1% protéines des graines	Kusnadi <i>et al.</i> , 1997; Goddijin & Pen, 1995; Vandekerckhove <i>et al.</i> , 1989
Anticoagulants				
Protéine C	Humain	Tabac	<0,01% PST	Cramer <i>et al.</i> , 1999
Hirudine	<i>Hirudo medicinalis</i> Humain	Canola, Tabac	0,3% et 1% protéines des graines	Cramer <i>et al.</i> , 1999; Parmenter <i>et al.</i> , 1995; Boothe <i>et al.</i> , 1997
Enzymes recombinantes				
Glucocérébrosidase	Humain	Tabac	1-10% PST	Cramer <i>et al.</i> , 1996-1999
α -amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Tabac	0,3% PS feuilles	Pen <i>et al.</i> , 1992
Chymosine	Veau	Tabac, pomme de terre	0,1-0,5% PS	Wilmitzer <i>et al.</i> , 1992
Lysozyme	Poulet	Tabac	0,003% PF feuilles	Trudel <i>et al.</i> , 1992
Phytase	<i>Aspergillus niger</i>	Tabac	14,4% PS feuilles	Verwoerd <i>et al.</i> , 1995

Tableau 2 Exemples de protéines produites dans les plantes transgéniques (suite).

Protéines	Origine	Hôte	Niveau d'expression	Références
Inhibiteurs de protéines et de peptides				
Forme sécrétée phosphatase alcaline	Humain	Tabac	Non mentionné	Komarnytsky <i>et al.</i> , 2000; Hanson <i>et al.</i> , 1999
Lactoferrine	Humain	Pomme de terre	0,1% PST	Chong <i>et al.</i> , 2000
Aprotinine	Humain	Maïs	Non mentionné	Delaney <i>et al.</i> , 2002; Zhong <i>et al.</i> , 1999
α 1-antitrypsine	Humain	Riz, maïs	Non mentionné	Terashima <i>et al.</i> , 1999
Enzyme de conversion de l'angiotensine-I	Humain	Tabac, tomate	Non mentionné	Hamamoto <i>et al.</i> , 1993
α -tricosanthine	<i>Virus de la mosaïque du tabac</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	2% PST	Giddings <i>et al.</i> , 2000; Kumagai <i>et al.</i> , 1993
Neutraceutiques				
Daffodil phytoène synthase	Humain	Riz	Non mentionné	Burkhardt <i>et al.</i> , 1997
Albumine de graines ama l	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Pomme de terre	Non mentionné	Chakraborty <i>et al.</i> , 2000
Produits de laboratoire				
Avidine	Poulet	Maïs	6% PS feuilles	Hood <i>et al.</i> , 1997
Ricine	<i>Ricinus communis</i>	Tabac	0,25% PS feuilles	Sehnke <i>et al.</i> , 1994

Tableau 2 Exemples de protéines produites dans les plantes transgéniques (suite).

Protéines	Origine	Hôte	Niveau d'expression	Références
Anticorps				
IgM (neuropeptide haptène)	Humain	Tabac	Non mentionné	Düring <i>et al.</i> , 1990
Hybride sIgA/G (adhésine)	<i>Streptococcus mutans</i>	Tabac	Non mentionné	Larrick <i>et al.</i> , 2001; Smith & Glick, 2000; Ma <i>et al.</i> , 1995-1996-1998
Guy's 13 (sIgA)	Souris	Tabac	500 µg/g PF feuilles	Ma <i>et al.</i> , 1995-1998
Guy's 13 (IgG)	<i>S. mutans</i>	Tabac	Non mentionné	Cabanes-Macheteau <i>et al.</i> , 1999; Ma & Hiatt, 1996; Hiatt <i>et al.</i> , 1989
C5-1 (IgG)	Souris	Luzerne	1% PST	Khoudi <i>et al.</i> , 1999
scFvT84.66	Souris	Blé Riz	900 ng/g feuilles ou 1,5 µg/g graines; 27-29 µg/g feuilles ou 32 µg/g graines ou 3,8 µg/g cals	Stoger <i>et al.</i> , 2000; Torres <i>et al.</i> , 1999
T84.66 (IgG)	Souris	Tabac	1 µg/g feuilles	Vaquero <i>et al.</i> , 1999
38C13 (scFv)	Riz	<i>N. benthamiana</i>	30 µg/g feuilles	McCormick <i>et al.</i> , 1999
CO17-1A (IgG)	Souris	<i>N. benthamiana</i>	Non mentionné	Verch <i>et al.</i> , 1998
Anti-HSV-2 (IgG)	Tabac	Soya	Non mentionné	Zeitlin <i>et al.</i> , 1998
scFv bryodine 1 immunotoxine (CD 40)		Tabac	Non mentionné	Francisco <i>et al.</i> , 1997
IgG	<i>Virus herpes simplex</i>	Soya	Non mentionné	Zeitlin <i>et al.</i> , 1998
LSC (longue chaîne simple)	<i>Virus herpes simplex</i>	<i>C. reinhardtii</i>	Non mentionné	Mayfield <i>et al.</i> , 2003
Chaînes γ et κ hybridome	Souris	Tabac	1,3% PS feuilles	Hiatt <i>et al.</i> , 1989
IgG	Humain	Tabac	Non mentionné	Conrad <i>et al.</i> , 1998
scFv de liaison phytochrome	Pomme de terre	Pomme de terre	Non mentionné	Conrad <i>et al.</i> , 1998; Hamamoto <i>et al.</i> , 1993
scFv d'un IgG	Souris	Tabac	Non mentionné	McCormick <i>et al.</i> , 1999
Vaccins				
Protéine enveloppe de surface	<i>Virus hépatite B</i>	Tabac, pomme de terre, lupin, laitue	< 0,01% PST ou < 0,01% PF	Richter <i>et al.</i> , 2000; Kapusta <i>et al.</i> , 1999; Mason <i>et al.</i> , 1992; Thanavala <i>et al.</i> , 1995
Glycoprotéine	Virus de la rage	Tomate, épinard	1% PST	McGarvey <i>et al.</i> , 1995
Glycoprotéine B	<i>Cytomegalovirus</i>	Tabac	< 0,02% PST	Tackaberry <i>et al.</i> , 1999

Tableau 2 Exemples de protéines produites dans les plantes transgéniques (suite).

Protéines	Origine	Hôte	Niveau d'expression	Références
Vaccins				
Glycoprotéine S	Virus gastroentérique transmissible au porc (Coronavirus)	Tabac, maïs, <i>Arabidopsis</i>	0,2% et 0,06% PST et < 0,01% PF	Lamphear <i>et al.</i> , 2002; Tuboli <i>et al.</i> , 2000; Streatfield <i>et al.</i> , 2000; Gomez <i>et al.</i> , 1998
VP60	Virus hémorragique du lapin	Pomme de terre	0,3% PST	Castanon <i>et al.</i> , 1999
VPI	Foot-and-mouth disease virus	<i>Arabidopsis</i> , luzerne	Non mentionné	Wigdorovitz <i>et al.</i> , 1999; Carrilo <i>et al.</i> , 1998
Sous-unité-B toxine labile à la chaleur	<i>E. coli</i> entérotoxique	Tabac, pomme de terre, maïs	0,19% et < 0,01% PST	Streatfield <i>et al.</i> , 2001; Tacket <i>et al.</i> , 1998; Mason <i>et al.</i> , 1998; Haq <i>et al.</i> , 1995
Protéine de capsid	<i>Virus Norwalk</i>	Pomme de terre, tabac	0,37 et 0,23% PST	Tacket <i>et al.</i> , 2000; Mason <i>et al.</i> , 1996
Autoantigène du diabète	Humain	Tabac, pomme de terre	Non mentionné	Ma <i>et al.</i> , 1997
Sous-unité B toxine	<i>Vibrio cholera</i>	Tabac, pomme de terre	0,3% PST	Daniell <i>et al.</i> , 2001; Arakawa <i>et al.</i> , 1997-1998
Sous-unité B et 2A toxine, Entérotoxine, Antigène de fusion entérotoxigénique	<i>V. cholera</i> , Rotavirus, <i>E. coli</i>	Pomme de terre	Non mentionné	Yu & Langridge, 2001; Arntzen <i>et al.</i> , 2000; Lam & Arntzen, 1997; Arntzen & Lam, 1995-1996
Sous-unités CtoxA et CtoxB toxine	<i>V. cholera</i>	Pomme de terre	Non mentionné	Fischer <i>et al.</i> , 2000
Épitopes malaria	<i>Plasmodium</i>	Tabac	0,4-0,8% poids virions	Turpen <i>et al.</i> , 1995
Antigène de surface	<i>Virus hépatite B</i>	Tabac	Non mentionné	Tacket & Mason, 1999; Ma & Hiatt, 1996; Mason <i>et al.</i> , 1992
Protéine de surface SpaA	<i>Streptococcus mutans</i>	Tabac	Non mentionné	Tacket & Mason, 1999
Acide glutamique décarboxylase	Humain	Pomme de terre	Non mentionné	Ma <i>et al.</i> , 1997

Adapté de Kusnadi *et al.*, 1998; Daniell, Streatfield, Wycoff, 2001; Ma, Drake et Christou, 2003 et Giddings *et al.*, 2000. Abréviations : Ig, immunoglobuline; sIg, immunoglobuline sécrétée; scFv, single chain variable fragment; HSV, *Herpes simplex virus*

^a PST : Protéines solubles totales

^b PS : Protéines solubles

^c PF : Poids frais

« cancéreuses ». Pour leur part, les opines servent de source de carbone et d'azote pour les cellules d'*A. tumefaciens*. Le transfert du T-DNA est opéré par des gènes de virulence (*vir*) codés sur le plasmide Ti. Le génome bactérien code, pour sa part, pour différents gènes impliqués dans l'attachement de la bactérie à l'organisme hôte, la colonisation de celui-ci, etc. La transformation naturelle effectuée par *A. tumefaciens* a ainsi permis l'élaboration du premier système vecteur-souche bactérienne pour la transformation génétique des plantes (Hooykaas et Shilperoort, 1992). Il existe deux types de ce système, le système *cis* et le système binaire. Le premier consiste à introduire, dans une région T-DNA comprise sur un plasmide Ti, les gènes voulant être transférés aux plantes. Cette introduction peut être effectuée par recombinaison homologue. Le système binaire a été élaboré pour sa part suite aux résultats démontrant qu'une région T-DNA, ne se retrouvant pas sur un plasmide Ti, peut tout de même être transférée si les cellules végétales sont en présence d'une souche bactérienne contenant les gènes *vir* du plasmide Ti et cette région T-DNA séparée (Hoekema *et al.*, 1983; De Framond, Barton et Chilton, 1983). De là, les gènes à être transférés peuvent être clonés dans un plasmide contenant une région T-DNA artificielle. Ce nouveau plasmide peut être introduit dans une souche d'*A. tumefaciens* contenant son plasmide Ti sans région T et les cellules végétales pourront être transformées. La région T-DNA doit préalablement être désarmée (i.e. absence des oncogènes) sinon les plantes ne pourront être régénérées. La transformation par bombardement de microprojectiles (biolistique) consiste à enrober des micro-particules d'or avec de l'ADN plasmidique et délivrer ces particules dans des cellules à l'aide d'un fusil à particules. De cet ADN entré mécaniquement, un petit pourcentage réussit à s'incorporer au génome des cellules. Un avantage de cette technique est la possibilité d'introduire dans les cellules plusieurs gènes simultanément (Hadi, McMullen et Finer, 1996). Mais le plus grand avantage reste l'applicabilité de cette méthode aux espèces les plus récalcitrantes à être transformées (Birch, 1997). Cette technique possède certains inconvénients, notamment celui de causer des dommages à l'ADN de la cellule hôte.

Peu importe la technique employée pour produire des plantes transgéniques stables, la quantité de protéine d'intérêt produite varie considérablement. L'expression de la

protéine d'intérêt peut être affectée par plusieurs facteurs dont le nombre de copies du transgène intégré et l'emplacement où celui-ci a été intégré ainsi que les événements de « gene silencing ». Le mécanisme de « gene silencing » est un mécanisme naturel de défense de la plante qui permet d'empêcher l'expression de certains gènes possédant une structure primaire ou secondaire aberrante. Ce mécanisme sera abordé de façon plus détaillée dans une prochaine section. Plusieurs plantes transgéniques doivent donc être analysées afin d'identifier celles qui produisent le plus la protéine d'intérêt. Il existe différents moyens pour augmenter l'expression de la protéine d'intérêt soit de cribler les plantes et choisir celles qui possèdent une seule insertion du transgène, d'éviter l'insertion de séquences à répétitions homologues ou de flanquer l'ADN étranger avec des régions d'attachement à la matrice (SAR). Malgré tout, la quantité de protéines recombinantes produite par expression stable dans une plante demeure faible. Généralement, la quantité obtenue est de l'ordre de 0,1-1% des protéines totales (James et Lee, 2001; Kusnadi, Nikolov et Howard, 1997). Cependant, il existe certains exemples où la quantité de protéine d'intérêt produite est particulièrement élevée. Outchkourov *et al.* (2003) ont réussi à obtenir un rendement de 10% des protéines solubles totales dans des plantes de tomate et de pomme de terre exprimant les gènes de la β -glucuronidase (GUS), de l'équistatine ou de la cystatine sous le contrôle du promoteur d'une sous-unité de la ribulose biphosphate carboxylase. Pour leur part, De Jaeger *et al.* (2002) sont parvenus à produire le fragment variable d'une chaîne simple G4 d'un anticorps de souris (scFv). Lorsque le gène est sous le contrôle des séquences régulatrices 5' et 3' du gène de l'arceline5-1, un niveau atteignant 12% des protéines solubles totales dans *A. thaliana* était obtenu. Le gène du même fragment lorsque sous le contrôle du promoteur de la β -phaseoline a permis d'obtenir 35% des protéines solubles totales. Une autre stratégie de production est d'introduire la séquence du gène d'intérêt dans le génome chloroplastique. Les rendements en protéines recombinantes atteignent près de 20% des protéines solubles totales (Tregoning *et al.*, 2003). Malgré l'amélioration des rendements de production, les plantes transgéniques ne nécessitent pas moins de six à douze mois avant d'être prêtes à produire la protéine d'intérêt.

2.2 Les vecteurs viraux

Des vecteurs viraux (ou amplicon viral) ont été développés pour l'expression rapide d'un haut niveau de protéines d'intérêt dans les plantes. La première génération de vecteurs viraux s'est inspirée des virus complets. Ainsi, ces vecteurs se comportent tout comme un virus type-sauvage. Bien que ces virus soient modifiés pour contenir un gène d'intérêt, ils conservent leur pouvoir infectieux, et ont la capacité de se déplacer dans la plante de façon systémique. Par cette approche, l'introduction de l'amplicon dans les cellules végétales est obtenue soit par l'infection de l'hôte avec les particules virales, par transfection avec un transcrit ARN obtenu d'une copie ADN du génome viral, ou directement par transfection de la copie ADN sous contrôle du promoteur CaMV 35S. Le gène d'intérêt est introduit dans la séquence virale de diverses manières : 1) en remplacement d'un gène viral qui n'empêchera en rien la réplication normale du virus modifié, 2) dans une région intergénique sous le contrôle d'un promoteur sous-génomique ou 3) directement dans un cadre de lecture ouvert (ORF) de la séquence virale en fusion avec une autre protéine virale (Figure 1). La majorité des vecteurs viraux qui ont été développés l'ont été à partir de virus à ARN simple brin de polarité positive (Siegel, 1983). Plusieurs protéines dont la L-amylase (Kumagai *et al.*, 2000), la défensine (Saitoh *et al.*, 2001), des molécules thérapeutiques (Kumagai *et al.*, 1993; McCormick *et al.*, 1999) et des anticorps recombinants (Hendy *et al.*, 1999) ont déjà été produits dans les plantes en utilisant ces vecteurs (Tableau 3).

L'avantage majeur rattaché à l'utilisation des vecteurs viraux est le fort taux de production de la protéine d'intérêt dans une très courte période de temps (une à quatre semaines). Couramment, le rendement en protéines recombinantes obtenu par cette technique atteint 10% des protéines solubles. Ce rendement correspond à la quantité de protéine de capsid virale produite lors d'une infection. Par contre, régulièrement le rendement en protéines recombinantes dans un système de vecteur viral demeure faible. Ce problème, qui a été récemment soulevé, vient du fait que maintenant le réplicon viral est initialement sous forme d'ADN (Marillonnet *et al.*, 2005; Chiba *et al.*, 2005). La transformation avec un réplicon introduit une phase artificielle d'intégration et de

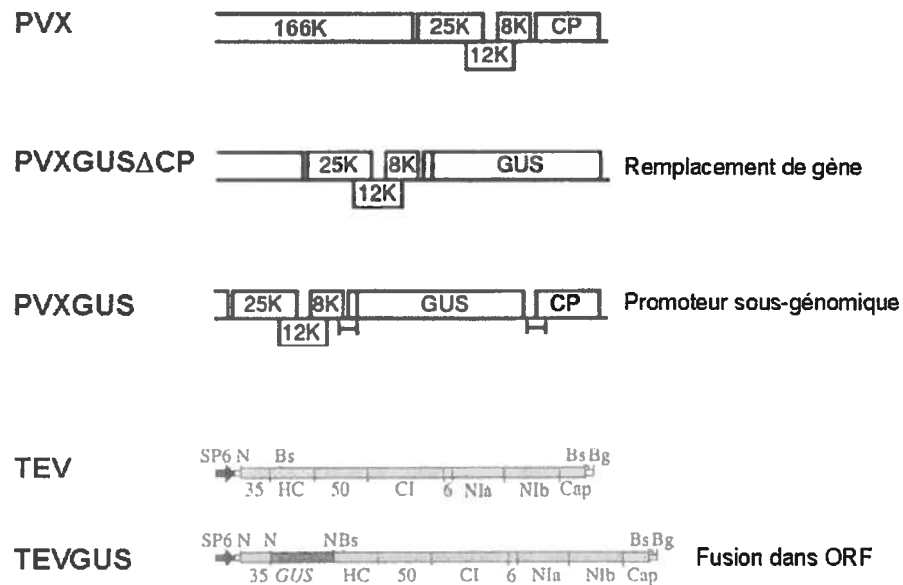


Figure 1 Production d'un vecteur viral recombinant. Les génomes de PVX (*potato virus X*) et de TEV (*tobacco etch virus*) sont représentés. Les protéines codées par ces virus sont également représentées : 166K, polymérase; 25K-8K-12K, bloc de protéines de mouvement; CP, capsid; 35, protéase de 35 kDa; HC, HcPro; 50, protéine de 50 kDa; CI, hélicase; 6, petite protéine de 6kDa; NIa et NIb, protéine d'inclusion nucléaire a et b; Cap, capsid. SP6 correspond au promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage SP6 et les lettres au-dessus des vecteurs TEV et TEVGUS correspondent aux différents sites de restriction. Le gène *gus* peut être inséré en remplacement de la séquence virale codant pour la capsid (PVXGUS Δ CP), sous le contrôle d'un promoteur sous-génomique dupliqué (PVXGUS) ou dans le cadre de lecture de la séquence virale en fusion avec une autre protéine (TEVGUS). Adaptée de Chapman, Kavanagh, Baulcombe, 1992 et Dolja, McBride, Carrington, 1992.

Tableau 3 Exemples de protéines recombinantes produites dans des plantes à partir de vecteurs viraux.

Groupes viraux	Virus spécifiques	Plantes	Protéines recombinantes	Références
Bromovirus	BMV	Tabac	Interféron- γ	French <i>et al.</i> , 1986
Tobamovirus	TMV	Tabac	Catalase;	Dawson <i>et al.</i> , 1989;
			Néomycine	Donson <i>et al.</i> , 1991;
			phosphotransférase II;	Takamatsu <i>et al.</i> , 1987;
			Hémagglutinine de l'influenza;	Beachy <i>et al.</i> , 1996;
			Protéine enveloppe du HIV-1 ;	Sugiyama <i>et al.</i> , 1995;
			Épitope de l'hépatite murin;	Sugiyama <i>et al.</i> , 1995; Beachy <i>et al.</i> , 1996;
			Épitope de la malaria (cellule B);	Beachy <i>et al.</i> , 1996;
			c-Myc;	Tacket & Mason, 1999; Turpen <i>et al.</i> , 1995;
			α -trichosanthine;	Beachy <i>et al.</i> , 1996;
			Peptide GP3 du virus de la rage;	Kumagai <i>et al.</i> , 1993;
			Peptide de HIV-1;	Modelska <i>et al.</i> , 1998; Yusibov <i>et al.</i> , 1997;
			α -galactosidase A humaine;	Yusibov <i>et al.</i> , 1997;
			scFv idiotypique;	Pogue <i>et al.</i> , 1998;
			VPI de FMDV;	Turpen, 1999;
			Antigène majeur bet 1 v du bouleau;	McCormick <i>et al.</i> , 1999;
			Allergène latex, bouleau et associé au spina-bifida;	Wigdorovitz <i>et al.</i> , 1999;
			Hormone de stimulation du follicule bovine;	<i>al.</i> , 1999;
			Peptide ZP3 du zona murin;	Krebitz <i>et al.</i> , 2000;
			Peptide hépatite C	Breiteneder <i>et al.</i> , 2001;
				Dirnberger <i>et al.</i> , 2001;
				Fitchen <i>et al.</i> , 1995;
				Nemchinov <i>et al.</i> , 2000

Tableau 3 Exemples de protéines recombinantes produites dans des plantes à partir de vecteurs viraux (suite).

Groupes viraux	Virus spécifiques	Plantes	Protéines recombinantes	Références
Potyvirus	ZYMV; WSMV; TEV; PVY; PPV; CIYVV	Concombre; Courge; Blé; Tabac	Interféron- $\alpha 2$; β -glucuronidase (GUS);	Azari <i>et al.</i> , 2001; Choi <i>et al.</i> , 2000; Dolja <i>et al.</i> , 1992;
			Néomycine phosphotransférase II; VP60 RHDV; Phosphinothricine acétyltransférase; Glutamine synthase; Peptide VP2 du parvovirus canin	Fernandez-Fernandez <i>et al.</i> , 2001; Shiboleth <i>et al.</i> , 2001; Whitham <i>et al.</i> , 1999
Potexvirus	PVX	Tabac; <i>N. benthamiana</i>	Protéine fluorescente verte (GFP);	Masuta <i>et al.</i> , 2000; Brennan <i>et al.</i> , 1999
			Défensine antimicrobienne; scFv de liaison herbicide diuron; scFv de liaison TSWV; scFv de liaison PVY; scFv; Protéines insecticide : WIN3, toxine Cry I Ac; Peptide gp41 du HIV-1; Protéine liaison fibronectine <i>S. aureus</i>	Santa Cruz <i>et al.</i> , 1996; Toth <i>et al.</i> , 2001; Saitoh <i>et al.</i> , 2001; Smolenska <i>et al.</i> , 1998; Franconi <i>et al.</i> , 1999; Hendy <i>et al.</i> , 1999; Roggero <i>et al.</i> , 2001; Lawrence & Novak, 2001; Marusic <i>et al.</i> , 2001; Brennan <i>et al.</i> , 1999
Comovirus	CPMV	Cow-pea; fève noire;	Épitope HRV-14 (HR14); Épitope FMDV (VP1); Épitope HIV-1 (gp41);	Porta <i>et al.</i> , 1994; Taylor <i>et al.</i> , 1999-2000; Lin <i>et al.</i> , 1996; Brennan <i>et al.</i> , 1999; Brennan <i>et al.</i> , 1999
		Tabac, cow-pea; fève noire; Cow-pea;	Peptide D2 protéine B de liaison fibronectine <i>S. aureus</i> ; Épitope HIV (gp120); Épitope virus entérique Mink (VP2); Protéine F membrane extérieure <i>P. aeruginosa</i> ; Épitope parvovirus canin (VP2)	Porta <i>et al.</i> 1994 Doran, 2000; Dalsgaard <i>et al.</i> , 1997; Brennan <i>et al.</i> , 1999a-b; 47; Staczek <i>et al.</i> , 2000; Langeveld <i>et al.</i> , 2001

Tableau 3 Exemples de protéines recombinantes produites dans des plantes à partir de vecteurs viraux (suite).

Groupes viraux	Virus spécifiques	Plantes	Protéines recombinantes	Références
Tombusvirus	TBSV	<i>N. benthamiana</i>	Boucle V3 de gp120 du HIV-1	Joelson <i>et al.</i> , 1997
Tobravirus	TRV	<i>N. benthamiana</i> ; <i>N. clevelandii</i>	GFP	MacFarlane & Popovich, 2000
Alfamovirus	AMV	Tabac; <i>N. benthamiana</i>	GFP	Sanchez-Navarro <i>et al.</i> , 2001
Closterovirus	BYV	Tabac; <i>Claytonia perfoliata</i> ; <i>N. benthamiana</i>	GUS; GFP	Peremyslov <i>et al.</i> , 1999; Hagiwara <i>et al.</i> , 1999
Hordivirus	BSMV	Orge	GFP	Haupt <i>et al.</i> , 2001

Adapté de Pogue *et al.*, 2002 et Giddings *et al.*, 2000. Abréviations : BMV, *Brome mosaic virus*; TMV, *Tobacco mosaic virus*; ZYMV, *Zucchini yellow mosaic virus*; WSMV, *Wheat streak mosaic virus*; TEV, *Tobacco etch virus*; PVY, *Potato virus Y*; PVX, *potato virus X*; CPMV, *Cowpea mosaic virus*; TBSV, *tomato bushy stunt virus*; TRV, *Tobacco ringspot virus*; AMV, *Alfalfa mosaic virus*; BYV, *Beet yellow virus*; BSMV, *Barley stripe mosaic virus*; TSWV, *Tomato spotted wilt virus*; HIV-1, *Human immunodeficiency virus type 1*; FMDV, *Foot-and-mouth disease virus*; RHDV, *Rabbit hemorrhagic disease virus*; HRV, *Human Rhinovirus*, scFc, single chain variable fragment.

transcription de cette nouvelle portion d'ADN dans le génome végétal suivie par l'exportation du noyau vers le cytoplasme et d'un possible épissage de cet ARN. Il est donc plausible que ceci puisse accélérer et aggraver la réponse de « gene silencing » réduisant par le fait même la capacité du réplicon à établir l'infection.

Par contre, comparativement aux plantes transgéniques, cette méthode ne permet pas aux plantes de transmettre le caractère nouveau aux générations suivantes du fait que le génome de ces virus ne s'intègre pas dans le génome des cellules hôtes. Cependant, l'infection virale occasionne parfois des symptômes sur les plantes hôtes qui entraînent des retards de croissance. Mais le plus important problème associé aux vecteurs viraux est l'instabilité du gène d'intérêt introduit dans la séquence virale.

2.2.1 L'instabilité génétique

L'instabilité d'un gène d'intérêt introduit dans une séquence virale représente l'enjeu majeur de l'utilisation d'un vecteur viral (Figure 2). Lorsque qu'un virus à ARN simple brin de polarité positive entre dans une cellule, le génome viral est immédiatement traduit par la machinerie cellulaire. Cette traduction permet d'obtenir plusieurs protéines virales, notamment une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP). La RdRP s'associe à d'autres protéines virales et probablement à des protéines cellulaires pour former le complexe de réplication. Ce complexe catalyse la première étape de réplication, soit la production d'une copie de polarité négative du génome viral. Cette copie de polarité négative sert ensuite de gabarit pour une deuxième étape de réplication où plusieurs copies d'ARN génomique de polarité positive sont produites. Une propriété de la RdRp est de faire des pauses lors de la réaction de polymérisation et de sauter d'un gabarit à un autre (Lai, 1992). Ce déplacement d'une molécule d'ARN à une autre peut provenir de la rencontre d'une structure primaire ou secondaire non habituelles provoquant la dissociation de la RdRp avec la séquence virale. La RdRp reprend par la suite sa lecture plus loin, soit sur le même gabarit ou sur un autre. Puisque le gène d'intérêt possède

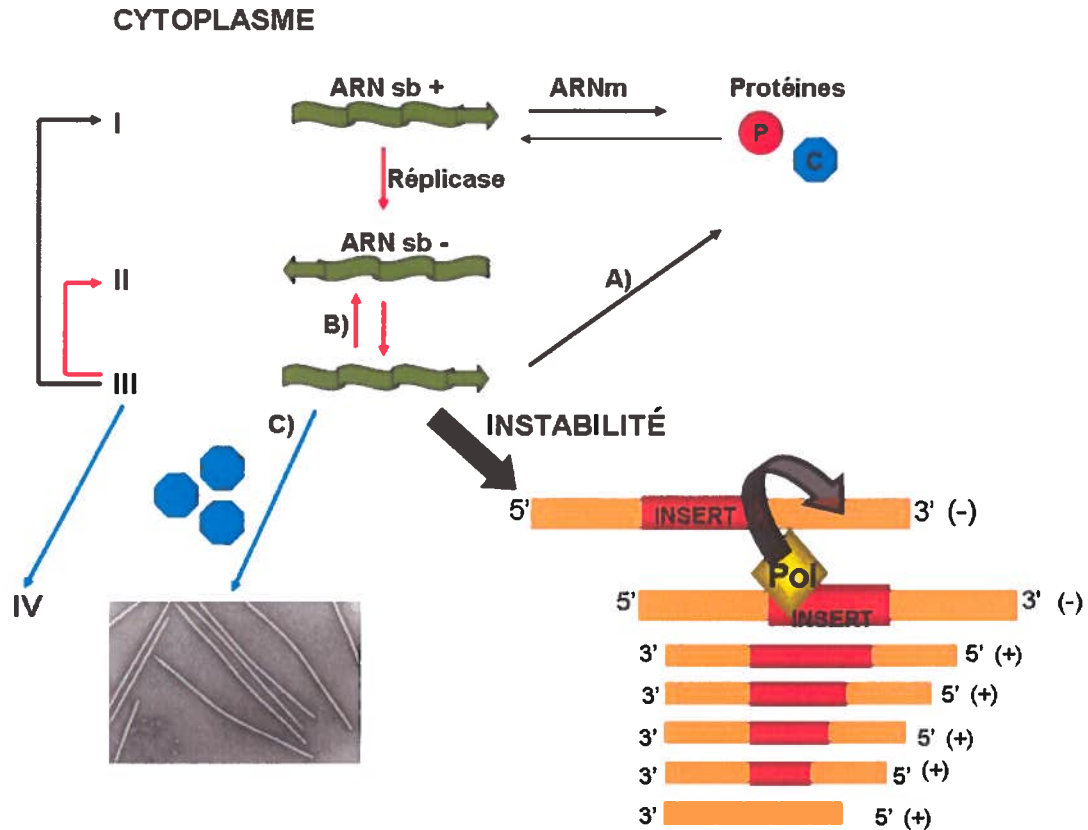


Figure 2 Représentation schématique du mécanisme de réplication virale d'un virus à ARN simple brin de polarité positive. L'étape I correspond à la traduction du génome en protéines virales (P, polymérase et C, capsid). L'étape II correspond à la réplication du brin de polarité positive (+) en brin de polarité négative (-). L'étape III correspond à la réplication du brin - en brin +. La succession de ces multiples cycles de réplication mène à l'instabilité génétique du transgène. Finalement, ce nouveau brin + peut être soit A) traduit de nouveau, B) se répliquer à nouveau ou être C) assembler en virion avec les protéines de capsid produites, correspondant à l'étape IV. La boucle à partir de l'étape III se répète ainsi jusqu'à l'éclatement de la cellule hôte et libération des particules virales.

aucune utilité fonctionnelle ou est même quelques fois nuisible pour le virus, il est progressivement éliminé après plusieurs cycles de réplication. Donc, à chaque cycle de dissociation de la RdRp avec la séquence virale. La RdRP reprend par la suite sa lecture plus loin, soit sur le même gabarit ou sur un autre. Puisque le gène d'intérêt possède aucune utilité fonctionnelle ou est même quelques fois nuisible pour le virus, il est progressivement éliminé après plusieurs cycles de réplication. Donc, à chaque cycle de réplication, une population d'ARN viraux, possédant des tailles légèrement différentes des molécules parentales, sont produites mais seulement les molécules les plus propices à la réplication seront reproduites.

2.2.2 Les vecteurs viraux de deuxième génération

L'instabilité génétique virale peut être contournée par l'intégration du génome viral dans le chromosome d'une plante (Gleba, Marillonnet, Klimyuk, 2004). Angell et Baulcombe (1997) ont produit des plantes de tabac transgéniques pour une copie d'ADN répliquable du *virus X de la pomme de terre* (PVX) sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du *virus de la mosaïque du chou-fleur* (CaMV). Les niveaux d'expression du virus sont plutôt faibles à cause du « gene silencing » post-traductionnel (PTGS).

L'infection par un virus, de part sa production d'ARN double brin (ARNdb) comme intermédiaire dans son cycle de réplication, déclenche le PTGS (Cogoni et Macino, 1999; Dalmay *et al.*, 2000; Smardon *et al.*, 2000; Baulcombe, 1996 et 1999). Le mécanisme général du PTGS est illustré dans la Figure 3. Les molécules d'ARNdb sont reconnues par l'enzyme DICER. Cette nucléase de type III hydrolyse l'ARNdb en petites molécules d'ARNdb de 21 à 24 nucléotides (siRNA). Les siRNA sont ensuite intégrés dans le RISC (RNA-induced silencing complex; Hammond *et al.*, 2000). Ce complexe est guidé par les siRNA vers les molécules d'ARNm qui sont homologues aux séquences des siRNA. Lorsque l'homologie n'est que partielle, il y aura répression de la traduction de l'ARNm sans clivage. Si par contre l'homologie de séquence est complète, l'ARNm est clivé par une endonucléase présente dans RISC, suivi par une dégradation complète par une

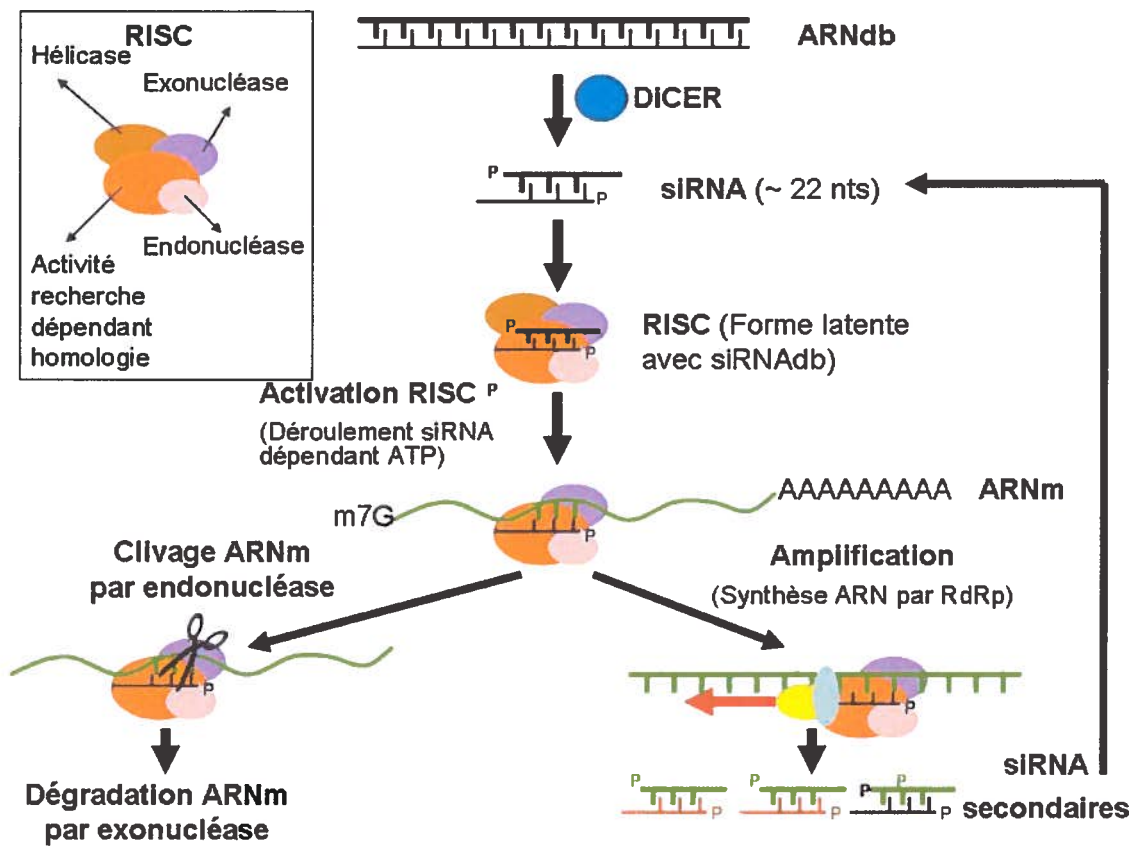


Figure 3. Mécanisme de « gene silencing » post-transcriptionnel.

Adaptée de Hannon, 2002 et Plasterk, 2002

exonucléase également présente dans RISC. Suite à l'appariement de séquences siRNA-ARNm, une réplication de l'ARNm à partir de l'amorce siRNA peut être effectuée par une polymérase endogène. L'ARNdb nouvellement synthétisé est à son tour sujet au clivage par DICER pour former de nouvelles molécules siRNA susceptibles d'être incorporées dans un RISC et reprendre le cycle. Ces nouvelles molécules siRNA sont nommées siRNA secondaires et semblent servir entre autres de molécules signal mobiles pour l'étendue systémique du silencing (Sijen *et al.*, 2001; Voinnet *et al.*, 1998; Voinnet, Lederer et Baulcombe, 2000; Wang *et al.*, 2000). Peu importe le mode d'action exercé sur l'ARNm, la finalité reste la même soit l'absence d'expression du ou des gènes ciblés. Certains virus possèdent des protéines capables d'inhiber le « gene silencing ». Plusieurs supresseurs de « gene silencing » ont été identifiés : la protéine HcPro (Helper component-protease gene) des potyvirus, la protéine 2b des cucumovirus, la protéine AC2 des geminivirus, la protéine P1 des sobemovirus, et la protéine 19K des tombusvirus (Voinnet, Pinto et Baulcombe, 1999; Elbashir *et al.*, 2001). Par contre, elles n'agissent pas toutes au même niveau pour supprimer le PTGS. Par exemple, HcPro inhibe le PTGS dans tous les tissus, que ce soit ceux qui ont été initialement infectés ou ceux qui n'avaient pas été touchés par l'infection initiale. Même les jeunes tissus développés après l'infection initiale ne peuvent déclencher le PTGS. HcPro semble bloquer le PTGS dans une étape en amont de la production du signal de silencing (Brigneti *et al.*, 1998; Llave, Kasschau et Carrington, 2000). La protéine 2b interfère avec l'étendue systémique du signal de silencing et prévient le silencing dans les tissus émergents. Le PTGS est donc actif au site d'infection local uniquement (Guo et Ding, 2002).

Une méthode efficace pour évaluer l'activité de suppression du PTGS d'une protéine virale est le synergisme. Le synergisme consiste à regrouper deux ou plusieurs membres pour effectuer une même fonction. Lors d'une infection virale, la synergie consiste à infecter une plante avec deux ou plusieurs virus pour, non seulement provoquer une infection, mais rendre cette infection plus virulente. Lorsqu'une plante hôte est infectée avec un virus ne possédant pas la capacité de supprimer le PTGS, la plante aura donc le pouvoir, grâce à ce mécanisme de défense, de combattre l'infection virale. Par contre, si une plante est infectée avec un virus codant pour une protéine de suppression du PTGS,

l'infection sera initiée. Finalement, lorsqu'une plante est infectée avec un virus codant pour une protéine de suppression du PTGS et un virus non apparenté ne codant pas pour ce type de protéines, l'infection sera initiée. En effet, l'action de suppression agira non seulement pour initier l'infection par le virus codant pour le supprimeur mais également sur l'initiation de l'infection par le virus ne possédant aucune action de suppression. Ceci représente une réaction de synergisme. Vance (1991) a démontré cette réaction de synergisme sur des plantes de *N. benthamiana* infectées avec le *virus Y de la pomme de terre* (PVY) codant pour une protéine HcPro connue pour son activité de suppression du PTGS et le *virus X de la pomme de terre* (PVX) ne codant aucune protéine de suppression du PTGS. Cette synergie était observée par une très forte augmentation dans l'accumulation des transcrits viraux pour le PVX. Cette augmentation était beaucoup plus prononcée pour l'accumulation des transcrits correspondant au brin de polarité négative. Par contre, le virus codant pour la protéine supprimeur du PTGS ne montrait pas d'augmentation dans l'accumulation de ses transcrits. La synergie s'effectue donc dans le but d'améliorer l'efficacité d'infection du virus le plus susceptible aux réactions de défense de la plante.

La protéine Hc-Pro est une des protéines virales les plus régulièrement employée pour supprimer le « gene silencing » dans les plantes transgéniques. Le PTGS a donc été contourné par co-expression du PVX avec HcPro (Anadalakshmi *et al.*, 1998). Ce système amélioré est connu sous le nom du système Amplicon-Plus. La production de protéines recombinantes a été rapportée comme étant quarante fois supérieure à l'expression dérivée à partir du promoteur CaMV 35S (Mallory *et al.*, 2002). Bien que cette méthode fournisse un niveau d'expression élevé, il reste encore l'inconvénient de l'expression constitutive d'un virus dans la plante. Mori *et al.* (2001) ont produit des plantes de *N. benthamiana* transgéniques pour l'ARN1 du *virus de la mosaïque du brome* (BMV) codant pour une sous-unité de la polymérase sous le contrôle d'un promoteur inductible aux glucocorticoïdes hautement régulé. De plus, ces plantes contiennent l'ADNc de l'ARN2 de BMV, codant pour une autre sous-unité de la polymérase, et un dérivé de l'ARN3 répliquable de BMV portant le gène codant pour l'interféron gamma humain (IFN). Lorsque les plantes sont traitées avec le glucocorticoïde dexaméthasone,

l'induction de la réplication et de l'amplification de l'ARN3 génétiquement modifié était observée avec un niveau d'accumulation d'ARN plus de 300 fois supérieur à celui observé avec le promoteur CaMV 35S. Cependant, ce système peut être sujet à une expression basale de la polymérase pour d'autres virus menant à une production incontrôlée de la protéine d'intérêt. C'est pourquoi des systèmes toujours plus performants doivent être construits.

2.3 La génération de plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques pour un système réplicon inductible

Dans cette étude, nous évaluons la possibilité de générer des plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques pour un système de réplicon basé sur le *virus de la mosaïque du navet* (TuMV) dans le but ultime de produire des protéines d'intérêt.

2.3.1 Le virus de la mosaïque du navet

Le *virus de la mosaïque du navet* (TuMV) fait partie de la grande famille des *Potyviriidae* de genre potyvirus dont font aussi partie certains virus d'importance économique tel le *virus Y de la pomme de terre* (PVY) (Ward et Shukla, 1991). Les potyvirus ont été bien étudiés pour l'expression de gènes d'intérêt puisqu'ils possèdent plusieurs caractéristiques avantageuses pour jouer le rôle de vecteurs viraux (Beauchemin, Bougie et Laliberté, 2005; Dolja *et al.*, 1993; El Amrani *et al.*, 2004; German-Retana *et al.*, 2000; Guo, Lopez-Moya et Garcia, 1998; Masuta *et al.*, 2000). Ce sont des virus de forme filamenteuse flexible non enveloppée entre 680 et 900 nanomètres de longueur par 11 à 15 nm de largeur (Dougherty et Carrington, 1988; Riechmann, Lain et Garcia, 1992; Langenberg et Zhang, 1997). Leur forme filamenteuse représente une des caractéristiques intéressantes des potyvirus. Celle-ci permet à un très gros génome d'être encapsider facilement comparativement à un virus de forme sphérique qui est limité en espace. Dans le cadre de l'utilisation d'un virus pour l'expression de

protéines recombinantes, cette caractéristique est importante compte tenu que l'ajout de la séquence codante pour cette nouvelle protéine à la séquence génomique du virus augmente la taille de celle-ci. Donc, dans un virus de forme filamenteuse, des séquences protéiques de grandes tailles peuvent être additionnées à la séquence virale sans restriction.

Le premier clone d'ADNc viral pleine longueur, à partir duquel des transcrits infectieux étaient produits, provenait du *virus de la mosaïque du brome* (BMV) (Ahlquist et Janda, 1984; Ahlquist *et al.*, 1984). Depuis, plusieurs clones infectieux ont été produits incluant ceux provenant des potyvirus (Dolja, McBride et Carrington, 1992, Guo, Lopez-Moya et Garcia, 1998). Un clone infectieux de TuMV est donc disponible (Sanchez *et al.*, 1998). Ce clone infectieux a été employé précédemment pour exprimer de façon adéquate deux protéines simultanément (Beauchemin, Bougie et Laliberté, 2005). Une protéine β -glucuronidase (GUS) et une protéine fluorescente verte (GFP) introduites dans l'un ou l'autre des sites prévus à cette fin. Ces deux sites sont présents entre les séquences codantes pour les protéines P1 et HcPro ainsi que les protéines N1b et CP.

2.3.1.1 Les hôtes et la symptomatologie

Le TuMV possède plusieurs plantes hôtes potentielles dont principalement des membres de la famille des *Cruciferae* du genre *Brassica* et *Arabidopsis* où il démontre des symptômes systémiques persistants. Quelques autres familles, dont tous les genres sont susceptibles, peuvent être infectées de manière systémique ou locale (*Leguminosae-Caesalpinioideae*, *Onagraceae*, *Orchidaceae*, *Papaveraceae*, *Phytolaccaceae*, *Tetragoniaceae*). Le genre *Nicotiana* (famille des *Solanaceae*) possède des espèces susceptibles et non susceptibles. Dans les espèces susceptibles, quelques-unes le sont pour une infection systémique telle *N. benthamiana* alors que d'autres le sont pour une infection locale uniquement telle *N. tabacum*. Plusieurs familles ne possèdent aucun genre susceptible à l'infection par le TuMV (*Euphorbiaceae*, *Gramineae*, *Malvaceae*, *Polygonaceae*, *Scrophulariaceae*, *Tropaeolaceae*, *Umbelliferae*, *Violaceae*).

2.3.1.2 Le génome

Les potyvirus possèdent un génome à ARN simple brin linéaire de polarité positive d'approximativement 10 kb. La polarité de leur génome leur permet d'être utilisé, dès leur entrée dans la cellule hôte, tel un ARN messager et être immédiatement traduit en protéines. Le génome possède une protéine nommée VPg liée à son extrémité 5' et est polyadénylé en son extrémité 3' (Hari *et al.*, 1979; Hari, 1981; Siaw *et al.*, 1985; Riechmann, Lain et Garcia, 1989; Murphy *et al.*, 1990; Takahashi, Takahashi, Uyeda, 1997). La queue polyadénylée possède une taille très variable d'un potyvirus à l'autre. L'ARN génomique code pour une polyprotéine (entre 340 et 368 kDa) qui est auto-clivée par des protéases virales et cellulaires en dix protéines matures (Figure 4) (Riechmann, Lain et Garcia, 1992; Langenberg et Zhang, 1997). Le cadre de lecture est bordé par une longue région 5' non traduite (UTR; 144 à 205 nucléotides) riche en résidus adénines alors que peu de résidus guanines y sont retrouvés. Celle-ci agit en tant que région d'amplification (enhancer) de la traduction (Carrington et Freed, 1990). La présence de plusieurs régions conservées dans ce 5' UTR entre les différents membres des potyvirus démontre son rôle potentiel dans l'encapsidation ou la réplication du virus (Reichmann, Lain et Garcia, 1992). La taille et la séquence de la région 3' non traduite est variable (Turpen, 1989; Quemada *et al.*, 1990).

2.3.1.3 Les protéines virales

Le tableau 4 résume les activités associées aux différentes protéines codées par le génome viral.

La protéine P1 correspond à une protéase de type sérine et est responsable principalement du clivage de sa propre extrémité COOH au niveau d'un dipeptide tyrosine-sérine ou phenylalanine-sérine. D'autres fonctions ont pu lui être rattachées telles sa possible implication dans la réplication ou les mouvements viraux (Brantley et Hunt, 1993; Soumounou et Laliberté, 1994; Citovsky, Knorr et Zambryski, 1991; Citovsky *et al.*, 1992; Schoumacher *et al.*, 1992; Osman, Hayes et Buck, 1992; Osman, Thommes et



Figure 4 Représentation schématique du génome du TuMV. Toutes les séquences correspondantes aux protéines virales matures sont représentées avec leurs noms respectifs ainsi que les extrémités 5' et 3' non traduites (UTR). On remarque aussi la protéine VPg en rouge liée en 5' et la queue polyadénylée en 3'.

Tableau 4 Les protéines potyvirales, leurs tailles respectives ainsi que leurs fonctions connues et anticipées.

Protéines	Fonctions possibles
P1	Protéase
33 kDa	Réplication Mouvements cellule-cellule
HcPro	Protéase
52 kDa	Transmission virale par les pucerons Réplication virale Transport longue distance Synergisme Suppression « gene silencing » Apparition symptômes
P3, 41 kDa	Inconnue (possible rôle dans réplication)
6K1 et 6K2	Inconnue, rôles possibles dans Réplication
6 kDa	Régulation translocation nucléaire NIa Ancrage machinerie réplication aux membranes
CI	Réplication (ARN hélicase)
71 kDa	Attachement aux membranes Stimulation activité ATPase Mouvements cellule-cellule
NIa-VPg	Réplication (amorce synthèse ARN)
22 kDa	Mouvements cellule-cellule et longue distance
NIa-Pro	Protéase
27 kDa	Mouvements cellule-cellule
NIb	Réplication (ARN-polymérase-ARN-dépendante)
59 kDa	Translocation nucléaire
CP	Encapsidation ARN
31 kDa	Reconnaissance de l'hôte Transmission virale par les pucerons Mouvements cellule-cellule et longue distance

Adapté de Winterhalter, Potyvirus : Virology donw under, <http://www.uq.edu.au/vdu/virology.htm>

Buck, 1993; Atabekov et Taliansky, 1990; Dougherty et Semler, 1993; Verchot et Carrington, 1995a et 1995b).

La protéine Hc-Pro (helper component-proteinase) est une protéine multifonctionnelle qui est premièrement responsable du clivage de sa propre extrémité COOH. Elle est également impliquée au niveau de la transmission du virus par les pucerons (Pirone et Blanc, 1996), du maintien de la réplication virale (Kasschau et Carrington, 1995; Kaaschau, Cronin et Carrington, 1997), de la stimulation des mouvements viraux longues distances (étendue systémique de l'infection; Cronin *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1997), de l'altération dans l'expression des symptômes (Atreya *et al.*, 1992; Atreya et Pirone, 1993; Dolja *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1994; Cronin *et al.*, 1995) ainsi que de la suppression des phénomènes de gene silencing provoquant entre autres des effets de synergie lors d'une infection avec deux virus non apparentés (Shi *et al.*, 1997; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau et Carrington, 1998; Bruening, 1998).

La protéine P3 représente une protéine dont le rôle n'a pas encore été identifié.

La protéine d'inclusion cylindrique (CI) joue principalement le rôle d'une hélicase (Lain, Riechmann et Garcia, 1990) mais elle peut aussi être impliquée dans la réplication et les mouvements viraux (Carrington, Jensen et Schaad, 1998).

On retrouve aussi deux petites protéines d'environ 6 kDa (6K1 et 6K2). La 6K2 possède une séquence hydrophobe, ce qui permettrait aux protéines qui lui sont liées d'être ancrées dans des membranes.

La protéine d'inclusion nucléaire NIa est également une protéine multifonctionnelle qui agit à différentes étapes du cycle de réplication. Elle possède deux domaines, un domaine VPg à son extrémité N-terminale et un domaine Pro (protéinase) à son extrémité C-terminale. Elle possède une activité protéolytique responsable de sa propre maturation

pour générer les sous-protéines VPg et Pro ainsi que du clivage des extrémités N-terminales des protéines Nlb et CP. La protéine VPg est retrouvée attachée à l'extrémité 5' du génome viral où elle joue plus ou moins le rôle de la structure CAP retrouvée chez les ARNm eucaryotiques. Elle peut agir telle une amorce pour l'enzyme ARN polymérase par interaction directe avec celle-ci (Hong *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997; Fellers *et al.*, 1998). Elle semble également être impliquée au niveau de la traduction (Wittmann *et al.*, 1997). Elle semble aussi être impliquée indirectement dans les mouvements viraux cellule-cellule via les plasmodesmes et plus directement dans les mouvements longues distances (Schaad et Carrington, 1996; Nicolas *et al.*, 1997; Schaad, Lellis et Carrington, 1997; Rajamäki et Valkonen, 1999 et 2002). Quant à son domaine protéinase, un rôle dans les mouvements viraux cellule-cellule lui a été récemment rattaché (Maiti *et al.*, 1993; Fellers *et al.*, 1998).

La protéine Nlb (protéine d'inclusion nucléaire b) représente la polymérase virale (Deiman *et al.*, 1997). Tout comme Nla, elle doit son nom au fait qu'elle est retrouvée principalement dans le noyau cellulaire régulièrement sous forme de corps d'inclusion. Leur fonction à toutes les deux dans le noyau est par contre encore inconnue. Elle est responsable de la réplication des molécules d'ARN viral de polarité positive et négative. Sa principale caractéristique est la présence du motif conservé glycine-aspartate-aspartate (GDD), signature des ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) (Urcuqui-Inchima, Haenni et Bernardi, 2001). Elle interagit avec les domaines VPg et Pro de Nla de même qu'avec la protéine de liaison à la queue de poly(a) de la cellule hôte (PABP) (Urcuqui-Inchima, Haenni et Bernardi, 2001). La traduction et la réplication semblent donc des étapes fortement liées.

Finalement, il y a la protéine de capsid (CP) qui possède un rôle majeur dans l'encapsidation du virus ainsi que dans la reconnaissance de l'hôte. De plus, en association avec les protéines Hc-Pro ou CI, CP semble impliquée dans les mouvements locaux et systémiques du virus dans les cellules hôtes (Rojas *et al.*, 1997; Carrington, Jensen et Schaad, 1998).

2.3.2 La transgénèse du réplicon TuMV

L'intégration de la copie ADN du TuMV dans le génome végétal permet à cet ADN d'être exprimé au même titre que n'importe quelle autre séquence d'ADN présente dans ce même génome. De plus, puisque régulièrement cette copie d'ADN est sous le contrôle d'un promoteur constitutif, elle est exprimée continuellement dans les plantes. Cette synthèse constante de transcrits viraux infectieux peut porter préjudice à la génération de plantes transgéniques normales. En effet, une infection virale provoque des symptômes visuels tels des chloroses, des mosaïques, des taches, des plissures et une rugosité sur les feuilles des plantes, qui sont habituellement accompagnés de déficiences du développement végétal tels des plantes étiolées (entre-nœuds plus longs, feuilles plus petites) ou atrophiées (entre-nœuds plus courts, feuilles plus grosses). Il n'est pas rare qu'une infection virale s'accompagne de déficiences si importantes qu'elle occasionne la mort de la plante. L'infection d'une plante par un virus génétiquement modifié peut également ne pas être convenable si le gène d'intérêt code pour une protéine qui est toxique pour les cellules végétales. Cet inconvénient est contourné par la construction de systèmes de transcription inductibles.

2.3.3 Les systèmes d'expression inductible

L'utilisation de séquences régulatrices de plantes répondant à un traitement chimique est une façon simple et efficace d'élaborer un système inductible. L'inconvénient majeur relié à l'utilisation de séquences d'origine végétale demeure l'activation non désirée de gènes natifs contrôlés par ces mêmes séquences (Gatz et Lenk, 1998). Dans cette optique, il est important de choisir un promoteur spécifique à un inducteur qui ne possède pas la capacité de réguler des gènes associés à la croissance et au développement normal de la plante. Il est donc préférable d'utiliser des éléments régulateurs provenant d'organismes distants tels les bactéries (*E. coli*), les levures (*S. cerevisiae*), les insectes (*D. melanogaster*) et les animaux. Ces éléments régulateurs répondent à des signaux chimiques qui ne sont pas retrouvés dans les plantes. Ces composés chimiques doivent

répondre à plusieurs caractéristiques pour être considérés comme un bon inducteur. Ils doivent avoir : 1) une très forte spécificité pour l'élément régulateur, 2) être non toxique pour la plante et son environnement, 3) être facilement applicable soit par vaporisation ou drainage par les racines, 4) être hautement efficace à faible concentration et ne pas nécessiter de nombreuses applications, et 5) être peu coûteux. Quatre différents systèmes de contrôle de gènes sont disponibles: des systèmes de dé-répression, d'inactivation, d'activation ou d'activation/inactivation transcriptionnelle (Tableau 5). Peu importe le système utilisé, celui-ci tout comme son inducteur associé doit posséder plusieurs caractéristiques importantes. Il doit 1) être « silencieux » (i.e. un taux de transcription nul) en absence de son inducteur, 2) avoir un très haut niveau d'inductibilité (i.e. un taux de transcription élevé) en présence de son inducteur, 3) être hautement spécifique à son inducteur, 4) y répondre rapidement, et finalement 5) être rapidement « éteint » (i.e. aucune transcription) lorsque l'inducteur n'est plus présent.

2.3.3.1 Le système de dé-répression de la transcription

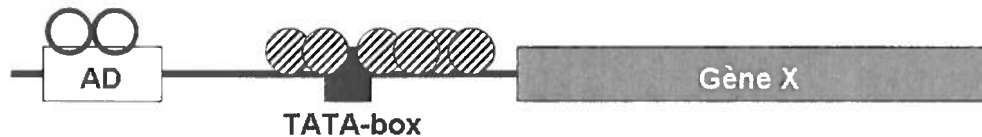
Le principe de base de ce type de système est la liaison du répresseur (sous forme dimérique) à la séquence promotrice, ce qui cause une interférence stérique pour la machinerie transcriptionnelle. L'ajout de l'inducteur favorise alors la monomérisation du répresseur. Ce changement d'état favorise la dissociation du répresseur de la séquence promotrice et permet à la machinerie transcriptionnelle d'opérer (Figure 5). Le système répresseur/opérateur Tet bactérien est le plus régulièrement employé. Le répresseur Tet (TetR) codé par le transposon Tn10 d'*E. coli* bloque l'expression du gène de résistance à la tétracycline (Gatz et Quail, 1988; Gatz, Frohberg et Wendenburg, 1992; Hillen et Berens, 1994). En présence de tétracycline, la répression effectuée par TetR sur le promoteur contrôlant l'expression d'un gène de résistance est abolie. Cette stratégie nécessite d'introduire dans le génome végétal le gène codant pour TetR sous le contrôle d'un promoteur constitutif et le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur constitué d'opérateurs *tet*. Ce système a été utilisé pour exprimer certains gènes dans différentes

Tableau 5 Liste des systèmes inductibles chimiquement utilisés dans les plantes.

Systèmes	Facteur de transcription	Inducteur	Références
Dé-répression	TetR	Tétracycline	Gatz et al., 1992
Inactivation	tTA	Tétracycline	Weinmann et al., 1994
Activation	GVG	Dexaméthasone	Aoyama et Chua, 1997
	AlcR	Éthanol	Caddick et al., 1998
	GVGEc	RH5992	Martinez et al., 1999
	ER-CI	β -Estradiol	Bruce et al., 2000
	XVE	β -Estradiol	Zuo et al., 2001
Activation/Inactivation	TGV	Dexaméthasone et Tétracycline	Böhner et al., 1999

Adapté de Zuo et Chua, 2000

A) SANS INDUCTEUR



B) AVEC INDUCTEUR

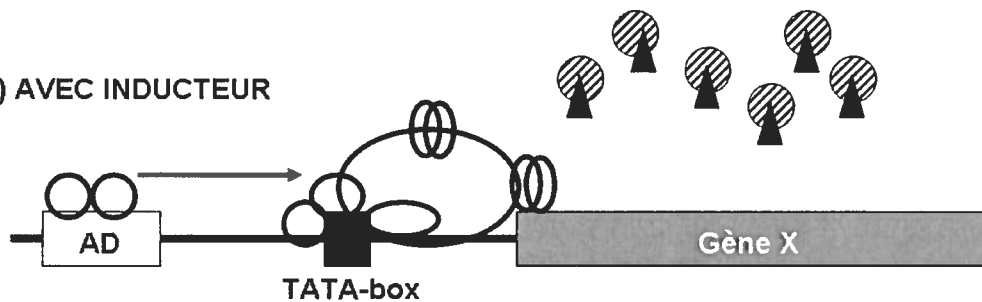


Figure 5 Représentation schématique d'un système de dé-répression de la transcription A) en absence et B) en présence d'un inducteur. A) Le domaine d'activation de la transcription (boîte AD) présent sur la région promotrice contrôlant l'expression du gène d'intérêt reçoit constitutivement un facteur de transcription (double cercle ouvert) qui ne peut déclencher la transcription du gène dû à la présence de répresseurs sous forme dimérique (cercle hachuré) sur la boîte TATA (boîte noire) de cette même séquence promotrice. B) En présence de l'inducteur (triangle noir), celui-ci s'associe au répresseur lequel retrouve une forme monomérique se dissociant automatiquement de la boîte TATA pour permettre au facteur de transcription de prendre sa place et guider l'expression du gène d'intérêt (machinerie cellulaire est représentée par l'assemblage de cercles ouverts sur la boîte TATA).

plantes telles le tabac, la tomate et la pomme de terre (Masgrau *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1996; Thompson et Myatt, 1997). Un inconvénient majeur est la courte demi-vie de la tétracycline nécessitant l'ajout régulier de celle-ci pour maintenir l'expression du gène d'intérêt. Le système répresseur/opérateur Lac impliqué dans le métabolisme du lactose chez les bactéries entériques est inductible par la présence de lactose ou de son analogue l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) et donne des résultats tout aussi intéressants (Beckwith et Zipser, 1970; Wilde *et al.*, 1992).

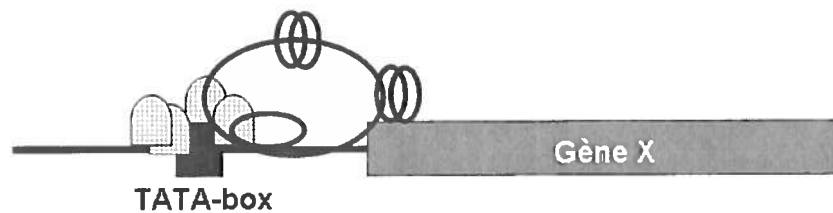
2.3.3.2 Le système d'inactivation de la transcription

Le principal système d'inactivation de la transcription (tTA) (Weinmann *et al.*, 1994) est basé sur TetR qui cette fois-ci est converti en activateur de la transcription par fusion avec la protéine VP16 du virus de l'*Herpes simplex*. tTA permet l'expression constitutive du gène d'intérêt, l'ajout de la tétracycline déloge tTA, et ne permet plus la transcription. Il y a donc expression constante en absence de l'inducteur suivie d'une répression en sa présence (Figure 6). Ce système a été utilisé dans le tabac et *Arabidopsis*. Puisque le choix d'utiliser un système inductible provient du fait que l'on veut exprimer une protéine précisément dans le temps, son expression constitutive n'est alors pas souhaitée. Donc, l'utilisation d'un système d'inactivation n'est pas avantageuse puisque l'application constante de l'inducteur est nécessaire pour ne pas avoir d'expression du gène d'intérêt. Compte tenu de la courte demi-vie de la tétracycline, ce système est plutôt à proscrire.

2.3.3.3 Le système d'activation de la transcription

La majorité des systèmes d'expression inductible décrit pour les plantes sont des systèmes d'activation de la transcription. La stratégie commune est d'exprimer constitutivement un facteur de transcription chimérique. Ce facteur de transcription est composé d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD), d'un domaine d'activation de la transcription (AD), d'un signal de localisation nucléaire (NLS) et d'un domaine régulateur. En absence de

A) SANS INDUCTION



B) AVEC INDUCTION

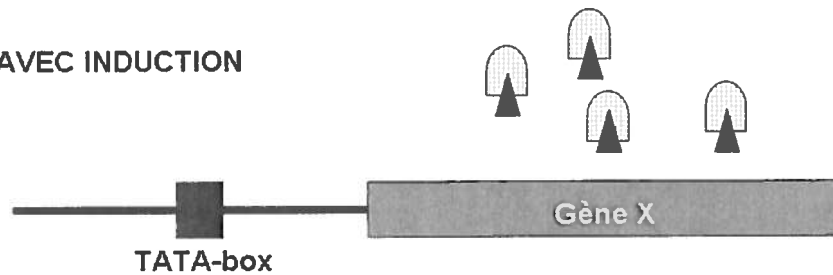


Figure 6 Représentation schématique d'un système d'inactivation de la transcription A) en absence et B) en présence de l'inducteur. A) Sur la boîte TATA (boîte noire) dans la séquence promotrice contrôlant l'expression du gène d'intérêt s'associe constitutivement l'activateur de la transcription (formes quadrillées) pour conduire l'expression du gène cible. B) En présence de l'inducteur (triangle noire), celui-ci se lie à l'activateur pour provoquer sa dissociation de la séquence promotrice et ainsi empêcher l'expression du gène cible.

l'inducteur, le domaine régulateur est associé à des protéines régulatrices cytoplasmiques et reste ancré dans le cytosol sous sa forme monomérique. En présence de l'inducteur, celui-ci s'associe au domaine régulateur à la place des protéines cytoplasmiques et favorise la dimérisation du facteur de transcription et sa translocalisation vers le noyau de la cellule. Une fois dans le noyau, il active l'expression du gène d'intérêt contrôlé par le promoteur cible (Figure 7). Ce système nécessite l'introduction dans le génome végétal du gène codant pour le facteur de transcription chimérique sous le contrôle d'un promoteur constitutif et le gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur inductible.

Plusieurs systèmes ont été construits dont ceux constitués du domaine régulateur provenant d'un récepteur nucléaire animal stéroïdien, répondant aux glucocorticoïdes (GVG; Evans, 1988; Aoyama et Chua, 1997; Ouwerkerk *et al.*, 2001) et aux estrogènes (XVE; Bruce *et al.*, 2000; Zuo *et al.*, 2000a; Zuo, Niu et Chua, 2000b). Puisque le choix de ces systèmes nécessite l'utilisation d'un inducteur hormonal d'origine animale, leur utilisation aux champs n'est pas appropriée. C'est ainsi qu'un système où le récepteur stéroïdien a été remplacé par un récepteur d'insecte de la super famille des récepteurs dits stéroïdien/acide rétinoïque/thyroïdien répondant à l'ecdysone a été élaboré. Toutefois, ce dernier possède un niveau d'expression en absence de l'inducteur plutôt élevé. Ce qui démontre qu'il y a toujours des avantages et des inconvénients rattachés à l'utilisation d'un ou l'autre des différents systèmes d'expression inductible disponibles. Outre ces systèmes composés d'un facteur de transcription chimérique, d'autres systèmes utilisent directement un facteur de transcription provenant d'un seul organisme autre que les plantes. C'est le cas du facteur de transcription AlcR d'*Aspergillus nidulans* inductible à l'éthanol (Caddick *et al.*, 1998) ou de ACE1 de *S. cerevisiae* inductible par le cuivre (Mett, Lochhead et Reynolds, 1993). Dans ces cas, la mécanique d'induction est un peu différente. En absence de l'inducteur, le facteur de transcription prend une conformation type qui sera modifiée en présence de l'inducteur pour lui permettre de s'associer à la séquence promotrice et promouvoir l'expression du gène d'intérêt sous son contrôle.

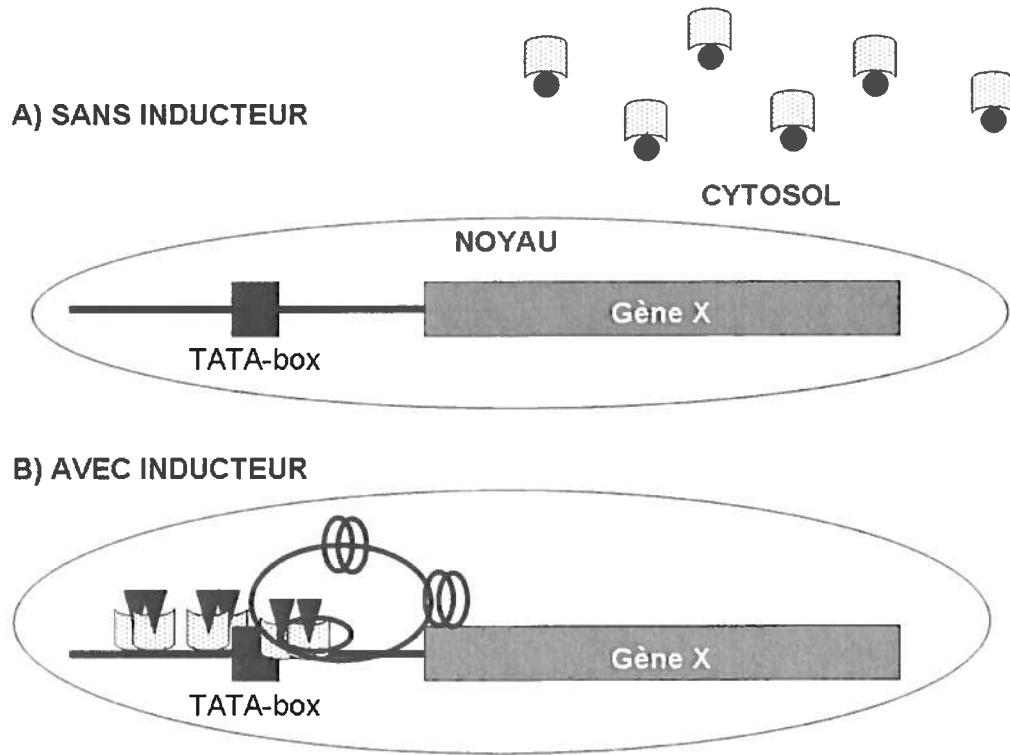


Figure 7 Représentation schématique d'un système d'activation de la transcription de type récepteur stéroïdien A) en absence et B) en présence de l'inducteur. A) Au niveau du cytosol se retrouve le facteur de transcription chimérique (formes pointillées) constitué d'un domaine de liaison à une hormone stéroïdienne provenant d'un récepteur stéroïdien sur lequel s'associe des protéines cellulaires (HSP90; cercles noirs). Cette association ancre le facteur de transcription au cytosol sous sa forme monomérique. B) En présence de l'inducteur (triangles noirs), celui-ci prend la place des protéines cellulaires et favorise la dimérisation du facteur de transcription ainsi que leur translocalisation vers le noyau où il procèdera à l'expression du gène d'intérêt suite à sa liaison au promoteur inducible.

2.3.3.4 Les systèmes à double contrôle

Jusqu'à aujourd'hui, un seul système à double contrôle de type activation/inactivation de la transcription a été construit. Celui-ci est basé sur la combinaison du système de dérépression TetR et du système d'inactivation tTA (Böhner *et al.*, 1999). Ce nouveau système possède tous les avantages des deux systèmes individuels et permet d'éliminer la presque totalité des inconvénients. Le facteur de transcription utilisé dans ce système est composé d'un domaine de liaison à l'ADN du répresseur TetR fusionné à la région régulatrice d'un récepteur de glucocorticoïdes et d'une séquence de transactivation de la transcription. Ce système est nommé TGV. En présence de dexaméthasone, le facteur de transcription TGV s'associe au promoteur inductible constitué d'opérateurs *tet* pour favoriser l'expression du gène d'intérêt de manière similaire à l'activation de la transcription conduit par l'utilisation du système GVG. En contrepartie, la présence de tétracycline déloge le facteur de transcription et « éteint » l'expression du gène d'intérêt.

Un deuxième système possédant deux niveaux de contrôle a été élaboré. Ce système consiste en un système d'excision par recombinaison d'ADN nommé Cre/loxP. Il a été premièrement élaboré dans le but d'éliminer le marqueur de sélection lors de la production de plantes transgéniques (Corneille *et al.*, 2001; Hare et Chua, 2002; Kopertekh, Juttner et Schiemann, 2004; Sreekala *et al.*, 2005; Zuo *et al.*, 2001). La recombinase Cre de 38 kDa provient du bactériophage P1 (Austin, Ziese et Sternberg, 1981; Abremski, Hoess et Sterberg, 1983; Hoess et Abremski, 1985). Elle reconnaît spécifiquement le site *loxP* qui est une séquence de 34 paires de bases composées de deux répétitions inversées de treize paires de bases séparées par une séquence cœur asymétrique de huit paires de bases. Dépendamment de l'orientation d'un site par rapport à l'autre dans une séquence d'ADN, Cre catalyse un événement de recombinaison qui résulte en une inversion, une délétion (Dale et Ow, 1991; Gleave *et al.*, 1999; Corneille *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2001), une translocalisation (Vergunst *et al.*, 2000) ou une intégration (Stuurman *et al.*, 1996; Day *et al.*, 2000) de la séquence flanquée par ces deux sites. Pour éliminer le marqueur de sélection, deux sites *loxP* orientés dans la même direction sont insérés de part et d'autres du gène de sélection (e.g. *np1II*). La présence de Cre induit la

recombinaison spécifique aux sites *loxP*, ce qui provoque l'élimination du gène de sélection. Ce système est fonctionnel dans différentes espèces de plantes telles le tabac (Odell *et al.*, 1990; Bayley *et al.*, 1992), *Arabidopsis* (Vergunst, Jasen et Hooykaas, 1998; Hoff, Schnorr et Mundy, 2001), la tomate (Stuurman *et al.*, 1996), le blé (Srivastava, Anderson et Ow, 1999), le maïs (Srivastava et Ow, 2001) et le riz (Hoa *et al.*, 2002). Cependant, une exposition prolongée de Cre dans les plantes cause l'apparition d'aberrations phénotypiques (Heidmann et Lehner, 2001). Ce problème est contourné par l'expression transitoire de la recombinase par diverses méthodes (Dale et Ow, 1990; Vergunst, Jasen et Hooykaas, 1998; Gleave *et al.*, 1999; Hendy *et al.*, 1999; Vergunst *et al.*, 2000; Kopertekh, Juttner et Schiemann, 2004). Le système CLX pour sa part, contre le problème puisque l'expression de la recombinase Cre est régulée de façon inductible (Hoff, Schnorr et Mundy, 2001). La figure 8 illustre le système d'excision par recombinaison d'ADN Cre/*loxP*.

Marillonnet *et al.* (2004) ont aussi utilisé le système de recombinaison par Cre pour l'assemblage d'un virus dans les plantes. Dans ce cas, le génome du *virus de la mosaïque du tabac* (TMV) était déconstruit en plusieurs modules pro-vecteur chacun possédant un site de recombinaison *loxP*. *Agrobacterium* était utilisé pour délivrer les modules dans des plantes de *N. benthamiana* transgéniques pour le gène codant pour Cre laquelle a permis l'assemblage adéquat des modules en virus actif pour sa réplication.

Ce système de recombinaison peut aussi être utilisé dans le but de réduire l'expression basale d'un gène d'intérêt provoquer par des fuites au niveau du promoteur inductible. En effet, la recombinaison opérée par Cre nécessite l'accumulation d'une quantité suffisante de cette protéine Cre. Donc, l'expression basale de Cre provoquée par une fuite au niveau du promoteur inductible ne pourrait pas rendre suffisamment de protéines Cre pour déclencher l'évènement de recombinaison, ce qui rend ce système d'autant plus intéressant.

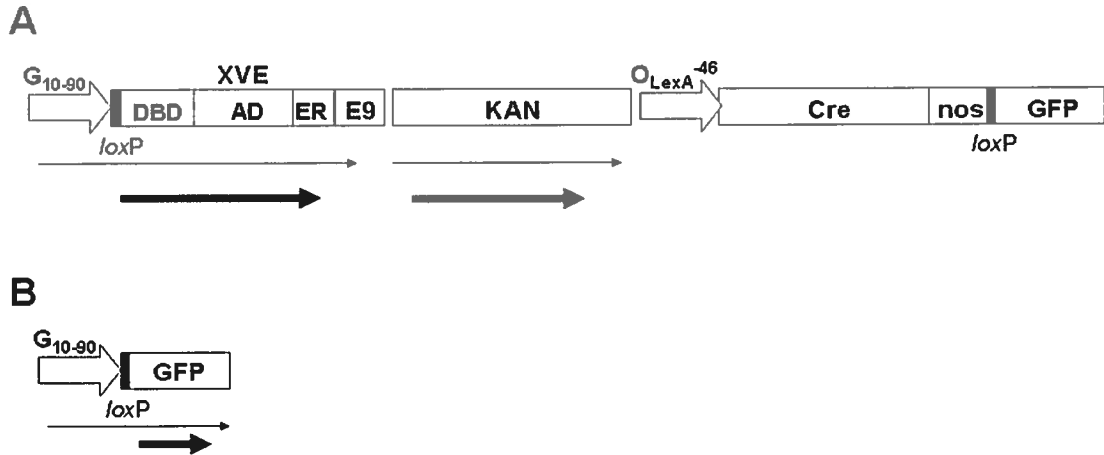


Figure 8 Représentation schématique du système d'activation/recombinaison, CLX, A) avant induction et B) après induction. Le facteur de transcription XVE est constitué du domaine de liaison à l'ADN du répresseur bactérien LexA (DBD), du domaine d'activation de la transcription de la protéine VP16 du virus de l'*Herpes simplex* (AD) et du domaine récepteur de l'estrogène humain (ER). Il est contrôlé par le promoteur constitutif G_{10-90} et le terminateur *rbcS* E9. Le bloc KAN consiste au gène *npII* codant pour la néomycine phosphotransférase II contrôlé par le promoteur constitutif et le terminateur du gène de la nopaline synthase (*nos*). Le gène *cre* codant pour la recombinase est contrôlé par le promoteur inducible constitué du promoteur minimal CaMV 35S fusionné à huit copies d'une séquence opératrice bactérienne LexA (O_{LexA}^{-46}) et le terminateur *nos*. Le bloc GFP consiste au gène *gfp* codant pour la protéine fluorescente verte et le terminateur de la transcription *rbcS* 3A. Les sites *loxP* sont représentés par les boîtes noires en aval du promoteur G_{10-90} et en amont de GFP. A) Avant induction, seule la transcription (flèche mince) et la traduction (flèche épaisse) des gènes XVE et KAN est possible. B) Après induction, la transcription et la traduction de Cre est activées, l'évènement de recombinaison sur les sites *loxP* a lieu et la séquence entre ces sites, de même qu'un de ces deux sites, sont perdus promouvant l'expression du gène *gfp* contrôlé par le promoteur constitutif G_{10-90} .

LES OBJECTIFS DE RECHERCHE

3.1 L'objectif général

L'objectif principal du projet consiste dans l'élaboration d'un système d'expression inductible basé sur le système Cre/*loxP* où l'expression de la recombinaise sera nécessaire pour réactiver la réplication du réplicon TuMV préalablement inactivé. Ce système est élaboré dans le but d'être utilisé pour produire des plantes transgéniques qui exprimeront une protéine recombinante.

3.2 Les objectifs spécifiques

Le premier objectif consistera à inactiver le TuMV pour permettre de contrôler sa réplication pendant le développement de la plante. L'inactivation sera effectuée par l'insertion d'un signal de terminaison de la traduction bordé de deux sites *loxP*. Cette insertion a été effectuée entre les séquences codantes pour les protéines P1 et HcPro du virus. Ce site dans le génome du TuMV a déjà été utilisé pour insérer la séquence codante pour les protéines GUS ou GFP (Beauchemin, Bougie et Laliberté, 2005). L'expression de ces deux protéines dans des plantes infectées avec le virus recombinant montre que celui-ci se réplique malgré l'ajout d'une séquence étrangère au sein de sa séquence. L'insertion du signal de terminaison de la traduction à cet endroit empêchera l'expression de la polymérase virale et ainsi la réplication du TuMV. Le TuMV inactif pour sa réplication sera nommé TuMV-flox. La réactivation de la réplication du TuMV se fera uniquement en présence de l'expression de la recombinaise Cre qui éliminera le signal de terminaison de la traduction par un événement de recombinaison spécifique aux sites *loxP*. La figure 9 illustre la stratégie employée.

Le deuxième objectif consistera à s'assurer de l'inactivation complète du TuMV. Compte tenu que l'expression d'une seule copie du génome viral provoquera la réplication en chaîne du virus, le système d'inactivation devra être très étanche. Cette étanchéité sera

évaluée par l'infection de plante d'*A. thaliana* avec la forme inactive du virus et observation de l'absence d'accumulation de protéines de capsid de celui-ci.

Le troisième objectif consistera à évaluer l'efficacité de recombinaison sur les sites *loxP* introduits dans le génome du virus par la recombinaise Cre. Cette recombinaison sera premièrement testée *in vitro* sur le plasmide correspondant à la séquence virale inactivée par une recombinaise Cre recombinante. Par la suite, la recombinaison sera également testée *in planta* pour s'assurer que celle-ci peut avoir lieu directement dans une plante.

L'atteinte de ces deux derniers objectifs permettra de procéder à l'insertion de la séquence virale inactivée dans le génome d'une plante de *Nicotiana tabacum* et d'*Arabidopsis thaliana* en étant certain de réussir à régénérer ces plantes transgéniques. Cette transformation génétique stable des plantes consistera alors au quatrième objectif.

Le cinquième objectif consistera à induire la réplication du TuMV-flox pour permettre au virus d'exprimer à nouveau toute ses protéines ainsi que toutes autres protéines dont la séquence aura été insérée dans la séquence du génome viral. Cette réactivation de la réplication nécessitera l'expression de la recombinaise Cre dans les plantes transformées. Trois méthodes d'expression de la protéine Cre seront testées. Les deux premières méthodes consisteront à exprimer Cre dans les plantes par agro-infiltration. Pour l'utilisation de cette méthode, l'expression de Cre sera contrôlée soit par un promoteur CaMV 35S ou par un promoteur sous-génomique viral puisqu'elle sera introduite dans la séquence du virus X de la pomme de terre. La troisième méthode consistera à exprimer Cre à partir d'un promoteur inducible à l'estrogène. Les plantes transgéniques pour le TuMV-flox seront transformées avec la cassette d'expression inducible de Cre et l'expression de Cre sera possible suite à l'addition de l'estrogène dans les plantes. L'induction par l'estrogène pourra se faire de deux façons. Dans un premier temps, l'estrogène sera ajouté au milieu de culture synthétique sur lequel les plantules pourront être transférées. Dans un deuxième temps, une solution contenant de l'estrogène pourra être utilisée pour vaporiser et/ou arroser les plantes transgéniques. Il sera donc important

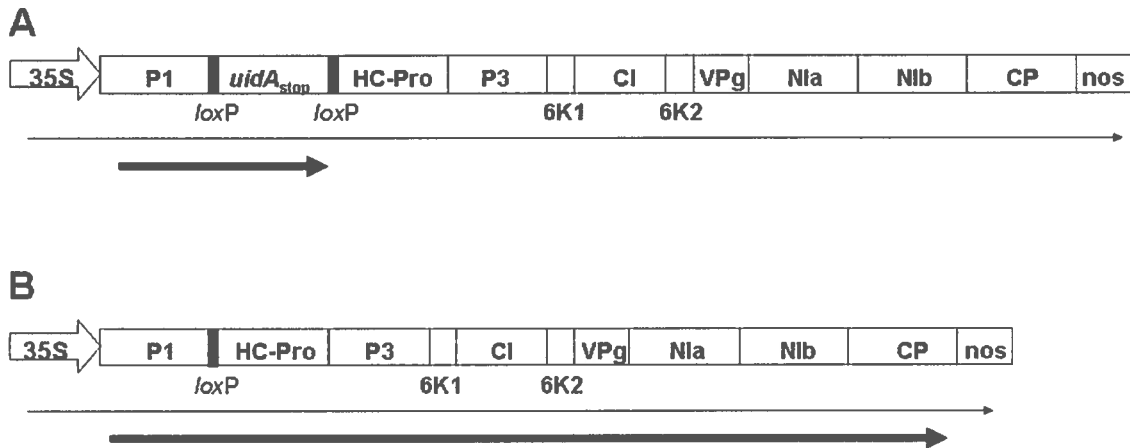


Figure 9 Représentation schématique du vecteur TuMV-flox ainsi que l'expression de celui-ci A) avant et B) après recombinaison. Le vecteur viral est contrôlé par le promoteur constitutif CaMV 35S et le terminateur nos. Suite à l'induction, le gène codant pour la protéine GUS et un site *loxP* sont perdus laissant un seul site *loxP* dans la séquence virale. La transcription est illustrée par une flèche mince et la traduction par une flèche épaisse.

d'évaluer la technique de réactivation de la réplication du virus qui permettra, dans un délai le plus court possible, l'expression la plus importante de protéines virales.

3.3 Les sous-objectifs

Le principal sous-objectif consistera à s'assurer que le TuMV réactivé (TuMV-lox) sera tout aussi infectieux que son homologue sauvage sur les mêmes plantes. Si tel est le cas, on pourra supposer que la quantité de protéines virales ou autres produites sera équivalente à celles produites à partir du virus sauvage. Une caractérisation détaillée du TuMV-lox par comparaison au TuMV sauvage sera effectuée. Premièrement, le taux de production de protéines de capsides de ces deux formes virales dans des plantes infectées sera estimé. Deuxièmement, une analyse détaillée de l'expression des gènes d'une plante hôte infectée par le TuMV-lox ou par le TuMV sauvage sera effectuée. Cette analyse permettra d'évaluer s'il y a certains gènes différemment régulés lorsqu'une plante est infectée avec deux virus possédant uniquement quatorze acides aminés différents. Les résultats obtenus pourront alors peut-être dévoiler des indices sur le rôle joué par ces quatorze acides aminés sur la fonction de la protéine HcPro. Troisièmement, compte tenu que la seule différence entre les séquences du TuMV-lox et du TuMV sauvage se retrouve au niveau de la protéine HcPro, quelques fonctions majeures dans lesquelles HcPro est impliquée seront testées. Compte tenu qu'une activité de suppression du PTGS est nécessaire dans les plantes infectées pour permettre un taux élevé d'expression virale, cette première fonction rattachée à la protéine HcPro sera évaluée pour les deux formes virales. Puisque le mécanisme de régulation par les microARN de l'expression des gènes de plantes est similaire à celui du PTGS, celui-ci sera également évalué dans des plantes infectées avec un virus codant pour une protéine HcPro sauvage et pour une protéine HcPro où 14 acides aminés auront été ajoutés. Ces résultats permettront peut-être de relier la sur-expression et la sous-expression de certains gènes végétaux obtenue par les analyses d'expression de gènes dans les plantes infectées avec les deux formes virales.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. La construction des plasmides

pUCTuMV-flox est un vecteur viral basé sur le TuMV dans un squelette pUC12 (Sanchez *et al.*, 1998) dans lequel la région codante pour la protéine β -glucuronidase (GUS) bordée de deux sites *loxP* était insérée entre les régions codantes pour P1 et HcPro. Le gène *uidA* était amplifié par PCR à partir du plasmide pBI101 (Jefferson, Kavanagh et Bevan, 1987) utilisant les amorces FLG et RLG qui contenait la séquence du site de restriction *SacII* et celle du site *loxP* en plus de la portion de séquence GUS. Le tableau 6 dénote toutes les amorces utilisées dans nos expériences. Le fragment amplifié était digéré avec *SacII* et inséré dans p35Tunos/*SacII* (Beauchemin, Bougie et Laliberté, 2005) digéré par le même enzyme résultant en pUCTuMV-flox. Ce dernier plasmide était digéré par *Apal* et *SmaI* avant d'être introduit dans un plasmide pGreen0179 (Hellens *et al.*, 2000). Ce plasmide était nommé pGreenTuMV-flox.

Le gène pour Cre était amplifié par PCR à partir du plasmide p6X-GFP (Hare et Chua, 2002) utilisant les amorces FXCre (contenant un site *XbaI*) et RHCre (contenant un site *HindIII*). Le fragment amplifié était ligué dans le plasmide pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le plasmide résultant était digéré avec *XbaI* et *HindIII* et le fragment contenant Cre était inséré entre le promoteur CaMV 35S et le signal de polyadénylation nos du plasmide pRT106 (Topfer *et al.*, 1993) digéré avec les mêmes enzymes. Ce nouveau plasmide était alors digéré avec *EcoRI* et la cassette 35S-Cre-nos était introduite dans pGreen0029 résultant en pGreen35S-Cre (Hellens *et al.*, 2000). Le gène codant pour Cre était aussi amplifié en utilisant les amorces FACre et RNCre pour son insertion dans

Tableau 6 Amorces utilisées pour les différents clonages, PCR et PCR en temps réel.

Technique	Nom des Amorces	Séquence (5' vers 3')
Clonage	FLG	ACTACCGCGGGCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAG TTATGGATGCTTATGTTACGTCCTGTAGAAAAC
	RLG	TAGTCCGCGGGCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAA GTTATTCATTGTTTGCCTCCCTGCTGCGG
	FXCre	AATCTAGATCGCATTATCATCCCCTCGACGTA
	RHCre	TATAAGCTTACGAAGTTATGATCTAGTAAC
	FACre	GGCGCGCCGCTGAAGCTAGTCGACTCTAGCC
	RNCre	GCGGCCGCTGAATGCATGCGAATTCAAACCTA
	FXVE	CCAATATATGCGGCCGCCCTGTCAAACACTGATAGTTTAAAC
	RXVE	GTACTAGTTTGGGATGTTTTACTCCTCATATT
	FHCre	AAGCTTTCGCATTATCATCCCCTCGACGTA
	RXCre	TACCCCGCTCGAGGTCGAAGATCCTCGAG
PCR	P1	TACTCGGGAAGAGAGCACAGC
	HCPro	GTTCTGTTCTTCAGGTATCGT
	VPg	TCCAAACCAAGAGCATAACGA
	RPol	TAGCAGTAAATTGTAAACGTTGACGAA
	FPol	GAACCAGGGAAAAAGGAGAC
	RCP	TCCGGCGTGTATAGGATTAGA
	FCre	AAATCGATTTCGCATTATCATCCCCTCGACGTA
	RCre	TATGGGCCCACGAAGTTATGATCTAGTAAC
	RPVX+	GTAGTTATGGTGGTGGTAGAGTGACAACAG
	RPVX-	ATGAGGCTTATAGAAACATTCGCCCCATCA
	RTuMV+	ACCCCTGAACGCCAGTAAGTTATGCATGT
	RTuMV-	ATGGCAGCAGTTACATTCGCATCAGCTATC
	FPVX+	ATGTGTATGCAATTCAATGCTATAGGGATT
	FPVX-	ATGCTGCCCAAACCTGCTGCCTTTGTGAAGA
	FTuMV+	GTGGATCGCAATGGCATTGGTGGGAAACTC
	FTuMV-	TATTTGTTCTGGCTTGGATGGAAACGTTGG
PCR temps réel	FqCP	GCACAAGAAGAGGGAAAACGC
	RqCP	TCCGGCGTGTATAGGATTAGA
	FqXVE	CTATGACCTGCTGCTGGAGATGCT
	RqXVE	TCTGCCTCCCCCGTGATGTAATAC
	FqCre	TCCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACATGC
	RqCre	AAATCAGTGCGTTCGAACGCTAGAGCC
	FNAM	GAAGAAACCCAATTTAAGAAGAATCTTCACAATTCAGGT
	RNAM	CAAGGTCACAATTCCTTATGGTTCCACTGGT
	FMYB	GATGGAATGGAGAGTGATTCAAGTTCTGATCTC
	RMYB	CTCGTGAGGCTTGCCAGTCTA
	FHIS	GTGAAGAAGGCGAGACAGCCTAAGTC
	RHIS	GAAGAAGGCCATGAAAGCTTCCGCT

Les lettres F et R au début des amorces signifient « Forward » et « Reverse ». La lettre q dans le nom de certaines amorces signifie que ce sont des amorces utilisées pour le PCR en temps réel.

les sites *AscI* et *NotI* du plasmide pGR106 (Lu *et al.*, 2003). Ce plasmide était nommé pGreenPVX-Cre.

Un système inductible chimiquement était aussi construit pour exprimer la recombinaise Cre. Une première paire d'amorces était dessinée pour une région spécifique du vecteur p6X-GFP. Le facteur de transcription XVE et le promoteur constitutif G_{10-90} étaient amplifiés utilisant les amorces FXVE et RXVE. Le fragment amplifié était introduit dans pCR2.1 (pCRXVE) pour être plus tard digéré par *NotI* et *SpeI* et cloné dans pGreen0029 (pGreenXVE). Une seconde paire d'amorces était utilisée pour amplifier le gène codant pour Cre et le promoteur inductible LexA, soit les amorces FHCre et RXCre. Ce second fragment PCR était introduit dans pCR2.1 (pCRCre) pour être digéré par *HindIII* et *XhoI* et cloné dans pGreenXVE résultant en un vecteur nommé pGreenXVE-Cre.

1.1 Clonage dans pGreen

1.1.1 Les plasmides pGreen

Le système de vecteurs binaires pGreenII 0000/pSoup était construit dans le but d'avoir des vecteurs binaires de clonage de petites tailles permettant l'insertion de fragments plus longs. Il consiste en un plasmide de type Ti nommé pGreen qui possède un site de clonage multiple basé sur le plasmide pBluescript. Il existe une série de plasmide pGreen dans ce système binaire. Ceux-ci diffèrent au niveau de leur région T-DNA. Ceux-ci possèdent des sites de clonage multiple différents ainsi que des gènes rapporteurs ou de résistance à un antibiotique également différents. Ces gènes présents dans la région T-DNA servent pour la sélection des plantes transformées. Les bactéries transformées peuvent être sélectionnées par la complémentation du gène *lacZ* et par leur résistance à la kanamycine due à la présence du gène *npI/II* dans le squelette du plasmide. Le plasmide pGreen se réplique via une origine de répllication *pSa*. Pour qu'il y ait répllication du plasmide dans les cellules bactériennes, *ori-pSa* doit être complémentée en *trans* par le

gène de la réplicase correspondante (*RepA*) situé sur un second plasmide nommé pSoup. La figure 10 correspond aux cartes de restriction de ce système de vecteurs binaires.

1.1.2 Digestion enzymatique

En règles générales, un microgramme d'ADN des plasmides à utiliser était digéré dans un mélange réactionnel de 20 µl contenant une unité d'enzyme de restriction dans 10% de son tampon spécifique concentré 10X. Les digestions étaient effectuées pour une période de trois heures à 37°C. Les réactions étaient déposées sur gel d'agarose 0,8 à 1% selon la taille des fragments à visualiser. Les fragments de tailles attendues étaient extraits du gel sur une colonne Qiagen (QIAquick gel extraction kit; Qiagen, Valencia, CA, USA) selon les instructions du fabricant.

1.1.3 Déphosphorylation

Une étape de déphosphorylation des plasmides pGreen dans lesquels un fragment d'ADN purifié sera introduit était nécessaire pour empêcher le plasmide de se refermer sur lui-même sans avoir incorporé l'ADN d'intérêt pendant la ligation. Cette déphosphorylation a été effectuée par une unité d'enzyme phosphatase alcaline de crevette (SAP; New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) dans un volume de 10 µl pour une période d'une heure trente minutes à 37°C. L'enzyme a été inactivée par la chaleur pour une période de quinze minutes à 65°C.

1.1.4 Ligation

L'étape de ligation provoque la formation de liaisons phosphodiester entre les extrémités 3' OH et 5' P de molécules d'ADN. L'enzyme T4 DNA ligase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) assurait cette réaction. Le ratio plasmide/insert optimal pour

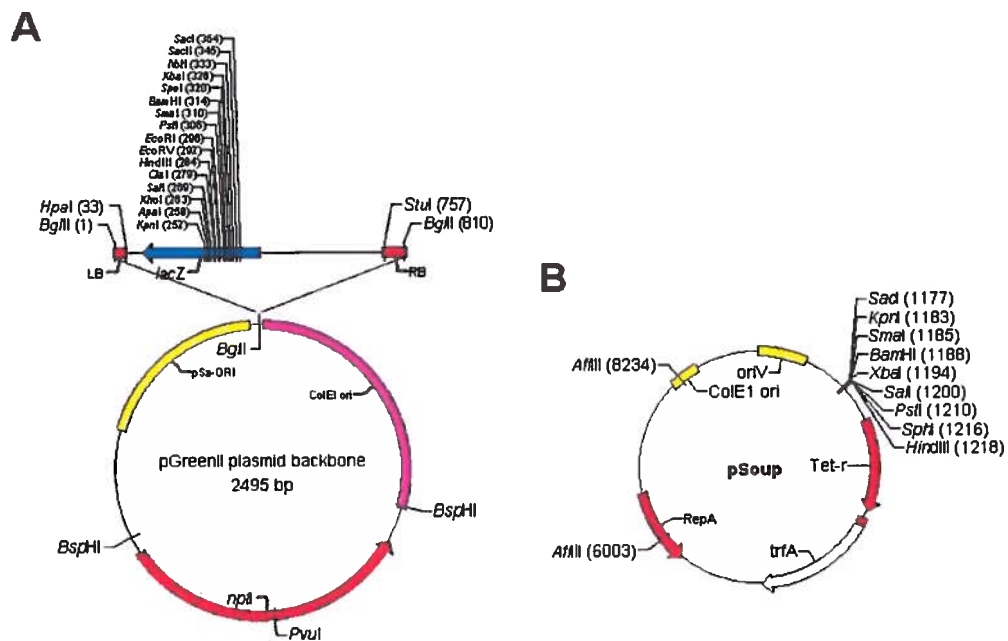


Figure 10 Représentation des cartes de restriction A) du plasmide pGreen 0000 et B) de son plasmide pSoup faisant partie du système binaire pGreenII. Tiré du site internet http://www.pgreen.ac.uk/a_pls_fr.htm.

effectuer une ligation était de 1/3. Quatre cent unités d'enzyme dans un volume final de 20 µl était nécessaire pour catalyser la réaction dans un tampon Tris 50 mM qui contient 10 mM de chlorure de magnésium, 1 mM d'adénosine triphosphate, 10 mM de dithiothréitol et 25 µg/ml d'albumine sérique bovine (pH 7,5). Cette réaction était effectuée en dedans de douze heures à 16°C. La ligation était dialysée pour une période d'une heure sur un filtre de 0,2 micron contenant de la nitrocellulose (Millipore, Billerica, MA, USA) préalablement à l'électroporation des cellules.

1.1.5 Électroporation de cellules d'*Escherichia coli* et d'*Agrobacterium tumefaciens*

1.1.5.1 Préparation de cellules d'*Escherichia coli* DH5α électrocompétentes

Deux litres de milieu SOB (2% tryptone, 0,5% extrait de levures, 0,05% NaCl) ont étéensemencés avec une pré-culture de 20 ml de cellules d'*E. coli* DH5α préalablement préparée. Cette culture a été incubée à 37°C sous une agitation de 200 RPM jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,7 à 550 nm. Cette suspension était alors centrifugée pour dix minutes à 5000 RPM puis lavée deux fois dans deux litres d'une solution stérile de glycérol à 10%. Un troisième lavage était effectué dans huit millilitres de glycérol 10% avant de resuspendre la suspension dans quatre millilitres de glycérol 10% dans le but d'obtenir une concentration de 10^{10} cellules/ml. Les cellules ont été rapidement aliquotées et congelées dans l'azote liquide avant d'être entreposées à -80°C.

1.1.5.2 Préparation de cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* électrocompétentes

Une seule colonie d'*A. tumefaciens*, prélevée sur un pétri préalablement préparé, a été inoculée dans 100 ml de milieu LB (Luria-Bertani; 1% tryptone, 0,5% extrait de levures, 1% NaCl, pH 7.0) supplémenté des antibiotiques appropriés. Hellens *et al.* (2000) ont défini les nombreuses souches d'*A. tumefaciens* disponibles ainsi que les antibiotiques

utilisés pour la sélection des bactéries. Cette suspension bactérienne a été incubée à 28°C sous agitation vigoureuse pour une période de douze heures. Les cellules ont été lavées trois fois dans 50 ml d'une solution froide de glycérol à 10% par centrifugation à 5000 RPM pour une période de cinq minutes à 4°C. Finalement, les cellules bactériennes ont été resuspendues dans un millilitre de solution froide de glycérol à 10%, aliquotées à 40 µl et entreposées à -80°C.

1.1.5.3 Électroporation

Tous les plasmides générés, avant l'étape finale d'insertion dans un vecteur binaire pGreen, ont été introduits dans des cellules d'*E. coli* par électroporation (*E. coli* Pulser, Bio-rad, Hercules, CA, USA). Pendant que les plasmides pGreen (pGreenTuMV-flox, pGreen35S-Cre, pGreenPVX-Cre, pGreenXVE et pGreenXVE-Cre) étaient co-introduits avec pSoup dans *A. tumefaciens* de souche C58/pMP90 (Koncz et Shell, 1986), à l'exception de pGreenPVX-Cre qui était introduit dans une souche GV3101 également par électroporation. La transformation a été effectuée dans des cuves à électrodes espacées de 1 mm (*E. coli*) ou 4 mm (*A. tumefaciens*) où dix nanogrammes d'ADN et 40µl de cellules bactériennes étaient additionnés. La cuve a été soumise à un voltage de 1,8 KV (*E. coli*) ou 2,0 KV (*A. tumefaciens*). Huit cent microlitres de milieu SOC (2% tryptone, 0,5% extrait de levures, 0,05% NaCl, 20 mM glucose) (*E. coli*) ou un millilitre de milieu YEP (1% peptone, 1% extrait de levure, 0,05% NaCl, pH 7.0) (*A. tumefaciens*) ont été additionnés aux cellules électroporées. Après une heure d'incubation à 28, 30 ou 37°C, selon les plasmides et les bactéries utilisés, les bactéries ont étéensemencées sur leur milieu approprié.

Les cellules d'*E. coli* croissent sur un milieu LB à 37°C dans une période de douze heures. Les antibiotiques de sélection appropriés étaient également additionnés au milieu (kanamycine ou ampicilline à 100 mg/L). Lorsque ces bactéries étaient transformées avec le vecteur viral pUCTuMV-flox, celles-ci poussaient à 30°C plutôt qu'à 37°.

Les cellules d'*A. tumefaciens* croissent sur un milieu YEP à 28°C dans une période de deux jours. Les antibiotiques de sélection appropriés étaient également additionnés au milieu (kanamycine à 100 mg/L, gentamycine à 25 mg/L, rifampicine à 50 mg/L et/ou tétracycline à 5 mg/L).

2. La recombinaison *in vitro*

pUCTuMV-flox (250 ng) était linéarisé avec *SacII* et incubé avec une unité de Cre recombinante (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) dans 50 µl de tampon recombinaise Cre (50 mM Tris-HCl, 33 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5). La réaction était effectuée à 37°C pour trente minutes. Un cinquième du volume du mélange réactionnel était soumis à une étape de ligation avant d'être utilisé pour la transformation d'*Escherichia coli* de souche DH5α par électroporation.

3. Le système de transformation d'*Arabidopsis thaliana* et de *Nicotiana tabacum*

3.1 La transformation stable d'*Arabidopsis thaliana* et de *Nicotiana tabacum*

Pour la production des plantes transgéniques stables, des graines d'*A. thaliana* écotype WS étaient germées en sol dans une serre où la température était fixée à environ 22°C et les conditions de lumière à seize heures de clarté/huit heures de noirceur. Lorsque les hampes florales atteignaient environ cinq centimètres de hauteur, les plantes étaient transformées par la méthode de trempage floral (Clough et Bent, 1998). Une suspension d'*A. tumefaciens* ayant atteint une densité optique de 0,9 à 1,0 à 600 nm était centrifugée quinze minutes à 6000 RPM. Le culot bactérien était resuspendu dans un volume égal d'une solution de sucrose à 5%. À cette nouvelle suspension bactérienne était additionnée 0,02% d'un agent surfactant (Silwet). Cet ajout permet d'obtenir des rendements en transformants supérieurs. Les hampes florales étaient alors trempées dans cette suspension bactérienne pour deux minutes. Les graines provenant de cet événement de

transformation étaient alors récoltées, stérilisées et mises à germées sur un milieu synthétique MS (Murashige et Skoog, 1962) de base contenant tous les macro et micronutriments essentiels à la régénération de plantes (1 M NH_4NO_3 , 0,9 M KNO_3 , 9 mM H_3BO_3 , 0,25 M KH_2PO_4 , 1 mM KI, 0,2 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,6 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,3 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20 mM $\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 60 μM $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OSCl} \cdot \text{HCl}$, 0,8 mM $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$, 0,5 mM $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$, 5 mM $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 30% de sucrose, 0,1 g/L de vitamines de Gamborg (Gamborg, Miller et Ojima, 1968), 6% d'agar (pH 7,2) et les antibiotiques de sélection appropriés (kanamycine 100 mg/L ou hygromycine à 25 mg/L). Deux semaines post-germination, les plantules sélectionnées étaient transplantées en sol et placées en chambre de croissance sous des conditions de douze heures lumière/douze heure noirceur à 22°C jusqu'à l'obtention de larges feuilles de rosette matures. Lorsque la production de graines était l'objectif, les conditions de luminosité étaient modifiées pour seize heures lumière/huit heures noirceur.

Le cultivar SR1 *Petite Havana* de *N. tabacum* était lui aussi transformé par *A. tumefaciens* selon la méthode décrite par Horsch *et al.* (1985). Des graines stériles étaient mises à germer sur un milieu MS de base tel que décrit précédemment et les feuilles de ces plantes étaient utilisées pour la transformation. Des disques foliaires fabriqués dans ces feuilles étaient submergés pour une période de vingt minutes dans une suspension bactérienne d'*A. tumefaciens*, en phase exponentielle de croissance (0,6 à D.O._{600 nm}) contenant le vecteur approprié. Le surplus de suspension bactérienne était absorbé en déposant les disques foliaires sur un papier à chromatographie (Whatman). Les disques foliaires étaient ensuite déposés sur un milieu de coculture (MS de base, 2 mg/L 6-benzylaminopurine, 0,2 mg/L acide α -naphtalèneacétique) pour une période de quatre jours à la noirceur à 22°C. Les disques foliaires étaient ensuite transférés sur un milieu d'induction des cals (MS de base, 2 mg/L 6-benzylaminopurine, 0,2 mg/L acide α -naphtalèneacétique, 100 mg/L kanamycine ou 25 mg/L hygromycine, 300 mg/L céfotaxime). Lorsque des cals étaient formés, ceux-ci étaient transférés sur un milieu de régénération (MS de base, 2 mg/L 6-benzylaminopurine, 5 mg/L acide gibberellique, 100 mg/L kanamycine ou 25 mg/L hygromycine, 300 mg/L céfotaxime). Lors de l'apparition

de tigelles sur les cals, ces tigelles étaient transférées sur un milieu de multiplication (MS, 100 mg/L kanamycine ou 25 mg/L hygromycine). Lorsque les plantes issues d'une cal étaient suffisamment grandes, elles étaient micropropagées pour obtenir plusieurs clones de celles-ci. L'acclimatation de ces plantes était nécessaire préalable à leur sortie en serre. Pour ce faire, les plantes étaient transplantées dans un terreau commercial (Pro-Mix) et placées sous une toile où de l'eau était continuellement vaporisée par un humidificateur. À chaque semaine les plantes étaient éloignées de l'humidificateur et trois semaines plus tard, elles étaient retirées de sous la toile.

3.2 L'agro-infection d'*Arabidopsis thaliana* et l'agro-infiltration de *Nicotiana benthamiana*

Pour l'agro-infection, des graines d'*A. thaliana* écotype Co-0 sauvage ou WS transgéniques étaient germées en sol pour un mois à 22°C pour douze heures de lumière/douze heures de noirceur en chambre de croissance. Les cultures d'*A. tumefaciens* en phase exponentielle de croissance, contenant le vecteur binaire approprié, étaient centrifugées et resuspendues dans un millilitre de milieu LB. Trois feuilles par plantes d'*A. thaliana* étaient piquées dans la veine centrale avec un cure-dent trempé dans la suspension bactérienne. Les plantes étaient alors incubées en chambre de croissance à 22°C sous des conditions de seize heures lumière/huit heures noirceur pour quinze jours avant de procéder à la récolte des échantillons foliaires.

Pour l'agro-infiltration, des graines de *N. benthamiana* étaient germées en sol en serre sous des conditions de luminosité de seize heures de lumière/huit heures de noirceur à environ 22°C. Des cultures d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur binaire approprié étaient centrifugées et resuspendues dans un milieu MS de base supplémenté de 10 mM de chlorure de magnésium et 100 µM d'acétosyringone pour obtenir une densité optique de 0,8 à 600 nm. Trois feuilles par plante étaient infiltrées sur leur face abaxiale utilisant une seringue sans aiguille tel que décrit par Voinnet *et al.* (2003).

4. Analyse moléculaire des plantes transgéniques

Une analyse moléculaire détaillée des plantes transgéniques doit être effectuée dans le but d'éviter de travailler avec des plantes qui ne seraient pas transformées adéquatement. La présence des différents transgènes dans le génome végétal, le niveau d'expression de ceux-ci ainsi que la production des protéines codées par ces transgènes doivent être étudiés préalablement.

4.1 Analyse de type PCR

4.1.1 Extraction d'ADN génomique

Environ 100 mg de feuilles ont été broyées dans 400 µl de tampon d'extraction. Ce broyat a été déposé sur une colonne Qiagen (DNeasy plant mini kit; Qiagen, Valencia, CA, USA) et l'ADN génomique a été extrait selon les instructions du manufacturier.

4.1.2 Dosage de l'ADN génomique

Les échantillons d'ADN ont été quantifiés par spectrophotométrie sous une longueur d'onde de 260 nm et 280 nm suite à leur extraction à partir du matériel végétal (spectrophotomètre Beckman, Fullerton, CA, USA). Une évaluation de la qualité du matériel extrait a été estimée par le ratio d'absorbance à 260 nm et à 280 nm.

4.1.3 Réaction en chaîne de la polymérase

Cinquante nanogrammes d'ADN génomique étaient utilisés pour effectuer une analyse PCR avec différentes amorces qui détectent la présence des gènes *xve*, *cre*, du TuMV et *gus* : FXVE-RXVE, FCre-RCre, P1-HcPro, VPg-RPol et FPol-RCP. Un échantillon

d'ADN des plasmides pGreenXVE-Cre et pUCTuMV-flox a été utilisé comme témoin positif. Des réactions de 20 µl contenant 0,25 unité de polymérase *Taq* (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) dans un tampon Tris 20 mM (10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8), 0,2 mM de dinucléotide-triphosphate et 0,5 µM des amorces appropriées. Les réactions ont été effectuées à 94°C pour trente secondes (étape de dénaturation), entre 50°C et 60°C pour trente secondes (étape d'hybridation des amorces au gabarit d'ADN) et à 72°C entre trente secondes et deux minutes et demi selon la longueur de l'amplicon (étape d'élongation). La température d'hybridation des amorces au gabarit d'ADN correspond généralement à 5°C sous la température de fusion des amorces qui peut être calculée selon l'équation suivante : $T_m = 2^{\circ}\text{C}(\text{nombre de [A+T]}) + 4^{\circ}\text{C}(\text{nombre de [G+C]})$. Le temps nécessaire pour l'élongation du fragment correspond à environ une minute par kilobase à amplifier.

4.1.4 Analyse sur gel d'agarose

Une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% dissous dans un tampon Tris 2 M pH 8,0 (TAE) qui contient 50 mM d'hexadécyltriméthyle-ammonium (pH 8,0) et 5,7% d'acide acétique glacial a été effectuée pour visualiser les produits d'amplification suite aux réactions PCR effectuées sur l'ADN génomique et plasmidique avec les différentes amorces. Un marqueur de poids moléculaire d'ADN de 1 Kb a été utilisé pour estimer la taille des fragments amplifiés. Avant le dépôt sur gel, 10% de tampon de chargement (0,25% bleue de bromophénol, 40% sucrose) a été additionné aux échantillons. Cette électrophorèse a été effectuée dans un tampon TAE à 80 Volts.

4.2 Analyse de type Southern

4.2.1 Extraction d'ADN génomique

Des feuilles de *N. tabacum* transgéniques ont été récoltées, congelées dans l'azote liquide et entreposées à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. L'ADN de chaque lignée a été extrait à partir d'un broyat de deux grammes de feuilles. L'extraction a été effectuée dans vingt millilitres de tampon de lyse Carlson (100 mM Tris-Cl pH 9,5, 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 1% PEG 8000, 20 mM EDTA) pré-chauffé à 74°C supplémenté de 50 µl de β-mercaptoéthanol et de 0,4 mg/ml de RNase A. Les échantillons ont été incubés à 74°C pour vingt minutes sous agitation et refroidis pour quinze minutes avant de procéder à deux étapes d'extraction au chloroforme/isoamylalcool (24 :1) à 4°C. Les échantillons ont été ajustés à un pH de 7,0 avant d'être passés sur une colonne selon les instructions du manufacturier (Qiagen Genomic Tip; Qiagen, Valencia, CA, USA). Le dosage de l'ADN génomique a été effectué tel que décrit dans la section 4.1.2.

4.2.2 Digestion de l'ADN génomique

Une digestion préliminaire d'un microgramme d'ADN génomique a été effectuée dans le but d'ajuster les conditions de restriction et de vérifier le dosage de l'ADN effectué par spectrophotométrie. Finalement, trente microgrammes d'ADN ont été digéré avec 70 unités d'enzyme de restriction *Stu*I dans 300 µl de tampon Tris 50 mM pH 8,0 (10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 4 mM spermidine) pour une période de douze heures à 37°C. L'ADN digéré a été précipité dans l'éthanol 95% et l'acétate de sodium 3 M avant d'être resuspendu dans trente microlitres d'eau. Une digestion de l'ADN plasmidique correspondant au vecteur pUCTuMV-flox ou pCRXVE a aussi été effectuée comme témoin positif. Cette digestion a été effectuée dans les mêmes conditions que les digestions d'ADN génomique.

4.2.3 Électrophorèse et transfert sur membrane de l'ADN

Les échantillons ont été supplémentés de cinq microlitres de tampon de chargement avant d'être chauffés à 60°C pour dix minutes puis chargés sur un gel d'agarose 0.8% dissous dans le tampon TAE. Le contrôle positif ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire d'ADN de 1 Kb (1 Kb Plus; New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) ont été séparés sur ce même gel dans le but d'évaluer la taille des fragments séparés. La séparation de l'ADN a été effectuée pour une période de 24 heures à trente volts dans du tampon TAE en circulation dans la cuve à électrophorèse. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane de nylon 0,2 micron (Biotrans; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) à un taux d'aspiration maximal de 50 cm de liquide (LKBromma2016 Vacu-gene vacuum blotting pump; Lehman Scientific, LLC, Wrightsville, PA, USA). Avant d'ajouter le tampon de transfert (3 M NaCl, 0,3 M de NaOAc, pH 7.0) sur la membrane, une étape de dépurination avec une solution de 0,25 M de chlorure de sodium suivie d'une étape de dénaturation avec une solution de 0,5 M de d'hydroxyde de sodium et 1,5 M de chlorure de sodium ont été effectuées pour cinq minutes chacune. Le transfert a été effectué pour une période d'une heure. La membrane a été séchée pour quinze minutes à 80°C et ensuite l'ADN a été fixé à la membrane par deux expositions maximales (1 200 µjoules X 100) aux rayons ultraviolets (UV crosslinker; Fisher, Pittsburgh, PA, USA).

4.2.4 Préparation de la sonde marquée au P³²

La sonde P1-GUS utilisée correspondait à une portion de la séquence codante pour la protéine virale P1 et d'une portion de la séquence codante pour GUS alors que la sonde XVE correspondait à une portion du gène XVE. Ces sondes ont été marquées au phosphore-32 ([α -P³²]-dCTP) par l'utilisation de billes conçues à cet effet selon les instructions du manufacturier (Ready-to-goTM; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Cette sonde d'ADN marquée a été purifiée sur une colonne Microspin S-200 HR (Amersham, Biosciences) selon les recommandations du manufacturier. La sonde a été dénaturée cinq minutes à 100°C avant d'être utilisée.

4.2.5 Hybridation des membranes d'ADN

Les membranes sur lesquelles l'ADN génomique a été fixé, ont été pré-hybridées dans dix millilitres de tampon (5X Denhardt's, 5X SSC, 0,1% SDS, 100 µg/ml ADN de sperme de saumon). Cette pré-hybridation a été effectuée pour une période minimum d'une heure à 62°C. L'hybridation a été effectuée dans le même tampon frais auquel a été ajouté 50 µl de la sonde utilisée. La période d'hybridation a été de 12 heures et suite à cette hybridation, les membranes ont été lavées deux fois pour une période de dix minutes et quatre fois pour quinze minutes dans deux solutions de lavages de différentes concentrations ioniques pour permettre l'élimination des hybridations non spécifiques (solution no.1 : 2X SSC, 0,5% sarcosyl; solution no.2 : 1X SSC, 0,5% sarcosyl).

4.2.6 Exposition des membranes et développement des autoradiogrammes

Lorsque les membranes ont été hybridées et lavées, elles sont ensuite exposées sur un film (Biomax XAR, Kodak) dans une cassette d'exposition entre deux écrans d'amplification. L'exposition des membranes a été effectuée à -80°C pour une période minimale de deux jours.

4.3 Analyse de type PCR en temps réel

4.3.1 L'extraction d'ARN total

Des feuilles de *N. tabacum* transgéniques, la totalité des feuilles de rosette de chacune des plantes d'*A. thaliana* transfectées avec PVX, PVX et TuMV ou PVX et TuMV-lox trois semaines après la transfection et la totalité des feuilles de rosette des plantes transfectées avec la forme sauvage du TuMV et avec le TuMV-lox deux semaines après la transfection ont été récoltées. Ces échantillons étaient immédiatement congelés dans l'azote liquide et entreposés à -80°C. L'ARN total de chacun des échantillons (deux

grammes de broyat de feuilles) était extrait selon la procédure de Chang, Puryear et Cairney (1993) et traité deux fois à l'ADNase I selon les instructions du manufacturier (Qiagen, Valencia, CA, USA). Les échantillons d'ARN étaient quantifiés au spectrophotomètre tel que mentionné à la section 4.1.2.

4.3.2 Transcription inverse

Une réaction de transcription inverse était effectuée utilisant 1 µg d'ARN total, traité à l'ADNase, dans un volume final de 20 µl. Premièrement, l'ARN, 10 mM de dinucléotides phosphate et 0,05 µg/µl d'oligonucléotides dT ou 0,2 µM d'oligonucléotides spécifiques ont été dénaturés à 65°C pour cinq minutes, afin de permettre l'hybridation des oligonucléotides, et rapidement transférés sur glace pour un minimum d'une minute. Les oligonucléotides dT étaient utilisés pour transcrire l'ADNc à partir de l'ARN génomique végétal et viral. Les amorces spécifiques étaient plutôt utilisées pour transcrire l'ADNc à partir des brins de polarité positive et négative de PVX et de TuMV (RPVX+, RVPX-, RTuMV+, RTuMV-). Ensuite, deux microlitres de tampon RT 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 et 500 mM KCl), 5 mM de chlorure de magnésium, 10 mM de dithiothréitol et un microlitre d'inhibiteur de RNase (RNaseOUT) ont été additionnés aux échantillons. Ceux-ci ont été incubés deux minutes à 42°C avant d'ajouter 50 unités de Superscript II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et d'incuber pour une période additionnelle de 50 minutes. Les réactions étaient arrêtées par une incubation de quinze minutes à 70°C. L'ADNc obtenu de ces réactions était dilué dix fois avant d'être utilisé pour des analyses PCR.

4.3.3 Réaction en chaîne de la polymérase en temps réel

Les analyses PCR en temps réel étaient effectuées utilisant le système Quantitec SYBR green (Qiagen, Valencia, Ca, USA) et l'appareil Mx3000P™ (Statagene, La Jolla, CA, USA). Les données étaient traitées utilisant le logiciel fourni par la compagnie. Les

amorces FqCP-RqCP, FqXVE-RqXVE, FqCre-RqCre ont été synthétisées pour analyser l'accumulation des transcrits des transgènes dans les plantes transgéniques. Les amorces spécifiques utilisées pour transcrire l'ADNc étaient utilisées comme amorces inverse et les amorces FPVX+, FPVX-, FTuMV+ et FTuMV- ont été synthétisées pour analyser l'accumulation des transcrits PVX et TuMV dans les plantes infectées avec ces virus. Les amorces FNAM-RNAM pour détecter le gène (At3g29035) codant pour une protéine NAM (no apical meristem), FMYB-RMYB pour le gène (At1g69160) codant pour une protéine inconnue nommée MYB-like 1 et FHIS-RHIS pour le gène (At2g18050) codant pour HIS 1-3 (histone 1-3) ont été synthétisées. Dans un volume final de 25 μ l, 10 ng d'ADNc (2 μ l d'une dilution 1 :10) ont été mélangés à 50% de mélange réactionnel SYBRgreen et 2,5 μ M d'amorces. Les conditions d'amplification de l'ADNc avec chacune des paires d'amorces mentionnées plus haut étaient les mêmes et celles-ci comportent deux étapes : une dénaturation de l'ADNc de dix secondes à 94°C et une élongation de trois minutes à 65°C. La fluorescence était évaluée cinq fois à la fin de l'étape d'élongation. La réaction PCR était maintenue pour cinquante cycles. La quantité de transcrits était calculée utilisant la méthode « sigmoidal curve-fitting » décrite par Rutledge (2004).

4.4 Analyses histochimiques pour l'expression β -glucuronidase

Les plantules étaient submergées dans 100 mM de tampon phosphate pH 7,0 contenant 1,5 mM de ferrocyanide, 1,5 mM de ferricyanide, 1,0 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique disodique, 0,1% de Triton X-100, 1,0 mM de réactif X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide dissous dans le diméthyl formamide) et incubées 24 heures sous vide à température pièce. La chlorophylle était éliminée par décoloration dans l'éthanol 70%.

5. Induction des plantes transgéniques XVE-Cre/TuMV-flox

Différentes techniques d'induction des plantes transgéniques ont été testées. Premièrement, l'estradiol (1, 3, 5[10]-Estratriene-3, 17 β -diol; Sigma, St. Louis, MO, USA) a été dissous dans de l'eau à une concentration de 50 μ M et cette solution a été utilisée pour vaporiser les feuilles des plantes et/ou pour arroser la terre des plantes. Une deuxième solution pour vaporiser les plantes a été testée. Celle-ci était supplémentée de 0,01% d'un agent surfactant (TWEEN-20) et 0,5% d'un agent pénétrant (DMSO). Deuxièmement, une solution d'eau/estradiol à 10 μ M a été utilisée comme substrat en culture hydroponique. Ces deux premières méthodes ont été testées sur des plantules de tabac qui avait germé en sol pour trois semaines. L'induction était maintenue pour des périodes allant de 24 heures à deux semaines avec des arrosages et vaporisation aux deux jours ou changement du substrat de culture hydroponique deux fois par semaine. Une troisième méthode consistait à compléter un milieu MS synthétique solide avec 5 μ M d'estradiol et d'y faire germer des plantules d'*A. thaliana* ou simplement d'y transférer des plantules, préalablement germées sur un milieu sans estradiol, pour une période de temps bien précis (1, 2, 4, 7 et 14 jours). Peu importe pour combien de temps les plantules étaient en contact avec l'estradiol, elles étaient toutes transférées en sol pour une période de deux semaines avant d'être analysées pour l'expression virale.

5.1 Extraction des protéines totales solubles

Deux semaines après l'agro-infiltration, l'agro-infection ou l'induction, cent milligrammes de feuilles étaient directement broyées dans trois volumes de tampon d'échantillon (0,1 M Tris.HCl pH 6,8; 25% glycérol; 1,25% SDS; 0,01% bromophénol bleue; 5% β -mercaptoéthanol). Après sédimentation des débris cellulaires par centrifugation une minute à vitesse maximale, vingt microlitres étaient utilisés pour les immunobuvardages.

5.2 Immunobuvardage

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

Les extraits bruts de protéines étaient séparés sur un gel SDS-PAGE à 10% d'acrylamide selon la technique décrite par Laemmli (1970). Préalablement, les protéines ont été dénaturées par une incubation à 95°C pour cinq minutes dans le but de rompre les ponts disulfures. L'électrophorèse était effectuée dans un tampon de migration contenant 0,1 M de Tris base, 1 M de glycine et 6,9 mM de sodium dodécyl sulfate, pH 8,3, à 160 volts. Les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose à 100 mA pour une période d'une heure dans un tampon de transfert composé de 20 mM de Tris base, 60 mM de glycine, 20% de méthanol et 0,05% de sodium dodécyl sulfate.

5.2.2 Immunorévélation après transfert

Lorsque la membrane était bien sèche, celle-ci était mise à tremper dans une solution de glycérol à 20% pour environ dix minutes. Un blocage des sites non spécifiques a été effectué dans une solution PBS-Lait-Tween-20 (1,4 M NaCl, 26,8 mM KCl, 18,9 mM Na₂HPO₄, 17,6 mM KH₂PO₄, 5% lait, 0,2% Tween-20, pH 7,4) pendant une heure à température pièce (ou douze heures à 4°C). Par la suite, la membrane était incubée dans un sérum anti-CP dilué 1 :2000 (anticorps primaire) dans la solution PBS-Lait-Tween-20 pour une période de deux heures à température pièce. Deux lavages de cinq minutes étaient effectués dans une solution PBS-Tween-20 avant de procéder à l'incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (dilution 1 :2500 dans PBS-Lait-Tween-20; anti-rabbit IgG (H+L) AP, Promega, Madison, WI, USA) pour une période d'une heure à température pièce. Quatre lavages de dix minutes étaient finalement effectués dans la solution PBS-Tween-20. La technique de chemiluminescence était utilisée pour détecter le signal sur la membrane utilisant une

préparation commerciale (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents; Amersham, Biosciences, Piscataway, NJ, USA) en accord avec les instructions du manufacturier.

6. Analyses de puces à ADN

Dix microgrammes d'ARN total (voir extraction de l'ARN total section 4.3.1) de chaque échantillon biologique étaient utilisés pour une hybridation sur puce d'ADN (*Arabidopsis* Genome ATH1 Array). L'ARN complémentaire était préparé, tel que décrit dans le manuel technique d'analyses d'expression des puces d'ADN, directement par la compagnie (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA; disponible sur <http://genomequebec.mcgill.ca>). Les données générées à partir du logiciel d'Affymetrix (MAS5.0) étaient téléchargées dans un fichier Excel pour chacune des puces à partir du site internet d'Affymetrix pour vérifier les niveaux de confiance (P value) des sondes d'intérêt. À chaque signal était assignée une lettre correspondant à la qualité de celui-ci. La lettre P pour présent indique que le signal est de haute qualité, la lettre A pour absent indique que le signal est généralement trop faible et/ou incertain et la lettre M pour marginal indique que le signal d'hybridation est négligeable (aucun transcrit détecté). Un test de student non-apparié ($P = 0,05$) était effectué sur les données à partir des six puces utilisant MAS5.0 pour sélectionner une première série de gènes potentiellement sur ou sous exprimés dans les plantes infectées avec TuMV-lox. Les faux positifs étaient éliminés en soustrayant les sondes qui montrent une différence inférieure à 200 dans le signal détecté entre les échantillons contrôles (plantes infectées avec la forme sauvage du TuMV) et les échantillons traités (plantes infectées avec TuMV-lox) ainsi qu'une augmentation ou une diminution (ratio) inférieure à deux.

7. Analyse de type Northern

7.1 Extraction d'ARN total

De l'ARN total isolé pour les analyses de puces, l'ARN de fort et de faible poids moléculaire a été séparé. L'ARN total a été dilué dans 500 µl d'eau et chauffé à 65°C cinq minutes pour rompre toutes associations entre les molécules d'ARN de 25 nucléotides de long et les molécules d'ARN plus larges ou les molécules d'ADN. Les échantillons ainsi dénaturés étaient précipités sur glace pour trente minutes dans 5% de polyéthylène glycol et 0,5 M de chlorure de sodium. Une centrifugation de dix minutes à 10 400 RPM permettait de sédimenter les acides nucléiques de hauts poids moléculaires. Le surnageant, contenant alors principalement les molécules d'ARN de transfert et ribosomal mais également les molécules d'ARN de 25 nucléotides de long, a été précipité dans trois volumes d'éthanol 95% à -20°C pour un minimum de deux heures. Le culot résultant d'une centrifugation de dix minutes à 10 400 RPM contenait alors seulement les molécules d'ARN de 25 nucléotides de long. Celui-ci était donc resuspendu dans quinze microlitres d'eau. Le dosage des échantillons a été effectué tel que mentionné dans la section 4.1.2.

7.2 Électrophorèse et transfert sur membrane de l'ARN

Cinq microlitres de formamide était additionnés aux échantillons (5 µg) avant d'être chauffé à 65°C pour cinq minutes et rapidement transférés sur glace. Les échantillons ont été supplémentés de cinq microlitres de tampon de chargement contenant du tampon TBE 2X (5X : 0,4 M Tris base, 2,75% acide borique, 10 mM EDTA, pH 8,3), 40% sucrose et 0,1% bromophénol bleu avant d'être chargés sur un grand gel de polyacrylamide 15% (17,7% polyacrylamide 19:1, 10,5 M urée) dissous dans un tampon TBE 5X. La séparation de l'ARN a été effectuée pour une période d'une heure à 200 volts puis augmentée à 500 volts pour une heure trente minutes additionnelle dans du tampon TBE 0,5X en circulation. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane de nylon 0,2 micron

(Biotrans; ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) à 250 mA (20 volts) pour une heure dans le tampon TBE 0,5X. Une coloration au bromure d'éthidium était effectuée sur le gel avant et après le transfert sur membrane dans le but de visualiser le transfert. La membrane a été séchée pour trente minutes à 80°C et ensuite l'ADN a été fixé à la membrane par deux expositions maximales (1 200 µjoules X 100) aux rayons ultraviolets (UV crosslinker; Fisher, Pittsburgh, PA, USA).

7.3 Préparation de la sonde marquée au P³²

Des oligonucléotides complémentaires à la séquence des microARN 171, 167, 160, 172, 164, 156 et 394 (Tableau 7) étaient marqués et utilisés comme sondes pour détecter l'accumulation des microARN respectifs. Les sondes ont été marquées au P³² dans un mélange réactionnel de 50 µl de tampon T4 PNKinase 10X (70 mM Tris.HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7,6) contenant 20 pmoles de sonde, 50 pmoles de [γ-P³²]-dATP et 20 unités de T4 Polynucléotide kinase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) incubé une heure à 37°C. La réaction a été arrêtée par une incubation de vingt minutes à 65°C avant d'être purifiée sur une colonne Microspin S-200 HR (Amersham, Biosciences) selon les recommandations du manufacturier. Les sondes ont été dénaturées cinq minutes à 100°C avant d'être utilisées.

7.4 Hybridation des membranes d'ARN

L'hybridation des ARN de faibles poids moléculaires était effectuée tel que décrite par Lau *et al.* (2001). Les membranes sur lesquelles l'ARN a été fixé, ont été pré-hybridées dans 50 ml de tampon (2X Denhardt's, 5X SSC, 7% SDS, 20 mM Na₂HPO₄ pH 7,2, 1 mg ADN de sperme de saumon). Cette pré-hybridation a été effectuée pour une période minimum de deux heures à 50°C. L'hybridation a été effectuée dans le même tampon frais auquel a été ajouté 25 µl de la sonde marquée. La période d'hybridation a été de 12 heures et suite à cette hybridation, les membranes ont été lavées quatre fois, deux fois dix

Tableau 7 Séquences des miARN et des sondes miARN

Nom	Séquence (5' vers 3') miARN	Séquence (5' vers 3') sonde
miARN		
miARN 156	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	GTGCTCACTCTCTTCTGTCA
miARN 160	UGCCUGGCUCCUGUAUGCCA	TGGCATAACAGGGAGCCAGGCA
miARN 164	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA	TGCACGTGCCCTGCTTCTCCA
miARN 167	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA	TAGATCATGCTGGCAGCTTCA
miARN 171	UGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC	GATATTGGCGCGGCTCAATCA
miARN 172	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG	CTGCAGCATCATCAAGATTCT
miARN 394	UUGGCAUUCUGUCCACCUCC	GGAGGTGGACAGAATGCCAA

La séquence des miARN provient du site <http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/>.

minutes et deux fois trente minutes, suivie d'un dernier lavage de cinq minutes dans deux solutions de forces ioniques différentes pour permettre l'élimination des hybridations non spécifiques (solution no.1 : 3X SSC, 25 mM NaH_2PO_4 pH7,5, 5% SDS, 10X Denhardt's; solution no.2 : 1X SSC, 1% SDS).

7.5 Exposition des membranes et développement des autoradiogrammes

Lorsque les membranes ont été hybridées et lavées, elles sont ensuite exposées sur un film (Biomax XAR, Kodak) dans une cassette d'exposition entre deux écrans d'amplification. L'exposition des membranes a été effectuée à -80°C pour une période minimale de douze heures.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Production d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques pour un système de réplicon basé sur le virus de la mosaïque du navet

1. Construction des vecteurs

La stratégie employée pour la construction du réplicon TuMV inactivé de façon réversible impliquait l'insertion de deux sites *loxP* de part et d'autre d'une séquence de terminaison de la traduction entre les régions codantes pour les protéinases P1 et HcPro du virus. Ce vecteur inactif était nommé pUCTuMV-flox (Figure 11A). Ce site d'insertion entre les régions codantes pour P1 et HcPro avait été testé positif pour l'introduction et l'expression adéquate des gènes codant pour la β -glucuronidase, *uidA*, et pour la protéine fluorescente verte, *gfp* (Dolja, McBride et Carrington, 1992; Guo, Lopez-Moya et Garcia, 1998; Beauchemin, Bougie et Laliberté, 2005). La séquence de terminaison de la traduction était celle présente dans la région codante pour la protéine β -glucuronidase, GUS. Cette insertion devrait permettre une transcription complète du génome viral mais la réplication de celui-ci devrait être empêchée due à la terminaison prématurée de la traduction laquelle empêche la production du complexe de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp). La réactivation de la réplication du virus pourrait alors être possible par un événement de recombinaison effectué par la recombinaise Cre qui élimine toutes séquences présentes entre les deux sites *loxP*. Le virus réactivé devrait avoir un seul site *loxP* qui maintient intact le cadre de lecture de la polyprotéine (pUCTuMV-lox, Figure 11B). Trois systèmes d'expression ont été élaborés pour produire Cre dans les cellules végétales. Dans le premier système, la recombinaise Cre était transitoirement produite dans les cellules végétales suivant l'agro-infiltration avec une suspension bactérienne d'*A. tumefaciens* contenant le gène Cre sous le contrôle du promoteur CaMV 35S (Figure 11C) dans un vecteur binaire pGreen0029 (Hellens *et al.*, 2000). Cre était

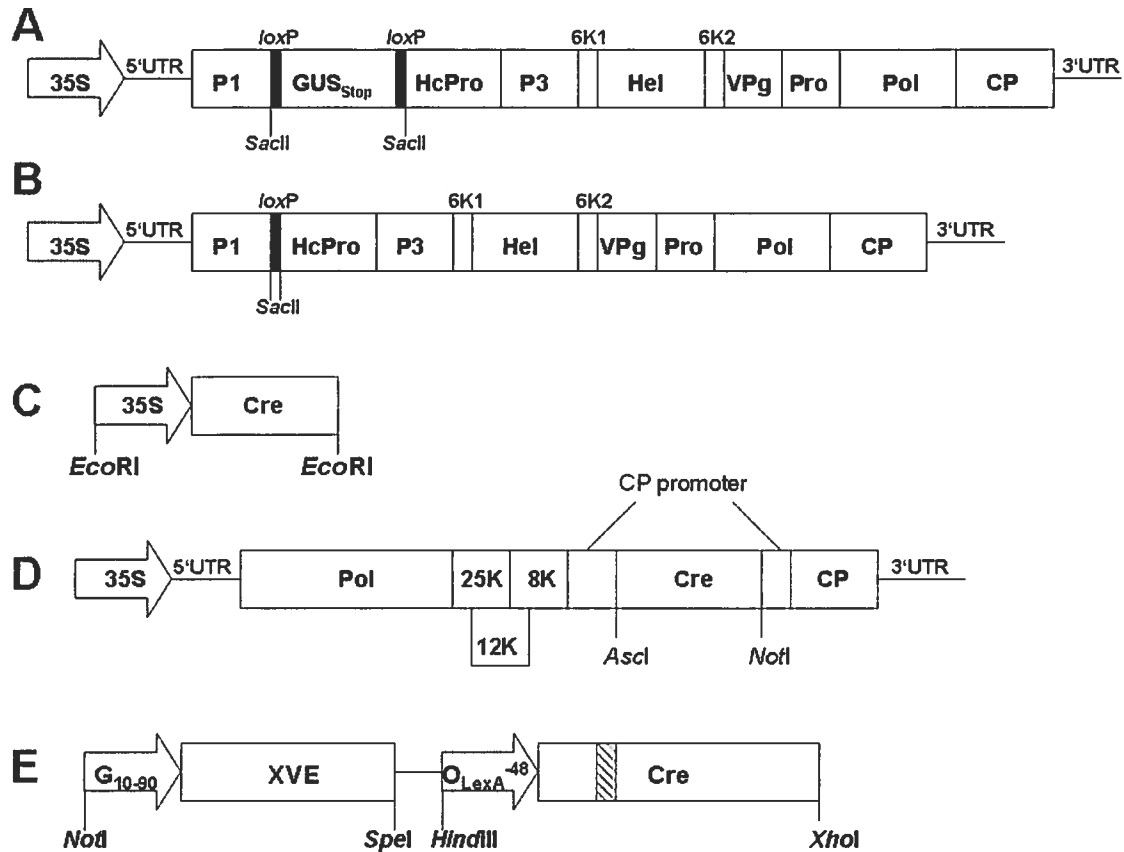


Figure 11. Représentation schématique des constructions de vecteurs. Les gènes des cassettes TuMV-flox (A), TuMV-lox (B) dans pUC ou pGreen et pCre (C), pPVX-Cre (D) exprimant Cre ou pXVE-Cre (E) dans pGreen sont représentés. Les flèches représentent les promoteurs CaMV 35S, G₁₀₋₉₀ constitutif et O_{LexA}⁻⁴⁸ inductible lequel contient huit copies de l'opérateur bactérien LexA fusionnées à un promoteur minimal CaMV 35S. Les régions 5' et 3' non-traduites (UTR) du TuMV (A) et de PVX (D) sont représentées par des lignes. Les gènes codants pour des protéines sont représentés par des boîtes. La boîte hachurée représente l'intron du gène *kor1* d'*A. thaliana* lequel empêche l'expression de Cre dans les bactéries. Les sites de restriction utilisés pour l'insertion des gènes sont indiqués.

aussi exprimée dans les cellules végétales par l'utilisation du vecteur d'expression viral correspondant au virus X de la pomme de terre (pPVX-Cre; Figure 11D). Le gène codant pour Cre était cloné dans pGR106 qui est un vecteur binaire basé sur pGreen0000 et qui contient une copie d'ADN infectieux du PVX pour l'expression de protéines d'intérêt (Lu *et al.*, 2003). Finalement, la synthèse de Cre était induite chimiquement dans les plantes d'*A. thaliana* transgéniques pour la construction pXVE-Cre laquelle code pour le facteur de transcription chimérique XVE et la recombinaise Cre (Figure 11E). Dans ce système développé par Hare et Chua (2002), le gène codant pour Cre était cloné sous le contrôle d'un promoteur comprenant huit copies d'un opérateur bactérien LexA fusionnées à un promoteur minimal 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Ce promoteur est activé par le facteur de transcription XVE lequel contient le domaine de liaison à l'ADN du répresseur bactérien LexA (X), du domaine d'activation de la protéine VP16 du virus de l'*Herpes simplex* (V) et de la région carboxyl-terminale du récepteur de l'estrogène humain (E). XVE est constamment produit mais demeure dans le cytoplasme. Cependant, suite à l'addition d'estrogène tel l'estradiol, ce dernier se lie à XVE ce qui permet sa translocalisation au noyau et sa liaison subséquente au promoteur cible menant ainsi à la production de Cre.

2. Recombinaison *in vitro* de TuMV-flox

Pour vérifier si la recombinaison a bel et bien eu lieu sur l'ADNc arborant la séquence GUS floxé, pUCTuMV-flox a été mélangé avec une Cre purifiée et après trente minutes d'incubation, le mélange a été transfecté dans des cellules d'*E. coli*. Les plasmides analysés à partir des colonies résistantes à l'ampicilline indiquaient la présence de plasmides, soit avec des patrons de restriction correspondant à pUCTuMV-flox ou pUCTuMV-lox. L'élimination de la séquence GUS a été confirmée par séquençage de pUCTuMV-lox dans lequel un seul site *loxP* demeurerait à la jonction des séquences codantes pour P1 et HcPro, indiquant que la recombinaison opérée par Cre avait effectivement eu lieu (Figure 12). La présence du site *loxP* ajoute 42 nucléotides en amont de la séquence codante pour HcPro.

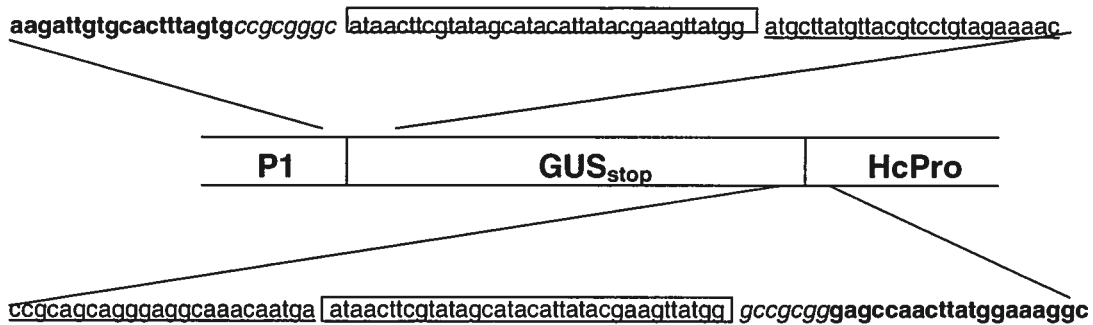
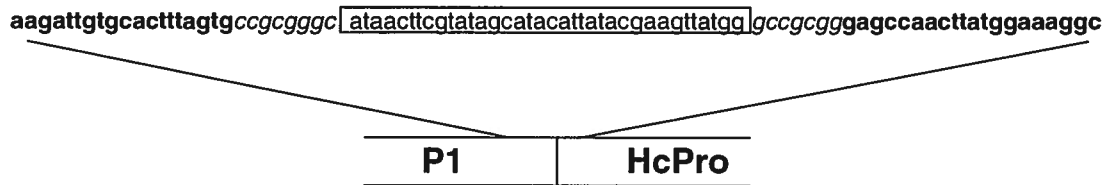
A**B**

Figure 12. Séquence en acides nucléiques de TuMV-flox et TuMV-lox. Suivant la recombinaison *in vitro*, les plasmides avec des patrons de restriction pUCTuMV-flox (A) et pUCTuMV-lox (B) ont été séquencés à la jonction des gènes codant pour P1 et HcPro. Les caractères en gras représentent l'extrémité 3' de la séquence du gène codant pour P1 (côté gauche de la séquence illustrée) et l'extrémité 5' de la séquence du gène codant pour HcPro (côté droit de la séquence illustrée). Les caractères soulignés représentent l'extrémité 5' (côté droit) et l'extrémité 3' (côté gauche) de la séquence du gène codant pour GUS. Les caractères encadrés représentent la séquence *loxP* et les caractères en italiques représentent le site de restriction *SacII*.

La capacité des cassettes TuMV-flox et TuMV-lox à initier une infection virale lorsque transfectées dans des cellules végétales a été évaluée par sous-clonage des séquences virales (précédées d'un promoteur CaMV 35S et suivies d'un terminateur de la nopaline synthase), pour les deux formes du virus ainsi que pour la forme sauvage pUCTuMV, dans un vecteur binaire pour *A. tumefaciens*, pGreen0179. Les plasmides résultants (i.e. pGreenTuMV-flox, pGreenTuMV-lox et pGreenTuMV) ont été introduits dans *A. tumefaciens* par l'agro-infection des plantes d'*A. thaliana*. De sévères délais dans la croissance des plantes ont été observés sept jours après l'agro-infection avec pGreenTuMV, représentant le virus de type sauvage, pendant qu'aucun délai n'était encore observés chez les plantes infectées avec pGreenTuMV-lox et pGreenTuMV-flox (Figure 13A). Par contre, après dix jours, de légers délais dans la croissance des plantes agro-infectées avec pGreenTuMV-lox ont été notés pendant que les plantes agro-infectées avec pGreenTuMV-flox restaient asymptomatiques et croissaient normalement, telles des plantes non-infectées, même au delà d'un mois suivant l'infection. Les tiges principales ainsi que les siliques étaient aussi différents selon l'infection effectuée sur les plantes. La tige principale des plantes agro-infectées avec pGreenTuMV était très courte tout comme les siliques pendant que la tige des plantes agro-infectées avec pGreenTuMV-lox était plus longue avec des siliques longues et courbées. La tige des plantes infectées avec TuMV-lox était par contre plus courte que celle des plantes agro-infectées avec pGreenTuMV-flox. La tige principale des plantes agro-infectées avec pGreenTuMV-flox montrait plusieurs ramifications secondaires ressemblant beaucoup plus à la tige principale de plantes non-infectées et leurs siliques étaient longues et droites (Figure 13B). L'infection par le TuMV a été confirmée par des analyses de type western utilisant un sérum anti-protéine de capsid du TuMV de lapin. La figure 13C montre que les plantes agro-infectées avec pGreenTuMV-lox accumulaient autant de protéines de capsid (CP) du virus que les plantes agro-infectées avec pGreenTuMV pendant qu'aucune protéine virale CP n'était détectée dans les plantes agro-infectées avec pGreenTuMV-flox. Des résultats phénotypiques et protéiques similaires ont été observés sur un deuxième hôte naturel pour le TuMV, *Brassica perviridis* (résultats non présentés). Cette expérience de recombinaison *in vitro* prouve que l'insertion d'un codon stop entre les séquences codantes pour P1 et HcPro

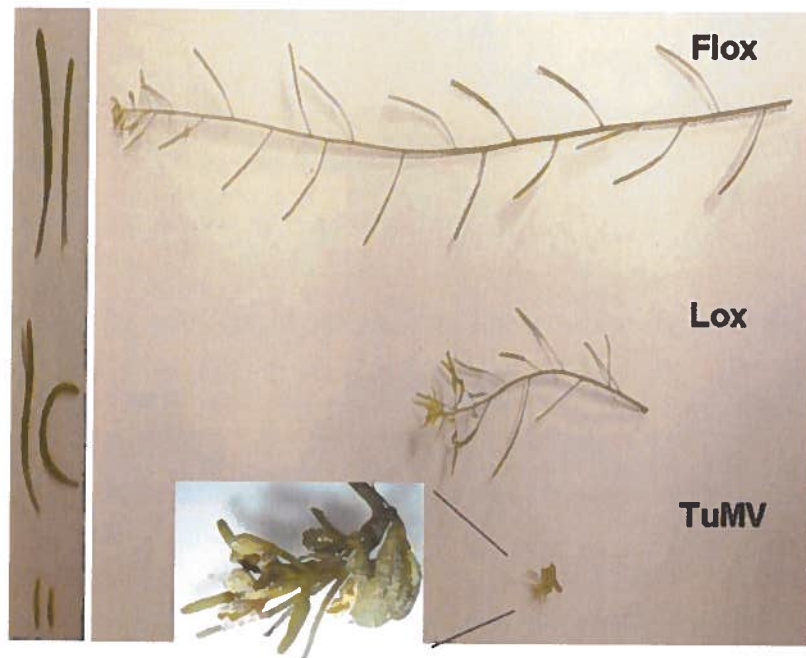
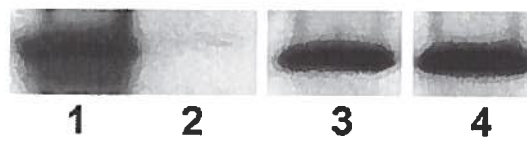
A**B****C**

Figure 13. Plantes d'*Arabidopsis thaliana* suivant la transfection avec les formes flox et lox du TuMV. A) Les plantes ont été observées vingt jours après l'agro-infiltration avec pGreenTuMV (TuMV), pGreenTuMV-lox (Lox) et pGreenTuMV-flox (Flox). B) L'observation des tiges principales et des siliques à partir des plantes transfectées tel que mentionné ci-haut. C) Analyses de type western pour la présence de la protéine de capsid de TuMV dans les plantes d'*A. thaliana* vingt jours après l'agro-infiltration avec pGreenTuMV-flox (puits 2), pGreenTuMV-lox (puits 3) et pGreenTuMV (puits 4). La forme recombinante de la protéine de capsid (CP) était utilisée comme contrôle positif (puits 1).

inactive la réplication virale et que la recombinaison effectuée par Cre élimine la séquence GUS floxé et restore la réplication du virus.

3. Recombinaison *in planta* de TuMV-flox

La recombinaison effectuée par Cre a été testée dans *Nicotiana benthamiana* agro-infiltré avec pGreenTuMV-flox et soit avec les constructions pGreen35S-Cre ou pPVX-Cre. La réplication virale a été évaluée par des analyses de type western douze jours suivant l'agro-infiltration. La protéine CP a été détectée dans les plantes qui ont été co-agro-infiltrées avec pGreenTuMV-flox et pGreen35S-Cre ou pGreenPVX-Cre (Figure 14). Les plantes ne produisaient pas de protéines CP quand le vecteur d'expression Cre était omis. Les mêmes résultats ont été obtenus pour l'agro-infiltration de plante d'*A. thaliana* (résultats non présentés). Cette expérience indique alors que la recombinaison de pGreenTuMV-flox pouvait donc avoir lieu dans les cellules végétales et que la présence de Cre était absolument requise pour cette recombinaison (i.e. il n'y a pas d'activité « Cre-like » dans les cellules végétales).

4. Production de plantes de *Nicotiana tabacum* et d'*Arabidopsis thaliana* transgénique pour XVE/Cre et TuMV-flox

L'agro-infiltration avec pGreenTuMV-flox a été un test sensible pour s'assurer qu'il n'y avait aucune activité « Cre-like » présente dans les cellules végétales. L'absence de cette activité étant confirmée, la transformation stable de plantes d'*A. thaliana* et de *N. tabacum* avec la cassette du TuMV-flox a été effectuée.

Les plantes de *N. tabacum* ont été transformées une première fois avec pGreenXVE-Cre. Quatre-vingt-quatre transformants résistants à la kanamycine ont été analysés pour la présence des portions XVE et Cre du transgène. Trente-trois transformants ont été positifs pour la présence de celles-ci par PCR (résultats non présentés). Une de ces lignées a été

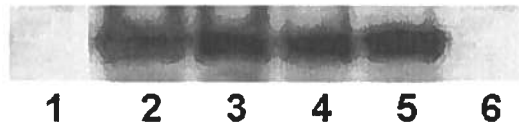


Figure 14. Recombinaison *in planta*. Des feuilles de *N. benthamiana* ont été agro-infiltrées avec une suspension d'*A. tumefaciens* et douze jours plus tard, les protéines totales ont été extraites et séparées par SDS-PAGE. La protéine CP a été détectée par des analyses de type western utilisant un sérum anti-CP de lapin contre la protéine CP de TuMV. Les suspensions d'*A. tumefaciens* contenaient p35SGUS (puits 1), pGreenTuMV (puits 2), pGreenTuMV-lox (puits 3), pGreenTuMV-flox avec pGreen35S-Cre (puits 4), pGreenTuMV-flox avec pGreenPVX-Cre (puits 5) ou pGreenTuMV-flox seul (puits 6).

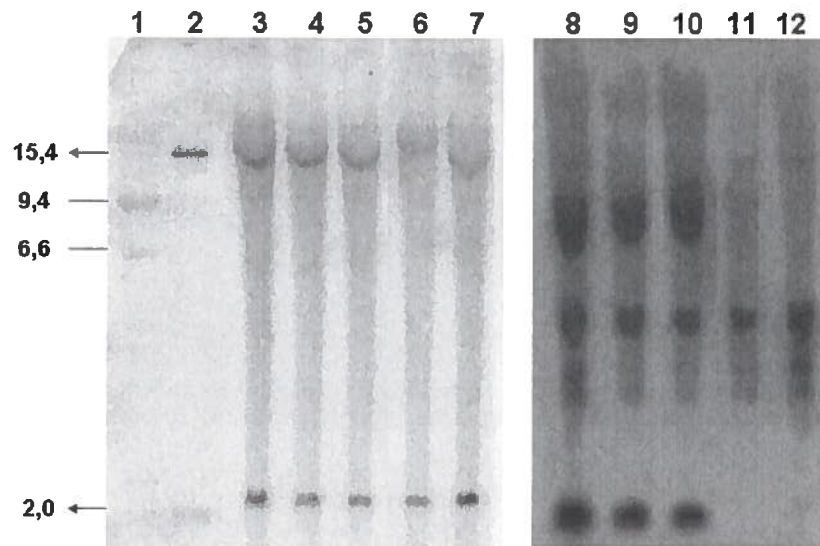
choisie au hasard et sur celle-ci une deuxième transformation a été effectuée avec pGreenTuMV-flox. Sept transformants résistants à la kanamycine et à l'hygromycine ont été analysés pour la présence du deuxième transgène. Quatre lignées ont montré que le génome TuMV-flox complet avait été inséré.

Des analyses de type Southern effectuées sur l'ADN génomique de 27 plantes de *N. tabacum* ont indiqué que toutes les plantes testées contenaient entre une et six copies du transgène XVE-Cre et une à deux copies du transgène TuMV-flox (Figure 15A).

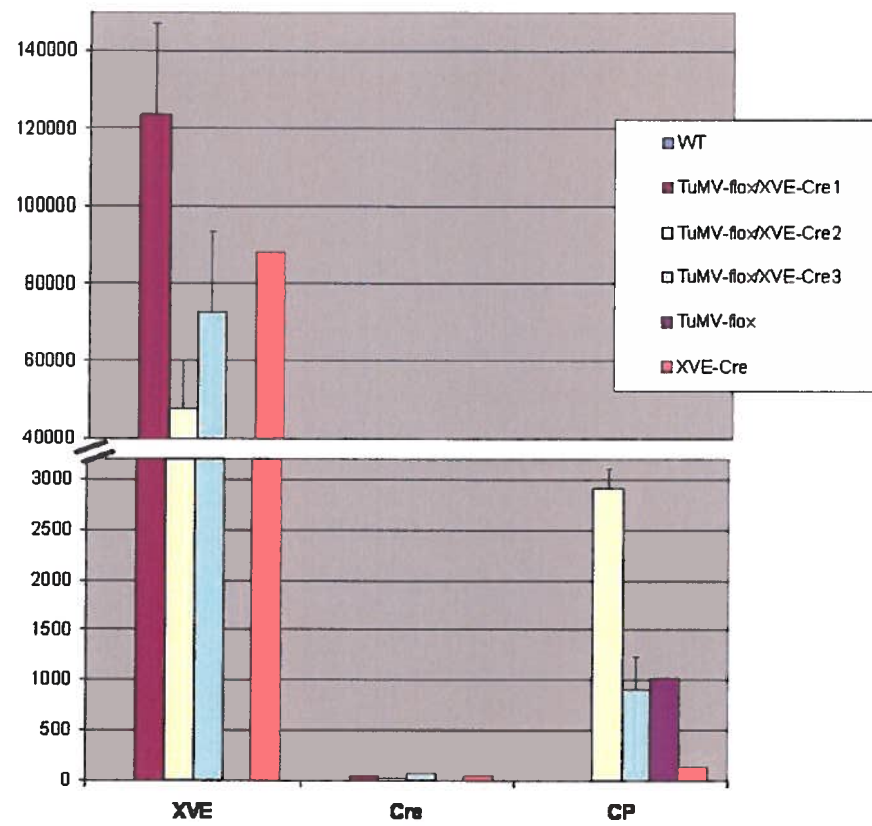
L'accumulation des transcrits XVE, Cre et CP a été analysée par PCR en temps réel (Figure 15B). L'accumulation des transcrits XVE a été observée, alors que les transcrits pour Cre s'accumulaient très faiblement en conditions de non-induction. L'accumulation des transcrits codant pour CP a aussi été observée, indiquant que la transcription du virus n'était pas affectée par l'insertion du signal de terminaison de la traduction malgré le fait que celui-ci ne s'accumule pas autant que les transcrits XVE.

En parallèle, des plantes d'*A. thaliana* ont été également transformées avec pGreenXVE-Cre. Sur quelques 600 graines mises à germées, six transformants résistants à la kanamycine ont été testés positifs pour la présence des portions XVE et Cre du transgène. Une de ces lignées a été choisie au hasard et une deuxième transformation avec pGreenTuMV-flox a été effectuée sur celle-ci. Sur plus de 1000 graines mises à germées, seulement trois lignées ont pu être sélectionnées pour leur résistance à la kanamycine et à l'hygromycine. Des analyses PCR ont été effectuées sur l'ADN génomique de ces lignées et celles-ci ont montré que le génome TuMV-flox complet avait été inséré tel que le montre l'amplification des fragments correspondant à P1-GUS-HcPro, la protéine VPg et la polymérase et CP par PCR sur l'ADN génomique (Figure 15C). Malgré que la présence du transgène XVE-Cre avait été observée avant la deuxième transformation de ces plantes et que les plantes étaient toutes trois résistantes aux antibiotiques, la présence de XVE-Cre a été montrée dans seulement une des trois lignées sélectionnées suivant la deuxième transformation.

A



B



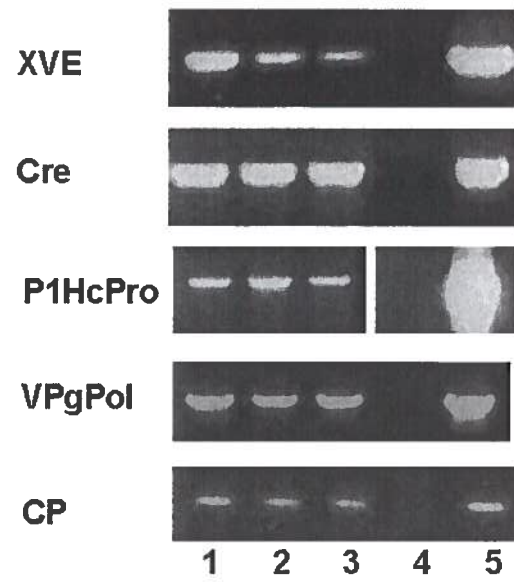
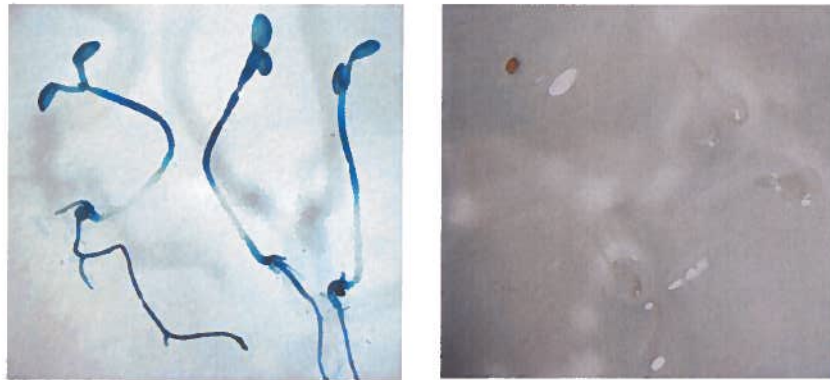
C**D**

Figure 15. Caractérisation moléculaire des plantes de *Nicotiana tabacum* et d'*Arabidopsis thaliana* transformées avec pGreenXVE-Cre et pGreenTuMV-flox. A) L'ADN des plantes de *N. tabacum* TuMV-flox/XVE-Cre et TuMV-flox seul a été digéré avec l'enzyme de restriction *Stu*I puis soumis à une analyse de type Southern avec une sonde P1-GUS (gauche) et une sonde XVE (droite). Les lignées TuMV-flox/XVE-Cre no.1, 2 et 3 (puits 3 à 5 et 8 à 10) ainsi que les lignées TuMV-flox no.8 et 9 (puits 6, 7, 11 et 12) ont été testées. Le puits no.1 contient l'ADN standard de poids moléculaire 1 kb et le puits no.2 correspond au signal généré par pGreenTuMV-flox utilisé comme contrôle positif. B) L'ADNc des lignées no. 1,2 et 3 de *N. tabacum* TuMV-flox/XVE-Cre ainsi que d'une lignée TuMV-flox et d'une lignée XVE-Cre a été soumis à une analyse PCR en temps réel pour l'accumulation des transcrits XVE, Cre et CP. C) L'ADN des plantes d'*A. thaliana* TuMV-flox/XVE-Cre a été soumis à une analyse PCR pour la présence des gènes *xve*, *cre*, P1-*gus*-HcPro (P1HcPro), VPg-Pro-Pol (VPgPol) et CP. Les analyses ont été effectuées sur les lignées transgéniques no.1, 2 et 3 (puits 1 à 3) en génération T3. Le puits 4 correspond à l'ADN de plantes non-transformées et le puits 5 correspond au signal généré par pGreenXVE-Cre ou pGreenTuMV-flox utilisé comme contrôle positif. D) La coloration au X-Glucuronide a été effectuée sur des plantes d'*A. thaliana* transgéniques pour TuMV-flox/XVE-Cre (gauche) et sur des plantes non-transformées (droite).

Toutes les plantes testées positives pour la présence et l'expression des transgènes, que ce soit des plantes de *N. tabacum* ou d'*A. thaliana*, ne montraient aucune évidence d'infection virale tel que démontré par leur croissance normale et l'absence de CP suite à des analyses de type western (résultats non présentés).

La présence du gène *gus* dans la séquence virale ayant également été démontrée, celui-ci contrairement à CP devait être exprimé compte tenu que le signal de terminaison de la traduction se retrouvait en aval de la séquence codante pour GUS. Par une analyse histochimique sur toutes les plantes testées positives pour la présence du gène *gus*, l'expression de celui-ci a été démontrée (Figure 15D).

5. Restauration de la réplication virale

Des graines de *N. tabacum* transgéniques pour XVE-Cre et TuMV-flox ont été mises en sol jusqu'à l'obtention de plantules avec quatre feuilles matures. Ces plantules ont alors été vaporisées et/ou arrosées avec une solution d'estradiol. D'autres plantules ont été placées en conditions hydroponiques dans une solution d'estradiol. Des échantillons foliaires de ces plantes ont été analysés pour la présence de CP 24, 48, 96 heures ainsi que une et deux semaines suivant le traitement. De tous les échantillons testés, seuls quelques-uns de ceux induits en conditions hydroponiques montraient l'expression de la protéine CP. Également, plusieurs plantes placées en conditions non-induites montraient l'expression de la protéine CP (données non présentées). Compte tenu des résultats, les tentatives de réactivation de la réplication virale dans les plantes de *N. tabacum* n'ont pas été poussées plus loin. Seules les plantes d'*A. thaliana* ont été utilisées pour la suite des expériences.

Des graines d'*A. thaliana* transgéniques pour la cassette TuMV-flox ont été mises en sol jusqu'à complète maturité des feuilles de rosettes, juste avant l'apparition de la hampe florale. Ces plantes ont été agro-infiltrées avec pGreen35S-Cre ou pGreenGUS, ou agro-infectées avec pGreenPVX-Cre ou pGreenPVX. Après deux semaines de croissance,

l'accumulation de CP a été observée seulement dans les plantes agro-infiltrées avec les vecteurs qui exprimaient Cre (Figure 16A). Régulièrement, l'accumulation de CP était plus importante lorsque pGreenPVX-Cre était utilisé pour induire la recombinaison.

Des graines d'*A. thaliana* transgéniques pour les deux cassettes XVE-Cre et TuMV-flox ont été mises à germer (une semaine) sur un milieu de culture supplémenté ou non avec de l'estradiol à 3 μ M. Quelques plantes germées sur un milieu sans estradiol ont été transférées sur un milieu contenant de l'estradiol à 3 μ M pour des périodes de une, trois, sept et quatorze jours. Quelques plantes germées sur un milieu avec estradiol ont été transférées sur un milieu sans estradiol pour les mêmes périodes de temps. Suite à leur séjour sur le milieu supplémenté ou non d'estradiol, les plantes ont toutes été transplantées en sol. Peu importe le temps qu'elles ont séjourné sur les milieux, la réplication du virus a été évaluée dans ces plantes deux semaines après la transplantation en sol. La figure 16B montre que seules les plantes traitées avec l'estradiol accumulaient de la CP, pendant que celle-ci n'était pas détectée dans les plantes non-traitées.

Des essais β -glucuronidase *in situ* ont été effectués pour évaluer l'étendue de la recombinaison (Figure 16C). Les feuilles provenant de plantes où la recombinaison n'avait pas encore eue lieu étaient entièrement colorées en bleu. Après recombinaison effectuée par Cre induite par l'estradiol, seulement quelques secteurs montrant de l'activité β -glucuronidase étaient observés, indiquant que la recombinaison survenait dans la majorité des cellules.

Ces expériences confirment alors que les plantes transgéniques pour une copie inactive du TuMV peuvent être générées et que l'infection virale peut être restaurée par un évènement de recombinaison effectué par Cre.

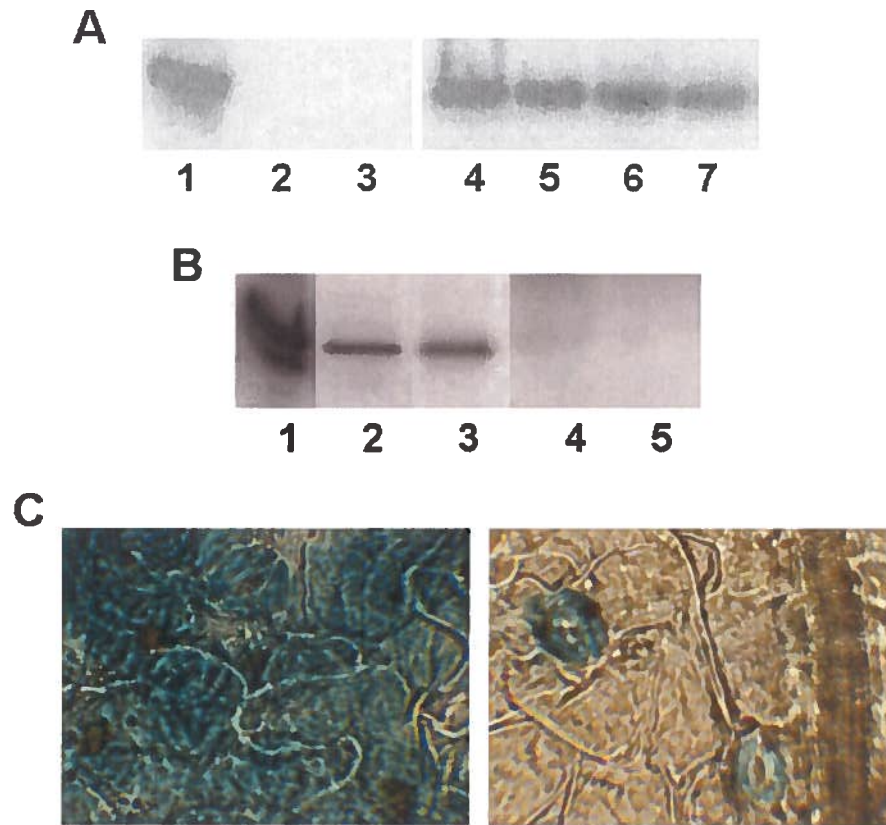


Figure 16. Réactivation de la réplication virale dans les plantes transgéniques. A) Deux plantes d'*A. thaliana* transgéniques pour la cassette TuMV-flox seulement ont été cultivées en sol jusqu'à complète maturité des feuilles de rosettes et ont été agro-infiltrées avec des suspensions d'*A. tumefaciens*. Deux semaines après l'agro-infiltration, l'accumulation de la protéine CP a été mesurée par des analyses de type western utilisant un sérum anti-CP de lapin contre la protéine CP de TuMV. Les suspensions d'*A. tumefaciens* contenaient p35SGUS (puits 2), pGreenPVX (puits 3), pGreenPVX-Cre (puits 4 et 5) et pGreen35S-Cre (puits 6 et 7). Les lignées transgéniques no.1 (puits 2, 3, 4 et 6) et no.2 (puits 5 et 7) ont été utilisées. Une forme recombinante de la protéine CP a été utilisée comme contrôle positif (puits 1). B) Les plantes d'*A. thaliana* transgéniques pour les cassettes XVE-Cre et TuMV-flox (lignée no.4) ont été cultivées *in vitro* sur un milieu supplémenté (puits 2 et 3) ou non (puits 4 et 5) avec de l'estradiol pour trois semaines. Deux semaines après le traitement, l'accumulation de la protéine CP a été mesurée par des analyses de type western utilisant un sérum anti-CP de lapin contre la protéine CP de TuMV. Une forme recombinante de la protéine CP a été utilisée comme contrôle positif (puits 1). C) L'activité *in situ* de la β -glucuronidase a été testée sur les plantes avant (gauche) et après (droite) la recombinaison effectuée par Cre.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

Caractérisation de la forme TuMV lox

Le TuMV-lox correspondait à la séquence du TuMV sauvage avec une insertion de quatorze acides aminés en amont de la séquence de HcPro. L'infection d'une plante avec le TuMV-lox résultait en une diminution des symptômes associés à l'infection avec le TuMV. Effectivement, les plantes infectées avec TuMV-lox montraient une tige principale et des siliques beaucoup plus longues que celle observées sur des plantes infectées avec le TuMV sauvage quoiqu'elles n'étaient ni aussi longues ni aussi droites que celles observées chez les plantes non-infectées. Malgré cette diminution dans les symptômes, les plantes infectées avec TuMV-lox montraient des niveaux d'expression de CP similaires à ceux observés chez les plantes infectées avec le TuMV sauvage. Ces résultats montraient qu'il n'y a peut être aucune corrélation entre l'apparition des symptômes et l'expression du virus. Des résultats similaires étaient observés par Gal-On (2000 : 467-473) qui avait muté un motif conservé dans la séquence de HcPro du *zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) par remplacement d'un acide aminé. Cette simple mutation dans HcPro provoquait une diminution dans les symptômes associés à une infection par le ZYMV pendant qu'autant de CP s'accumulait dans les plantes infectées.

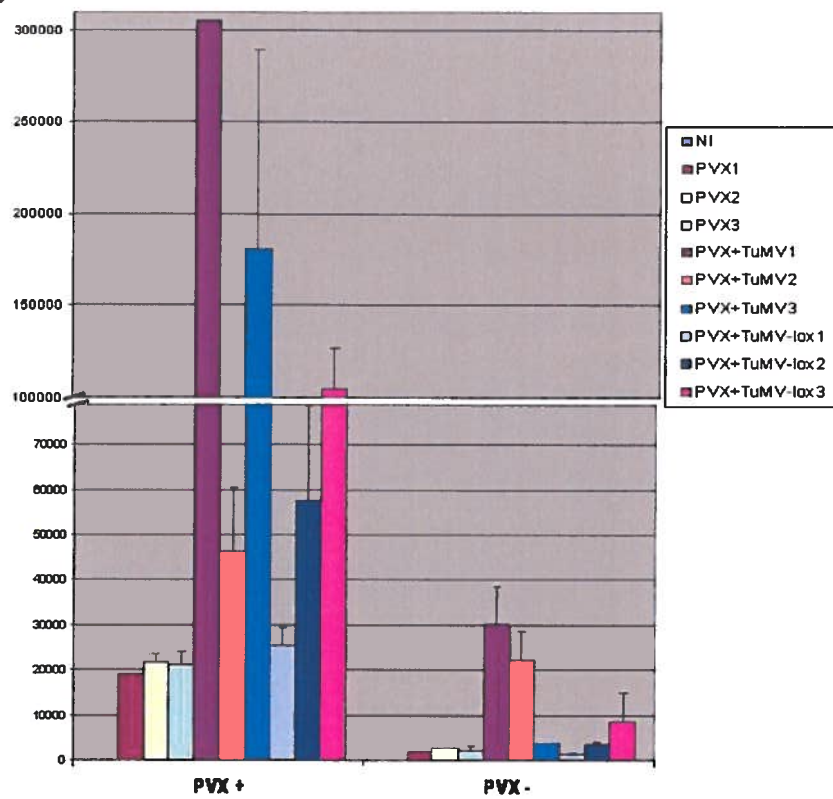
1. Réaction de synergisme dans des plantes infectées avec les deux formes du TuMV et un virus non apparenté

La protéine modifiée dans le TuMV-lox est la protéine HcPro. Celle-ci est impliquée dans la suppression du PTGS. Des analyses d'efficacité de suppression du PTGS ont alors été effectuées. Une méthode efficace pour évaluer la suppression du PTGS est le synergisme. Une réaction de synergisme s'opère lorsque deux virus non apparentés s'associent pour

infecter une plante. À ce moment, un des membres de l'infection, généralement le virus le plus virulent, profitera au deuxième virus en augmentant sa capacité infectieuse. Dans le cas qui nous intéresse, le TuMV qui possède une protéine de suppression du silencing mettra à profit l'activité de cette protéine pour permettre au virus X de la pomme de terre, ne possédant pas de protéine semblable, d'être plus infectieux. Seul ce deuxième membre viral montrera un taux d'accumulation différent dans les plantes infectées.

Dans nos expériences, des plantes d'*A. thaliana*, ayant atteint une pleine maturité des feuilles de rosette, ont été infectées avec le PVX seul, le PVX en combinaison avec le TuMV-lox et le PVX en combinaison avec le TuMV sauvage. Trois semaines après l'infection, les plantes infectées avec le PVX seul montraient un très léger délai de croissance comparativement à des plantes non infectées. Les plantes infectées avec le PVX et le TuMV-lox ou le TuMV sauvage montraient des délais de croissance plus importants, de l'ordre de ceux qui étaient observés chez les plantes infectées avec le TuMV-lox ou le TuMV sauvage seul (Figure 17A).

L'accumulation des transcrits de l'ARN de polarité positive et négative de PVX a été analysée par PCR en temps réel (figure 17B). Les plantes infectées avec le PVX seul contenaient entre 19 128,3 et 21 866,9 unités d'ARN de polarité positive et entre 2 085,8 et 2 613,9 unités de transcrits de polarité négative. Les plantes infectées avec le PVX en combinaison avec le TuMV sauvage montraient des accumulations de transcrits PVX de polarité positive correspondantes à 46 367,1, 180 480,3 et 305 369,1 unités et de polarité négative à 22 311,7, 3 747,4 et 30 120,8 unités. Il y avait une réelle augmentation dans l'accumulation des transcrits de PVX lorsqu'une plante était infectée avec PVX et TuMV. Cette augmentation de l'ordre de 8,6 fois pour les transcrits de polarité positive et de 8,1 fois pour les transcrits de polarité négative montrait bien l'existence d'une réaction de synergie entre le TuMV et le PVX. Vance *et al.* (1995 : 583-590) montraient des accumulations d'environ trois fois pour les transcrits de polarité positive et d'environ quinze fois pour les transcrits de polarité négative. Par contre, chez les plantes infectées avec le PVX et le TuMV-lox, l'accumulation des transcrits de polarité positive

A**B**

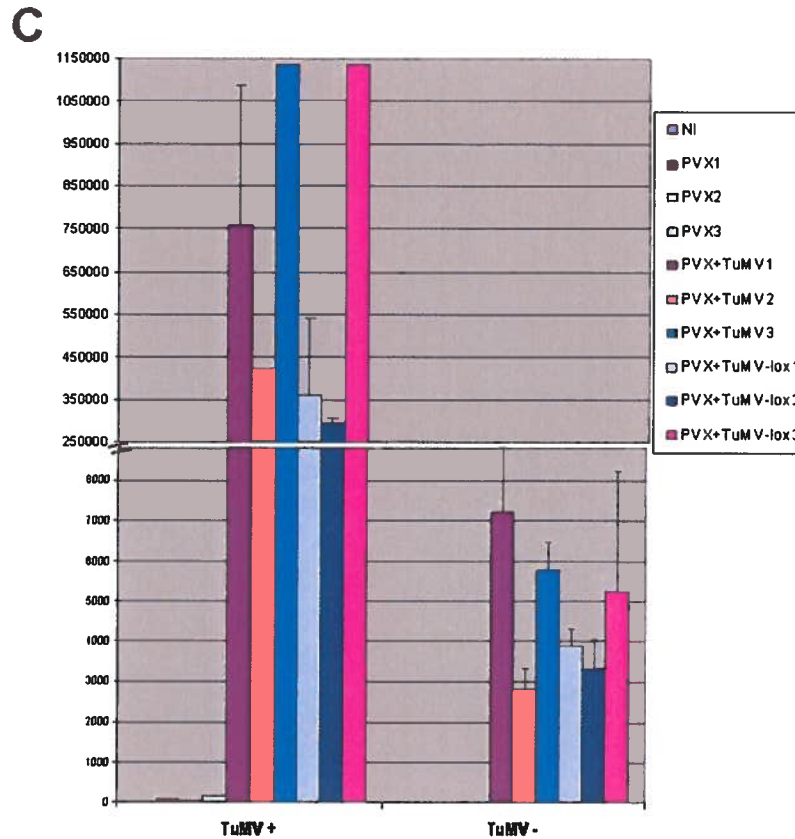


Figure 17 Synergisme dans des plantes d'*Arabidopsis thaliana*. A) Les plantes ont été observées trois semaines après l'infection avec le PVX seul, avec le PVX et le TuMV sauvage et avec le PVX et le TuMV-lox. Une plante non-infectée a été utilisée comme contrôle négatif. Des plantes infectées avec TuMV sauvage et TuMV-lox ont été utilisées comme témoin positif de l'infection par le TuMV seul. B) et C) Quantification des transcrits de polarité positive et négative de PVX (B) et de TuMV (C) dans des plantes d'*A. thaliana* infectées par qRT-PCR. Les résultats ont été standardisés par rapport à l'expression stable du facteur de transcription ATHB6 (At2g22430; protéine homéodomaine de la classe des leucines zipper; HD-Zip 1). La transcription inverse a été effectuée sur l'ARN total extrait à partir de la totalité des feuilles de rosette de trois plantes infectées avec les différents virus et d'une plante non-infectée utilisée comme témoin.

correspondait à 25 618,6, 57 537,5 et 104 743,6 unités et de polarité négative à 1 555,5, 3 372,1 et 8 626,0 unités. Il y a là aussi augmentation dans l'accumulation des transcrits de PVX mais cette augmentation (trois et deux fois respectivement) est beaucoup moins importante que celle observée lorsque le TuMV sauvage opère la réaction de synergie.

Pour ce qui est des transcrits de TuMV, ceux-ci s'accumulaient de manière semblable chez les plantes infectées avec le TuMV-lox ou le TuMV sauvage, en présence de PVX. Cette accumulation correspondait en moyenne à 5 263 unités d'ARN de polarité positive. Cette expérience montrait alors que la modification présente sur la protéine virale HcPro peut avoir affectée son efficacité de suppression du PTGS. En effet, si HcPro modifié avait eu la même efficacité à supprimer le PTGS que son homologue sauvage, la synergie entre le TuMV et PVX aurait montré des augmentations dans l'accumulation des transcrits, autant de polarité positive que négative, équivalentes à celles observées dans les plantes infectées avec TuMV sauvage et PVX.

2. Identification des gènes d'*Arabidopsis thaliana* différentiellement régulés lors d'une infection avec les deux formes du TuMV

L'infection par le TuMV cause de sévères anomalies développementales dans les plantes d'*A. thaliana*, de *N. benthamiana* et de *B. perviridis*. Ces anomalies sont moins importantes lorsque les plantes étaient infectées avec le TuMV-lox. Une analyse détaillée de l'expression des gènes d'une plante infectée avec le TuMV sauvage et d'une plante infectée avec le TuMV-lox ont été effectuées. Cette analyse permettrait d'identifier les gènes différentiellement régulés qui pourraient être responsables des différences développementales observées dans ces plantes. Pour ce faire, la technologie des puces à ADN a été utilisée. Les puces Affymetrix ATH1-24K contiennent 22 500 sondes représentant environ 24 000 gènes uniques d'*A. thaliana*. Deux semaines après l'infection, la totalité des feuilles de rosette a été récoltée et l'ARN extrait. La qualité de l'ARN extrait a été visualisée au bioanalyseur (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Trois répétitions biologiques pour chaque infection ont été utilisées pour

l'hybridation. Les échantillons d'ARN ont été utilisés comme gabarit pour synthétiser de l'ARNc marqué. Les données complètes générées à partir de chaque échantillon ne sont pas présentées dans ce document puisque celles-ci le rendrait trop volumineux. Suite à une analyse statistique sur les six puces (test de Student non apparié; $P = 0.05$), 1 926 gènes dans les plantes infectées avec le TuMV-lox étaient régulés différenciellement comparativement aux plantes infectées avec le TuMV sauvage (données non présentées). Deux paramètres supplémentaires d'analyse ont été choisis pour éliminer les gènes dont l'expression différentielle était incertaine. Une différence supérieure à 200 unités entre le signal d'expression associé à un gène dans les plantes infectées avec TuMV-lox et celui observé dans les plantes infectées avec TuMV sauvage correspond au premier paramètre. Une diminution ou une augmentation (ratio) supérieure à deux fois entre le signal d'expression associé à un gène dans les plantes infectées avec TuMV-lox et celui dans les plantes infectées avec TuMV sauvage correspond au deuxième paramètre. Une analyse préliminaire a été effectuée pour valider la rigueur des paramètres fixés. La reproductibilité entre les différentes expériences d'hybridation a été visualisée par des graphiques de la moyenne des signaux de chaque sonde générés à partir d'une puce hybridée avec l'ARN d'une plante infectée avec TuMV sauvage comparée à la moyenne des signaux générés par l'ARN soit d'une autre plante infectée avec TuMV sauvage ou d'une plante infectée avec TuMV-lox (Figure 18). Après application des paramètres sur les 1 926 gènes régulés, 93 gènes ont été trouvés sur ou sous exprimés chez les plantes infectées avec le TuMV-lox (Tableau 8). Dans le but de minimiser au maximum l'effet qu'aurait pu causer l'utilisation d'échantillons avec des niveaux d'infection différents, l'expression des 93 gènes sélectionnés a été examinée pour chaque puce hybridée avec l'ARN provenant de plantes infectées avec le TuMV-lox comparée à chaque puce hybridée avec l'ARN de plantes infectées avec TuMV sauvage. Neuf combinaisons ont donc été analysées. Le gène était conservé lorsqu'il était sur ou sous exprimé de la même façon dans un minimum de quatre différentes combinaisons. Des 93 gènes sélectionnés suite aux analyses générées par le logiciel, seulement treize étaient retenus. La moyenne et l'écart-type des signaux, le ratio et la valeur P générée par le test de Student pour chacun des treize gènes sélectionnés sont représentés dans le tableau 9. Qu'il s'agisse de

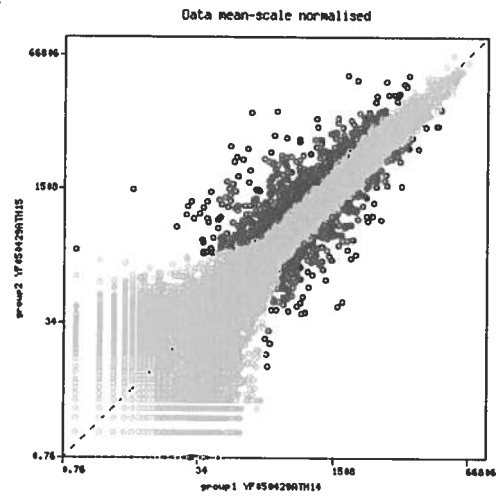
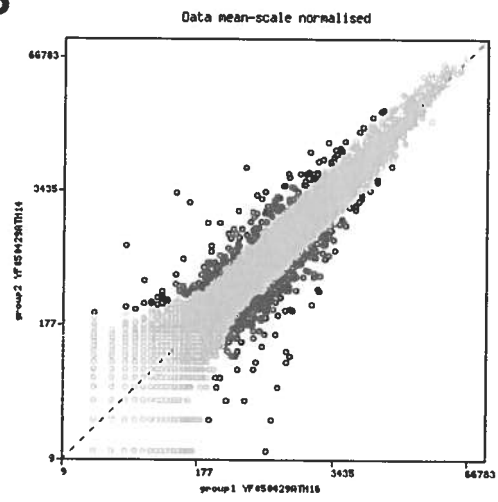
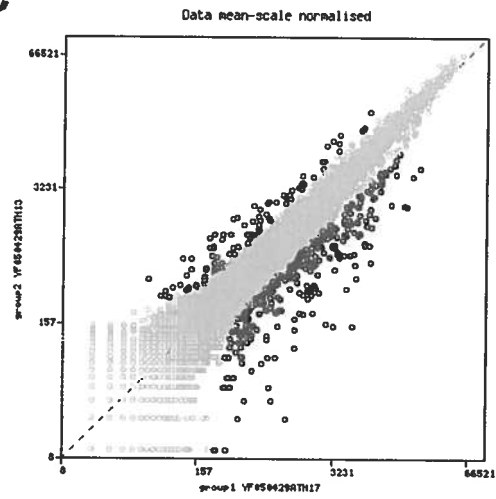
A**B****C**

Figure 18 Graphiques des intensités d'expression normalisées résultants de l'analyse de puces de plantes infectées avec TuMV sauvage et TuMV-lox. A) Une plante infectée avec le TuMV sauvage versus une plante infectée avec TuMV-lox. B) Une plante infectée avec TuMV sauvage versus une plante infectée avec une autre plante infectée avec TuMV sauvage. C) Une plante infectée avec TuMV-lox versus une autre plante infectée avec TuMV-lox.

Tableau 8. Les gènes sur ou sous exprimés, montrant une différence supérieure à 200 et un ratio supérieur à 2,0 dans les signaux d'expression associés aux gènes, dans les plantes d'*A. thaliana* infectées avec TuMV-lox comparativement à celles infectées avec TuMV sauvage.

T1 = ASN018-3 Lox-YF050429ATH13

T2 = ASN020-6 Lox-YF050429ATH15

T3 = ASN022-10 Lox-YF050429ATH17

C1 = ASN019-4 WT-YF050429ATH14

C2 = ASN021-7 WT-YF050429ATH16

C3 = ASN023-12 WT-YF050429ATH18

Unpaired analysis on mean-scale normalised MAS5 data with fold: 2.0 and change: 200 performed on: Tue Jan 24 11:46:28 2006

Probe name	T1 call	T2 call	T3 call	C1 call	C2 call	C3 call	Mean Treated	Mean Control	Signifi cant	Accession	Gene	Title
245262_at	P	A	P	A	P	P	112.91	356.55	yes	At4g16563		aspartyl protease family protein
245275_at	A	A	A	P	P	P	35.67	279.17	yes	At4g15210		beta-amylase (BMV1) / 14-alpha-D-glucan maltohydrolase
245463_at	P	P	P	A	P	P	1306.17	232.84	yes	At4g17030		expansin-related
245523_at	P	P	P	P	P	P	797.20	314.07	yes	At4g15910		drought-responsive protein / drought-induced protein (Di21)
245688_at	A	A	P	P	P	P	96.08	310.23	yes	At1g28290		pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
245749_at	P	P	P	P	P	P	1422.22	330.81	yes	At1g51090		heavy-metal-associated domain-containing protein
245882_at	A	A	P	P	P	P	135.09	342.49	yes	At5g09470		mitochondrial substrate carrier family protein
245982_at	A	P	A	A	A	A	1152.10	78.79	yes	At1g13170		nodulin MN3 family protein
246403_at	P	P	P	P	P	P	984.89	308.23	yes	At5g57590		pectinacetyltransferase putative
246908_at	P	P	P	P	P	P	16105.00	5852.47	yes	At5g25610	RD22	dehydration-responsive protein (RD22)
246922_at	P	P	P	P	P	A	743.88	257.05	yes	At5g25110		CBL-interacting protein kinase 25 (CIPK25)
247095_at	P	P	P	P	P	P	13042.61	1019.62	yes	At5g66400	RAB18	dehydrin (RAB18)
247717_at	P	P	P	P	P	P	11435.12	1791.79	yes	At5g59320	LTP3	lipid transfer protein 3 (LTP3)

Probe name	T1 call	T2 call	T3 call	C1 call	C2 call	C3 call	Mean Treated	Mean Control	Significant	Accession	Gene	Title
247718_at	A	P	P	P	P	P	3470.16	989.83	yes	At5g59310	LTP4	lipid transfer protein 4 (LTP4)
247723_at	P	P	P	P	P	P	2272.87	485.52	yes	At5g59220		protein phosphatase 2C putative / PP2C putative
248218_at	A	P	A	A	A	A	261.10	27.72	yes	At5g53710		expressed protein
248236_at	P	P	P	P	P	P	2563.78	1010.23	yes	At5g53870		plastocyanin-like domain-containing protein
248337_at	P	P	P	P	P	P	9715.40	3650.41	yes	At5g52310		low-temperature-responsive protein 78 (LT178) / desiccation-responsive protein 29A (RD29A)
248352_at	A	P	A	A	A	A	4287.50	106.26	yes	At5g52300		low-temperature-responsive 65 kD protein (LT165) / desiccation-responsive protein 29B (RD29B)
248505_at	A	P	A	P	A	A	372.86	62.48	yes	At5g50360		expressed protein
248763_at	P	P	P	P	P	P	3395.22	750.82	yes	At5g47550		cysteine protease inhibitor putative / cystatin putative
248910_at	P	P	P	P	P	P	501.97	180.76	yes	At5g45820		CBL-interacting protein kinase 20 (CIPK20)
248918_at	P	P	P	P	P	P	4817.93	1257.59	yes	At5g45890	SAG1	senescence-specific SAG12 protein (SAG12) / cysteine proteinase putative
248969_at	P	P	P	P	P	P	1185.22	250.64	yes	At5g45310	2	expressed protein
249011_at	P	P	P	P	P	P	868.04	317.71	yes	At5g44670		expressed protein
249117_at	A	P	P	P	A	A	607.62	39.98	yes	At5g43840		heat shock transcription factor family protein
249797_at	P	P	P	P	P	P	1410.54	397.40	yes	At5g23750		remorin family protein
250109_at	P	P	P	P	P	P	592.81	1679.81	yes	At5g15230		gibberellin-regulated protein 4 (GASA4) / gibberellin-responsive protein 4
250158_at	P	P	P	P	P	P	1347.36	258.49	yes	At5g15190		expressed protein
250408_at	P	P	P	P	P	P	1819.28	568.26	yes	At5g10930		CBL-interacting protein kinase 5 (CIPK5)
250648_at	A	P	A	A	A	A	1694.74	64.97	yes	At5g06760		late embryogenesis abundant group 1 domain-containing protein / LEA group 1 domain-containing protein
250891_at	A	P	A	A	A	A	486.56	64.54	yes	At5g04530		beta-ketoacyl-CoA synthase family protein
250955_at	P	P	P	P	P	P	740.71	292.83	yes	At5g03190		expressed protein
251084_at	P	P	P	P	P	P	3078.66	995.50	yes	At5g01520		zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
251137_at	P	P	P	P	P	M	443.77	144.60	yes	At5g01300		phosphatidylethanolamine-binding family protein

Probe name	T1 call	T2 call	T3 call	C1 call	C2 call	C3 call	Mean Treated	Mean Control	Signifi cant	Access ion	Gene	Title
251272_at	P	P	P	P	P	P	3814.47	1510.80	yes	At3g 61890	ATHB -12	homeobox-leucine zipper protein 12 (HB-12) / HD-ZIP transcription factor 12
251356_at	P	P	P	P	P	P	3599.06	917.28	yes	At3g 61060		F-box family protein / lectin-related
251428_at	P	P	P	P	P	P	425.11	1446.50	yes	At3g 60140		glycosyl hydrolase family 1 protein
251642_at	P	P	P	P	P	P	4716.92	1787.47	yes	At3g 57520		alkaline alpha galactosidase putative
251677_at	A	A	P	A	A	P	46.02	247.68	yes	At3g 56980		basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
251928_at	A	P	P	A	P	P	478.13	187.05	yes	At3g 53980		protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
252102_at	P	P	P	P	P	P	5345.96	1539.85	yes	At3g 50970		dehydrin xero2 (XERO2) / low-temperature-induced protein LT130 (LT130)
253145_at	A	P	A	P	P	A	380.07	110.57	yes	At4g 35560		expressed protein
253293_at	P	P	P	P	P	A	353.48	82.85	yes	At4g 33905		peroxisomal membrane protein 22 kDa putative
253344_at	P	P	P	A	P	A	346.24	62.47	yes	At4g 33550		protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
253373_at	P	P	P	P	P	P	2598.88	774.61	yes	At4g 33150		lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme
254066_at	P	P	P	P	P	A	364.05	110.33	yes	At4g 25480		DRE-binding protein (DREB1A) / CRT/DRE-binding factor 3 (CBF3)
254377_at	P	P	P	P	P	P	477.81	146.60	yes	At4g 21650		subtilase family protein
255527_at	A	P	P	A	P	A	328.78	128.40	yes	At2g 02360		expressed protein
255822_at	P	P	P	P	P	P	1003.05	388.53	yes	At2g 40610		expansin putative (EXP8)
255891_at	P	P	P	P	P	A	547.34	79.46	yes	At1g 17870		expressed protein
255943_at	P	P	P	P	P	P	659.10	242.80	yes	At1g 22370		UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
256008_s_at	P	P	P	P	P	P	1105.33	295.30	yes	At1g 34040		alliinase family protein
256021_at	P	P	P	P	P	P	2449.69	311.36	yes	At1g 58270		meprin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein
256114_at	P	P	P	P	P	P	2281.93	345.03	yes	At1g 16850		expressed protein
256603_at	P	P	P	P	P	P	2519.91	378.34	yes	At3g 28270		expressed protein
256789_at	P	P	P	P	P	P	1172.17	248.31	yes	At3g 13672		seven in absentia (SINA) family protein

Probe name	T1 call	T2 call	T3 call	C1 call	C2 call	C3 call	Mean Treated	Mean Control	Significant	Accession	Gene	Title
257271_at	P	P	P	P	P	P	415.40	136.53	yes	At3g28007		nodulin MN3 family protein
257280_at	P	P	P	P	P	A	462.94	162.74	yes	At3g14440	NC1	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase putative / neoxanthin cleavage enzyme putative / carotenoid cleavage dioxygenase putative
257919_at	A	P	P	P	P	P	239.33	687.89	yes	At3g23250		myb family transcription factor (MYB15)
258091_at	P	P	P	P	P	P	626.95	232.85	yes	At3g14560		expressed protein
258139_at	P	P	P	P	P	A	805.18	211.07	yes	At3g24520		heat shock transcription factor family protein
258181_at	P	P	P	P	P	P	2647.93	1020.94	yes	At3g21670		nitrate transporter (NTP3)
258270_at	A	P	P	P	P	P	100.55	647.57	yes	At3g15650		phospholipase/carboxylesterase family protein
258347_at	A	P	A	P	A	A	1572.02	46.84	yes	At3g17520		late embryogenesis abundant domain-containing protein / LEA domain-containing protein
258498_at	A	P	A	P	A	A	1427.95	114.84	yes	At3g02480		ABA-responsive protein-related
259373_at	P	P	P	P	A	P	526.45	177.91	yes	At1g69160		expressed protein
259618_at	P	P	P	P	P	P	695.19	274.28	yes	At1g48000		myb family transcription factor
259632_at	P	P	P	P	P	P	194.90	622.42	yes	At1g56430		nicotianamine synthase putative
259773_at	P	P	P	P	M	P	410.72	150.74	yes	At1g29500		auxin-responsive protein putative
259789_at	P	P	P	P	P	P	4469.43	1559.84	yes	At1g29395		stress-responsive protein putative
260028_at	P	M	P	P	P	P	131.84	362.66	yes	At1g29980		expressed protein
260357_at	P	P	P	P	P	P	1337.34	299.21	yes	At1g69260		expressed protein
260561_at	A	P	A	A	P	P	375.49	67.87	yes	At2g43580		chitinase putative
260770_at	P	P	P	P	P	P	1230.96	449.96	yes	At1g49200		zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
260876_at	P	P	P	P	P	P	1427.51	553.76	yes	At1g21460		nodulin MN3 family protein
261059_at	P	P	P	P	P	P	452.43	164.26	yes	At1g01250		AP2 domain-containing transcription factor putative
261077_at	P	P	P	P	P	P	1448.68	343.22	yes	At1g07430		protein phosphatase 2C putative / PP2C putative
249770_at	P	P	P	P	P	P	237.49	542.23	yes	At5g24110		WRKY family transcription factor

Probe name	T1 call	T2 call	T3 call	C1 call	C2 call	C3 call	Mean Treated	Mean Control	Significant	Accession	Gene	Title
249214_at	P	P	P	P	P	P	186.50	450.10	yes	At5g42720		glycosyl hydrolase family 17 protein
262312_at	P	P	P	P	P	P	1416.99	631.92	yes	At1g70830		Bet v I allergen family protein
261500_at	P	P	P	P	P	P	738.32	1447.91	yes	At1g28400		expressed protein
264056_at	P	P	P	P	P	P	308.72	513.42	yes	At2g28510		Dof-type zinc finger domain-containing protein
256597_at	P	P	P	P	P	P	418.23	832.42	yes	At3g28500		60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2C)
257890_s_at	P	P	P	P	P	P	344.49	155.03	yes	At3g42570		peroxidase-related
267590_at	P	P	P	P	P	P	215.94	678.64	yes	At2g39700		expansin putative (EXP4)
264100_at	P	P	P	A	P	P	319.95	99.17	yes	At1g78970	LUP1	lupol synthase (LUP1) / 23-oxidosqualene-triterpenoid cyclase
265573_at	P	P	P	P	P	P	481.06	176.20	yes	At2g28200		zinc finger (C2H2 type) family protein
260527_at	P	P	P	P	P	P	407.51	179.19	yes	At2g47270		expressed protein
265817_at	P	P	P	P	P	P	4182.40	1589.65	yes	At2g18050		histone H1-3 (HIS1-3)
247751_at	P	P	P	A	P	P	373.73	154.78	yes	At5g59050		expressed protein
252412_at	P	P	P	P	P	P	898.73	452.52	yes	At3g47295		expressed protein
264638_at	P	P	P	P	P	P	533.83	181.78	yes	At1g65480		flowering locus T protein (FT)

Tableau 9. Les gènes sur ou sous exprimés dans les plantes d'*A. thaliana* infectées avec TuMV-lox.

Sonde	Numéro d'accension	Signaux d'expression ^a		Ratio ^b	Valeur du test Student ^c	Description
		TuMV	TuMV-lox			
249214_at	At5g42720	450.1 ± 93.2	186.5 ± 65.60	-3.25	0.01605	Protéine glycosyl hydrolase famille 17
253598_at	At4g30800	343.2 ± 87.41	140.4 ± 21.72	-3.21	0.01754	Protéine 40S ribosomale S11 (RPS11B)
259373_at	At1g69160	177.9 ± 58.19	526.4 ± 143.8	+4.46	0.01768	Protéine exprimée
260028_at	At1g29980	362.7 ± 85.69	131.8 ± 34.20	-3.39	0.01231	Protéine exprimée
260527_at	At2g47270	179.2 ± 104.0	407.5 ± 85.64	+3.77	0.04255	Protéine exprimée
264638_at	At1g65480	181.8 ± 52.59	533.8 ± 204.3	+3.79	0.04455	Protéine de floraison locus T (FT)
265573_at	At2g28200	176.2 ± 40.75	481.1 ± 144.8	+3.15	0.02467	Protéine famille doigts de zinc (C2H2 type)
265817_at	At2g18050	1589.6 ± 425.8	4182.4 ± 1049.0	+3.36	0.01658	Histone H1-3 (HIS1-3)
267590_at	At2g39700	678.6 ± 215.5	215.9 ± 70.22	-2.8	0.02409	Expansine (EXP4)
248910_at	At5g45820	180.8 ± 62.05	502.0 ± 155.0	+3.61	0.02904	Protéine kinase 20 interagissant avec CBL (CIPK20)
259773_at	At1g29500	150.7 ± 62.81	410.7 ± 56.12	+3.66	0.00590	Protéine de réponse à l'auxine
262312_at	At1g70830	631.9 ± 292.8	1417.0 ± 358.8	+3.5	0.04256	Protéine Bet v 1 famille allergens
264100_at	At1g78970	99.17 ± 31.63	320.0 ± 36.57	+3.26	0.00138	Lupéol synthase (LUP1)/23 oxidosqualene-triterpénoïde cyclise

^a Moyenne et écart-type des trois répétitions biologiques^b Le signe – indique que le gène est sous exprimé et le signe + indique que le gène est sur exprimé dans les plantes infectées avec TuMV-lox .^c Les valeurs du test Student représentent le niveau de confiance

ces treize gènes ou des 80 autres non sélectionnés, la majorité étaient sur ou sous-exprimés d'un ratio très modeste soit entre deux et cinq fois. Ces treize gènes représentent une série de gènes impliqués dans plusieurs fonctions végétales dont la défense, la transcription des gènes, la transduction de signal et l'organisation cellulaire.

Une quantification du niveau de transcrits de deux gènes sélectionnés et d'un troisième gène retrouvé dans les 80 gènes non sélectionnés a été effectuée par des analyses PCR en temps réel en triplicata, sur les trois répétitions biologiques de chaque infection, pour confirmer les données générées par les analyses de puces. Des amorces spécifiques ont été synthétisées pour le gène codant pour une protéine possédant des motifs semblables au facteur de transcription MYB (MYB-like1; At1g69160), pour le gène codant pour l'histone 1-3 (HIS1-3; At2g18050) et pour le gène codant pour une protéine « no apical meristem » (NAM; At3g29035). Ce dernier gène n'était pas sélectionné dans les treize gènes puisque son ratio est légèrement sous deux (1,98). L'accumulation des transcrits MYB-like1 et HIS1-3 a été évaluée à environ 4,0 et 2,3 fois sur-exprimés dans les plantes infectées avec TuMV-lox (Figure 19) pouvant être comparé à leur sur-expression de 4,46 et 3,36 fois observée par les analyses de puces. La sous-expression d'environ 1,1 fois de NAM calculée par PCR en temps réel était moins comparable à l'expression observée par les analyses de puces qui notait une sur-expression de 2,2 fois de ce gène. Il est possible que des augmentations d'expression aussi faibles que 2,2, 3,4 et 4,5 fois soient difficiles à évaluer exactement par des analyses de PCR en temps réel compte tenu de la variabilité entre les échantillons biologiques (environ 1,4 cycles) et du fait qu'un seul cycle représente déjà une augmentation de deux fois dû au caractère exponentiel des analyses PCR.

3. Régulation par les microARN

L'expression différentielle de certains facteurs de transcription dans les plantes infectées par le TuMV-lox représentait un élément intéressant. Une diminution dans l'expression de certains facteurs de transcription a été démontrée comme étant le résultat d'une

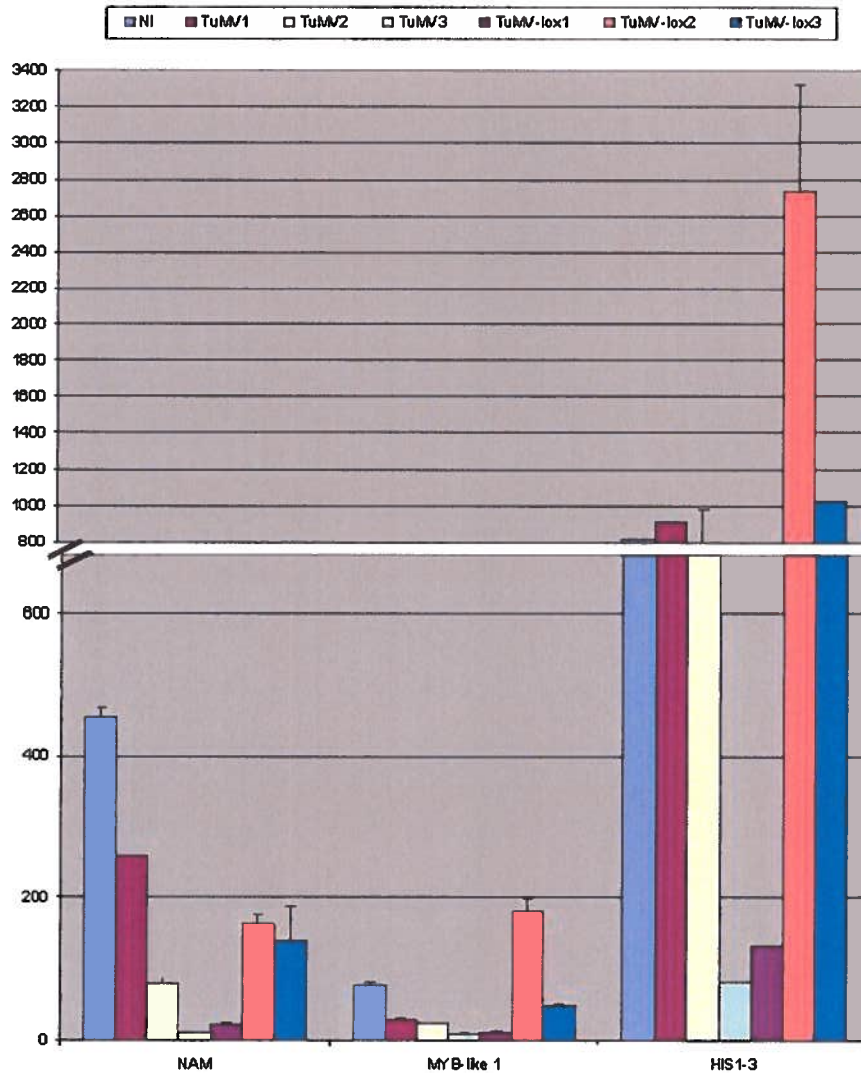


Figure 19. Quantification des transcrits MYB-like1, HIS1-3 et NAM dans les plantes d'*Arabidopsis thaliana* infectées avec le TuMV sauvage et le TuMV-lox. L'ARN total extrait à partir des feuilles de rosette de plantes infectées avec TuMV sauvage et TuMV-lox a été utilisé pour effectuer une transcription inverse. Dix nanogrammes d'ADNc ont été utilisés pour procéder aux analyses PCR en temps réel. Une plante non-infectée (NI) a été utilisée comme témoin. La quantification a été standardisée par rapport à la quantification du facteur de transcription stable *ATHB6* dans ces mêmes échantillons.

régulation par les microARN. Il s'agit d'une régulation négative opérée sur certains gènes, dont certains facteurs de transcription, responsables de l'expression d'autres gènes impliqués dans différentes étapes du développement de la plante (Ambros, 2001 ; Park *et al.*, 2002; Pasquinelli et Ruvkun, 2002; Rhoades *et al.*, 2002; Palatnik *et al.*, 2003). Lorsque la régulation par les microARN est affectée d'une manière quelconque, les plantes montrent des anomalies développementales (Park *et al.*, 2002; Schauer *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003). La protéine HcPro responsable de la suppression du PTGS peut aussi être impliquée dans la régulation des microARN compte tenu de la très grande ressemblance dans le mécanisme de production et d'action des microARN et des siARN. La seule différence majeure entre ces deux mécanismes réside dans l'origine des petits ARN. La formation des microARN origine d'un gène codé dans le génome des plantes nommé gène *MIR*. Ce gène ne code pas pour une protéine et le transcrit résultant contient une structure tige-boucle imparfaite (Pasquinelli et Ruvkun, 2002; Ambros *et al.*, 2003). C'est à partir de cette structure double brin que DICER produit les petits ARN de 21 nucléotides de long nommés microARN (miARN) (Bartel, 2004). Les miARN sont par la suite introduits dans un complexe RISC pour guider le clivage des transcrits possédant une homologie de séquence avec eux.

Les bases moléculaires pour expliquer les maladies induites par un virus ont longtemps été un mystère. L'infection d'*Arabidopsis* par le TuMV induit de nombreuses déficiences développementales dans les organes végétatifs et reproducteurs. Compte tenu des similitudes entre le patron développemental contrôlé par les miARN et le patron anti-viral de « silencing » de l'ARN, la protéine HcPro semble avoir également un rôle de suppression de la régulation par les miARN (Chapman *et al.*, 2004). Des plantes exprimant la protéine HcPro ont montré plusieurs anomalies développementales ressemblant à celles observées avec une plante mutée dans une des étapes de régulation par les miARN (Kasschau *et al.*, 2003). Cette équipe a trouvé que les déficiences observées, plusieurs de lesquelles ressemblaient à celles observées dans un mutant déficient pour « dicer-like 1 » (*dcl1*), étaient causées par le suppresseur de « silencing » codé par TuMV, c'est-à-dire HcPro. *Dcl1* est à l'origine de la production des miARN à partir d'un précurseur double brin. Puisque dans les plantes exprimant HcPro les miARN

s'accumulent, leur production n'était donc pas altérée par l'expression de HcPro. HcPro pourrait donc agir en inhibant la fonction nucléotidique guidée par les miARN, ce qui permettrait l'accumulation des ARNm ciblés pour ce clivage. C'était ce qu'ont observé Kasschau *et al.* (2003) avec miARN 171 qui guide le clivage de plusieurs ARNm dont ceux codant pour les facteurs de transcription de la famille des « Scarecrow-like ». Dix autres ARNm étaient validés comme étant des cibles pour le clivage guidé par les miARN. De ces dix, huit s'accumulaient à des niveaux plus élevés en présence de P1/HcPro. La base moléculaire pour expliquer les maladies induites par le TuMV et d'autres virus dans les plantes pourrait donc être partiellement élucidée. Une interférence dans le patron développemental contrôlé par les miARN pourrait être à l'origine de ces maladies végétales causées par les virus.

Plusieurs miARN ont été découverts dans les plantes. En synthétisant l'anti-sens de ces séquences, il est possible par des analyses de type Northern de les utiliser comme sonde pour hybrider des échantillons d'ARN et ainsi observer leur accumulation. Des puces d'ADN sont également disponibles où tous les miARN répertoriés dans une plante ont été fixés sur un support qui peut être hybridé par la suite avec des échantillons d'ARNc pour détecter l'accumulation des miARN dans différents échantillons.

Des analyses de type Northern ont donc été effectuées sur nos échantillons d'ARN extraits de plantes d'*A. thaliana* infectées avec le TuMV sauvage et le TuMV-lox. Les séquences anti-sens de miARN, dont l'accumulation avait déjà été démontrée comme étant affectée par l'expression d'une protéine HcPro par Kasschau *et al.* (2003), ont été synthétisées. Il s'agissait des miARN 156, 160, 164, 167, 171 et 172. Deux autres séquences de miARN ont été synthétisées puisqu'elles possédaient des homologies de séquences avec deux transcrits provenant de gènes sélectionnés dans les analyses de puces précédemment exposées. Le miARN 164* possédait une homologie de séquence avec HIS1-3 et le miARN 394 possédant une homologie de séquence avec MYB-like1. Ces miARN ont été utilisés comme sonde pour hybrider les échantillons d'ARN extraits des plantes infectées avec TuMV sauvage et TuMV-lox. Seuls les miARN 167 et 171 ont été détectés dans nos échantillons (Figure 20). L'accumulation de miARN 167 semblait

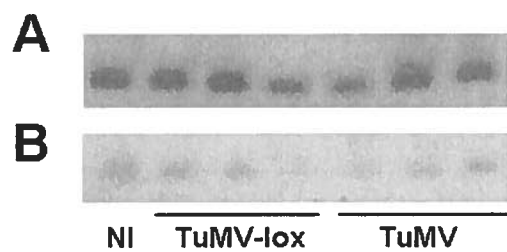


Figure 20. Analyse de l'accumulation du miARN 167 et 171 dans les plantes d'*A. thaliana* infectées avec le TuMV sauvage et le TuMV-lox. L'ARN extrait de trois plantes infectées avec le TuMV sauvage et trois plantes infectées avec TuMV-lox a été hybridé avec les sondes correspondantes aux séquences des miARN A) 167 et B) 171. L'ARN extrait d'une plante non-infectée (NI) a été utilisé comme témoin.

similaire que ce soit dans les plantes non-infectées que dans les plantes infectées avec TuMV sauvage ou TuMV-lox. L'accumulation de miARN 171 était très faible dans les plantes non-infectées comparativement aux plantes infectées avec le virus. Par contre, son accumulation dans les plantes infectées avec TuMV sauvage ou TuMV-lox n'était pas différente. Ces résultats ne nous permettent pas de mentionner que l'insertion de quatorze acides aminés dans la séquence de HcPro affecte son rôle de suppression de la régulation par les miARN.

CHAPITRE V

DISCUSSION

L'objectif général était de produire des plantes transgéniques pour un réplicon basé sur le génome du TuMV dans un but éventuel de production de protéines recombinantes. Pour ce faire, le génome du TuMV a été génétiquement modifié de façon réversible pour empêcher sa réplication. La copie d'ADN modifié a été introduite dans le génome de plantes *d'A. thaliana* et de *N. tabacum*. Les plantes transgéniques produites ne montraient aucun signe d'infection virale. La réplication virale a ensuite été réactivée suite à un événement de recombinaison. Le chapitre III a démontré les résultats obtenus lors de ces expériences et la section 1 du présent chapitre discute ces résultats.

Une forme modifiée du TuMV a été produite au cours de ce travail. Les plantes infectées par ce TuMV modifié montraient des symptômes beaucoup moins sévères que ceux observés lors d'une infection par le virus sauvage, bien que la production de particules virales était du même ordre. Une caractérisation moléculaire a donc été entreprise afin de déterminer quel processus cellulaire pouvait bien être affecté. Le chapitre IV a fait mention des résultats de cette caractérisation et la section 2 du présent chapitre discutera de cette caractérisation.

1. Développement du réplicon viral

Les tentatives de production de plantes transgéniques pour une copie ADN du TuMV sous le contrôle du promoteur CaMV 35S n'ont jamais été fructueuses. D'autres travaux ont également montré la difficulté de régénérer des plantes transgéniques pour un vecteur viral actif (Palmer et Rybicki, 1997; Palmer, Thomson et Rybicki, 1999). Par exemple, des plantes transgéniques pour le *tobacco mosaic virus* (TMV) (Yamaya *et al.*, 1988) ou

le *potato leafroll virus* (PLRV) (Franco-Lara *et al.*, 1999; Prüfer *et al.*, 1997) montraient des retards de croissance. Dans le cas de plantes transgéniques pour le PVX, la réplication virale était nettement moindre que celle observée lors d'une infection systémique (Angell et Baulcombe, 1997). L'utilisation de promoteurs inductibles pour contrôler l'expression du réplicon viral semblait initialement une solution à ce problème (Mori *et al.*, 2001). Nous avons alors tenté d'exprimer le vecteur viral TuMV sous le contrôle d'un promoteur inductible par le dexaméthasone. Toutefois, nous avons observé une production du virus en conditions de non-induction qui nous empêchait de régénérer des plantes. En effet, la majorité de ces promoteurs ne sont pas suffisamment étanche transcriptionnellement (Padidam, 2003), et un seul événement de transcription pouvait être suffisant pour produire une infection virale. Nous avons alors émis l'idée que la réactivation de la réplication virale par un système de recombinaison par Cre pouvait introduire un autre élément de contrôle pour empêcher tout événement de « fuite ». Ici, une concentration seuil de Cre devait être atteinte avant qu'il ait recombinaison : une production basale ne devait donc pas conduire à une réactivation du réplicon.

1.1 Recombinaison *in vitro*

Une étape clé de la stratégie envisagée a été de s'assurer que la recombinaison par la recombinase Cre sur le vecteur viral non réplcatif était précise. L'utilisation d'une recombinase Cre purifiée nous a permis de reproduire l'événement de recombinaison en éprouvette. La séquence résultante de plusieurs plasmides isolés montrait effectivement une recombinaison spécifique aux sites *loxP*. Le vecteur viral était exempt du signal de terminaison de la traduction et ne contenait qu'un seul site *loxP*. Celui-ci était en phase avec le cadre de lecture de la séquence virale. Lors du clivage des protéines virales P1 et HcPro, le site *loxP* restant faisait partie intégrante de la protéine HcPro et ajoutait quatorze acides aminés à l'extrémité N-terminal de la protéine. La majorité de ces résidus additionnels étaient hydrophyles, non chargés et polaires. Klein *et al.* (1994) ont produit une série de mutants HcPro dans lequel quatre acides aminés étaient introduits à différents emplacements dans la séquence protéique. Le premier mutant possédait une

insertion au 405^{ième} nucléotide de la séquence codant pour HcPro, le deuxième mutant au 527^{ième}, le troisième au 964^{ième} et le quatrième au 1228^{ième} nucléotide. Trois de ces mutants montraient une accumulation d'ARN viral ou de protéines CP diminuée ou complètement absente ainsi qu'une impossibilité d'engendrer une infection systémique dans les plantes infectées. Seul le mutant possédant l'insertion au 964^{ième} nucléotide de la séquence codant pour HcPro accumulait l'ARN viral de l'ordre de 35 à 60% de l'accumulation observée dans des plantes infectées avec le virus sauvage ainsi qu'une infection systémique dans les plantes infectées. Par contre, cette infection systémique était observée avec un délai de trois jours comparativement aux plantes infectées avec le virus sauvage. Ceci montre donc que l'insertion d'aussi peu que quatre acides aminés dans la séquence codant pour HcPro peut provoquer des diminutions du niveau d'infection de ces virus.

1.2 Recombinaison *in planta*

Une deuxième étape importante de la stratégie a été de s'assurer qu'aucune activation de la réplication du virus n'était possible sans l'apport exogène de Cre. Compte tenu que la traduction d'une seule copie du virus peut mener à la réplication et à la reproduction de centaine d'autres copies, le système de recombinaison se devait d'être très étanche. L'agro-infiltration de *N. benthamiana* avec la construction pGreenTuMV-flox nous a permis d'observer ce qui se produirait dans les plantes transgéniques. L'absence de CP, deux semaines après l'infiltration de ces plantes, démontrait l'absence d'activité « cre-like » dans les plantes. De plus, dans des plantes agro-infiltrées avec les constructions pGreenTuMV-flox et pGreen35SCre ou pGreenPVX-Cre, l'accumulation de CP démontrait que la recombinaison menant à la traduction et à la réplication du virus était très spécifique.

1.3 Transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana* et de *Nicotiana tabacum*

Une fois ces vérifications faites, nous avons été en mesure de procéder à la transgénèse avec les constructions produites. Les plantes transgéniques étaient asymptomatiques et avaient un taux de croissance similaire à celui observé avec des plantes non transgéniques. L'apparence normale de ces plantes et l'absence de réplication virale (confirmée par immunobuvardage avec le serum anti-CP) dans celle-ci confirmaient la fiabilité du système. Cette fiabilité résulte dans l'absence d'activité « Cre-like » dans les plantes, du moins pour *A. thaliana*, *N. tabacum* et *N. benthamiana*, et dans la nécessité d'atteindre une concentration seuil de Cre pour exercer la recombinaison. Dans le cas des plantes doubles transgéniques (i.e. TuMV-flox et XVE-Cre) une expression basale de Cre était prévue (Böhner *et al.*, 1999). Par contre, le niveau de recombinase résultant de cet événement n'était apparemment pas suffisamment élevé pour réactiver le réplicon. La majorité des travaux utilisant le système Cre/loxP dans les plantes pour exciser un fragment d'ADN mentionnent effectivement l'importance de la concentration de Cre (Russell, Hoopes et Odell, 1992; Gleave *et al.*, 1999; Mlynárová et Nap, 2003). Nagy (2000) mentionnait que la recombinaison effectuée par Cre est à la base un événement purement stochastique qui prend du temps et qui dépend de l'expression de Cre. Récemment, Kasim, Miyagishi et Taira (2004) ont démontré que le taux de recombinaison effectuée sur une molécule d'ADN permettant d'éliminer l'expression du gène *luc* était augmenté plus la concentration de Cre dans les cellules était elle aussi augmentée.

1.4 Évaluation de l'état transgénique des plantes transformées

Les analyses PCR confirment la présence des transgènes entiers. Le nombre de copies de chacun des transgènes a été évalué sur les plantes de *N. tabacum* uniquement. Dans les plantes transgéniques pour TuMV-flox, une seule copie du transgène a été insérée alors que le transgène XVE-Cre a été inséré en une à six copies. Les analyses RT-PCR

quantitatif sur tous les transgènes ont montré que les cassettes XVE et du vecteur viral inactif avec sa séquence GUS étaient transcrites, suggérant que le PTGS n'avait apparemment pas été induit. Ceci était confirmé par la présence d'activité GUS.

1.5 La réactivation de la réplication virale dans les plantes transgéniques

La réactivation de la réplication virale était obtenue par un événement de recombinaison par la recombinaise Cre. Cre était synthétisée à travers trois systèmes d'expression. L'expression par agro-infiltration avec pGreen35S-Cre, par agro-infection avec pGreenPVX-Cre et par induction à l'estradiol à partir de la cassette XVE-Cre introduite dans les plantes TuMV-flox. La réactivation a été observée dans toutes plantes pour lesquelles Cre avait été produite par agro-infiltration ou par le vecteur PVX. La quantité de CP dans les plantes infiltrées avec PVX-Cre était en apparence plus abondante que celle observée dans les plantes infiltrées avec 35S-Cre. Cette différence vient probablement de la production différente de Cre. En effet, on s'attend à ce que la recombinaise produite par le vecteur PVX s'accumule en plus grande quantité, comparativement à pGreen35SCre. Également, la fenêtre de temps pour l'expression de Cre à partir de PVX pourrait être plus large.

La recombinaison n'a cependant pas eu lieu dans toutes les plantes lorsque Cre était produite suivant l'application de l'estradiol. Plusieurs procédures d'application de l'estradiol ont été essayées. Les procédures les plus couramment employées sont : 1) l'ajout d'inducteur au milieu synthétique (*in vitro*), 2) l'ajout d'inducteur au milieu liquide (culture hydroponique), 3) la vaporisation des feuilles avec l'inducteur en solution et 4) l'arrosage de la plante avec l'inducteur en solution (Aoyama et Chua, 1997 ; Caddick *et al.*, 1998; Salter *et al.*, 1998; Böhner *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 1999; Böhner et Gatz, 2001; Zuo *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2003). Toutes ces approches ont été essayées. Dans chaque cas, les conditions d'induction ont été évaluées sur des *A. thaliana* transgéniques pour le gène GUS sous le contrôle du même promoteur inductible à

l'estradiol. Les plantes ont exprimé le gène GUS pour toutes les conditions d'application testées.

Les systèmes d'expression inductible ne fonctionnent pas de façon équivalente dans toutes les espèces de plantes. Par exemple, le système de dé-répression basé sur TetR ne fonctionne pas dans *A. thaliana* probablement parce qu'il requiert une concentration plus élevée de répresseur TetR pour une expression efficace et que cette concentration est intolérable pour la plante (Zuo et Chua, 2000). Donc, il est possible que le système développé dans nos recherches ne soit pas adapté aux plantes de *N. tabacum* SR1 cultivar *Petite Havana*. Par contre, la majorité des expériences utilisant un système inductible à l'estradiol ont été effectuées avec succès sur des plantes d'*A. thaliana*, de *N. benthamiana* et de *N. tabacum* de différents cultivars. La tomate et le riz ont été utilisés plus récemment avec succès pour le système estradiol (Pedley et Martin, 2004; Sreekala *et al.*, 2005). Le fait que *N. tabacum* ne soit pas un hôte où l'infection systémique par le TuMV est possible pourrait être à l'origine des difficultés à réactiver la réplication de celui-ci dans cette plante. Une infection uniquement locale dans ces plantes traduit certainement la présence d'une réponse anti-virale forte et efficace. D'autres raisons potentielles pour expliquer la grande difficulté à activer notre système d'expression dans notre cultivar de tabac pourraient être qu'il nécessite une concentration d'estradiol, plus élevée que celles que nous avons testées (3 à 60 μ M). L'induction en sol peut être plus difficile puisque le sol peut représenter un obstacle à l'apport de l'estradiol vers les racines. Par contre, en culture hydroponique l'estradiol devrait être facilement accessible aux racines étant donné le contact direct. Cette technique devrait être équivalente à l'induction sur milieu synthétique solide puisque les racines sont aussi en contact direct avec l'agent inducteur. Malgré tout, cette technique n'était pas plus efficace. La vaporisation d'une solution d'estradiol sur les feuilles des plantes aurait également pu être un moyen efficace, ce qui n'était pas le cas non plus. Il est possible que l'épaisseur de la cuticule soit responsable de l'échec de cette méthode. En effet, les feuilles de tabac sont beaucoup plus épaisses que celles d'*A. thaliana*. Cette caractéristique peut également expliquer le fait que l'infiltration d'estradiol dans ces plantes est pratiquement impossible tout comme l'agro-infiltration.

Cependant, la réactivation a été obtenue avec *A. thaliana*. Par contre, la germination sur un milieu contenant de l'estradiol n'était pas suffisante, ainsi qu'un seul contact de 48 heures avec l'inducteur. Les plantes devaient être en contact avec l'inducteur pour une période minimum de 96 heures qu'elles aient ou non germées sur un milieu contenant de l'estradiol. La CP était absente chez les plantes non traitées à l'estradiol. Par contre, la réactivation virale n'a jamais été observée dans plus de 20% des plantes traitées. Ce faible pourcentage peut refléter le fait que la production de Cre à partir de promoteurs inductibles n'est pas uniforme et que les quantités de transcrits sont inférieures à ceux observés avec le promoteur CaMV 35S (Böhner *et al.*, 1999; Zuo *et al.*, 2000a).

Le pourcentage de cellules où la recombinaison a eu lieu n'a pas été calculé mais des colorations histochimiques pour l'activité de GUS indique que la recombinaison avait lieu dans la majorité des cellules. Des études rapportent des fréquences de recombinaison de 48 à 82% lorsque Cre était produite par le PVX (Kopertekh, Juttner et Schiemann, 2004) et 29 à 66% lorsque que Cre est produite par un système inductible (Zuo *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1997).

Nous avons noté un long délai (environ deux semaines) avant que l'accumulation de la CP soit détectée. Normalement, la réplication virale est observée dans les 48 à 72 heures suivant la transfection de protoplastes avec l'ARN génomique (Li et Carrington, 1995). Selon nos estimations, le temps requis pour que Cre soit exprimée est d'environ six heures suivant l'induction de l'estradiol, ou 48 à 72 heures lors de l'agro-infiltration. Des travaux ont montré que la recombinaison avait lieu entre 18 et 42 heures suivant l'expression de Cre (Hoff, Schnorr et Mundy, 2001; Zuo *et al.*, 2001). Il y aurait donc un délai de 12 jours entre l'événement de recombinaison et l'accumulation de CP.

Kopertekh, Juttner et Schiemann (2004) ont obtenu des résultats similaires. Cre était exprimé par PVX et la recombinaison a été observée que dix jours suivant l'infection. On peut penser que le temps nécessaire pour que la copie ADN du génome viral puisse conduire à une infection est relativement long. Dans l'expérience de Kopertekh, Juttner et

Schiemann (2004), le temps nécessaire pour que PVX débute sa multiplication ferait en sorte que Cre serait exprimée plutôt tardivement.

Ce délai pourrait être expliqué par le fait que le TuMV est un virus à ARN de polarité positive. La réplication s'effectue dans le cytoplasme et le génome viral n'entre jamais dans le noyau. Lorsque la copie d'ADN du génome viral est introduite dans une plante via *Agrobacterium*, elle doit forcément se retrouver dans le noyau pour permettre la transcription en ARN. Les transcrits sont ensuite « processés » par la machinerie de traitement des pré-ARNm (épissage) avant d'être expédiés au cytoplasme pour la traduction. Il semble donc que l'ARN viral ne soit pas optimisé pour un transit nucléaire, entre autre par la présence des sites cryptiques d'épissage. Marillonnet *et al.* (2005) ont procédé à de nombreuses modifications sur un réplicon TMV. Ils ont éliminé toutes séquences qui pouvaient nuire à la reconnaissance par la machinerie cellulaire des transcrits viraux et additionné des introns dans la séquence virale. Avec ce TMV modifié et le TMV sauvage, dans lesquels la séquence codante pour une protéine fluorescente verte (GFP) était introduite, des expériences d'agro-infiltration sur des plantes de *N. tabacum* et *N. benthamiana* ont été effectuées. Différentes dilutions des suspensions bactériennes étaient utilisées (10^{-1} à 10^{-6}). Aucun foyer d'expression de GFP n'était observé dans les plantes infiltrées avec une suspension bactérienne TMV sauvage diluée à moins de 10^{-3} . Alors que dans les plantes infiltrées avec une suspension bactérienne TMV modifié diluée à 10^{-4} , le nombre de foyers d'expression de GFP était équivalent à celui dénombré dans les plantes infiltrées avec une suspension bactérienne TMV sauvage diluée 10^{-1} . Ceci permettait d'estimer que les modifications apportées au vecteur viral augmentaient de 1000 fois l'efficacité du virus à initier sa réplication.

Deuxièmement, le réplicon TuMV produit un transcrit beaucoup plus long que la taille des ARNm cellulaires. La production de ces longs transcrits pourrait induire une réponse cellulaire anti-virale, par exemple du PTGS. Cette hypothèse a été confirmée par Chiba *et al.* (2005). Ils ont testés deux constructions qui permettaient l'expression de GFP dans des plantes de *N. benthamiana* par agro-infiltration. Une première construction contenait le gène *gfp* sous le contrôle d'un promoteur CaMV 35S. Une deuxième construction

contenait une copie de la séquence codante pour les protéines essentielles à la réplication du *beet yellow virus* (BYV) dans laquelle était inséré le gène *gfp*. La première construction permettait une expression élevée de la protéine GFP dans un grand pourcentage des cellules agro-infiltrées. Par contre lorsque la GFP était exprimée par l'entremise du réplicon viral, la présence de GFP était observée que dans quelques cellules. L'expression en *trans* d'une protéine capable de supprimer le phénomène de PTGS augmentait de façon marquée le pourcentage de cellules exprimant GFP. Ainsi donc, le délai dans l'accumulation de CP de TuMV pourrait s'expliquer par le PTGS.

1.6 Conclusion

Mes études ont mené à la production de plantes d'*A. thaliana* transgéniques pour le TuMV-flox. Malgré le délai observé dans la réactivation de la réplication du virus dans ces plantes, celle-ci s'effectue adéquatement lorsque la recombinaise Cre est exprimée dans ces plantes. L'expression de Cre à partir d'un réplicon viral PVX représente la meilleure méthode pour réactiver la réplication du virus. La réplication du virus suivant cette réactivation nous montre par contre des effets d'infection sur les plantes infectées très différents de ceux observés sur des plantes infectées avec le virus TuMV sauvage.

2. Caractérisation du TuMV-lox

Suite à la recombinaison, un site *loxP* demeure dans le génome viral. La présence de ce site ne nuit pas à la réplication virale, mais les plantes infectées montrent des symptômes atténués. Suite à l'infection de *B. perviridis* par TuMV-lox, nous avons observé une différence de croissance et de symptomatologie par rapport à une infection par le virus sauvage. Cependant, ces différences phénotypiques n'étaient pas accompagnées par une diminution dans la quantité de CP. Des résultats similaires ont été observés avec *A. thaliana* et *N. benthamiana*. Comparativement à ce qui a longtemps été cru, que l'apparition des symptômes était directement reliée à l'infection systémique par un virus

(Hull, 2002), ces résultats semblaient plutôt dénoter la dissociation de ces deux phénomènes.

Le site *loxP* dans le génome du TuMV code pour quatorze acides aminés qui sont fusionnés à l'extrémité N-terminale de HcPro. La protéine HcPro est une protéine multifonctionnelle qui interagit avec elle-même pour former un dimère. HcPro interagit également avec la CP pour favoriser la transmission du virus d'une plante à l'autre par l'intermédiaire de pucerons (Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005) et aussi avec une protéine rgsCaM (protéine « calmoduline-like » régulateur de gene silencing) cellulaire pour son action de répression du PTGS (Anadalakshmi *et al.* 2000).

Plusieurs travaux ont fait état de modifications de HcPro qui avaient de conséquences sur la virulence. La majorité de ces modifications consistait en des remplacements d'acides aminés et des délétions. Atreya *et al.* (1992) ont montré que le remplacement d'acides aminés dans une région riche en cystéines présente à l'extrémité N-terminale de la protéine HcPro affectait la transmission du virus par les pucerons. Ils ont également montré que ces mutations affectaient l'accumulation de l'ARN viral et des protéines. Par contre, cette dernière observation semblait être restreinte au *tobacco vein mottling virus* (TVMV) puisque les mêmes mutations introduites dans HcPro d'autres virus tels le *potato virus C* (PVC) et le *potato virus Y* (PVY) ne montraient aucune altération au niveau de l'accumulation du virus. D'ailleurs, une caractérisation structurale récente de HcPro semble effectivement montrer qu'une délétion dans la région N-terminale n'affecte en rien l'accumulation du virus et que seule la transmission du virus par les pucerons est affectée (Plisson *et al.*, 2003). D'autres équipes de recherche avaient également observé ces résultats (Dolja *et al.*, 1993 et 1997; German-Retana *et al.*, 2000).

2.1 Le PTGS et le synergisme

HcPro est un suppresseur de PTGS. Notre hypothèse était donc que l'insertion de quatorze acides aminés avait modifié l'efficacité de suppression du PTGS. Une méthode

pour analyser l'efficacité de suppression du PTGS est le synergisme. Les analyses de synergie réalisées sur des plantes infectées avec PVX et TuMV-lox ou TuMV sauvage montrent que l'efficacité de suppression du PTGS est quelque peu réduite avec TuMV-lox. L'accumulation de PVX dans les plantes infectées avec le TuMV sauvage comparativement au PVX seul était environ huit fois supérieure à celle observée en absence d'infection par TuMV. Vance *et al.* (1995) avaient montré que cette accumulation était de 12,8 à 16 fois supérieure pour les transcrits de polarité négative et de 2,5 à 3,3 fois supérieure pour les transcrits de polarité positive lorsque les plantes étaient infectées avec le PVY. La différence observée dans l'augmentation des transcrits de polarité négative dans nos expériences et celles de Vance *et al.* (1995) peut s'expliquer par le fait que nous n'utilisons pas les mêmes virus codant pour la protéine HcPro. Par contre, la grande variabilité observée autant dans nos données d'accumulation des transcrits d'une répétition biologique à l'autre que dans celles obtenues par Vance *et al.* (1995) pourrait s'expliquer par le fait qu'une infection virale dans une plante ne se conduit pas nécessairement de la même façon dans une autre plante. Il s'agit d'évènements totalement indépendants. L'accumulation des transcrits de polarité positive et négative de PVX était moins importante dans les plantes infectées avec le TuMV-lox que celles infectées avec le TuMV sauvage. Cependant, il y avait plus de PVX en présence de TuMV-lox qu'en absence, indiquant qu'il y avait tout de même synergisme avec cette forme viral du TuMV. La baisse dans le niveau de synergisme pourrait venir d'une plus faible concentration de HcPro dans les plantes infectées avec TuMV-lox. Cependant, l'accumulation des transcrits TuMV ne montre pas de différence significative entre les plantes infectées avec TuMV-lox ou TuMV sauvage. En conclusion, la baisse d'accumulation des transcrits PVX dans les plantes infectées avec le TuMV-lox pourrait être reliée à la modification de HcPro.

2.2 Les MicroARN

Kasschau *et al.* (2003) ont montré que certains miARN s'accumulaient plus fortement dans les plantes infectées par le TuMV qu'en absence d'infection. Le même phénomène a

été observé avec des plantes transgéniques pour HcPro. Il semble donc que HcPro puisse également avoir un rôle à jouer dans le métabolisme des miARN. Notre hypothèse serait alors que la modification de HcPro pourrait en quelque sorte rétablir l'accumulation des miARN et ainsi diminuer la sévérité des symptômes observés chez les plantes infectées avec le TuMV-lox. Puisque HcPro pourrait altérer la régulation des miARN, le patron d'accumulation de certains de ceux-ci a été analysé dans les plantes infectées avec le TuMV sauvage ou le TuMV-lox. Nous avons choisi quelques miARN qui avaient été analysés par Kasschau *et al.*, (2003). Le miARN 167 montrait une accumulation similaire dans les plantes non-infectées et infectées, autant par le TuMV sauvage que lox. Les résultats de Carrington ont montré plutôt que miARN 167 augmentait de 3,5 fois dans des plantes infectées ou exprimant HcPro par rapport à des plantes non-infectées ou non-transgéniques. Pour ce qui est du miARN 171, celui-ci était très faiblement exprimé dans les plantes non-infectées alors que son expression augmentait considérablement dans les plantes infectées, autant par le TuMV sauvage que lox. Les résultats de Kasschau *et al.* (2003) montraient plutôt une augmentation très légère de l'expression de ce miARN dans les plantes infectées ou exprimant HcPro comparativement aux plantes sauvages qui malgré tout montraient un niveau d'expression de miARN 171 relativement élevé. Nos résultats sont donc quelque peu différents de ceux obtenus par l'équipe de Carrington (Kasschau *et al.*, 2003). L'absence de différence dans l'accumulation des deux miARN dans les plantes infectées avec TuMV sauvage ou TuMV-lox nous porte à penser que la modification de HcPro n'affecte pas son rôle de suppression dans le mécanisme de régulation par les miARN.

2.3 Expression des gènes d'*Arabidopsis thaliana* lors d'une infection avec le TuMV-lox

Les symptômes suite à une infection par le TuMV-lox étaient différents de ceux observés avec le virus sauvage, bien que la production de virus était la même. Il était donc intéressant de voir quels gènes de l'hôte pouvaient être affectés. Des analyses de puces à ADN nous ont permis de pointer treize gènes sur-exprimés dans les plantes infectées avec

TuMV-lox. Ces gènes peuvent être regroupés dans plusieurs catégories de fonctions. Quelques-uns sont impliqués dans la défense de la plante, dans l'organisation cellulaire, dans la transduction de signal ou dans la transcription des gènes.

2.3.1 Gène impliqué dans la floraison

Malgré l'absence de phénotype évident pour la floraison ou l'identité des organes floraux, l'augmentation de l'expression du locus T de la floraison (FT; Atlg65480) est à noter pour les plantes infectées avec TuMV-lox. Chez les plantes, la floraison constitue un procédé développemental pouvant survenir de manière autonome. Plus régulièrement il s'agit d'un procédé développemental réagissant aux variables exogènes telles la lumière et la température et/ou aux variables endogènes telles l'état nutritionnel et hormonal de la plante. En condition de jour long, le facteur de transcription nommé CONSTANS (CO) est exprimé. CO possède deux cibles bien connues, le suppresseur de la sur-expression de CONSTANS 1 (SOC1) et le locus T de la floraison (FT). Ces deux gènes sont considérés comme des intégrateurs floraux qui doivent atteindre un niveau d'expression adéquat pour initier la floraison. Malgré que le gène CO n'ait pas été sélectionné dans les treize gènes de notre analyse, il était tout de même présent dans les 1 926 gènes retenus avant l'analyse rigoureuse. L'expression de CO dans les plantes infectées avec TuMV sauvage correspondait à un signal de 44 unités. Alors que dans les plantes infectées avec TuMV-lox, le signal d'expression de CO était augmenté à 104 unités. Dans les plantes infectées avec le TuMV sauvage, le signal correspondant à l'expression de FT était pour sa part de 182 unités pendant qu'il était augmenté à 534 unités dans les plantes infectées avec TuMV-lox. Qu'elles soient infectées avec TuMV sauvage ou TuMV-lox, les plantes étaient toutes sous les mêmes conditions environnementales. L'augmentation de l'expression de CO ainsi que de FT doit donc provenir d'une autre source.

Deux miARN, le 172 et le 159, ont été identifiés comme jouant un rôle spécifique dans le développement des plantes, incluant la régulation de la floraison et l'identité des organes floraux (Aukerman et Sakai, 2003; Chen, 2004; Achard *et al.*, 2004). Puisque la

régulation par les miARN affecte régulièrement l'expression des facteurs de transcription, il est possible que l'expression du gène CO soit régulée par ceux-ci ce qui affecterait également l'expression du gène FT. Maintenant que de plus en plus d'études montrent l'implication de la protéine HcPro dans la suppression de la régulation par les miARN, l'infection des plantes avec un virus codant pour HcPro pourrait affecter l'expression de certains gènes. S'il y a suppression de la régulation par les miARN de CO, son expression serait augmentée ainsi que celle des gènes sous son contrôle tel FT. Par contre, l'effet causé sur la régulation par les miARN d'une protéine HcPro modifiée pourrait être différente. Dans cette optique, les résultats obtenus dans notre expérience tendraient vers un effet accru de suppression sur la régulation par les miARN de HcPro modifiée. Par contre, l'impossibilité d'observer une quelconque accumulation du miARN 172 dans nos échantillons ne permet pas de prouver cette hypothèse.

2.3.2 Gène impliqué dans la réponse au calcium

L'expression d'un autre gène codant pour une protéine kinase interagissant avec une « calcineurine B-like » ou CBL (CIPK20; At5g45820) augmentait dans les plantes infectées avec le TuMV-lox comparativement aux plantes infectées avec le TuMV sauvage. Ce gène donnait un signal de 181 unités pour des plantes infectées avec le TuMV sauvage. Par contre, dans les plantes infectées avec TuMV-lox, le signal était de 502 unités.

Suite à une infection par un agent pathogène, les plantes réagissent pour instaurer une barrière de défense efficace. Une des nombreuses réactions physiologiques chez les plantes infectées est la modification de la concentration du calcium (Kaufman, 1999; Clough *et al.*, 2000). L'infection par un agent pathogène n'est pas le seul phénomène qui engendre une modification dans la répartition du calcium, d'autres phénomènes comme les changements de températures par exemple en sont également responsables. Ces différents états du calcium sont nommés des signatures du calcium. Plusieurs protéines, dont fait partie la « calcineurine B-like », ont la capacité de reconnaître les différen

signatures et de lier le calcium. Ces protéines sont nommées des senseurs de calcium. La liaison du calcium par les senseurs modifie leur conformation et leur permet de s'associer à une autre protéine pour transmettre le signal. La « calcineurine B-like » lié au calcium peut s'associer à une protéine kinase tel CIPK20. Les protéines kinases sont à leur tour impliquées dans la transduction de signal jusqu'à une réponse cellulaire associée au stress initial.

Dans nos expériences, on pourrait peut être penser que les deux formes du virus peuvent produire deux signatures de calcium différentes. Ces différentes signatures ne seraient probablement pas reconnues par les mêmes senseurs de calcium et ainsi les protéines de transduction du signal pourraient ne pas être les mêmes également. Par contre, dans nos expériences, de tous les gènes CBL identifiés chez *A. thaliana* la grande majorité est sur-exprimée dans les plantes infectées répondant probablement au calcium produit lors de l'infection mais la majorité est exprimée au même niveau que les plantes soient infectées avec le TuMV sauvage ou avec le TuMV-lox. Les mêmes résultats étaient également observés lorsque tous les gènes CIPK, autre que CIPK20, étaient analysés. Peut être que la signature de calcium provoquée par une infection avec le TuMV sauvage est reconnue par un tout autre senseur qu'une protéine CBL.

2.3.3 Gène impliqué dans la réponse à l'auxine

Un gène codant pour une protéine de réponse à l'auxine (At1g29500) avait un signal de 151 unités dans les plantes infectées avec le TuMV sauvage. Dans les plantes infectées avec TuMV-lox, un signal de 411 unités était obtenu. Il est bien connu que certaines phytohormones telles l'acide salicylique, l'acide jasmonique ou l'éthylène sont impliquées dans la signalisation vers une réponse de défense dans les plantes infectées. Une étude récente montrait que l'auxine pourrait également être impliquée dans la réponse de défense face à une infection virale (Mayda *et al.*, 2000). Compte tenu que le métabolisme de l'auxine répond tout autant aux signaux développementaux qu'aux signaux environnementaux (Normanly et Bartel, 1999), sa réponse à une infection virale

est certainement possible. Sheldrake (1973) avait d'ailleurs noté une baisse dans le niveau de tryptophane associée à une baisse réciproque du niveau d'auxine endogène suite à une infection virale. Puisque le TuMV-lox semble moins virulent lorsque l'on observe le patron de croissance des plantes infectées avec celui-ci, le niveau d'auxine endogène dans ces plantes est peut être comparable à celui retrouvé dans des plantes non-infectées contrairement au niveau dans les plantes infectées avec TuMV sauvage. Ce qui expliquerait l'augmentation de l'expression de certains gènes en réponse à l'auxine dans les plantes infectées avec TuMV-lox comparativement aux plantes infectées avec TuMV sauvage. Une balance différente du niveau d'auxine dans les plantes infectées avec TuMV sauvage ou TuMV-lox pourrait également expliquer l'apparence différente de ces plantes. Puisqu'en effet, le niveau d'auxine cellulaire affecte la division, l'expansion et la différenciation des cellules.

Pour ce qui est des facteurs de transcription en réponse à l'auxine (ARF) qui permettent la transcription des gènes en réponse à l'auxine, quelques-uns montraient une légère augmentation ou diminution dans les plantes infectées avec TuMV-lox comparativement avec TuMV sauvage. Ceux-ci n'étaient par contre pas inclus dans les treize gènes sélectionnés après l'analyse rigoureuse. Plusieurs ARF sont régulés par des miARN. Les miARN 160 et 167 ont entre autres été identifiés responsables de la régulation de l'expression de ARF10, ARF17 et ARF8 (Kasschau *et al.*, 2003).

2.3.4 Gène impliqué dans le cycle de production des terpènes

Un quatrième gène codant pour une lupéole synthase (LUP1; At1g78970) montrait une augmentation dans les plantes infectées avec TuMV-lox (signal de 320 unités). Les plantes infectées avec le TuMV sauvage montraient un signal de 99 unités.

LUP1 est un membre de la famille des oxidosqualène cyclase qui sont responsables de la transformation du 2,3-oxidosqualène en triterpènes tel le lupéole. Dans les plantes, la production de terpènes est associée à deux catégories de procédés. Ils servent à la

communication de la plante avec son environnement ainsi qu'à la défense des plantes (Harborne et Tomas-Barberan, 1991) mais également ils possèdent des fonctions physiologiques, métaboliques et structurales dans la plante (McGarvey et Croteau, 1995).

De par le rôle des terpènes dans la défense, nous aurions donc pu croire que l'infection avec le TuMV-lox, qui semble moins virulente lorsque nous observons le patron de croissance des plantes infectées, aurait résulté en une moins grande production de terpènes. Donc, il y aurait eu diminution dans l'expression de certains gènes tels LUP1. Ce qui n'était pas le cas des résultats observés ici. Donc, le rôle des terpènes dans le développement semblerait plus approprié pour expliquer les résultats obtenus dans nos expériences.

2.4 Conclusion

Mes études ont permis de découpler l'apparition des symptômes et la multiplication du virus dans des plantes infectées. Par contre, les résultats obtenus concernant l'effet de suppression du PTGS et de la régulation par les miARN de la protéine HcPro modifiée ne sont pas clairs. Puisque que HcPro est une protéine multifonctionnelle, il pourrait être possible que la modification dans sa séquence affecte une autre fonction que celle de suppression du PTGS. La régulation différentielle de certains gènes dans les plantes d'*Arabidopsis* infectées avec TuMV-lox nous amène des pistes de recherche qui pourrait s'avérer intéressantes.

3. Perspectives

Puisque le système a été élaboré dans le but de produire une protéine recombinante à grande échelle, une étape préalable à l'introduction de cette protéine dans le système sera l'optimisation du temps nécessaire à la production des protéines. En effet, le délai observé pour la production de la protéine CP n'est pas souhaitable dans une optique industrielle.

C'est pourquoi il est envisagé de tenter d'agro-infiltrer les plantes d'*Arabidopsis* transgéniques pour TuMV-flox avec une construction Cre mais également avec une construction contenant la séquence codante pour la protéine HcPro sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Cette approche permettra d'empêcher l'initiation du PTGS dans les plantes. Donc, dès la réactivation de la réplication du virus, celui-ci pourra se multiplier immédiatement, sans délai, à son niveau optimal. En bout de ligne, la quantité de protéines s'en trouvera augmentée tel qu'exposée par Chiba *et al.* (2005).

Puisque le site d'insertion entre les séquences virales codantes pour la polymérase et la CP était montré comme un site adéquat pour l'expression d'une protéine d'intérêt, la séquence codante pour une protéine d'intérêt thérapeutique (possiblement un anticorps) y sera insérée. L'expression du système, dans lequel le gène d'intérêt aura été inséré, sera alors testée dans les plantes d'*Arabidopsis* mais également dans des plantes de luzerne qui représentent une plate-forme de production de protéines recombinantes hautement efficace. L'évaluation de la quantité de protéines recombinantes produites sera également effectuée.

En parallèle, le vecteur viral pourrait être optimisé pour une réplication accrue dans les cellules hôtes tel que mentionné par Marillonnet *et al.* (2005). Pour ce faire, l'ajout d'introns dans la séquence virale pourrait être envisagé mais également la réduction de la taille du vecteur viral. Cette réduction pourrait toucher non seulement les sites susceptibles d'être mal interprétés par la machinerie cellulaire mais également certaines portions du virus impliquées dans des fonctions jugées limitatives ou dispensables lors de la création d'un système de production de protéines recombinantes (Gleba, Klimyuk et Marillonnet, 2005). Puisque notre système exploite la transgénèse, les séquences virales impliquées dans les fonctions de mouvements local et systémique du virus ainsi que la capacité de celui-ci à produire des particules virales infectieuses fonctionnelles ne sont pas essentielles. Nous pourrions donc envisager d'éliminer la séquence codante pour la protéine CP. Les tests adéquats devront être faits pour s'assurer que la production des protéines recombinantes ne sera pas affectée par ces délétions dans la séquence du virus.

Se basant sur ce principe ainsi que sur les résultats qui serait obtenus, l'élimination d'autres portions de séquence pourrait être envisagée.

4. Contribution

La majorité des systèmes d'expression de protéines recombinantes utilisant les vecteurs viraux sont des systèmes dits transitoires où le vecteur viral est introduit dans la plante via l'infiltration de celle-ci avec une suspension d'*Agrobacterium* contenant le vecteur. Ces systèmes fonctionnent bien mais l'instabilité génétique des vecteurs viraux font que les quantités de protéines recombinantes produites peuvent en être affectées. Également, le temps nécessaire pour agro-infiltrer toute une série de plantes représente un travail en soit. Notre système permettra donc de produire à grande échelle des protéines recombinantes de façon stable et constante sans nécessiter un apport important ni en temps ni en manipulations. La transgénèse représente l'étape la plus longue et la plus laborieuse mais celle-ci est effectuée qu'une seule fois. D'autre part, cette technique permet d'éliminer les problèmes d'instabilité du vecteur viral et les plantes transgéniques produites seront la source de graines qui seront-elles aussi porteuses du vecteur viral. Lorsque les protéines recombinantes devront être produites, des graines seront tout simplement semées et l'agent inducteur sera appliqué en temps voulu.

La protéine multifonctionnelle HcPro est très étudiée depuis quelques années dans le but de comprendre le mécanisme complet de multiplication virale. Les différents phénotypes observés sur les plantes infectées avec le TuMV-lox comparativement aux plantes infectées avec le TuMV sauvage pourront peut être permettre d'améliorer les connaissances sur les fonctions déjà connues de HcPro mais également permettre de découvrir d'autres fonctions non attendues associées à cette protéine grandement importante.

BIBLIOGRAPHIE

Abremski, K., Hoess, R., Sterberg, N. 1983. Studies of the properties of P1 site-specific recombination: Evidence for topologically unlinked products following recombination. Cell 32: 1301-1311.

Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C., Harberd, N.P. 2004. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. Development 131: 3357-3365.

Ahlquist, P., French, R., Janda, M., Loesch-Fries, S. 1984. Multicomponent RNA plant virus infection derived from clone viral cDNA. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 81: 7066-7070.

Ahlquist, P., Janda, M. 1984. cDNA cloning and *in vitro* transcription of the complete *Brome Mosaic Virus* genome. Molecular and Cell Biology 4: 2876-2882.

Ambros, V. 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. Cell 107: 823-826.

Ambros, V. B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C.; Chen, X., Dreyfuss, G.; Eddy, S.R.; Griffiths-Jones, S.; Marshall, M.; *et al.* 2003. A uniform system for microRNA annotation. RNA 9: 277-279.

Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr Jr., J.M., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., Vance, V.B. 2000. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. Science 290: 142-144.

Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., Vance, V.B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 95: 13079-13084.

Angell, S. M., Baulcombe, D.C. 1997. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. EMBO Journal 16: 3675-3684.

Aoyama, T., Chua, N.-H. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. The Plant Journal 113: 605-612.

Atabekov, J. G. T., M.E. 1990. Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. Advances in Virus research 38: 201-248.

Atreya, C. D., Atreya, P. L., Thornbury, D. W., Pirone, T. P. 1992. Site-directed mutations in the potyvirus HC-PRO gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. Virology 191: 106-111.

Atreya, C. D., Pirone, T.P 1993. Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: Effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 11919-11923.

Aukerman, M. J., Sakai, H. 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. The Plant Cell 15: 2730-2741.

Austin, S. M., Ziese, M., Sternberg, N. 1981. A novel role for the sitespecific recombination in maintenance of bacterial replicons. Cell 25: 729-736.

Awram, P. G., R.C; Forster, R.L; Bellamy, A.R 2002. The potential of plant viral vectors and transgenic plants for subunit vaccine production. Advances in Virus research 58: 81-124.

Bartel, D. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116: 281-297.

Baulcombe, D. C. 1996. RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. Plant Molecular Biology 32: 79-88.

Baulcombe, D. C. 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Current Opinion in Plant Biology 2: 109-113.

Bayley, C. C., Morgan, M., Dale, E.C., Ow, D.W. 1992. Exchange of gene activity in transgenic plants catalyzed by the Cre-lox site-specific recombination system. Plant Molecular Biology 18: 353-361.

Beauchemin C, Bougie V, Laliberte JF 2005. Simultaneous production of two foreign proteins from a polyvirus-based vector. Virus Research 112: 1-8.

Beckwith, J. R., Zipser, D. 1970. The lactose operon. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Binns, A. N. T., M.F 1988. Cell biology of agrobacterium infection and transformation of plants. Annual Review of Microbiology 42: 575-606.

Birch, R. G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 297-326.

Böhner, S., Gatz, C. 2001. Characterization of novel target promoters for the dexamethasone-inducible/tetracycline-repressible regulator TGV using luciferase and isopentenyl transferase as sensitive reporter genes. Molecular General Genetic 264: 860-870.

Böhner, S., Lenk, I., Rieping, M., Herold, M., Gatz, C. 1999. Transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. The Plant Journal 191: 87-95.

Brantley, J. D. H., A.G 1993. The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottling virus is an RNA-binding protein. Journal of General Virology 746: 1157-1162.

Brigneti, G. V., O; Li, W.-X; Ji, L.-H; Ding, S.-W; Baulcombe, D.C 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. The EMBO Journal 1722: 6739-6746.

Bruce, W., Folkerts, O., Garnaat, C., Crasta, O., Roth, B., Bowen, B. 2000. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. The Plant Cell 12: 65-80.

Bruening, G. 1998. Plant gene silencing regularized. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 9523: 13349-13351.

Caddick, M. X. G., A.J; Jepson, I; Krause, K.P; Qu, N; Riddell, K.V; Salter, M.G; Schuch, W; Sonnewald, U; Tomsett, A.B 1998. An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. Nature Biotechnology 16: 177-180.

Carrington, J. C., Freed, D.D. 1990. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. Journal of Virology 64: 1590-1597.

Carrington, J. C. J., P.E; Schaad, M.C 1998. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. The Plant Journal 144: 393-400.

Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. 1993. A simple method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Report 112: 113-116.

Chapman, E. J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V., Carrington, J.C. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. Genes Development 18: 1179-1186.

Chapman, S. N., Kavanagh, T.A., Baulcombe, D.C. 1992. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. Plant Journal 2: 549-557.

Chen, X. 2004. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. Science 303: 2022-2025.

Chiba, M., Reed, J.C., Prokhnevsky, A.I., Chapman, E.J., Mawassi, M., Koonin, E.V., Carrington, J.C., Dolja, V.V. 2005. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. Virology 3461: 7-14.

Chung, K. M., Nybakken, G.E., Thompson, B.S., Engle, M.J., Marri, A., Fremont, D.H., Diamond, M.S. 2006. Antibodies against West Nile Virus Nonstructural Protein NS1 Prevent Lethal Infection through Fc gamma Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms. Journal of Virology 803: 1340-1351.

Citovski, V. K., D; Zambryski, P. 1991. Gene I, a potential cell-to-cell movement locus of cauliflower mosaic virus, encodes an RNA-binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 2476-2480.

Citovsky, V., Wong, M. L., Shaw, A. L., Prasad, B. V. V., Zambryski, P. 1992. Visualization and characterization of *tobacco mosaic virus* movement protein binding to single-stranded nucleic-acids. The Plant Cell 4: 397-411.

Clare, J. J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K., Romanos, M.A. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. Bio/Technology 9: 455-460.

Clark, A. J. 1998. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. Journal of mammary gland biology and neoplasia 33: 337-349.

Clough, S. J., Bent, A.F 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 16: 735-743.

Clough, S. J., Fengler, K.A., Yu, I.-c., Lippok, B., Smith, Jr., R.K., Andrew F. Bent 2000. The *Arabidopsis* *dnd1* gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 9716: 9323-9328.

Cogoni, C. a. M., G. 1999. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. Nature 3996732: 166-169.

Colman, A. 1996. Production of proteins in the milk of transgenic livestock: Problems, solutions, and successes. The American Journal of Clinical Nutrition 634: 639S-645S.

Corneille, S., Lutz, K., Svab, Z., Maliga, P. 2001. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system. The Plant Journal 272: 171-178.

Cregg, J. M. V., T.S; Raschke, W.C 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Bio/Technology 11: 905-910.

Cronin, S. V., J; Haldeman-Cahill, R; Schaad, M.C; Carrington, J.C 1995. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. The Plant Cell 7: 549-559.

Dale, E. C., Ow, D.W. 1990. Intra- and intramolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. Gene 911: 79-85.

Dale, E. C., Ow, D.W. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 8823: 10558-10562.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D.C. 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. Cell 101: 543-553.

Daniell, H., Streatfield, S.J., Wycoff, K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in Plant Science 6: 219-226.

Day, C. D., Lee, E., Kobayashi, J., Holappa, L.D., Albert, H., Ow, D.W. 2000. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. Genes development 1422: 2869-2880.

De Framond, A. J., Barton, K.A., Chilton, M.-D. 1983. Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering. Bio/Technology 1: 262-269.

de Jaeger, G., Scheffer, S., Jacobs, A., Zambre, M., Zobell, O., Goossens, A., Depicker, A., Angenon, G. 2002. Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. Nature Biotechnology 20: 1265-1268.

Deiman, B. A. L. M., Seron, K., Jaspars, E. M. J., Pleij, C. W. A. 1997. Efficient transcription obtained by a new procedure of the tRNA-like structure of turnip yellow mosaic virus by a template-dependent and specific viral RNA polymerase. Journal of Virological Methods 642: 181-195.

Dolja, V. V., Herndon, K.L., Pirone, T.P., Carrington, J.C. 1993. Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. Journal of virology 6710: 5968-5975.

Dolja, V. V., Hong, J., Keller, K. E., Martin, R. R., and Peremyslov, V. V. 1997. Suppression of potyvirus infection by coexpressed closterovirus protein. Virology 234: 243-252.

- Dolja, V. V., McBride, H.J., Carrington, J.C. 1992. Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 89: 10208-10212.
- Dougherty, W. G. a. C., J.C. 1988. Expression and function of potyviral gene products. Annual Review of Phytopathology 26: 123-143.
- Dougherty, W. G. S., B.L. 1993. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. Microbiological Reviews 57: 781-822.
- El Amrani, A., Barakate, A., Askari, B.M., Li, X., Roberts, A.G., Ryan, M.D., Halpin, C. 2004. Coordinate expression and independent subcellular targeting of multiple proteins from a single transgene. Plant Physiology 135: 16-24.
- Elbashir, S. M. M., J.; Patkaniowska, A.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. EMBO Journal 20: 6877-6888.
- Evans, R. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240: 889-895.
- Fellers, J. W., J; Hong, Y; Collins, G.B; Hunt, A.G 1998. In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. Journal of General Virology 79: 2043-2049.
- Fischer, R., Twyman, R.M., Schillberg, S. 2003. Production of antibodies in plants and their use for global health. Vaccine 21: 820-825.
- Fischer, R. D., J; Emans, N; Commandeur, U; Hellwig, S 1999. Towards molecular farming in the future: Pichia pastoris-based production of single-chain antibody fragments. Biotechnology and applied biochemistry 30: 117-120.
- Fraley, R. T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woo, S.C. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 80: 4803-4807.

Franco-Lara, L. F., McGeachy, K.D., Commandeur, U., Martin, R.R., Mayo, M.A., Barker, H. 1999. Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of *Potato leafroll virus*: evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. Journal of General Virology 80: 2813-2822.

Gal-On, A. 2000. A point mutation in the FRNK motif of the potyvirus helper component-protease gene alters symptom expression in cucurbits and elicits protection against the severe homologous virus. Phytopathology 90: 467-473.

Gallardo, C., Blanco, E., Rodriguez, J.M., Carrascosa, A.L., Sanchez-Vizcaino, J.M. 2006. Antigenic Properties and Diagnostic Potential of African Swine Fever Virus Protein pp62 Expressed in Insect Cells. Journal of Clinical Microbiology 44: 950-956.

Gamborg, O. L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.

Gao, M., Brufatto, N., Chen, T., Murley, L.L., Thalakada, R., Domagala, M., Beattie, B., Mamelak, D., Athanasopoulos, V., Johnson, D., McFadden, G., Burks, C., Frappier, L. 2005. Expression Profiling of Herpesvirus and Vaccinia Virus Proteins Using a High-Throughput Baculovirus Screening System. Journal of Proteome Research 4: 2225-2235.

Gatz, C., Froberg, C., Wendenburg, R. 1992. Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. The Plant Journal 23: 397-404.

Gatz, C., Lenk, I. 1998. Promoters that respond to chemical inducers. Trends in Plant Science 39: 352-358.

Gatz, C., Quail, P.H. 1988. Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85: 1394-1397.

German-Retana S, C. T., Alias E, Delbos RP, Le Gall O 2000. Effects of green fluorescent protein or beta-glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking Lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. Molecular Plant-Microbe Interaction 13: 316-324.

Gerngross, T. U. 2004. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nature Biotechnology 22: 1409-1414.

Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., Carter, A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. Nature Biotechnology 1811: 1151-1155.

Gleave, A. P., Deepali, S.M., Mudge, S.R., *et al.* 1999. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. Plant Molecular Biology 402: 223-235.

Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S. 2005. Magniffection - a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. Vaccine 23: 2042-2048.

Gleba, Y., Marillonnet, S., Klimyuk, V. 2004. Engineering viral expression vectors for plants: the "full virus" and the "deconstructed virus" strategies. Current opinion in plant biology 7: 182-188.

Gordon, K., E. Lee, J. A. Vitale, A. E. Smith, H. Westphal, and L. Hennighausen 1987. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. Bio/Technology 5: 1183-1187.

Guo, H. S., Ding, S.W. 2002. A viral protein inhibits the long range signalling activity of the gene silencing signal. The EMBO Journal 21: 398-407.

Guo, H. S., Fei, J.F., Xie, Q., Chua, N.H. 2003. A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. The Plant Journal 34: 383-392.

Guo, H. S., Lopez-Moya, J.J., Garcia, J.A. 1998. Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric plum pox potyvirus genome after insertion of a foreign gene. Virus Research 57: 183-195.

Gutiérrez-Ortega, A., Sandoval-Montes, C., Olivera-Flores, T. d. J., Santos-Argumedo, L., Gomez-Lim, M.A. 2005. Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. Transgenic Research 14: 877-885.

Hadi, M. Z. M., M.D; Finer, J.J 1996. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. The Plant Cell Report 157: 500-505.

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature 404: 293-296.

Hannon, G. J. 2002. RNA interference. Nature 418: 244-251.

Harborne, J. B., Tomas-Barberan, F.A. 1991. Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids-Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Oxford, Clarendon Press.

Hare, P. D., Chua, N.-H. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. Nature Biotechnology 20: 575-580.

Hari, V. 1981. The RNA of Tobacco etch virus: Further characterization and detection of protein linked to RNA. Virology 112: 391-399.

Hari, V., A. Siegel, et al. 1979. The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). Virology 92: 568-571.

Heidmann, D., Lehner, C.F. 2001. Reduction of Cre recombinase toxicity in proliferating *Drosophila* cells by estrogen-dependent activity regulation. Development and genes evolution 211: 458-465.

Hellens, R. P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., Mullineaux, P.M. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Plant Molecular biology 42: 819-832.

Hendy, S., Chen, Z.C., Barker, H., Santa Cruz, S., Chapman, S., et al. 1999. Rapid production of single-chain Fv fragments in plants using a *potato virus X* episomal vector. Journal of Immunological Methods 231: 137-146.

Hiatt, A., Cafferkey, R., Bowdish, K. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. Nature 342: 76-78.

Hillen, W., Berens, C. 1994. Mechanisms underlying expression of TN10 encoded tetracycline resistance. Annual Review of Microbiology 48: 345-369.

Hoa, T. T. C., Bong, B.B., Huq, E., *et al.* 2002. Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. Theoretical and Applied Genetics 1044: 518-525.

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Nature 303: 179-180.

Hoess, R. H., Abremski, K. 1985. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. Journal of Molecular Biology 1813: 351-362.

Hoff, T., Schnorr, K.M., Mundy, J. 2001. A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. Plant Molecular Biology 451: 41-49.

Hogue, R. S., Lee, J.M., An, G. 1990. Production of a foreign protein product with genetically modified plant cells. Enzyme Microbiological Technology 12: 533-538.

Hong, Y., Levay, K., Murphy, J. F., Klein, P. G., Shaw, J. G., Hunt, A. G. 1995. A Potyvirus Polymerase Interacts with the Viral Coat Protein and VPg in Yeast Cells. Virology 2141: 159-166.

Hooykaas, P. J. a. S., R.A 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology 191: 15-38.

Horsch, R. B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227: 1229-1231.

Houdebine, L.-M. 1994. Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. Journal of Biotechnology 343: 269-287.

Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology. San Diego, Academic Press.

James, E. L., J.M 2001. The production of foreign proteins from genetically modified plant cells. Advances in biochemical engineering biotechnology 72: 127-156.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal 6: 3901-3907.

Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.A., Stahl, S. 2002. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotechnology and Applied Biochemistry 35: 91-105.

Kane, J. F. and D. L. Hartley 1988. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Trends in Biotechnology 65: 95-101.

Kasim, V., Miyagishi, M., Taira, K. 2004. Control of siRNA expression using the Cre±loxP recombination system. Nucleic Acids Research 327: e66-e73.

Kasschau, K. D., Carrington, J. C. 1995. Requirement for HC-Pro Processing during Genome Amplification of Tobacco Etch Potyvirus. Virology 2091: 268-273.

Kasschau, K. D., Cronin, S., Carrington, J. C. 1997. Genome Amplification and Long-Distance Movement Functions Associated with the Central Domain of Tobacco Etch Potyvirus Helper Component-Proteinase. Virology 2282: 251-262.

Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., Carrington, J.C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. Developmental Cell 4: 205-217.

Kasschau, K. D. a. C., J.C. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. Cell 95: 461-470.

Kaufman, R. J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes & Development 1310: 1211-1233.

Kitt, P. A. P., R.D 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. Biotechniques 14: 810-817.

Klein, P. G., Klein, R.R., Rodriguez-Cerezo, E., Hunt, A.G., Shaw, J.G. 1994. Mutational Analysis of the Tobacco Vein Mottling Virus Genome. Virology 2042: 759-769.

Koncz, C., Shell, J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet. 204: 383-396.

Kopertekh, L., Juttner, G., Schiemann, J. 2004. Site-specific recombination induced in transgenic plants by PVX virus vector expressing bacteriophage P1 recombinase. Plant Science 1662: 485-492.

Kumagai, M. H., J. Donson, et al. 2000. Rapid, high-level expression of glycosylated rice [alpha]-amylase in transfected plants by an RNA viral vector. Gene 2451: 169-174.

Kumagai, M. H. T., T.H; Weinzettl, N; Della-Cioppa, G; Turpen, A.M; Donson, J; Hilf, M.E; Grantham, G.L; Dawson, W.O; Chow, T.P; Piatak Jr, M; Grill, L.K 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 of the United States of America 902: 427-430.

Kumar, A., Taylor, M.A., Mad Arif, A.A., Davies, H. V. 1996. Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. The Plant Journal 92: 147-158.

Kusnadi, A. R., Hood, E.E., Witcher, D.R., Howard, J.A., Nikolov, Z.L. 1998. Production and Purification of Two Recombinant Proteins from Transgenic Corn. Biotechnology Progress 14: 149-155.

Kusnadi, A. R. N., N. L; Howard, J.A 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. Biotechnology and Bioengineering 565: 473-484.

Kuwae, S., Ohda, T., Tamashima, H., Miki, H., Kobayashi, K. 2005. Development of a fed-batch culture process for enhanced production of recombinant human antithrombin by Chinese hamster ovary cells. Journal of Bioscience and Bioengineering 1005: 502-510.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227259: 680-685.

Lai, M. M. C. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. Microbiol. rev. 56: 61-79.

Lain, S. R., J.L; Garcia, J.A 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. Nucleic Acids Research 1823: 7003-7006.

Langenberg, W. G., Zhang, L. 1997. Immunocytology Shows the Presence of Tobacco Etch Virus P3 Protein in Nuclear Inclusions. Journal of Structural Biology 1183: 243-247.

Lau, N. C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Barteli, D.P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *C. elegans*. Science 2945543: 858-862.

Li, X. H., Carrington, J.C. 1995. Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 457-461.

Li, X. H., Valdez, P., Olvera, R.E., Carrington, J.C. 1997. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). Journal of virology 712: 1598-1607.

Liu, Y. L., Si, B.Y., Hu, Y., Zhang, Y., Yang, Y.H., Zhu, Q.Y. 2005. Expression of tick-borne encephalitis virus prM-E protein in insect cells and studies on its antigenicity. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 194: 335-339.

Llave, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. 2000. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 97: 13401-13406.

Lu, R., Malcuit,I., Moffett,P., Ruiz,M.T., Peart,J., Wu,A.J., Rathjen,J.P., Bendahmane,A., Day,L., Baulcombe,D.C. 2003. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. EMBO Journal 2221: 5690-5699.

Ma, J. K.-C., Drake, P.M.W., Christou, P. 2003. THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PHARMACEUTICAL PROTEINS IN PLANTS. Nature Reviews Genetics 4: 794-805.

Maiti, I. B. M., J.F; Shaw, J.G; Hunt, A.G 1993. Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(13): 6110-6114.

Makvandi-Nejad, S., McLean, M.D., Hiram, T., Almquist, K.C., MacKenzie, C. R., Hall, J. C. 2005. Transgenic tobacco plants expressing a dimeric single-chain variable fragment (scFv) antibody against *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B. Transgenic Research 14: 785-792.

Mallory, A. C., Parks, G., Endres, M.W., Baulcombe, D.C., Bowman, L.H., Pruss, G.J., Vance, V.B. 2002. The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. Nature Biotechnology 20: 622-625.

Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y. 2004. *In planta* engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 101(18): 6852-6857.

Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y. 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. Nature Biotechnology 23(6): 718-723.

Marino, M. H. 1989. Expression systems for heterologous protein production. BioPharmaceuticals 2: 18-33.

Martinez, A. S., C; Hart, C.A; Thompson, j; Jepson, I 1999. Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants. The Plant Journal 19(1): 97-106.

Masgrau, C., Altabella, T., Farrás, R., Flores, D., Thompson, A.J., Besford, R.T., Tiburcio, A.F. 1997. Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. The Plant Journal 11(3): 465-473.

Mason, H. S., Haq, T.A., Clements, J.D., Arntzen, C.J. 1998. Edible vaccine protects mice against *E. coli* heat-labile Enterotoxin (LT): Potatoes expressing a synthetic LT-B gene. Vaccine 16: 1336-1343.

Masuta, C., Yamana, T., Tacahashi, Y., Uyeda, I., Sato, M., Ueda, S., Matsumura, T. 2000. Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene- expression system for legume species. The Plant Journal 23: 539-546.

- Mayda, E., Marqués, C., Conejero, V., Vera, P. 2000. Expression of a Pathogen-Induced Gene Can Be Mimicked by Auxin Insensitivity. Molecular Plant-Microbe Interaction 131: 23-31.
- McCarroll, L. and L. A. King 1997. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. Current Opinion in Biotechnology 85: 590-594.
- McCormick, A. A. K., M.H; Hanley, K; Turpen, T.H; Hakim, I; Grill, L.K; Tusé, 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 of the United States of America 962: 703-708.
- McGarvey, D. J., Croteau, R. 1995. Terpenoid Metabolism. The Plant Cell 7: 1015-1026.
- Mett, V. L., Lochhead, L.P., Reynolds, P.H.S. 1993. Copper-controllable gene expression system for whole plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 9010: 4567-4571.
- Mlynárová, L., Nap, J.-P. 2003. A self-excising Cre recombinase allows efficient recombination of multiple ectopic heterospecific *lox* sites in transgenic tobacco. Transgenic Research 12: 45-57.
- Mori, M., Fujihara, N., Mise, K., Furusawa, I. 2001. Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants. The Plant Journal 27: 79-86.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiological Plant 15: 473-497.
- Murphy, J. F., R. E. Rhoads, et al. 1990. The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. Virology 1781: 285-288.
- Nagy, A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. Genosis 26: 99-109.
- Nester, E. W. G., M.P; Amasino, R.M; Yanofski, M.F 1984. Crown gall: A molecular and physiological analysis. Annual Review of Plant Physiology 35: 387-413.

Nicolas, O., Dunnington, S.W., Gotow, L.F., Pirone, T.P., Hellmann, G.M. 1997. Variations in the VPg Protein Allow a Potyvirus to Overcome a Gene Resistance in Tobacco. Virology 237: 452-459.

Nilsson, J., S. Stahl, et al. 1997. Affinity Fusion Strategies for Detection, Purification, and Immobilization of Recombinant Proteins. Protein Expression and Purification 11: 1-16.

Normanly, J., Bartel, B. 1999. Redundancy as a way of life - IAA metabolism. Current Opinion in Plant Biology 2: 207-213.

Odell, J., Caimi, P., Sauer, B., Russell, S. 1990. Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. Molecular and general genetic 223: 369-378.

Osman, T. A. H., R.J; Buck, K.W 1992. Cooperative binding of the red clover necrotic mosaic virus movement protein to single-stranded nucleic acids. Journal of General Virology 73: 223-227.

Osman, T. A. T., P; Buck, K.W 1993. Localization of a single-stranded RNA-binding domain in the movement protein of red clover necrotic mosaic dianthovirus. Journal of General Virology 74: 2453-2457.

Outchkourov, N. S., Peters, J., de Jong, J., Rademakers, W., Jongsma, M.A. 2003. The promoter-terminator of chrysanthemum rbcS1 directs very high expression levels in plants. Planta 216: 1003-1012.

Ouwerkerk, P. B. F., de Kam, R.J., Hoge, J.H.C., *et al.* 2001. Glucocorticoid-inducible gene expression in rice. Planta 213: 370-378.

Padidam, M. 2003. Chemically regulated gene expression in plants. Current Opinion in Plant Biology 6: 169-177.

Paifer, E. M., E; Cremata, J; Montesino, L; Delgado, J.M 1994. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. Yeast 10: 1415-1419.

- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C., Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. Nature 425: 257-263.
- Palmer, K. E., Rybicki, E.P. 1997. The use of geminiviruses in biotechnology and plant molecular biology, with particular focus on Mastreviruses. Plant Science 1292: 115-130.
- Palmer, K. E., Thomson, J.A., Rybicki, E.P. 1999. Generation of maize cell lines containing autonomously replicating maize streak virus-based gene vectors. Archives of Virology 1447: 1345-1360.
- Palmiter, R. D. B., R.L; Hammer, R.E; Trumbauer, M.E; Rosenfeld, M.G; Birnberg, N.C; Evans, R.M 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature 300: 611-615.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Current Biology 12: 1484-1495.
- Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G. 2002. Control of developmental timing by microRNAs and their targets. Annual Review of Cell and Developmental Biology 18: 495-513.
- Pedley, K. F., Martin, G.B. 2004. Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. Journal of Biological Chemistry 279: 49229-49235.
- Peeters, K., Wilde, C.De, Jaeger, G.De, Angenon, G., Depicker, A. 2001. Production of antibodies and antibody fragments in plants. Vaccine 19: 2756-2761.
- Pirone, T. P., Blanc, S 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. Annual Review of Phytopathology 341: 227-247.
- Plasterk, R. H. A. 2002. RNA silencing: The genome's immune system. Science 2965571: 1263-1265.
- Plisson, C., Druckers, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D., Bron, P. 2003. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. The Journal of Biological Chemistry 27826: 23753-23761.

Pogue, G. P., Lindbo, J.A., *et al.* 2002. Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. Annual review of phytopathology 40: 45-74.

Potrykus, I. 1990. Gene-transfer methods for plants and cell-cultures. Ciba Foundation Symposia 154: 198-212.

Prüfer, D., Schmitz, J., Tacke, E., Kull, B., Rohde, W. 1997. In vivo expression of a full-length cDNA copy of *potato leafroll virus* (PLRV) in protoplasts and transgenic plants. Molecular Genetics and Genomics 253: 609-614.

Quemada, H. S., L.C; Siemieniak, D.R; Gonsalves, D; Slightom, J.L 1990. Watwermelon mosaic virus II and zucchini yellow mosaic virus: cloning of 3'-terminal regions, nucleotide sequences, and phylogenetic comparisons. Journal of General Virology 71: 1451-1460.

Rajamäki, M. L., Valkonen, J.P.T. 1999. The 6K2 protein and the VPg of Potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca*. Molecular plant-microbe interactions 12: 1074-1081.

Rajamäki, M. L., Valkonen, J.P.T. 2002. Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. Molecular plant-microbe interactions 15: 138-149.

Rhoades, M. W. R., B.J.; Lim, L.P.; Burge, C.B.; Bartel, B.; Bartel, D.P. 2002. Prediction of plant microRNA targets. Cell 110: 513-520.

Riechmann, J. L. C., M.T; Garcia, J.A 1995. Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. Journal of General Virology 76: 951-956.

Riechmann, J. L. L., S; Garcia, J.A 1989. The genome-linked protein and 5 prime end RNA sequence of plum pox potyvirus. Journal of General Virology 70: 2785-2789.

Riechmann, J. L. L., S; Garcia, J.A 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal of General Virology 73: 1-16.

- Rojas, M. R. Z., F. Murilo Allison, Richard F. Gilbertson, Robert L. Lucas, William J. 1997. Capsid Protein and Helper Component-Proteinase Function as Potyvirus Cell-to-Cell Movement Proteins. Virology 237: 283-295.
- Rudolph, N. S. 1999. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. Trends in Biotechnology 17: 367-374.
- Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., López-Abella, D., López-Moya, J.J. 2005. Structural Analysis of Tobacco Etch Potyvirus HC-Pro Oligomers Involved in Aphid Transmission. Journal of Virology 79: 3758-3765.
- Russell, S. H., Hoopes, J.L., Odell, J.T. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. Molecular Genomics and Genetics 234: 49-59.
- Rutledge, R. G. 2004. Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications. Nucleic Acids Research 32: e178-185.
- Saitoh, H. K., A; Masahiro, N; et al. 2001. Production of an antimicrobial defensin in *Nicotiana benthamiana* with a potato virus X vector. Molecular plant-microbe interaction 14: 111-115.
- Salter, M. G., Paine, J.A., Riddell, K.V., Jepson, I., Greenland, A.J., Caddick, M.X., Tomsett, A.B. 1998. Characterisation of the ethanol-inducible *alc* gene expression system for transgenic plants. The Plant Journal 16: 127-132.
- Sanchez, F., D. Martinez-Herrera, I. Aguilar, F. Ponz 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, M. C., Carrington, J.C 1996. Suppression of long-distance movement of tobacco etch virus in a nonsusceptible host. Journal of virology 70: 2556-2561.
- Schaad, M. C., Lellis, A.D, Carrington, J.C 1997. VPg of tobacco etch virus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. Journal of virology 71: 8624-8631.

- Schoumacher, F., C. Erny, et al. 1992. Nucleic acid-binding properties of the alfalfa mosaic virus movement protein produced in yeast. Virology 1882: 896-899.
- Shauer, S. E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W., Ray, A. 2002. DICER-LIKE 1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. Trends in Plant Sciences 7: 487-491.
- Sheldrake, R. 1973. The Production of Hormones in Higher Plants. Biological Reviews 48: 509-559.
- Shi, X. M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J.C., Vance, V.B. 1997. Mutations in the Region Encoding the Central Domain of Helper Component-Proteinase (HC-Pro) Eliminate Potato Virus X/Potyviral Synergism. Virology 2311: 35-42.
- Siaw, M. F. E. S., M; Ballard, S; Shaw, J.G; Rhoads, R.E. 1985. Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of tobacco vein mottling virus RNA. Virology 142: 134-143.
- Siegel, A. 1983. RNA viruses as cloning vehicles. Phytopathology 735: 775.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H.A., Fire, A. 2001. On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing. Cell 107: 465-476.
- Simons, J. P. M., M; Clark, A.J 1987. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. Nature 328: 530-532.
- Smardon, A., J. M. Spoerke, et al. 2000. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. Current Biology 104: 169-178.
- Soumounou, Y. L., J.-F 1994. Nucleic acid-binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in *Escherichia coli*. Journal of General Virology 7510: 2567-2573.
- Sreekala, C., Wu, L., Gu, K., Wang, D., Tian, D., Yin, Z. 2005. Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system. Plant Cell Report 242: 86-94.

- Srivastava, V., Anderson, O.D., Ow, D.W. 1999. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 9620: 11117-11121.
- Srivastava, V., Ow, D.W. 2001. Single-copy primary transformants of maize obtained through the co-introduction of a recombinase-expressing construct. Plant Molecular Biology 465: 561-566.
- Stevens, R. C. 2000. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. Structure 89: R177-R185.
- Stuurman, J., Vroomen de, M.J., Nijkamp, H.J., Haaren van, M.J. 1996. Single-site manipulation of tomato chromosomes in vitro and in vivo using Cre-lox site-specific recombination. Plant Molecular Biology 32: 901-913.
- Takahashi, Y., Takahashi, T., Uyeda, I. 1997. cDNA clone to clover yellow vein potyvirus genome is highly infectious. Virus Genes 143: 235-243.
- Thompson, A. J., Myatt, S.C. 1997. Tetracycline-dependent activation of an upstream promoter reveals transcriptional interference between tandem gene within T-DNA in tomato. Plant Molecular Biology 34: 687-692.
- Topfer, R., Maas, C., Horicke-Grandpierre, C., Schell, J., Steinbiss, H.H. 1993. Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. Methods of Enzymology 217: 67-78.
- Tregoning, J. S., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare, S., Bowe, F., Fairweather, N., Ytterberg, J., van Wijk, K.J., Dougan, G., Maliga, P. 2003. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. Nucleic Acids Research 31: 1174-1179.
- Turpen, T. 1989. Molecular cloning of a potato virus Y genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. Journal of General Virology 708: 1951-1960.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L., Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. Virus Research 74: 157-175.
- Van Brunt, J. 1986. Fungi: The perfect hosts? Bio/Technology 4: 1057-1062.

- Vance, V. B. 1991. Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. Virology 182: 486-494.
- Vance, V. B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G., Shi, X.M. 1995. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. Virology 206: 583-590.
- Verchot, J., Carrington, J.C. 1995b. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. Journal of Virology 69: 3668-3674.
- Verchot, J. C., J.C. 1995a. Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. Journal of Virology 69: 1582-1590.
- Vergunst, A. C., Jansen, L.E.T., Fransz, P.F., *et al.* 2000. Cre/lox-mediated recombination in Arabidopsis: evidence for transmission of a translocation and a deletion event. Chromosoma 109: 287-297.
- Vergunst, A. C., Jansen, L.E., Hooykaas, P.J. 1998. Site-specific integration of Agrobacterium T-DNA in Arabidopsis thaliana mediated by Cre recombinase. Nucleic Acids Research 26: 2729-2734.
- Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D.C. 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. Cell 103: 157-167.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M., Baulcombe, D.C. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 96: 14147-14152.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. The Plant Journal 33: 949-956.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., and Baulcombe, D.C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localised introduction of ectopic promoterless DNA. Cell 95: 177-187.

- Wall, R. J. 1999. Biotechnology for the production of modified and innovative animal products: transgenic livestock bioreactors. Livestock Production Science 592-3: 243-255.
- Wang, Z., Morris, J.C., Drew, M.E., Englund, P.T. 2000. Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. Journal of Biological Chemistry 27551: 40174-40179.
- Ward, C. W. a. S., D.D. 1991. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. Intervirology 32: 269-296.
- Weinmann, P. G., M; Hillen, W; Bujard, H; Gatz, C 1994. A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. The Plant Journal 54: 559-569.
- Wilde, R. J. S., D; Cooke, S; Jasinska, I; Merryweather, A; Beri, R; Brammar, W.J; Bevan, M; Schuch, W 1992. Control of gene expression in tobacco cells using a bacterial operator-repressor system. EMBO Journal 11: 1251-1259.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G., Laliberte, J. F. 1997. Interaction of the viral protein linked genome 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.
- Yamaya, J., Yoshioka, M., Meshi, T., Okada, Y., Ohno, T. 1988. Expression of tobacco mosaic virus RNA in transgenic plants. Molecular Genetics and Genomics 2113: 520-525.
- Zuo, J., Chua, N.-H. 2000. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. Current Opinion in Biotechnology 112: 146-151.
- Zuo, J., Niu, Q.-W., Nishizawa, N., Wu, Y., Kost, B., Chua, N.-H. 2000a. KORRIGAN, an *Arabidopsis* endo-1,4-beta-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. The Plant Cell 127: 1137-1152.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Chua, N.-H. 2000b. Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. The Plant Journal 24: 265-273.

Zuo, J., Niu, Q.W., Moller, S.G., Chua, N.-H. 2001. Chemical regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. Nature Biotechnology 19: 157-161.