

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE - LILLE I

- Ecole doctorale Biologie et Santé -

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Discipline : Biologie - Santé

Présentée par

Julia BALLY

**Synthèse et repliement des protéines
dans les chloroplastes
Effets collatéraux de l'expression massive d'un transgène**

Soutenue

le 21 mars 2008

Directeur de thèse : Dominique JOB

JURY

Steven BALL	président du jury
Gilles PELTIER	rapporteur
Francis-André WOLLMAN	rapporteur
Ralph BOCK	examineur
Henry DANIELL	examineur
Manuel DUBALD	co-directeur de thèse

ANNEE 2008

Thèse préparée au sein du laboratoire mixte CNRS / Bayer CropScience (UMR 5240)
Au Centre de Recherche de La Dargoire à Lyon, France

Sommaire

Chapitre I : Introduction	1
1. PLANTES TRANSGENIQUES : VUE D'ENSEMBLE	3
1. 1 AVANTAGES DES PLANTES POUR L'EXPRESSION DE PROTEINES D'INTERET	6
1. 2 SYSTEMES D'EXPRESSION VEGETAUX DISPONIBLES	8
1.2.1 Choix du système végétal	8
1.2.2 Localisation cellulaire de la protéine	10
1. 3 TECHNIQUES DE TRANSFORMATION DES SYSTEMES VEGETAUX	11
1.3.1 Transformation transitoire	11
1.3.2 Transformation stable du génome nucléaire	12
1.3.3 Transformation stable du génome chloroplastique	13
2. PRESENTATION GENERALE DES PLASTES	14
2.1 LES PLASTES : ORGANITES POLYVALENTS	14
2.1.1 Différenciation des plastes	14
2.1.2 Fonctions cellulaires et métaboliques des plastes	15
2.2 LE GENOME PLASTIDIAL	19
2.2.1 Origine et évolution du génome plastidial	20
2.2.2 Hérité des génomes plastidiaux	21
2.2.3 Régulation de l'expression du génome plastidial	21
2.3 ADRESSAGE DES PROTEINES AU NIVEAU DES PLASTES	24
2.3.1 Importation des protéines dans le stroma des plastes	24
2.3.2 Importation des protéines au lumen des thylacoïdes du plaste	25
2.3.3 Incorporation des protéines aux membranes des thylacoïdes	27
3. LA TRANSFORMATION PLASTIDIALE	28
3.1 INTRODUCTION ET INTEGRATION DE L'ADN RECOMBINANT	28
3.2 SELECTION ET REGENERATION DES TRANSFORMANTS	30
3.2.1 Principe de sélection des plastomes recombinants	30
3.2.2 Marqueurs de sélection	31
3.3 AVANTAGES DE LA TRANSFORMATION PLASTIDIALE	33
3.4 LIMITES DE LA TRANSFORMATION PLASTIDIALE	34
4. APPLICATIONS DE LA TRANSFORMATION PLASTIDIALE	36
4.1 RECHERCHE FONDAMENTALE	36
4.2 DEVELOPPEMENTS BIOTECHNOLOGIQUES	37

Objectifs	39
------------------	----

Chapitre II : Compétence des chloroplastes pour la formation de ponts disulfures dans les protéines recombinantes	43
--	----

1. LA PHOSPHATASE ALCALINE	46
-----------------------------------	----

1.1 CHOIX DE LA PROTEINE RECOMBINANTE, LA PHOSPHATASE ALCALINE	46
--	----

1.2 CONSTRUCTION DES VECTEURS DE TRANSFORMATION PLASTIDIALE	48
---	----

1.3 TRANSFORMATION PLASTIDIALE	51
--------------------------------	----

1.3.1 Transformation et sélection des transformants primaires	51
---	----

1.3.2 Régénération des lignées transplastomiques et analyse de l'homoplasmie	53
--	----

1.4 ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES PLASTES	55
---	----

1.5 ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES BACTERIES RECOMBINANTES	58
---	----

1.6 ACTIVITE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE	60
---	----

1.6.1 Activité de la phosphatase alcaline <i>in vivo</i>	60
--	----

1.6.2 Activité de la phosphatase alcaline <i>in vitro</i>	61
---	----

1.7 ETUDE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES COMPARTIMENTS PLASTIDIAUX	64
---	----

1.7.1 Localisation de la phosphatase alcaline dans différents compartiments plastidiaux	64
---	----

1.7.2 Activité de la phosphatase alcaline dans les compartiments du chloroplaste	66
--	----

1.8 DISCUSSION / CONCLUSION	67
-----------------------------	----

2. UN AUTRE MODELE D'ETUDE DE L'ETAT REDOX CELLULAIRE, LA GFP REDOX	72
--	----

2.1 LA GFP REDOX, UNE GFP SENSIBLE AUX VARIATIONS REDOX DE L'ENVIRONNEMENT	72
--	----

2.2 CONSTRUCTION DES VECTEURS POUR L'EXPRESSION DU GENE DE LA roGFP	73
---	----

2.3 EXPRESSION DE LA roGFP DANS LES BACTERIES	76
---	----

2.3.1 Analyse de l'expression de la roGFP	76
---	----

2.3.2 Activité <i>in vitro</i> de la roGFP	77
--	----

2.3.3 Activité <i>in vivo</i> de la roGFP	79
---	----

2.4 TRANSFORMATION CHLOROPLASTIQUE ET ANALYSE DES EVENEMENTS TRANSPLASTOMIQUES	81
--	----

2.4.1 Détection de la roGFP dans les feuilles de tabac transplastomique	81
---	----

2.4.2 Activité <i>in vivo</i> de la roGFP dans les tabacs transplastomiques	82
---	----

2.5 DISCUSSION / CONCLUSION	83
-----------------------------	----

3. OPTIMISATION DU REPLIEMENT DES PONTS DISULFURES	85
3.1 CHOIX DES PROTEINES DSBA ET DSBC	86
3.2 CONSTRUCTIONS DES VECTEURS DE TRANSFORMATION POUR L'EXPRESSION DES PROTEINES « Dsb »	88
3.3 OBTENTION DE TRANSFORMANTS NUCLEAIRES	89
3.3.1 Préparation des anticorps anti-Dsb	89
3.3.2 Fixation de lignées monolocus homozygotes et détection de l'accumulation des protéines DsbA et DsbC dans les feuilles de tabac	91
3.3.3 Détection de l'accumulation des protéines DsbA et DsbC dans les feuilles de tabac	91
3.4 ANALYSE DE L'EFFET DES PROTEINES Dsb	92
3.4.1 Transformation nucléaire de plantes transplastomiques possédant le gène de l'aprotinine et de l'héliomycine	92
3.4.2 Croisements des lignées fixées homozygotes avec les plantes transplastomiques : obtention et analyse d'hybrides exprimant les protéines DsbA et DsbC	93
3.5 DISCUSSION / CONCLUSION	95
 <i>Chapitre III : Conséquences de l'expression massive de protéines recombinantes par le génome chloroplastique</i>	97
 1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET ACCUMULATION MASSIVE DE PROTEINES RECOMBINANTES DANS LES PLANTES	101
1.1 PROTEINES RECOMBINANTES ET VECTEURS DE TRANSFORMATION	101
1.1.1 La phosphatase alcaline	101
1.1.2 La p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD)	101
1.1.3 La green fluorescent protein (GFP)	103
1.2 PROFIL D'EXPRESSION DES PROTEINES RECOMBINANTES	103
1.3 ETUDE PHENOTYPIQUE DES PLANTES TRANSPLASTOMIQUES	106
1.3.1 Développement des plantes en serre	107
1.3.2 Floraison	107
 2. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES PLANTES TRANSFORMEES	109
 3. ETUDE PROTEOMIQUE DES PLANTES TRANSFORMEES	112
 4. LA RUBISCO	118
 5. CONDITIONS DE CARENCE EN AZOTE	121
 6. ANALYSES PHENOTYPIQUES ET BIOCHIMIQUES DE LA GERMINATION	125

6.1 TEST DE GERMINATION	125
6.2 ANALYSE PROTEOMIQUE	126
6.2.1 Analyse protéomique totale des graines de tabacs transplastomiques	127
6.2.2 Analyse protéomique séquentielle des graines de tabacs transplastomiques	129
7. DISCUSSION / CONCLUSION	131
 <i>Conclusion générale</i>	 133
 <i>Chapitre IV : Matériels et méthodes</i>	 143
 1. MATERIEL BIOLOGIQUE	 145
1.1 MATERIEL VEGETAL	145
1.2 SOUCHES BACTERIENNES	145
1.2.1 <i>Escherichia coli</i>	145
1.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	146
1.3 VECTEURS PLASMIDIQUES	146
1.3.1 Vecteurs de transformation chloroplastique	146
1.3.2 Vecteur de transformation nucléaire	147
1.3.3 Vecteur de clonage des produits PCR	147
 2. BIOLOGIE MOLECULAIRE	 149
2.1 METHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES	149
2.1.1 Extraction et purification d'ADN plasmidique	149
2.1.2 Extraction et purification d'ADN génomique de plante	150
2.1.3 Extraction et purification des ARN totaux de plante	151
2.2 DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES	152
2.2.1. Par mesure de l'absorbance avec un spectrophotomètre	152
2.2.2 Par analyse sur un gel d'agarose	152
2.3 AMPLIFICATION D'UNE SEQUENCE D'ADN PAR PCR	153
2.4 REALISATION DE CONSTRUCTIONS MOLECULAIRES OU CLONAGES	155
2.4.1 Digestion de fragments d'ADN par des enzymes de restriction	155
2.4.2 « Remplissage » des extrémités cohésives	156
2.4.3 Déphosphorylation	156
2.4.4 Electrophorèse en gel d'agarose	156
2.4.5 Isolement d'un fragment d'ADN après migration sur gel	157
2.4.6 Ligature des brins d'ADN	157
2.4.7 Clonage des fragments PCR	158
2.4.8 Introduction d'ADN plasmidique dans une bactérie	158
2.4.9 Analyse des bactéries recombinantes	159

2.5 ANALYSE DE L'ADN TOTAL DE PLANTES PAR SOUTHERN BLOT	160
2.5.1 Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse	160
2.5.2 Transfert de l'ADN sur une membrane de Nylon	160
2.5.3 Marquage de la sonde	161
2.5.4 Hybridation de la membrane	161
2.5.5 Exposition et révélation par autoradiographie	162
2.6 « REVERSE TRANSCRIPTION » OU SYNTHÈSE D'ADN COMPLEMENTAIRE	162
2.7 PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	163
2.7.1 Principe de la PCR quantitative en temps réel	163
2.7.2 Etapes de la PCR quantitative	164
2.7.3 Détermination et optimisation des amorces	165
3. BIOCHIMIE	166
3.1 PREPARATION D'EXTRAITS PROTEIQUES	166
3.1.1 Extraction des protéines totales de bactéries	166
3.1.2 Extraction des protéines totales de plantes	166
3.1.3 Extraction différentielle des protéines de graines	168
3.2 PURIFICATION DES PROTEINES	171
3.2.1 Purification par chromatographie sur colonne Ni-NTA agarose	171
3.2.2 Purification par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions	172
3.3 DOSAGE DES PROTEINES	172
3.3.1 Dosage à 280 nm	172
3.3.2 Dosage par la méthode de Bradford	173
3.4 PRECIPITATION DES PROTEINES AU TCA	173
3.5 SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE	173
3.5.1 Séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	173
3.5.2 Séparation des protéines en conditions natives	174
3.5.3. Visualisation du profil protéique	175
3.5.4. Electroéluion et dialyse à partir d'un gel SDS-PAGE	175
3.6 IMMUNODETECTION DES PROTEINES	175
3.6.1 Préparation d'anticorps polyclonaux de cobaye	175
3.6.2 Western blot	176
3.6.3 Dot blot	176
3.7 ANALYSE DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE	177
3.7.1 Réhydratation des gels d'IEF	177
3.7.2 Migration en première dimension : Isoélectrofocalisation (IEF)	177
3.7.3 « Equilibration » des protéines	179
3.7.4 Migration en deuxième dimension	179
3.7.5 Méthodes de coloration des protéines sur gel 2D	180
3. 8 ANALYSE DENSITOMETRIQUE DES GELS 2D	182
3. 8. 1 Acquisition de l'image	182
3. 8. 2 Détection des spots protéiques (« Spotting »)	182
3. 8. 3 Comparaison automatique des images des gels (« Matching »)	183
3. 8. 4 Étalonnage de l'intensité des spots	184
3. 8. 5 Soustraction du bruit de fond	184
3. 8. 6 Normalisation du volume des spots	184
3. 8. 7 Gels moyens et expression des résultats	185

3. 10 ANALYSE DES PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	185
3.10.1 Prélèvement des spots	185
3.10.2 Spectrométrie de masse en tandem	186
3. 11 ANALYSE ENZYMATIQUE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE	187
3.11.1 Test NBT BCIP	187
3.11.2 Test enzymatique pour la phosphatase alcaline	188
 4. BIOLOGIE CELLULAIRE	 189
4. 1 TRANSFORMATION GENETIQUE DES PLANTES	189
4. 1. 1 Transformation nucléaire par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	189
4. 1. 2 Transformation chloroplastique par biolistique	191
4. 1. 3 Régénération et sélection des plantes transformées	192
4. 2 CROISEMENTS DE PLANTES TRANSFORMEES, HYBRIDATION	193
4. 3 PREPARATION DE CHLOROPLASTES PURIFIES DE FEUILLES DE TABAC	194
4. 3. 1 Préparation de chloroplastes	194
4. 3. 2 Préparation de fraction stromale	195
4. 3. 3 Préparation de thylacoïdes	195
4. 3. 4 Traitement par la thermolysine de la fraction de thylacoïdes purifiés	195
4. 4 PREPARATION DE PROTOPLASTES PURIFIES DE FEUILLES DE TABACS	196
4. 5 EXPERIENCES DE GERMINATION	196
4. 6 TEST DE CARENCE EN AZOTE	197
 5. MICROSCOPIE	 198
5. 1 MICROSCOPIE CONFOCALE	198
5. 2 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	198
5.2.1 Fixation chimique	198
5.2.2 Déshydratation	198
5.2.3 L'inclusion	198
5.2.4 Marquage immuno-cytochimique	198
 Références bibliographiques	 201
 Annexes	 219
 Publications	 249

Liste des figures

Chapitre I

<u>Figure I. 1</u> : Evolution des surfaces de cultures d'OGM ainsi que des espèces cultivées dans le monde entre 1996 et 2006 (ISAAA 2006)	4
<u>Figure I. 2</u> : Comparaison de différents systèmes de production de protéines recombinantes	7
<u>Figure I. 3</u> : Représentation schématique de l'organisation d'une cellule végétale	14
<u>Figure I. 4</u> : Différenciation des organites plastidiaux	15
<u>Figure I. 5</u> : Photographie de microscopie électronique d'un chloroplaste de plante	16
<u>Figure I. 6</u> : La photosynthèse génère l'ATP et les agents réducteurs riches en énergie, utilisés par le cycle de Calvin	18
<u>Figure I. 7</u> : Organites subcellulaires semblables aux chloroplastes chez le protozoaire <i>Plasmodium falciparum</i> et <i>Elysia chlorotica</i>	18
<u>Figure I. 8</u> : Plastome de tabac (<i>N. tabacum</i>)	19
<u>Figure I. 9</u> : ARN polymérases plastidiales	22
<u>Figure I. 10</u> : Import des protéines au chloroplaste et à ses différents compartiments	25
<u>Figure I. 11</u> : Protéome du lumen des thylacoïdes	26
<u>Figure I. 12</u> : Chronologie de la transformation des plastes de plantes supérieures	28
<u>Figure I. 13</u> : Représentation schématique des diverses cassettes d'expression pour la transformation du génome chloroplastique	30
<u>Figure I. 14</u> : Sélection des transplastomes pour atteindre l'état d'homoplasmie	31
<u>Figure I. 15</u> : Applications de la transformation chloroplastique	36

Chapitre II

<u>Figure II. 1</u> : Réaction d'hydrolyse par la phosphatase alcaline sur les mono-esters	46
<u>Figure II. 2</u> : La phosphatase alcaline	47
<u>Figure II. 3</u> : Construction du vecteur d'expression PhoA-L, pCLT516	49
<u>Figure II. 4</u> : Construction du vecteur d'expression PhoA-S, pCLT515	50
<u>Figure II. 5</u> : Structure génétique des plastomes sauvages et recombinants	51
<u>Figure II. 6</u> : Analyse PCR des lignées sélectionnées	52
<u>Figure II. 7</u> : Analyse de l'homoplasmie par PCR	53
<u>Figure II. 8</u> : Analyse par Southern blot	54
<u>Figure II. 9</u> : Accumulation de la phosphatase alcaline (PhoA) dans les chloroplastes	56
<u>Figure II. 10</u> : Analyse protéomique de l'accumulation de la phosphatase alcaline (PhoA) dans les bactéries transformées	59
<u>Figure II. 11</u> : Activité <i>in vivo</i> de la phosphatase alcaline recombinante chez <i>E. coli</i> , et dans les chloroplastes de tabac	61

<u>Figure II. 12</u> : Activité spécifique relative de la phosphatase alcaline recombinante dans les chloroplastes de tabac et les bactéries transformées	62
<u>Figure II. 13</u> : Activité de la phosphatase alcaline recombinante exprimée dans les chloroplastes après séparation en gel natif	63
<u>Figure II. 14</u> : Isolement de chloroplastes sur gradient de Percoll	64
<u>Figure II. 15</u> : Localisation de la phosphatase alcaline recombinante (PhoA) dans les compartiments plastidiaux	65
<u>Figure II. 16</u> : Activité de la phosphatase alcaline dans les différents compartiments du chloroplaste	67
<u>Figure II. 17</u> : Structure de la roGFP	73
<u>Figure II. 18</u> : Séquences roGFP, TATroGFP et SECroGFP obtenues après amplification PCR et overlap-PCR	74
<u>Figure II. 19</u> : Vecteurs d'expression de la roGFP	76
<u>Figure II. 20</u> : Analyse western blot réalisée avec des protéines totales solubles extraites de bactéries BL21 et BL21 <i>trx/gor</i> transformées avec les vecteurs pCLT583, pCLT585 et pCLT587	77
<u>Figure II. 21</u> : Spectre d'excitation de la roGFP1 dans les extraits bactériens BL21 et BL21 origami transformés avec le vecteur pCLT583	78
<u>Figure II. 22</u> : Visualisation de la roGFP dans les bactéries transformées	79
<u>Figure II. 23</u> : Analyses western blot réalisées avec des extraits protéiques de feuilles de tabacs transformés avec le vecteur pCLT587	81
<u>Figure II. 24</u> : Modèle de la formation des ponts disulfures chez les procaryotes	86
<u>Figure II. 25</u> : Vecteurs d'expression de DsbA, pEPA56 et DsbC, pEPA54	89
<u>Figure II. 26</u> : Analyse électrophorétique en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des différentes fractions protéiques obtenues à l'issue des étapes de purification des protéines DsbA et DsbC	90
<u>Figure II. 27</u> : Détection des protéines DsbA et DsbC par western blot	91
<u>Figure II. 28</u> : Croisements effectués	93
<u>Figure II. 29</u> : Activité spécifique relative de la phosphatase alcaline dans les plantes hybrides	94

Chapitre III

<u>Figure III. 1</u> : Organisation des vecteurs de transformation	102
<u>Figure III. 2</u> : Implication double de l'HPPD dans la biosynthèse des prénylquinones et dans le catabolisme de la tyrosine	103
<u>Figure III. 3</u> : Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie	104
<u>Figure III. 4</u> : Quantification des protéines recombinantes et de la Rubisco	105
<u>Figure III. 5</u> : Lignées de tabacs cultivés en serre	106
<u>Figure III. 6</u> : Fleurs de tabacs	108
<u>Figure III. 7</u> : Analyse des transcrits plastidiaux par RT-qPCR	110
<u>Figure III. 8</u> : Analyse du protéome total des feuilles de tabac	113
<u>Figure III. 9</u> : Spots analysés par spectrométrie de masse	114

<u>Figure III. 10</u> : Quantification relative de la Rubisco dans les lignées transplastomiques	119
<u>Figure III. 11</u> : Tabacs transplastomiques et sauvages carencés ou non en azote et traités avec une solution nutritive supplémentée avec 0 mM (1), 0.2 mM (2), 2 mM (3) et 20mM (4) de nitrate d'ammonium, 5 jours et 5 semaines après traitement	122
<u>Figure III. 12</u> : Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie représentant les profils protéiques des feuilles de tabacs sauvages (WT) ou transplastomiques (PhoA-S, PhoA-L, GFP et HPPD) traités avec 0 mM, 0.2 mM, 2 mM et 20 mM de nitrate d'ammonium.	123
<u>Figure III. 13</u> : Germination et développement des plantules de tabac sauvage et transformées	126
<u>Figure III. 14</u> : Analyse du protéome total des graines de tabac	128
<u>Figure III. 15</u> : Analyse protéomique des différentes classes de protéines de graines de tabac sauvages ou transformées	130

Chapitre IV

<u>Figure IV. 1</u> : Ligation d'un fragment d'ADN à bouts francs avec la topoisomérase I (Invitrogen)	148
<u>Figure IV. 2</u> : Ligation d'un fragment d'ADN à bouts sortants avec la topoisomérase I (Invitrogen)	148
<u>Figure IV. 3</u> : Courbe d'amplification d'une réaction de qPCR	163
<u>Figure IV. 4</u> : Principe du Cp	164
<u>Figure IV. 5</u> : Extractions protéiques successives selon Osborne (1924)	170
<u>Figure IV. 6</u> : Extractions protéiques successives selon la méthode du laboratoire	171
<u>Figure IV. 7</u> : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle	177
<u>Figure IV. 8</u> : Réaction NBT/BCIP avec la phosphatase alcaline	187
<u>Figure IV. 9</u> : Canon à particules	191
<u>Figure IV. 10</u> : Régénération et sélection des plantes transformées	193
<u>Figure IV. 11</u> : Technique d'hybridation	193
<u>Figure IV. 12</u> : Chloroplastes intacts séparés sur gradient de Percoll	194
<u>Figure IV. 13</u> : Stades de germination des graines de tabac <i>Nicotiana tabacum</i>	197

Liste des Tableaux

Chapitre I

<u>Tableau I. 1</u> : Protéines thérapeutiques produites dans les plantes	5
<u>Tableau I. 2</u> : Traits agronomiques, protéines pharmaceutiques, antigènes et biomatériaux exprimés à partir de transgènes plastidiaux	38

Chapitre III

<u>Tableau III. 1</u> : Quantification des protéines recombinantes, cartographiées par spectrométrie de masse	115
<u>Tableau III. 2</u> : Quantification des protéines de feuilles cartographiées par spectrométrie de masse	117

Chapitre IV

<u>Tableau IV. 1</u> : Liste des oligonucléotides utilisés pour réaliser des amplifications PCR	154
<u>Tableau IV. 2</u> : Oligonucléotides utilisés pour réaliser de la PCR quantitative	165

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine 5'-diphosphate
ANA	acide α -naphtalène acétique
AMP	adénosine monophosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATP	adénosine 5'-triphosphate
BAP	benzamino purine
BET	bromure d'éthidium
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoly-phosphate
β ME	beta mercaptoéthanol
BSA	bovine serum albumine
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CHO	chinese hamster ovary
Cp	crossing point
CRY1Ab	toxine insecticide de <i>Bacillus thuringiensis</i>
Ct	threshold cycle
CTAB	cetyl trimethylammonium bromide
DKN	dikétonitrile
DNase	désorybonucléase
dNTP	désoxyribonucléotides
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
g	constante gravitationnelle
GFP	green fluorescent protein
GSU	grande sous-unité
HPPD	p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
HSA	serum albumine humaine
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Kb	kilo bases
kDa	kilo dalton
LB	milieu de Luria Bertani
mBBr	monobromobimane
MS	Murashige et Skoog
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NEP	nuclear encoded polymerase
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
Pb	paire de bases
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyéthylène glycol
PEP	plastid encoded polymerase

PVDF	polyvinylidene difluoride
PSU	petite sous-unité
qPCR	PCR quantitative
RBS	ribosome binding site
RE	reticulum endoplasmique
RNase	ribonucléase
RT	reverse transcription
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	dodécyl sulfate de sodium
TCA	trichloroacétylène
TEMED	tetraméthyl-éthylènediamine
UV	ultra-violet

Chapitre I

Introduction

1. PLANTES TRANSGENIQUES : VUE D'ENSEMBLE

Grâce aux avancées scientifiques spectaculaires des vingt dernières années en matière de génie génétique et de biologie moléculaire, il est aujourd'hui envisageable de modifier le patrimoine génétique de tout organisme vivant en lui incorporant un fragment d'ADN provenant d'une espèce différente et de lui faire exprimer cette information génétique étrangère. Cette compétence nouvelle a permis d'ouvrir des voies de recherche et de développement biotechnologique aux perspectives considérables. Les années 70 ont marqué la naissance des premiers organismes génétiquement modifiés : des bactéries recombinantes. Ainsi, en 1973 la transgénèse a été appliquée pour la première fois à un microorganisme modèle, *E. coli*, avec le transfert d'un gène amphibien (Cohen *et al.*, 1973). Ces techniques de transformation ont été étendues aux plantes.

C'est en 1983, date de l'apparition des premières plantes transgéniques (Fraley *et al.*, 1983 ; Caplan *et al.*, 1983 ; Murai *et al.*, 1983), que l'histoire de la transgénèse végétale débute. Sa progression est rapide. Les premières applications concernent des caractères simples monogéniques, qui ont contribué à résoudre des problèmes agronomiques importants tels que les attaques d'insectes ravageurs ou une gestion plus aisée du désherbage. Les premières plantes résistantes aux insectes ou tolérantes aux herbicides ont été décrites en 1985 et 1987 respectivement. En à peine dix ans, la transgénèse passe du stade expérimental aux premières applications commerciales au champ.

Le début des années 90 marque l'essor des cultures transgéniques aux Etats-Unis. En 1994, la première variété transgénique y est commercialisée : la tomate Flavr-Savr à maturation retardée de la société Calgene. Puis, c'est le tour, en 1995, des premières variétés transgéniques de soja résistant à un herbicide total, le glyphosate, suivies de cotonniers et de maïs résistants à certains insectes ravageurs, comme la pyrale, suite à l'introduction d'un gène codant une toxine de la bactérie tellurique *Bacillus thuringiensis*. L'augmentation des surfaces de plantes génétiquement modifiées, depuis 1996, représente un des taux les plus élevés pour une nouvelle technologie agricole. Une croissance soutenue de plus de 11 % a été atteinte chaque année, huit années de suite (Figure I.1). Les principales cultures transgéniques au niveau mondial sont le soja, le maïs, le coton et le colza (Figure I.1).

Cet engouement des agriculteurs traduit le fait que la transgénèse est l'une des pratiques agricoles les plus rapidement adoptées au cours de l'histoire de l'humanité.

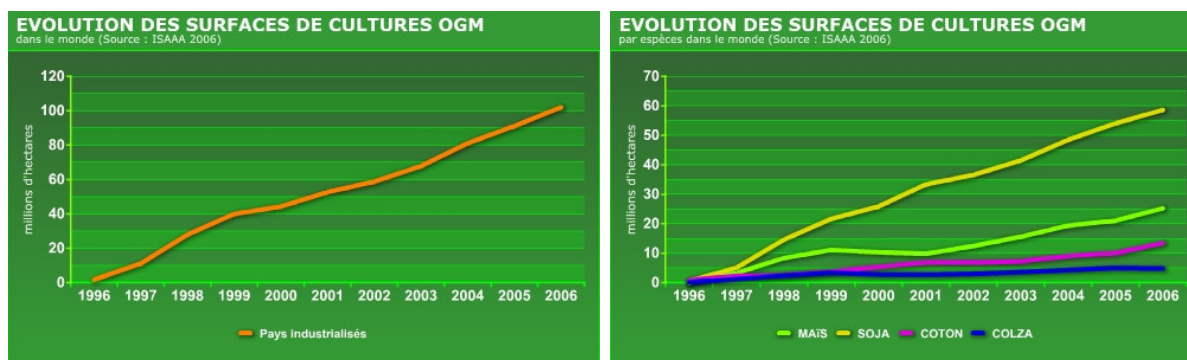


Figure I.1 : Evolution des surfaces de cultures d'OGM ainsi que des espèces cultivées dans le monde entre 1996 et 2006. (ISAAA 2006)

La recherche actuelle concerne des caractères dits de seconde génération, plus complexes, tels que la tolérance à divers types de stress (hydrique, salin, température), la qualité nutritionnelle, ou encore la résistance aux maladies fongiques. On peut déjà anticiper le développement d'une troisième génération qui aura un impact encore plus significatif sur le rendement et qui concernera l'amélioration de la photosynthèse ou la fixation de l'azote par les céréales. *Arabidopsis thaliana* et le tabac sont les espèces modèles pour l'étude à un niveau plus fondamental de la compréhension du vivant : l'inactivation d'un gène ou au contraire son expression accrue grâce aux précieux outils de transgénèse végétale permettent souvent de clarifier sa fonction.

La production de biopolymères modifiés (amidon, fibres, plastiques...), de molécules médicamenteuses et de vaccins ont également été initiées dans divers systèmes végétaux (Kusnadi *et al.*, 1998). Une large gamme de protéines, de différentes sources, ont déjà été produites (Daniell *et al.*, 2001a ; Faye *et al.*, 2001 ; Menkhaus *et al.*, 2004 ; Tableau I.1). Les premières protéines recombinantes dérivées de plantes modifiées ont déjà atteint le marché pour des applications de recherche. C'est le cas par exemple de l'avidine, de la trypsine, de la β -glucuronidase (Prodigène - maïs), ou encore de l'aprotinine (Large Scale Biology - tabac).

Bien qu'actuellement aucune protéine végétale recombinante ne soit commercialisée pour un usage thérapeutique, certaines ont déjà atteint les derniers stades de développement commercial, et d'essais cliniques. Elles comprennent des anticorps, des vaccins, ou encore, des hormones et des régulateurs de croissance (Ma *et al.*, 2005 ; Liénard *et al.*, 2007). Si les plantes transgéniques font l'objet de tant de recherches c'est parce qu'elles présentent certains avantages économiques et sécuritaires par rapport à d'autres systèmes d'expression.

Produits	Protéines	Plantes transgéniques
Protéines plasmatiques et sanguines	Albumine	Pomme de terre, tabac
	Aprotinine	Maïs, Lemna
	Collagène I	Tabac
	Encéphaline	Tabac
	Hémoglobine	Tabac
	Alpha-1 antitrypsine humaine	Riz
Vaccins	Bet v 1	Tabac
	Sous-unité B de la toxine du cholera	Pomme de terre
	Glycoprotéine B du cytomégalo virus humain (CMV)	Tabac
	Protéine de fusion sous-unité B de la toxine du Cholera/ insuline	Pomme de terre
	Peptide D2 de la protéine B de <i>S. aureus</i>	Haricot noir
	VP1	Haricot noir
	VP2	Arabette
	VP4	Luzerne
	Hemagglutinine	Tabac
	Antigène de l'hépatite B	Tabac et Pomme de terre
	Glycoprotéine gp41	Soja
	Enterotoxine B d' <i>E. coli</i>	Pomme de terre, tabac
	Toxine B du cholera <i>V. cholera</i>	Pomme de terre
	Epitope de <i>P. falciparum</i>	Tabac
	Capside du virus Norwalk	Tabac, pomme de terre
	Proteine G du virus de la rage	Tabac, épinard, tomate
	Autoantigène	Pomme de terre
Hormones, cytokines et facteurs de croissance	GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)	Tabac, canne à sucre
	Interferon β	Tabac
	Interferon α	Tabac
	Interferon γ	Riz
	Somatotropine hGH (human Growth Hormon)	Tabac (chloroplastes)
	Érythropoïétine	Tabac
	EGF (Epidermal Growth Factor)	Tabac
	VEGF (Vascular endothelial growth factor)	Mousse
	Interleukine 2	Pomme de terre
	Interleukine humaine 6	Tabac
	Interleukine 10	Tabac
	Interleukine 12	Tabac
	IGF (Insulin like Growth factor)	Riz, Tabac
Enzyme	ACE (angiotensin converting enzyme)	Tabac, tomate
	Proteine C (protéase sérique)	Tabac
	Glucocérébrosidase	Tabac (plante et graines)
	Alpha-trichosantine	Tabac
	Acétylcholinestérase humaine	Tomate
	Lipase gastrique du chien	Tabac
	Transglutaminase humaine	Tabac
Autres	Hirudine	Tabac, colza
	Endostatine	Tabac
	Lactoferrine humaine	Tabac, riz

Tableau I. 1 : Protéines thérapeutiques produites dans les plantes. Ce tableau adapté de Liénard *et al.*, (2007). Il n'est pas exhaustif et n'inclut pas les anticorps recombinants produits dans les plantes.

1. 1 AVANTAGES DES PLANTES POUR L'EXPRESSION DE PROTEINES D'INTERET

Aujourd'hui, différents systèmes de production de molécules recombinantes sont disponibles : bactéries, levures, cellules animales, animaux et plantes transgéniques (Figure I.2). Les bactéries sont des systèmes de choix, par rapport aux autres alternatives, pour la production de protéines recombinantes. Elles représentent un système d'expression robuste qui permet souvent l'obtention de rendements élevés. D'autres avantages liés à la production de protéines d'intérêt dans les bactéries, (comme dans *E. coli*), sont la simplicité du transfert de gènes dans cet hôte et la facilité de générer rapidement un volume de production important. De nombreux vecteurs plasmidiques ont été construits et sont disponibles afin d'exprimer un gène étranger au sein de la bactérie. Celles-ci se prêtent très bien à la culture de masse en fermenteur dans des conditions contrôlées et permettent de produire jusqu'à plusieurs grammes de protéines recombinantes par litre de culture. Ce système procaryotique ne peut cependant servir qu'à l'expression de molécules relativement simples, ne nécessitant pas de modifications post-traductionnelles complexes pour être actives, puisque certains de ces mécanismes demeurent totalement absents chez ces organismes (Gomord et Faye, 2004). Ainsi, il n'est pas possible de faire produire aux bactéries des protéines glycosylées. En revanche, les levures qui permettent des taux d'expression similaires installent bien les chaînes glycosidiques, mais différentes de celles rencontrées chez l'homme. Ces organismes ne sont donc pas toujours adaptés à la production de protéines animales complexes. Il a également été rapporté que des conditions de stress peuvent affecter la qualité et la quantité du produit obtenu (Schweder *et al.*, 2002). L'hormone de croissance ou l'insuline, qui ne sont pas glycosylées peuvent être produites par les bactéries ou les levures. D'autres protéines, comme l'érythropoïétine, nécessitent la présence d'un mécanisme de glycosylation similaire à celui retrouvé chez l'être humain pour pouvoir assurer leur fonctionnalité.

Les cellules animales, comme par exemple les cellules ovariennes de hamster (CHO), présentent l'avantage parfois déterminant de produire des protéines recombinantes dont les modifications post-traductionnelles, notamment la glycosylation, sont très similaires des protéines humaines (Borth *et al.*, 2005). Cependant l'usage de ces cellules animales comme outil de production reste limité en raison d'un coût de production élevé et de leur rendement moyen en protéine recombinante (Gomord *et al.*, 2004).

L'obtention d'un rendement élevé dans un système possédant des mécanismes post-traductionnels proches de ceux de l'être humain est possible par l'utilisation d'animaux transgéniques. Des quantités importantes de molécules recombinantes ont été obtenues dans le

blanc d'œuf d'oiseau ou encore le lait provenant d'animaux transgéniques domestiques comme les vaches, les brebis, les truies et les chèvres. En revanche, l'obtention d'animaux transgéniques est un processus extrêmement long et coûteux. De plus, une contamination par un pathogène animal endogène, tel qu'un virus ou un prion ne peut être exclue (Capell *et al.*, 2004).

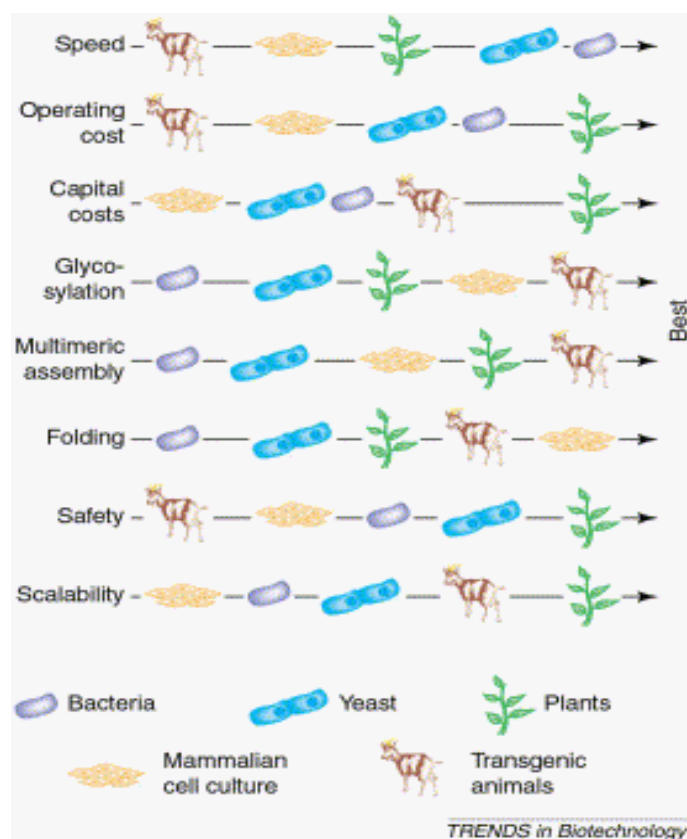


Figure I. 2 : Comparaison de différents systèmes de production de protéines recombinantes (d'après Raskin *et al.*, 2002). Le pictogramme présente un classement des différents systèmes de production de protéines recombinantes. Les plantes transgéniques se situent en première position au niveau des coûts de production, de l'investissement, de la sécurité et de la montée en cadence.

Au cours de la dernière décennie, les systèmes d'expression végétaux ont émergé comme une sérieuse force concurrentielle pour la production de protéines recombinantes à grande échelle. Les plantes transgéniques offrent certains avantages par rapport aux autres modes de production. Une caractéristique importante des cellules végétales est leur capacité à régénérer une plante entière (*in vitro*, en conditions contrôlées). Il est donc possible d'obtenir

un grand nombre de plantes transformées identiques à partir de très peu de matériel. Outre cette caractéristique fondamentale, l'utilisation des plantes pour la production de protéines est moins coûteuse puisque les cellules végétales n'ont besoin que de lumière, de CO₂, d'eau et de sels minéraux. Cela implique la possibilité d'une production à grande échelle pour un moindre coût. Les biens d'équipement et leurs coûts de fonctionnement sont nettement inférieurs à ceux des autres systèmes de production. Il a été estimé que les protéines recombinantes peuvent être fabriquées par l'intermédiaire des plantes à 2-10% du coût de la fermentation microbienne et à 0,1% du coût des cultures de cellules de mammifères (Twyman *et al.*, 2003).

Les coûts de production d'une protéine recombinante dépendent également de façon significative de la pureté requise. La purification d'une protéine peut représenter plus de 80% du coût de production (Faye *et al.*, 2001). L'étape de purification est nécessaire, à moins que, comme dans le cas de certaines molécules thérapeutiques, le produit puisse être administré oralement. Les plantes sont par exemple avantageuses pour la délivrance d'un vaccin oral (Mason *et al.*, 2002). De même, des enzymes industrielles telles que la glucanase ou la phytase peuvent être utilisées directement sans nécessiter leur purification (Denbow *et al.*, 1998 ; Dai *et al.*, 2000). Les risques sanitaires dus à des contaminations pathogènes d'origine animale ou encore à des toxines sont également minimisés (Staub *et al.*, 2000). En effet, il n'existe pas, à l'état actuel de nos connaissances, de pathogènes végétaux capables d'infecter l'animal et l'homme. De surcroît, les plantes transgéniques présentent une grande flexibilité. Les systèmes de fermentation et les animaux transgéniques ont un potentiel limité dans ce domaine. Les systèmes d'expression végétaux présentent une plus grande souplesse car on peut ajuster facilement la surface cultivée à la demande du marché même pour des quantités importantes. Ainsi, les plantes représentent un intérêt important en terme de productivité, de sécurité et de coût. Un dernier avantage des systèmes végétaux est la multitude d'options possibles pour le ciblage et l'expression des protéines (Tableau I.1).

1. 2 SYSTEMES D'EXPRESSION VEGETAUX DISPONIBLES

1.2.1 Choix du système végétal

En pratique, différentes espèces et tissus végétaux ont été considérés pour la production de protéines recombinantes, le choix d'une espèce ou d'un tissu reposant sur un ensemble de facteurs inhérents aux infrastructures disponibles et aux caractéristiques de la

protéine d'intérêt (Schillberg *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, parmi les systèmes de production disponibles, deux types principaux sont utilisés en raison de la quantité importante de biomasse qu'ils génèrent, à savoir les parties végétatives et les organes de réserve ou de propagation comme les graines (Faye *et al.*, 2001).

Les feuilles, présentes en grande quantité comme chez le tabac, la luzerne, le soja ou encore la laitue, sont souvent ciblées pour l'expression du transgène (Twyman *et al.*, 2003 ; Buswell *et al.*, 2005 ; Joh *et al.*, 2005). La graine est l'organe de choix chez le maïs, le colza, le soja ou encore le riz (Azzoni *et al.*, 2002) et présente l'avantage de permettre un stockage à long terme avant extraction et purification des protéines recombinantes exprimées, sans dégradation importante (Stöger *et al.*, 2005). Ainsi, des anticorps exprimés dans des graines sont stables pendant au moins trois ans, à température ambiante (Stöger *et al.*, 2000). En revanche, la nécessité d'atteindre le stade de floraison durant le cycle de production peut représenter un risque accru de dispersion du transgène dans l'environnement (Einsiedel et Medlock, 2005). Les feuilles, pour leur part, présentent un métabolisme endogène actif et complexe offrant beaucoup de possibilités, mais elles montrent aussi une activité protéolytique endogène importante qui limite l'accumulation de protéines naturellement peu stables dans la cellule transformée (Goldstein et Thomas, 2004).

L'expression de la protéine d'intérêt peut également être effectuée au niveau d'autres organes comme par exemple les fruits. Ceux-ci peuvent être consommés directement, ce qui les rend idéaux pour la production de vaccins comestibles. La tomate ou la banane sont ainsi des systèmes très attrayants pour la production de vaccins ou d'anticorps (Mason *et al.*, 2002). D'autres systèmes de production, comme la pomme de terre, ont aussi été évalués pour la production de vaccins, d'anticorps, de glucanase, et d'autres protéines variées (Dai *et al.*, 2000 ; Chong et Langridge, 2000).

La production de protéines en cultures cellulaires est une alternative plus sophistiquée aux plantes entières (Gasdaska *et al.*, 2003 ; Schillberg *et al.*, 2003 ; Misaki *et al.*, 2006). La culture de cellules végétales permet la production de protéines recombinantes complexes, en combinant les avantages des plantes avec ceux des bactéries et des cultures de cellules animales. Les protéines peuvent être secrétées dans le milieu de culture permettant un processus continu de production et de récupération du produit, ce qui peut augmenter considérablement le rendement total, sans compter l'aspect sécuritaire de la production en milieu confiné. L'instabilité des protéines dans le milieu extracellulaire, par contre, représente

toujours un défi de taille, difficile à résoudre sans l'addition de composés stabilisants et parfois toxiques (Hellwig *et al.*, 2004).

1.2.2 Localisation cellulaire de la protéine

Le ciblage subcellulaire peut être utilisé comme une méthode générale afin d'augmenter le rendement en protéine recombinante. Cette approche consiste à ajouter des signaux d'adressage permettant de diriger l'accumulation des protéines recombinantes dans le milieu extracellulaire, le cytosol, le reticulum endoplasmique, les chloroplastes ou la vacuole. Cette possibilité de contrôler la destination finale des protéines recombinantes contribue à préserver leur intégrité structurale et à maximiser les rendements.

En pratique, l'absence de signal d'adressage entraîne l'accumulation de la protéine dans le compartiment cytosolique de la cellule végétale. Certaines protéines exogènes sont relativement stables dans ce compartiment (De Jaeger *et al.*, 1999). Il s'avère cependant parfois nécessaire d'adresser la protéine vers d'autres compartiments cellulaires plus appropriés (Schillberg *et al.*, 1999). A titre d'exemple, les faibles taux d'accumulation de l'hormone de croissance humaine observés dans le compartiment cytosolique des cellules foliaires de tabac ont été améliorés en dirigeant cette protéine dans le compartiment apoplastique (Gils *et al.*, 2005). Des études comparatives portant sur l'adressage cellulaire des immunoglobulines ont montré que la voie de sécrétion par le reticulum endoplasmique constitue un compartiment intéressant pour le repliement et l'assemblage des anticorps en comparaison au compartiment cytosolique, générant dans la plupart des cas des rendements en protéine recombinante nettement plus importants (Faye *et al.*, 2005). Dans le cas des protéines nécessitant un repliement et un assemblage complexe, le reticulum apparaît comme le compartiment de choix en raison de sa teneur limitée en protéases et de la présence importante de chaperonnes assistant le repliement des protéines néo-synthétisées, en particulier celles contenant des ponts disulfures (Twyman *et al.*, 2003).

Des niveaux élevés d'accumulation de protéines ont également été mis en évidence pour d'autres destinations cellulaires incluant, la mitochondrie, le péroxysome et en particulier le chloroplaste (Daniell *et al.*, 2002; Gils *et al.*, 2005; Hyunjong *et al.*, 2006). La toxine insecticide codée par le gène *Cry2Aa2* dans le génome chloroplastique recombinant de tabac est ainsi exprimée à un niveau extraordinaire, représentant 45% des protéines solubles des feuilles matures (De Cosa *et al.*, 2001). Les hauts rendements possibles avec le système des chloroplastes transgéniques sont attrayants, et seront discutés dans le prochain chapitre.

1. 3 TECHNIQUES DE TRANSFORMATION DES SYSTEMES VEGETAUX

La production de molécules recombinantes par les végétaux passe par la transgénèse. Les méthodes utilisées pour la transformation génétique des plantes s'apparentent souvent à celles utilisées chez les levures ou les cellules de mammifères. Deux grandes catégories de méthode de transformation sont distinguables selon que le transgène est intégré dans le génome de la cellule végétale ou seulement exprimé de façon transitoire.

1.3.1 Transformation transitoire

L'incorporation de l'ADN exogène dans le génome de la cellule de façon stable est rare. Il se maintient souvent dans le noyau pendant plusieurs jours avant d'être dégradé. Pendant cette période son expression est soumise aux régulations cellulaires au même titre que les gènes endogènes. Cette expression transitoire présente certains avantages par rapport à la transformation stable. Les résultats de l'expression d'une protéine sont obtenus rapidement (Kapila *et al.*, 1997). Ceci permet la vérification quasi-immédiate de la fonctionnalité du produit d'un gène avant de passer à une production à grande échelle. Deux techniques sont utilisées : l'agro-infiltration et l'infection virale (Fischer et Emans, 2000).

La bactérie pathogène du sol, *A. tumefaciens*, fournit une méthode de transformation simple pour la plupart des espèces dicotylédones. C'est une bactérie gram-négative responsable de la galle du collet, une maladie des plantes dicotylédones (Van Larebeke *et al.*, 1974). Cette maladie se traduit par une division anarchique des cellules au point d'infection et par le développement d'une tumeur végétale. *A. tumefaciens* a la propriété remarquable de transférer une partie de son ADN (ADN-T) dans le génome des cellules végétales lors de l'infection. Ce mécanisme naturel de transfert d'ADN a été domestiqué à des fins biotechnologiques pour devenir un outil de transformation génétique. Il est possible d'avoir une expression transitoire par la technique d'agroinfiltration qui consiste à faire rentrer, sous vide, une solution d'agrobactéries dans l'espace intercellulaire des tissus végétaux. Le niveau d'expression est cependant souvent médiocre (Djamei *et al.*, 2007).

L'utilisation de vecteurs viraux est une alternative attractive car elle permet un haut niveau d'expression du transgène, rapidement dans toutes les cellules de la plante (Scholthof *et al.*, 1996). Des vecteurs viraux modifiés sont utilisés pour une synthèse transitoire de diverses protéines, une technique maîtrisée essentiellement dans quelques espèces du genre *Nicotiana*. Ainsi, pour le tabac, le virus de la mosaïque du tabac est utilisé (TMV ; Heinlein,

2002). La multiplication du gène introduit au sein de l'ARN viral est effectuée par réplication dans le cytoplasme, ce qui génère transitoirement de nombreux transcrits du gène d'intérêt. L'amplification du virus est cependant non synchrone et il existe une corrélation négative entre la taille de l'insert et la stabilité de l'expression des protéines vectorielles (Avesani *et al.*, 2007). D'autre part, le virus recombinant est protégé par une capside protéique et la mobilisation des ressources métaboliques de la cellule pour la synthèse d'une grande quantité de cette protéine réduit le niveau d'expression de la protéine d'intérêt.

Face à ces problèmes, une nouvelle technologie d'expression transitoire a été générée : la magniffection (Gleba *et al.*, 2007). C'est une technologie hybride de l'agroinfiltration par *A. tumefaciens* et de l'expression virale. L'idée est d'infiltrer sous vide des plantes entières ou des feuilles matures avec une suspension d'agrobactéries dont l'ADN-T code le virus recombinant délété du gène de la capside. Le T-DNA est délivré simultanément dans tous les tissus grâce à l'agroinfiltration, permettant de synthétiser un ARN viral qui pourra alors infecter de manière synchrone les cellules voisines. Cette technologie présente de nombreux avantages tels que de très hauts rendements de production, une manipulation simple et des résultats rapides. La magniffection a été utilisée pour produire des protéines pleinement fonctionnelles, telles que l'hormone de croissance humaine, des anticorps ou certains antigènes (Gils *et al.*, 2005 ; Giritch *et al.*, 2006 ; Dorokhov *et al.*, 2007).

1.3.2 Transformation stable du génome nucléaire

Cette transformation est actuellement réalisable par deux catégories de techniques. La première consiste à utiliser les propriétés des bactéries *Agrobacterium*. Cette méthode de transformation est assez simple pour la plupart des espèces dicotylédones. Les graminées semblaient exclues de cette voie car insensibles à l'infection par *Agrobacterium* et présentaient des difficultés de régénération *in vitro*. Aujourd'hui cependant, la technique est maîtrisée chez le riz, le blé et le maïs (Casse-Delbart, 1996).

La deuxième méthode, appelée biolistique ou bombardement de microparticules, appartient aux techniques de transformation directe et fait intervenir les propriétés physico-chimiques qui permettent de forcer la pénétration de l'ADN dans les cellules. Elle s'est révélée utile pour la transformation des tissus végétaux récalcitrants à l'infection par *Agrobacterium*. Le principe consiste à projeter sur le tissu végétal à transformer des microparticules d'or ou de tungstène enrobées de l'ADN à insérer dans le génome de la plante hôte. Cette méthode reste longue et délicate mais a prouvé sa faisabilité comme l'atteste le

succès d'expériences réalisées sur de nombreuses espèces, parmi lesquelles, le tabac, le soja, le blé, le coton, le maïs ou le riz. D'autres méthodes de transformation directe telles que l'utilisation du polyéthylène glycol (PEG) ou l'électroporation de protoplastes (Paszkowski *et al.*, 1984 ; Fromm *et al.*, 1985) sont moins fréquemment employées.

En plus du génome nucléaire, les plantes possèdent deux autres génomes, au niveau mitochondrial et au niveau plastidial. La transformation du génome mitochondrial des eucaryotes n'a été réalisée à ce jour que chez une algue unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii* (Randolph-Anderson *et al.*, 1993) et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Butow *et al.*, 1996). La transgénèse nucléaire a néanmoins trouvé chez les plantes une alternative dans la transformation du génome plastidial.

1.3.3 Transformation stable du génome chloroplastique

Cette technologie a été décrite pour la première fois en 1988, chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton *et al.*, 1988) puis adaptée aux plantes supérieures. Elle permet une insertion ciblée du transgène au sein du génome plastidial par recombinaison homologue. Cette technique, qui présente certains avantages par rapport à la transformation du génome nucléaire, a été utilisée pour mener à bien tous les travaux réalisés au cours de cette thèse et sera donc plus amplement décrite dans les paragraphes suivants.

2. PRESENTATION GENERALE DES PLASTES

La cellule végétale représente le sommet de la complexité cellulaire. Elle est capable de synthétiser toutes les substances organiques qui lui sont nécessaires. Comme toute cellule eucaryote, elle comporte donc, entre autre, un noyau qui contient le matériel génétique, le reticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et des mitochondries. La plus grande partie de son cytoplasme est occupé par une vacuole. Elle est entourée d'une paroi pecto-cellulosique. Mais la principale caractéristique des cellules végétales est la présence de plastes (Figure I. 3). Ces organites subcellulaires caractéristiques des cellules végétales sont présents toutes les cellules, des algues et des végétaux supérieurs, excepté le pollen (Zhang *et al.*, 2003).

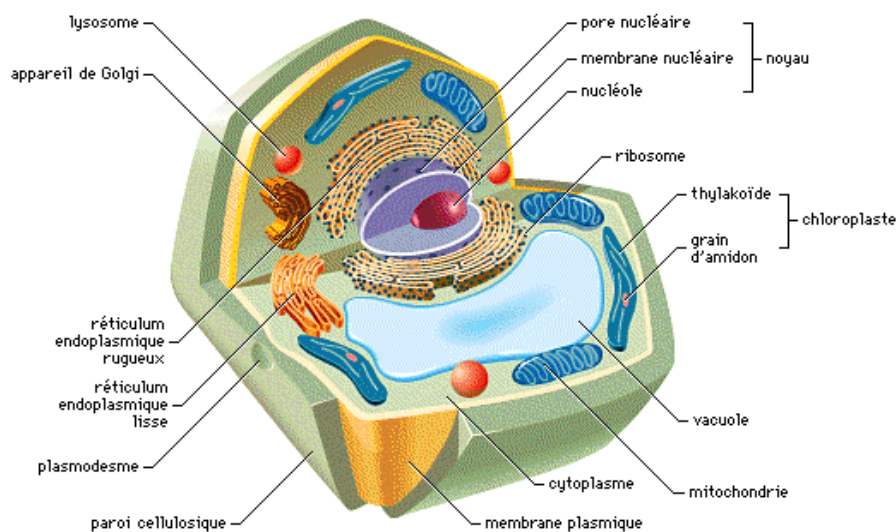


Figure I. 3: Représentation schématique de l'organisation d'une cellule végétale

Chez les plantes supérieures, les plastes et notamment les chloroplastes, sont des sites importants pour la synthèse des protéines et pour de nombreuses voies métaboliques qui sont partiellement ou entièrement localisées à l'intérieur de cet organe.

2. 1 LES PLASTES : ORGANITES POLYVALENTS

2.1.1 Différenciation des plastes

Chez les végétaux supérieurs on trouve un large éventail de plastes qui diffèrent par leur morphologie, leur fonction ou leur état de différenciation, dicté par le tissu dans lequel ils se trouvent (Waters et Pykes, 2005). Les plus connus sont (i) les chloroplastes présents en

grand nombre dans les cellules chlorophylliennes et qui sont le siège de la photosynthèse, (ii) les chromoplastes chargés en caroténoïdes (et leurs dérivés) qui sont à l'origine de la pigmentation de certains tissus comme chez la carotte (racine) ou encore la tomate (fruit), (iii) les amyloplastes qui accumulent l'amidon dans les organes de réserve comme les tubercules. Tous ces plastes sont issus de la différenciation d'un même organite, le proplaste, présent dans les tissus indifférenciés, ou évoluent progressivement à partir d'un autre type fonctionnel différencié (Figure I. 4).

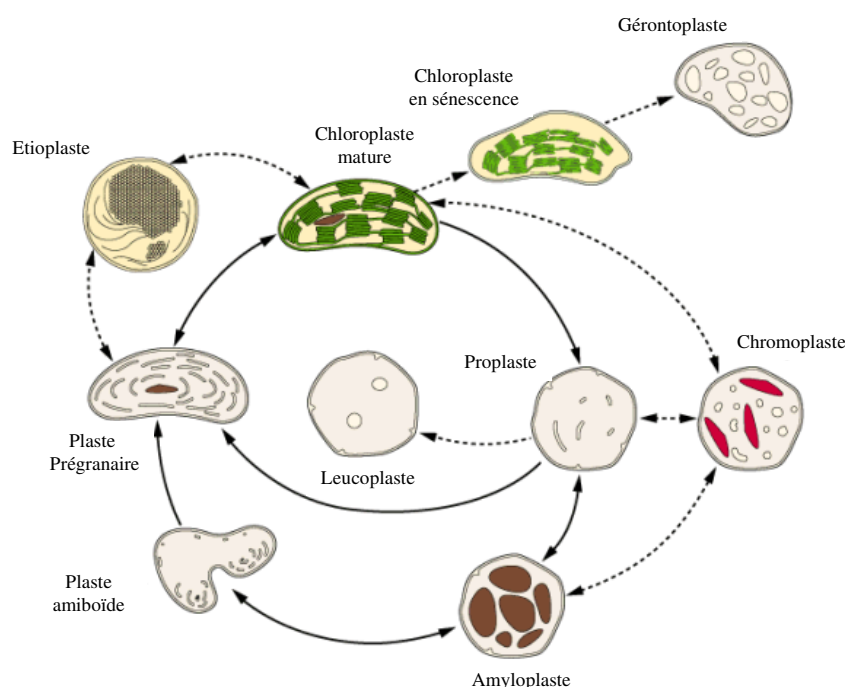


Figure I. 4: Différenciation des organites plastidiaux.

Figure adaptée d'après Buchanan, B. B., W. Gruissem and R. L. Jones. (2000).

Le processus de différenciation est régulé par des signaux échangés entre les plastes et la cellule hôte, intégrant la nature et la fonction de la cellule végétale, mais aussi les conditions du milieu environnant. Cette différenciation est un phénomène réversible.

2.1.2 Fonctions cellulaires et métaboliques des plastes

Les plastes sont polyvalents et assurent une grande partie des fonctions cellulaires : métabolisme des tétrapyrroles, de lipides, de l'amidon, d'acides aminés, de pigments, et de nombreux métabolites secondaires (Neuhaus et Emes 2000).

✓ Les chromoplastes sont observés dans les cellules des organes végétaux pigmentés. Ces organites peuvent dériver des chloroplastes ou des proplastides et sont riches en pigments non chlorophylliens, comme les xanthophylles ou les caroténoïdes. Le changement de couleur, lors du mûrissement des fruits par exemple, résulte d'une transformation des chloroplastes en chromoplastes dans les cellules du péricarpe. Ils jouent un rôle dans la « coévolution » entre la plante et l'insecte : la couleur des fleurs la plante (due aux chromoplastes) attire l'insecte qui se nourrit de nectar le plus souvent, et "en retour " pollinise la plante.

✓ Les amyloplastes sont spécialisés dans le stockage de l'amidon. Ils sont largement présents dans les racines et les tubercules et contiennent des couches concentriques d'amidon. Dans certaines parties de la plante (tige et coiffe de la racine), les amyloplastes sont également appelés statolithes : sous l'effet de la gravité, les plastides remplis d'amidon sédimentent vers la base de la cellule, permettant ainsi d'activer la voie de transduction du signal gravitropique (Morita et Tasaka, 2004).

✓ Les chloroplastes sont, après la vacuole, les compartiments majeurs des cellules végétales. Ils sont spécialisés dans la photosynthèse. Ils assurent la perception et la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique grâce aux pigments chlorophylliens principalement dans les feuilles mais également dans les tiges et les fruits verts. Ces organites possèdent à cet effet une organisation particulière avec un système membranaire complexe : les thylacoïdes (Figure I. 5).

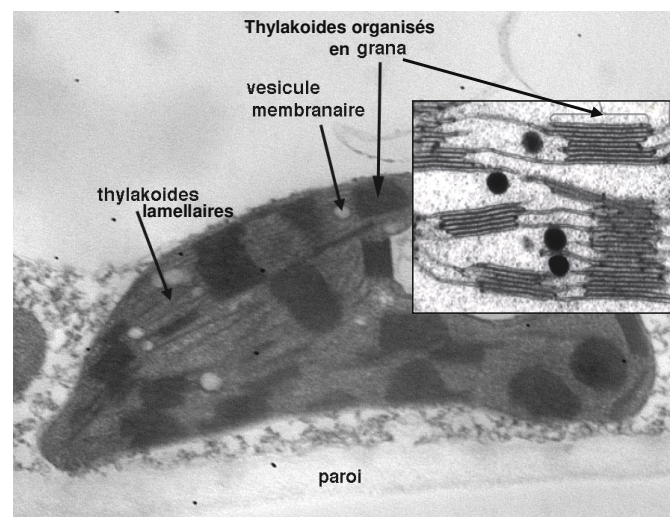


Figure I. 5 : Photographie de microscopie électronique d'un chloroplaste de plante.

Ces membranes peuvent s'organiser en grana qui sont interconnectés les uns aux autres par des thylacoïdes lamellaires, directement en contact avec le stroma. Ces membranes thylacoïdiennes délimitent un espace intra-thylacoïdien, le lumen.

Dans les membranes des thylacoïdes se trouvent l'appareil photosynthétique et les pigments photosynthétiques (chlorophylles, caroténoïdes et phycoérythrine) : le photosystème I (PSI), essentiellement au niveau des grana et le photosystème II (PSII), essentiellement au niveau des thylacoïdes lamellaires. Ces centres réactionnels capturent l'énergie des photons grâce à la chlorophylle. L'énergie lumineuse est tout d'abord piégée par le photosystème II et va induire l'oxydation des molécules d'eau en libérant de l'oxygène (Figure I.6). Les électrons issus de l'oxydation de l'eau vont être transférés jusqu'à un accepteur, le NADP^+ qui sera réduit en NADPH, *via* une chaîne de transfert d'électrons impliquant des plastoquinones, le complexe cytochrome *b6f*, des plastocyanines et le photosystème I. Ces réactions lumineuses engendrent par l'intermédiaire du chloroplaste la synthèse d'ATP, une molécule hautement énergétique, à partir d'ADP et de phosphate. L'enzyme responsable de cette réaction, l'ATP-synthétase est activée par le passage des protons libérés à l'intérieur du chloroplaste vers le cytoplasme de la cellule.

Le NADPH et l'ATP libérés par ces réactions lumineuses sont stockés dans le stroma du chloroplaste. Ils vont servir pour réduire le dioxyde de carbone (CO_2) en carbone organique, sous forme de glucides, *via* le cycle de Calvin. Chez les plantes en C3 chaque cycle consomme trois molécules de CO_2 . La condensation de ces molécules de CO_2 en 3-phosphoglycérate est catalysée par la Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase, EC 4.1.1.39), enzyme la plus abondante de la biosphère. Cette protéine complexe est codée à la fois au sein du génome nucléaire (petite sous-unité, PSU) et au sein du génome plastidial (grande sous-unité, GSU). La consommation du NADPH et de l'ATP permet ensuite la formation de glyceraldéhyde-3-phosphate, précurseur de divers sucres à partir du 3-phosphoglycérate. Les plantes présentant un métabolisme en C4 possèdent une autre enzyme fixant le CO_2 , la phospho-énol-pyruvate-carboxylase. Le CO_2 atmosphérique est rapidement intégré par cette enzyme dans un composé à quatre atomes de carbone (oxaloacétate, puis malate ou aspartate). Ces réactions ont lieu dans le mésophylle. Ce composé à quatre atomes de carbone, un acide dicarboxylique, est ensuite transporté vers les cellules de la gaine périvasculaire où le CO_2 piégé est libéré. Le CO_2 est alors refixé par le cycle de Calvin selon le mécanisme des plantes en C3 mais avec un meilleur rendement. Ce type de photosynthèse

existe notamment chez des Graminées d'origine tropicale ou aride, comme la canne à sucre ou le sorgho.

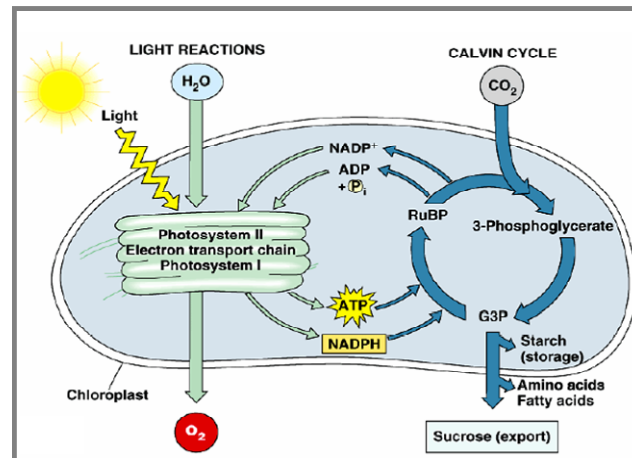


Figure I. 6 : La photosynthèse génère l'ATP et les agents réducteurs riches en énergie, utilisés par le cycle de Calvin.

Le chloroplaste apparaît donc comme l'organe clé dans l'autotrophie des végétaux. Il fournit de l'énergie sous forme d'ATP et d'agents réducteurs grâce à la photosynthèse mais permet aussi l'assimilation des formes inorganiques du carbone, du soufre et de l'azote (Figure I. 6).

✓ Des organites subcellulaires, proches des chloroplastes, ont également été décrits chez d'autres espèces (Figure I.7), comme les apicoplastes chez le protozoaire parasite *Plasmodium falciparum*, agent infectieux responsable de la malaria (Mc Fadden et Waller, 1997), ou chez *Toxoplasma gondii* (Maréchal et Cesbron-Delauw, 2001). On trouve également des chloroplastes, recrutés par certaines limaces de mer, comme *Elysia chlorotica* (Rumpho *et al.*, 2001).

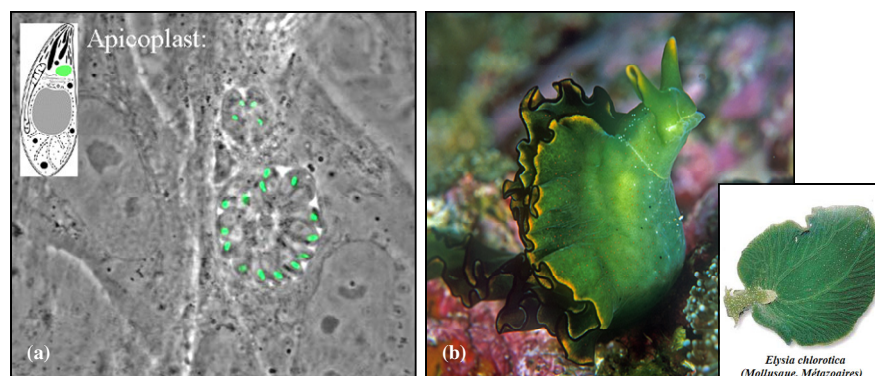
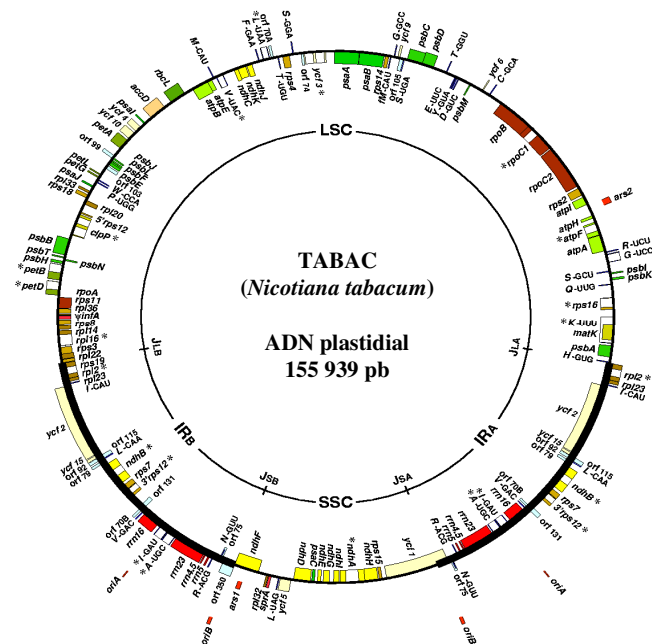


Figure I.7 : Organites subcellulaires semblables aux chloroplastes chez le protozoaire *Plasmodium falciparum* (a) et chez *Elysia chlorotica* (b).

Les plastes, possèdent leur propre information génétique sous forme de molécules circulaires d'ADN double-brin de 130 à 160 kb (Figure I. 8). Ce génome est appelé plastome. La variation de taille entre diverses espèces concerne essentiellement la région inversée répétée du génome. Certaines légumineuses (le pois par exemple) ne contiennent pas cette séquence répétée. Chez d'autres espèces, elle est beaucoup plus grande, comme par exemple chez *Pelargonium hortorum* qui possède un plastome de 217 kb en raison de la présence d'une région inversée répétée trois fois plus importante (Palmer *et al.*, 1987). D'autre part, chez les espèces non photosynthétiques la taille du plastome est réduite, comme c'est le cas par exemple de la plante parasite *Epifagus virginia* qui a perdu la plupart de ses gènes plastidiaux et possède un génome de seulement 70 kb (Morden *et al.*, 1991).



Le génome plastidial est hautement polyploïde. En effet, une cellule foliaire peut contenir de 50 à 100 chloroplastes, et chacun peut posséder de multiples copies du génome (souvent plus d'une centaine). Il est donc possible de trouver jusqu'à 10 000 copies identiques d'ADN plastidial dans une seule cellule, parfois même jusqu'à 50 000 comme dans le cas des cellules foliaires du blé (Bendich, 1987).

Le génome plastidial est idéalement représenté comme un monomère circulaire possédant deux régions inversées répétées (IR_A et IR_B) permettant d'individualiser une grande région simple copie (LSC) et une petite région simple copie (SSC) (Figure I.8). Cependant la réalité semble plus complexe, et des plastomes sous forme de multimères linaires ou circulaires sont fréquemment observés (Maier et Schmitz-linneweber, 2004). La séquence complète du génome plastidial est disponible pour plus de vingt espèces différentes d'Angiosperme (http://megasun.bch.umontreal.ca/ogmp/projects/other/cp_list.html). Une grande partie des produits des gènes plastidiaux est impliquée dans les mécanismes de transcription et traduction du plastome, comme les protéines ribosomales ou les ARNt par exemple ; ce sont les gènes dits de ménage. Un deuxième groupe de gènes codent des protéines impliquées dans le fonctionnement de l'appareil photosynthétique, telles que des protéines des photosystèmes I et II, la grande sous-unité de la Rubisco (*rbcL*) ou encore les sous-unités de l'ATP-synthase et de la NADH déhydrogénase. Enfin, quelques gènes supplémentaires sont présents et ont des fonctions variées, voire même parfois non identifiées. La répartition des gènes sur ce génome peut varier d'une espèce à l'autre.

2.2.1 Origine et évolution du génome plastidial

Selon la théorie endosymbiotique (Margulis, 1975), étayée par des études biochimiques et moléculaires, les plastes ont pour ancêtre un procaryote de type cyanobactérie qui s'est installé dans un organisme eucaryote phagocytaire dans un bénéfice commun (McFadden, 2001). Les plastes sont considérés comme des organites semi-autonomes en raison de la conservation d'une partie de leur génome ancestral. Tandis que plusieurs milliers de protéines sont codées par les cyanobactéries contemporaines, seulement quelques dizaines sont codées dans le génome plastidial des végétaux supérieurs photosynthétiques. La grande majorité des gènes ancestraux du génome plastidial ont été éliminés au cours de l'évolution ou relocalisés dans le génome nucléaire. Les milliers de protéines identifiées dans les plastes et non codées par le génome chloroplastique sont codées dans ce génome nucléaire et importées après leur traduction au niveau du cytoplasme de la cellule (Martin et Herrmann, 1998) avant d'être adressées au chloroplaste. Elles comportent en général un peptide d'adressage du côté N-terminal qui est clivé lors du transfert.

On estime que la moitié des gènes nucléaires dont le produit est plastidial est d'origine cyanobactérienne (Maier et Schmitz-Linneweber, 2004). En conséquence, de nombreux caractères plastidiaux sont typiquement bactériens, comme les appareils de transcription et de

traduction, certains complexes protéolytiques, ou les systèmes de sécrétion vers les thylakoïdes. D'autres traits, notamment métaboliques, mais aussi par exemple les systèmes membranaires d'import de protéines du cytosol vers le plaste, l'édition des ARNm ou la présence des introns, ne sont eux pas d'origine procaryotique (Hermann *et al.*, 2003).

2.2.2 Hérité des génomes plastidiaux

Les gènes chloroplastiques ne ségrégent pas comme les chromosomes nucléaires. Les traits génétiques de ces organites échappent aux règles mendéliennes standard. La transmission des caractères génétiques est uni-parentale, strictement maternelle chez la plupart des Angiospermes.

Les microsporocytes diploïdes des jeunes anthères des Angiospermes produisent, après l'étape de méiose, quatre microspores haploïdes. Chaque microspore se divise alors, par une mitose classique, pour donner deux cellules différentes : une petite cellule spermatique et une grosse cellule nourricière recevant l'essentiel des plastes. Les plastes persistant dans cette petite cellule spermatique sont soit dégradés dans les autophagosomes, soit exclus de la cellule générative par formation de corps cytoplasmiques anucléiques.

Chez certaines espèces cependant, l'hérité plastidiale est strictement paternelle : chez les gymnospermes, et plus particulièrement les conifères ou encore chez le kiwi (Cipriani *et al.*, 1995). L'hérité biparentale reste beaucoup plus rare, néanmoins décrite pour des espèces comme *Medicago sativa* (Smith, 1989).

2.2.3 Régulation de l'expression du génome plastidial

Le premier niveau de régulation de l'expression des gènes concerne la transcription. Comme la plupart des fonctions plastidiales, la transcription est de type procaryote et est assurée par un ensemble de polypeptides codés à la fois par le noyau et par le plaste. Ainsi, les gènes plastidiaux sont transcrits par au moins deux ARN polymérases ADN dépendantes utilisant chacune des promoteurs de nature différente (Figure I. 9).

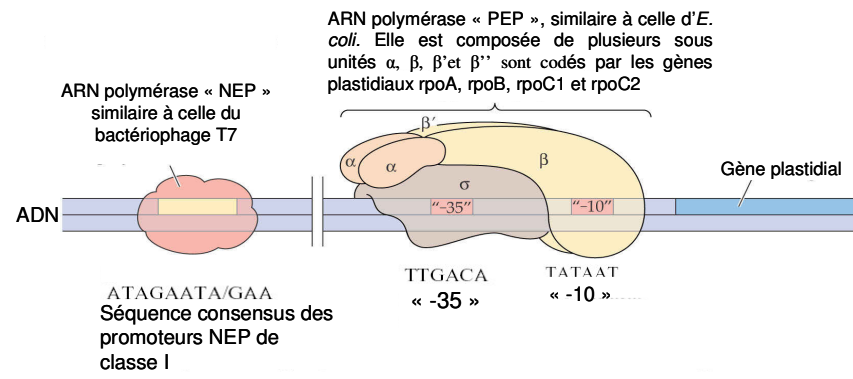


Figure I. 9: ARN polymérases plastidiales.

Figure adaptée d'après Buchanan, B. B., W. Gruissem and R. L. Jones (2000).

La PEP (Plastid Encoded Polymerase) doit son nom à la localisation plastidiale des gènes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* et *rpoC2*, codant ses sous-unités α , β , β' , β'' . Elle est de structure et de propriétés fonctionnelles proches de l'ARN polymérase d'*E. coli* (Serino et Maliga, 1998).

La NEP (Nuclear Encoded Polymerase) est codée chez *A. thaliana* par deux gènes nucléaires *rpoTmp* et *rpoTp*. Le produit du gène *rpoTmp* possède un adressage double vers les plastes et les mitochondries (Hedtke *et al.*, 2000, Richter *et al.*, 2002). Elle est proche de l'ARN polymérase du bactériophage T7 (Allison *et al.*, 1996).

Les deux types de polymérases sont impliquées dans la transcription de différents groupes de gènes plastidiaux. Schématiquement, la PEP transcrit les gènes impliqués dans la photosynthèse. La NEP transcrit préférentiellement les gènes de ménage, (Lerbs-Mache, 2000) dans les proplastides, et certains gènes comme l'opéron codant diverses sous-unités de la polymérase PEP quel que soit le stade de différenciation de l'organite. Dans une cellule méristématique contenant des proplastides, plastides indifférenciés présents à un stade précoce du développement, seule l'ARN polymérase NEP est active dans le compartiment plastidial. Dans ces proplastides, les gènes photosynthétiques ne sont pas transcrits. La transcription par l'ARN polymérase PEP est également régulée par des facteurs de transcription (facteurs « sigma-like ») codés dans le génome nucléaire. Ces facteurs sigma-like s'associent au cœur de la polymérase PEP, pour créer une holoenzyme, capable de reconnaître les promoteurs PEP (Allison, 2000). Au cours de la différenciation des cellules méristématiques en cellules de feuilles, les proplastides se différencient en chloroplastes, où les deux types de polymérases coexistent et transcrivent différents groupes de gènes. L'ARN polymérase PEP transcrit les gènes photosynthétiques et prend le relais de la NEP pour la transcription des gènes de

ménage. Certaines études contredisant cette régulation hiérarchique ont montré chez des tabacs déficients en activité PEP une transcription de tous les gènes plastidiaux incluant les gènes possédant uniquement des promoteurs de type PEP (Legen *et al.*, 2002 ; Demarsy *et al.*, 2006). Ces données suggèrent donc une certaine redondance des deux polymérases chez les plastes différenciés.

Suite à la transcription, l'ARN messenger précurseur peut subir divers événements de maturation.

- ✓ Certains gènes plastidiaux possèdent un ou plusieurs introns nécessitant un épissage.
- ✓ L'édition est aussi une des étapes de maturation des ARN plastidiaux, relativement rare dans les cellules eucaryotes, et qui existe également dans la mitochondrie. C'est un processus de déamination hydrolytique permettant en général de convertir une cytidine (C) en uridine (U), catalysé par une cytidine déaminase (EC 3.5.4.5) et inversement (on parle alors d'édition « réverse », un phénomène beaucoup plus rare). Cette conversion de C en U (ou de U en C) permet de créer des codons d'initiation ou des codons stop, ou encore d'induire des changements d'acide aminé (Bock, 2000).
- ✓ Beaucoup de messagers codés par le génome plastidial sont polycistroniques, et codent plusieurs protéines ou plusieurs ARN de transfert et/ou ribosomiaux (Shinozaki *et al.*, 1986). Des clivages par des endoribonucléases plastidiales génèrent souvent des monocistrons avant toute traduction.
- ✓ La maturation des extrémités 5' et 3' est également importante. Contrairement aux ARN messagers nucléaires, les messagers plastidiaux ne possèdent pas de coiffe (guanine méthylée ajoutée à l'extrémité 5' par une liaison 5'-5' triphosphate) à leur extrémité 5'. La polyadénylation dans le compartiment plastidial entraîne généralement la dégradation des messagers, comme dans les cellules procaryotes. La région 3' non traduite joue un rôle dans la stabilité du messenger. Elle forme une structure en épingle à cheveux qui protège l'ARN messenger de la dégradation (Hayes *et al.*, 1999).

Les éléments 5' et 3' non traduits des messagers plastidiaux jouent un rôle prépondérant dans la stabilité et la traduction des ARNm (site de fixation des ribosomes). Ils permettent une régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes plastidiaux, faisant intervenir de nombreux facteurs nucléaires, permettant une régulation de la demi-vie des messagers ainsi que de leur niveau d'expression selon les variations de l'environnement et des stades de différenciation tissulaires (Eibl *et al.*, 1999).

La régulation de l'expression des gènes plastidiaux est également effectuée au niveau de la traduction. La machinerie de traduction plastidiale est très proche de celle des organismes procaryotes et utilise des ARN ribosomiaux 70S. L'initiation de la traduction se fait par reconnaissance d'un site de fixation du ribosome. Il s'agit d'une séquence plus ou moins consensus (GGAGG), trouvée dans la région 5' non traduite du messenger, complémentaire à l'ARN 16S et similaire de la séquence de Shine-Dalgarno définie chez les bactéries. Le complexe d'initiation de la traduction, contenant la petite sous-unité du ribosome 30S, des facteurs d'initiation, l'ARN de transfert initiateur et du GTP, est dirigé vers le codon d'initiation. Après hydrolyse du GTP et libération des facteurs d'initiation, le complexe d'élongation est formé par l'association des deux sous-unités du ribosome et la traduction de la protéine est réalisée (revu par Zerges, 2000). Comme chez les procaryotes, le premier acide aminé incorporé est une formyl-méthionine. Cette traduction de type procaryote permet également la synthèse des protéines codées par des ARN polycistroniques largement représentés dans le plastome (Shinozaki *et al.*, 1986).

Au niveau post-traductionnel, il semblerait que les mécanismes nécessaires au repliement de la plupart des protéines eucaryotiques soient différents, voire même absents au niveau des plastes, comme la glycosylation. Une autre modification post-traductionnelle, la formation des ponts disulfures, est indispensable pour l'activité et la stabilité de certaines protéines. Peu de données sur ce mécanisme au niveau des plastes sont aujourd'hui disponibles.

Ainsi, en réponse au développement et aux stimuli extérieurs, l'expression des gènes plastidiaux est contrôlée à différents niveaux : transcription et stabilité des ARNm, efficacité de la traduction et demi-vie des protéines. Une meilleure compréhension des mécanismes qui conduisent à l'efficacité de la synthèse des protéines dans les plastes est nécessaire pour certaines applications pratiques, telles que la réalisation de systèmes d'expression de protéines recombinantes.

2.3 ADRESSAGE DES PROTEINES AU NIVEAU DES PLASTES

2.3.1 Importation des protéines dans le stroma des plastes

Les précurseurs cytosoliques ont accès à l'intérieur du chloroplaste *via* la machinerie de translocation Toc/Tic (pour « Translocation at the Outer envelope membrane of Chloroplasts » et « Translocation at the Inner membrane of Chloroplasts »), ATP/GDP

dépendante (Figure I. 10). Ils portent tous un peptide d'adressage du côté N-terminal qui contient toute l'information de ciblage. Lors de l'arrivée dans le stroma ce peptide est clivé et la protéine prend alors sa conformation finale ou est adressée à l'un des différents compartiments de l'organe (Keegstra et Cline, 1999).

Pendant de nombreuses années, ce système d'importation a été considéré comme l'unique voie pour l'entrée des protéines au sein des chloroplastes. Des données récentes montrent une autre possibilité. Certaines protéines glycosylées provenant du reticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi ont été retrouvées au niveau du stroma (Villarejo *et al.*, 2005). D'autres protéines, n'ayant pas de peptide N-terminal ont été trouvées associées à la membrane externe des chloroplastes (Miras *et al.*, 2002 ; Nada et Soll, 2004).

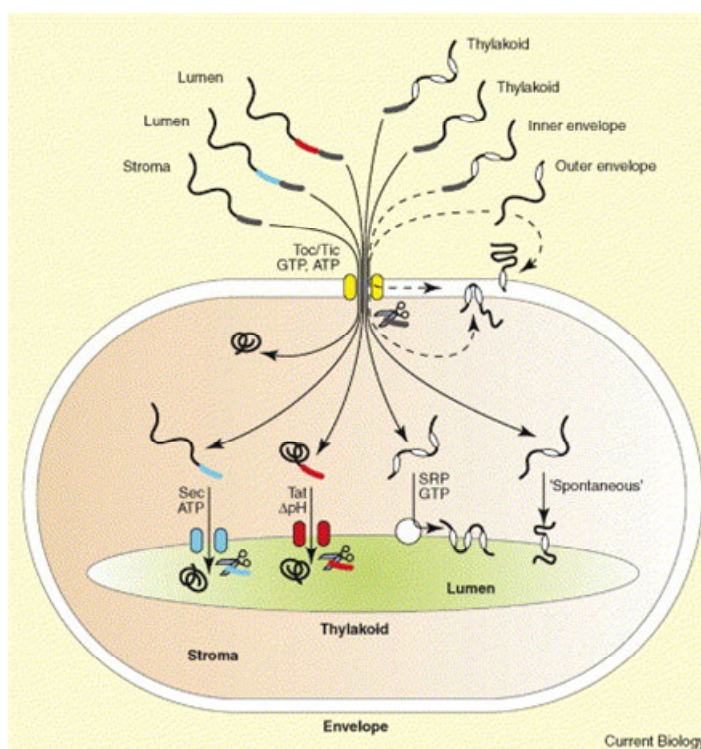


Figure 1.10: Import des protéines au chloroplaste et à ses différents compartiments.
D'après Jarvis et Robinson, (2004).

2.3.2 Importation des protéines au lumen des thylacoïdes du plaste

Le lumen des thylacoïdes du plaste contient un nombre restreint de protéines (environ 80 polypeptides différents) toutes codées par le génome nucléaire (Figure I.11). Ces protéines adressées au lumen des thylacoïdes sont synthétisées dans le cytosol avec une préséquence en deux parties, contenant à la fois le peptide de transit pour l'adressage au sein du chloroplaste

et un peptide signal en tandem pour le ciblage dans le lumen des thylacoïdes. Le peptide transit est éliminé après l'import de la protéine dans le stroma et les protéines peuvent alors être transportées au lumen par différentes voies (Figure I.10). Deux différentes voies de sécrétion, de type procaryotique, pour l'adressage des protéines solubles dans le lumen des thylacoïdes des chloroplastes ont été caractérisées (Di Cola *et al.*, 2005) : la voie Tat et la voie Sec.

Les protéines substrats de la voie Tat portent un peptide signal caractérisé par un motif Twin-arginine à l'extrémité N-terminale et un motif Ala-Xaa-Ala à l'extrémité C-terminale. Le système Tat est composé de trois protéines Tha4, Hcf106 et TatC. Leur découverte chez le chloroplaste a conduit à l'identification du système homologue TatABC chez les procaryotes (Bogsch *et al.*, 1998). Ce système de translocation est plus ou moins dépendant du gradient de pH des membranes thylacoïdiennes (Finazzi *et al.*, 2003 ; Theg *et al.*, 2005) et est capable de transporter des protéines repliées. Les protéines utilisant la voie Sec portent un peptide signal hydrophobe caractéristique capable d'interagir dans le stroma avec SecA, qui hydrolysant de l'ATP permet le transport de la préprotéine à travers le translocon Sec lié à la membrane et contenant SecY et SecE (Dalbey et Chen, 2004). Ce système de translocation Sec est donc dépendant de l'ATP et transporte des protéines non repliées.

Dans ces protéines résidentes du compartiment luménal on retrouve une abondance particulière d'immunophilines impliquées dans le repliement de certaines protéines (Figure I.11). D'autre part ce compartiment semblerait plus oxydant que le stroma permettant probablement une plus grande stabilité de certaines protéines contenant des ponts disulfures (Buchanan et Luan, 2005).

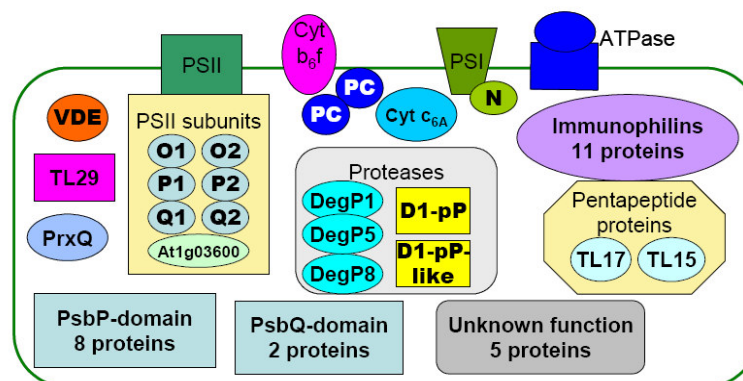


Figure I. 11: Protéome du lumen des thylacoïdes d'après Schubert M., PhD thesis, 2006.

2.3.3 Incorporation des protéines aux membranes des thylacoïdes

Beaucoup de protéines hydrophobes sont insérées au niveau des membranes des thylacoïdes. L'insertion de ces protéines est effectuée par la machinerie SRP (« Signal Recognition Particle »). Le système SRP, comme les systèmes Tat et Sec, est hérité des systèmes procaryotes. Deux protéines du système SRP, cpSRP54 et cpSRP43, se lient au substrat pour former un complexe intermédiaire, avant son intégration au niveau de la membrane ; cette intégration est dépendante du GTP et implique les protéines cpFtsY et Alb3 (Schünemann, 2004).

Certaines protéines peuvent également s'insérer spontanément au niveau des membranes thylacoïdiennes. Ce phénomène est retrouvé uniquement chez les chloroplastes et n'est réalisé que par un nombre restreint de protéines (Mant *et al.*, 2001).

3. LA TRANSFORMATION PLASTIDIALE

La transformation génétique des plastes a été décrite chez les plantes supérieures pour la première fois en 1990 dans le tabac (Svab *et al.*, 1990), puis lentement étendue à d'autres espèces. Ce n'est que très récemment que cette technologie a été décrite dans des espèces agronomiques majeures comme le colza, le soja ou le coton (Figure I.12). Elle n'est cependant encore utilisée en routine que chez *N. tabacum*. Le tabac est en effet l'espèce modèle pour la transformation des plantes.

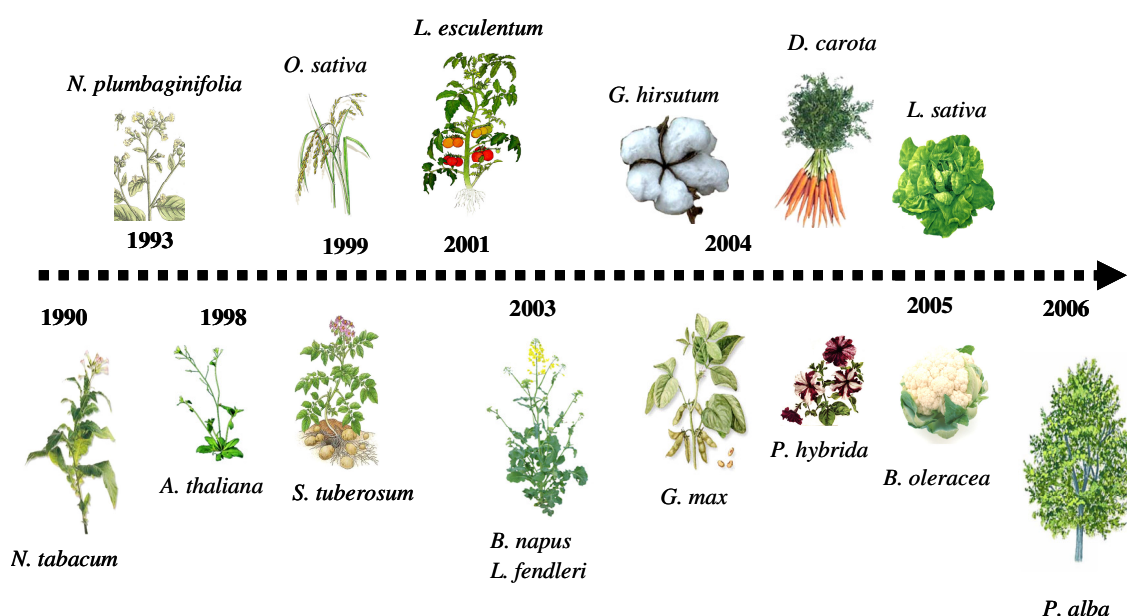


Figure I. 12: Chronologie de la transformation des plastes de plantes supérieures.

La transformation des génomes plastidiaux requiert classiquement deux grandes étapes : (i) l'introduction de l'ADN recombinant et son intégration au sein du plastome, (ii) la sélection des transformants et la régénération des plantes transformées.

3.1 INTRODUCTION ET INTEGRATION DE L'ADN RECOMBINANT

Pour son intégration dans le génome plastidial, l'ADN transformant doit traverser la paroi pectocellulosique des cellules végétales, la membrane plasmique et la double membrane protégeant le plastome. Plusieurs techniques de transformation directe ont été utilisées à cette

fin. La micro-injection n'a pas permis l'obtention de plantes transplastomiques stables (Knoblauch *et al.*, 1999). L'introduction de l'ADN au PEG a également été mise en œuvre (O'Neill *et al.*, 1993 ; Golds *et al.*, 1993) et n'a été décrite à ce jour que pour la transformation plastidiale de peu d'espèces dont la laitue et le tabac.

La transformation par biolistique initiée en 1988 pour la transformation du génome de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton *et al.*, 1988) s'est avérée être la technique la plus appropriée pour l'intégration d'un transgène au sein du génome chloroplastique. Le principe de cette technique consiste à projeter des microparticules d'or ou de tungstène enrobées de l'ADN à insérer dans le génome de la plante hôte. De nombreux types de canons qui utilisent différents moyens de propulsion des particules ont été mis au point. On peut faire appel à l'explosion d'une cartouche de poudre, à la surpression provoquée par la vaporisation instantanée d'un goutte d'eau ou encore, à la détente d'un gaz comprimé pour projeter violemment mais de façon contrôlée et sous une pression d'air réduite, les particules sur le tissu. Celles-ci ont alors suffisamment d'énergie cinétique pour traverser la paroi et les membranes cellulaires. L'ADN transformant peut alors accéder au génome de la cellule et s'intégrer directement à un endroit précis dans le plastome par recombinaison homologue.

Les vecteurs utilisés pour la transformation chloroplastique sont dérivés de plasmides bactériens. Ils possèdent deux régions d'ADN plastidial (contiguës sur le plastome), correspondant aux deux séquences cibles de recombinaison homologue (HRR). Ces deux séquences flanquantes encadrent les cassettes d'expression à insérer, composées en général, d'un marqueur de sélection et du transgène d'intérêt. Elles n'ont pas d'autres propriétés spécifiques que d'être homologues au site ciblé pour la recombinaison. La longueur des séquences flanquantes utilisées est un paramètre important pour permettre un taux de recombinaison homologue élevé, comme chez *E. coli* (Shen et Huang, 1986). Des fragments de 1-2 kb sont le plus souvent utilisés. Différentes régions du génome plastidial ont été ciblées à ce jour comme site d'intégration, dans les régions répétées et dans les régions simple-copie (Maliga, 2004 ; Figure I.13). Le site d'insertion est choisi de façon à ne pas perturber la fonctionnalité des gènes plastidiaux voisins, à moins que l'objectif de la transformation ne soit celui-ci délibérément.

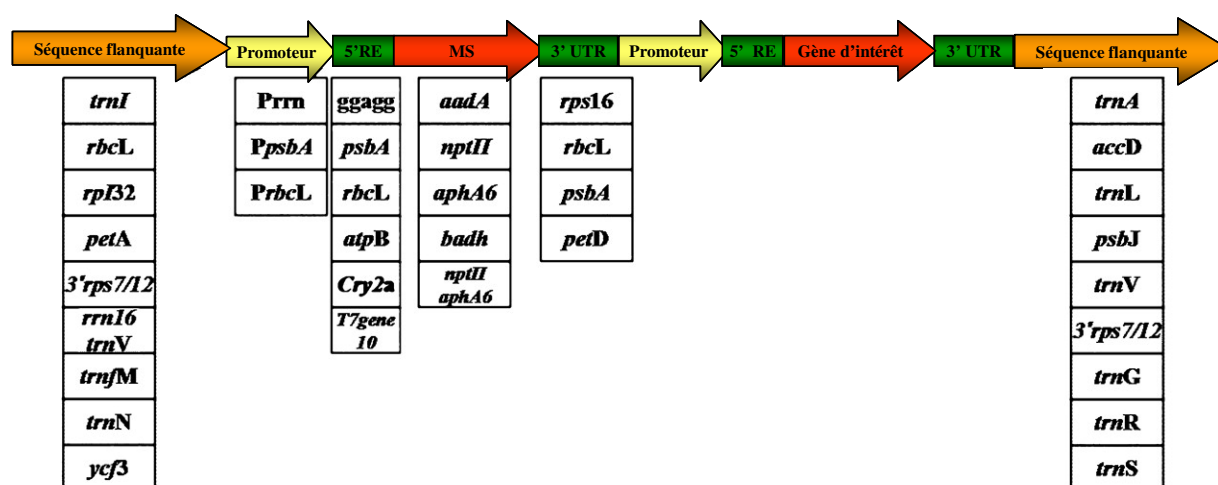


Figure I. 13 : Représentation schématique des diverses cassettes d'expression pour la transformation du génome chloroplastique. Figure adaptée d'après Verma et Daniell, (2007).

3.2. SELECTION ET REGENERATION DES TRANSFORMANTS

3.2.1 Principe de sélection des plastomes recombinants

L'intégration de l'ADN transformant au sein du génome plastidial est un événement rare, qui se produit vraisemblablement uniquement au sein de quelques plastomes d'une seule cellule. L'intégration de l'ADN conduit à un état dit hétéroplasmique, caractérisé par une population hétérogène de génomes plastidiaux (sauvages et recombinants). Les plastomes recombinants, ayant intégré l'ADN exogène, doivent alors être sélectionnés grâce à un gène marqueur de sélection présent sur le vecteur de transformation afin d'éliminer l'ensemble des copies d'ADN plastidial sauvage résiduelles. Plusieurs cycles successifs de régénérations, sous une forte pression de sélection, sont parfois nécessaires pour l'obtention de l'homoplasme (Figure I. 14), caractérisée par une population homogène de plastomes transformés, et cela pour l'ensemble des cellules. L'obtention de cette homoplasme est théoriquement nécessaire et pratiquement souhaitée pour assurer la stabilité du transgène et éviter la résurgence des plastomes sauvages une fois la pression de sélection coupée.

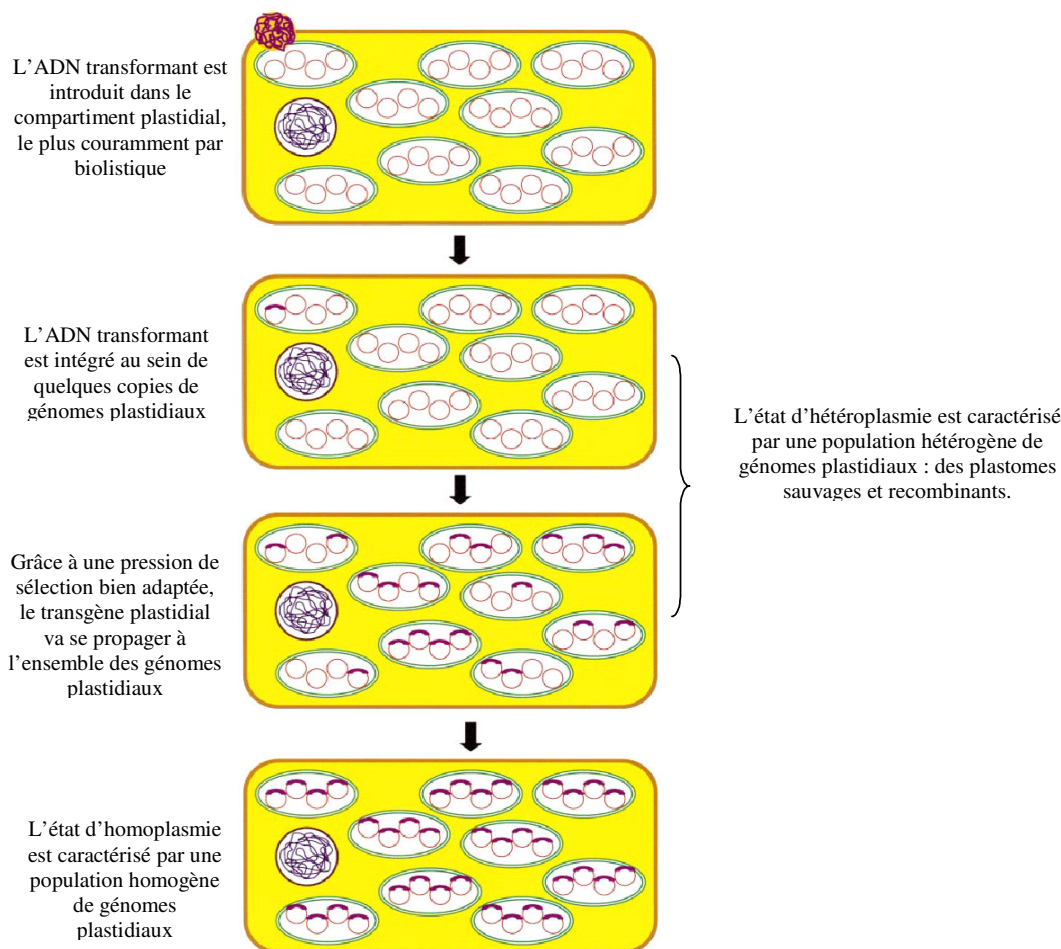


Figure I. 14: Sélection des transplastomes pour atteindre l'état d'homoplasmie. Figure adaptée d'après Bock, (2001).

3.2.2 Marqueurs de sélection

La sélection des transformants plastidiaux utilise des agents de sélection adaptés à cet organelle. Ils codent des résistances à certains antibiotiques inhibant la traduction dans les systèmes procaryotiques, c'est le cas des gènes *aadA* (Goldschmidt-Clermont, 1991 ; Svab et Maliga, 1993), *nptII* (Carrer *et al.*, 1993) ou encore *aphA6* (Huang *et al.*, 2002). Le marqueur de sélection le plus couramment utilisé est le gène bactérien *aadA* codant une 3' aminoglycoside 3'' adénylyltransférase (EC 2.7.7.47), conférant une double résistance aux antibiotiques spectinomycine et streptomycine.

Les gènes introduits doivent être suffisamment exprimés pour permettre une sélection efficace. La cassette d'expression doit ainsi être fonctionnelle au sein du chloroplaste. Pour

cela, la région codante doit être sous le contrôle d'éléments régulateurs reconnus par les machineries de transcription et de traduction de cet organite (Figure I. 12). Des promoteurs plastidiaux sont à ce titre largement utilisés, *Prn* : promoteur constitutif fort de l'opéron des ARN ribosomiaux (Svab et Maliga, 1993), *PpsbA* : promoteur fort contrôlant la transcription du gène codant la protéine D1 du photosystème II (Zoubenko *et al.*, 1994), *PrbcL* : promoteur de la grande sous-unité de la Rubisco. Des régions 5' non traduites sont également nécessaires pour une traduction efficace de ces phases ouvertes de lecture. Elles amènent les sites de reconnaissance pour les ribosomes et sont généralement d'origine plastidiale (une partie des régions 5' non traduites des gènes *rbcL*, *psbA* par exemple, Svab et Maliga, 1993 ; Zoubenko *et al.*, 1994). Ces éléments régulateurs situés en amont du gène de sélection peuvent également être d'origine bactérienne comme la région 5' non traduite, encadrant le RBS du gène *10L* du bactériophage T7 (Khan et Maliga, 1999). Les terminateurs situés en aval des régions codantes sont plastidiaux le plus souvent, en raison de leur rôle dans la stabilité du transcrit.

Le nombre élevé de copies des transgènes plastidiaux, ainsi que la nature procaryotique de cet organite augmentent le risque potentiel de dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Avec l'utilisation de marqueurs alternatifs, le moyen le plus sûr pour éviter le transfert horizontal du marqueur de sélection reste son élimination. Cette élimination peut être spontanée (Fischer *et al.*, 1996). En effet, le processus de recombinaison homologue utilisé pour l'intégration ciblée des transgènes au sein du génome plastidial permet l'élimination de certaines séquences (comme les gènes marqueurs de sélection). L'élimination si elle n'est pas spontanée, peut être réalisée par le système *CRE/lox*. Cette technologie repose sur l'utilisation de l'enzyme CRE, recombinase spécifique du bactériophage P1, pour permettre l'élimination de toute séquence d'ADN comprise entre deux sites *lox* en répétition directe. Ce système d'élimination permet de générer des plantes homoplasmiques, ne possédant plus aucune copie du marqueur de sélection et est maîtrisable dans le temps (Kuroda et Maliga, 2003).

D'autres stratégies ont également été développées pour l'élimination du gène marqueur, comme par exemple la cointégration transitoire d'un marqueur de sélection antibiotique et la restauration d'une fonction plastidiale comme la pigmentation ou la photosynthèse (Dubald *et al.*, 2008).

3. 3. AVANTAGES DE LA TRANSFORMATION PLASTIDIALE

- ✓ Elle permet tout d'abord un haut niveau d'expression du transgène. En effet, la grande polyploïdie des génomes plastidiaux offre un potentiel énorme pour l'expression de gènes étrangers à des niveaux élevés (Bock, 2001). Des travaux montrent par exemple que la toxine insecticide codée par le gène *CryAa2* peut être exprimée dans les tissus foliaires à un niveau qui atteint plus de 45% des protéines totales solubles de feuilles matures, sans effet délétère apparent sur le développement de la plante (De Cosa *et al.*, 2001).
- ✓ L'insertion du transgène plastidial est réalisée par recombinaison homologue, et permet, à la différence du transgène nucléaire, un ciblage précis du transgène, à un locus donné. Les effets de position (dus à une intégration aléatoire du transgène au sein du génome nucléaire cible), largement décrits dans le cas d'une transformation nucléaire, n'ont jamais été rapportés dans le cas de la transformation plastidiale, pour un ADN transformant donné. De plus, par ce processus d'intégration, les séquences du squelette de vecteur de transformation ne sont pas retrouvées au sein du génome recombinant. Le criblage des plantes transplastomiques est ainsi rendu plus facile que celui des plantes contenant un transgène nucléaire. Il ne nécessite pas l'analyse d'une grande quantité d'évènements, dans la mesure où, idéalement, les différentes plantes transplastomiques obtenues sont toutes génétiquement identiques, à l'exception d'éventuelles intégrations nucléaires, et de niveaux différents d'homoplasme.
- ✓ Le phénomène de « silencing » n'a jamais été décrit dans le compartiment plastidial. Cela permet donc une expression des transgènes plastidiaux stable et uniforme dans les différentes lignées transplastomiques générées.
- ✓ L'origine endosymbiotique du chloroplaste et la parenté de sa machinerie de synthèse protéique avec les procaryotes rendent possible l'expression directe de gènes bactériens sans optimisation préalable de l'usage codon. De plus, cette machinerie de synthèse protéique est relativement flexible et permet également la forte expression de gènes eucaryotes (Fernandez-SanMillan *et al.*, 2003). L'organisation de gènes en opéron retrouvée au sein du génome plastidial autorise l'expression de plusieurs transgènes en une seule unité transcriptionnelle. Ceci permet de générer des plantes exprimant plusieurs transgènes en une seule étape de transformation, en utilisant un seul marqueur de sélection, et de reconstituer plus aisément des voies métaboliques complexes.
- ✓ La compartimentation du produit du transgène plastidial peut apporter une solution à l'expression de protéines toxiques qui peuvent occasionner des effets délétères sur la plante

lorsqu'elles sont exprimées dans le cytosol. Ainsi, l'accumulation de la sous-unité β de la toxine du choléra (CTB) dans la pomme de terre, à partir d'un transgène nucléaire, a conduit à l'obtention de plantes naines dont le phénotype semblait lié à l'expression du transgène dans les tubercules (Mason *et al.*, 1998). Le même transgène exprimé à partir du génome plastidial de tabac a généré des plantes transplastomiques, de phénotype sauvage, exprimant plus fortement la protéine CTB (Daniell *et al.*, 2001b).

✓ La transformation chloroplastique permet également un confinement amélioré des transgènes puisque les génomes plastidiaux sont transmis par hérédité maternelle dans la plus grande majorité des cas (Svab et Maliga, 2007 ; Ruf *et al.*, 2007). Ce phénomène implique que le risque de dissémination des transgènes est très réduit.

Ces caractéristiques rendent les chloroplastes (de tabac dans le cadre de notre projet) appropriés pour la production d'un grand nombre de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutiques, agronomiques ou agroalimentaires.

3.4. LIMITES DE LA TRANSFORMATION PLASTIDIALE

Si la transformation plastidiale offre de nombreux avantages, elle présente tout de même certains inconvénients ou certaines inconnues:

✓ L'hérédité maternelle de nombreuses Angiospermes n'est pas totalement stricte puisque, bien que rares, des transferts de gènes plastidiaux par le pollen ont été rapportés chez le tabac (Svab et Maliga, 2007 ; Ruf *et al.*, 2007). De plus, ce risque peut être augmenté par la possibilité de transfert de gène du plastome vers le génome nucléaire. Ce phénomène s'est avéré très efficace au cours de l'évolution, ayant permis la re-localisation de la plupart des gènes plastidiaux au niveau de l'ADN nucléaire. Des études du taux de transfert d'un transgène plastidial vers le génome nucléaire de *N. tabacum* ont été réalisées (Stegemann *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2003). Pour cela des tabacs transplastomiques contenant en plus du marqueur de sélection plastidial *aadA*, un gène marqueur conférant une tolérance à la kanamycine, ne s'exprimant que s'il est localisé dans le noyau, ont été générés. Les graines T1 ont ensuite été testées pour leur résistance à la kanamycine. A chaque fois une seule graine a germé indiquant une relocalisation des transgènes plastidiaux (*aadA* et *nptII*) dans le noyau. Le transgène transféré dans le génome nucléaire a montré dans la descendance de ces tabacs, une hérédité mendélienne. Ce taux de transfert semble être variable entre les espèces

végétales car la même étude chez *Chlamydomonas* n'a permis de détecter aucun transfert du transgène plastidial vers le génome nucléaire (Lister *et al.*, 2003).

✓ Le transfert horizontal vers les bactéries à partir de plantes transplastomiques est un problème potentiel qui a été évoqué (Kay *et al.*, 2002). La fréquence de ce transfert s'est révélée faible (10^{-8}), dans des conditions très particulières où le transfert a été favorisé par l'intégration de séquences du génome plastidial de tabac au sein du génome d'*Acinetobacter*. Néanmoins, ces travaux montrent la possibilité d'un transfert horizontal, favorisé par les homologues de séquences qui peuvent exister entre les bactéries et les séquences d'ADN exogènes intégrées dans le génome plastidial.

✓ Un autre inconvénient réside dans la différence et parfois l'absence des processus de modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation ou encore la formation de ponts disulfures, qui chez les eucaryotes prennent place dans le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ces modifications sont le plus souvent essentielles pour la stabilité, le repliement et l'activité biologique des protéines à usage thérapeutique (Land et Braakman, 2001). L'absence de glycosylation est un frein pour l'expression de certaines protéines. De nombreux travaux sont actuellement en cours afin de modifier la machinerie de glycosylation chez les plantes et même tendre à une glycosylation de type humaine (Faye *et al.*, 2001). La formation des ponts disulfures est elle aussi une modification indispensable pour la stabilité et l'activité de certaines protéines. Peu de données sur ce mécanisme sont à ce jour disponibles. En effet, il y a dans la littérature peu d'exemples de protéines recombinantes contenant des ponts disulfures qui ont été exprimées avec succès dans les chloroplastes. C'est tout de même le cas de l'hormone de croissance humaine (Staub *et al.*, 2000), de la sous-unité de la toxine B du choléra (Daniell *et al.*, 2001b), de l'albumine humaine qui possède 17 ponts disulfures (Fernandez San-Millan *et al.*, 2003), d'un anticorps simple chaîne (Mayfield *et al.*, 2003), ou encore de l'interféron α humain (Daniell *et al.*, 2004). Il n'est pas toujours précisé dans ces articles si ces ponts sont correctement formés et surtout s'ils se sont formés *in planta* ou spontanément lors de l'extraction protéique. Ces observations concernant ce mécanisme de modification post-traductionnelle restent donc fragmentaires et isolées. Le potentiel des chloroplastes pour l'accumulation de protéines contenant des ponts disulfures mérite d'être clarifié.

4. APPLICATIONS DE LA TRANSFORMATION PLASTIDIALE

4.1 RECHERCHE FONDAMENTALE

La transformation du génome chloroplastique a ouvert une voie intéressante permettant d'analyser et de comprendre les mécanismes qui gouvernent l'expression des gènes au sein de ce compartiment. Cette technique permet d'inactiver des gènes plastidiaux, de les surexprimer ou plus généralement de les modifier de façon ciblée de manière à élucider leur fonction (Figure I. 15)

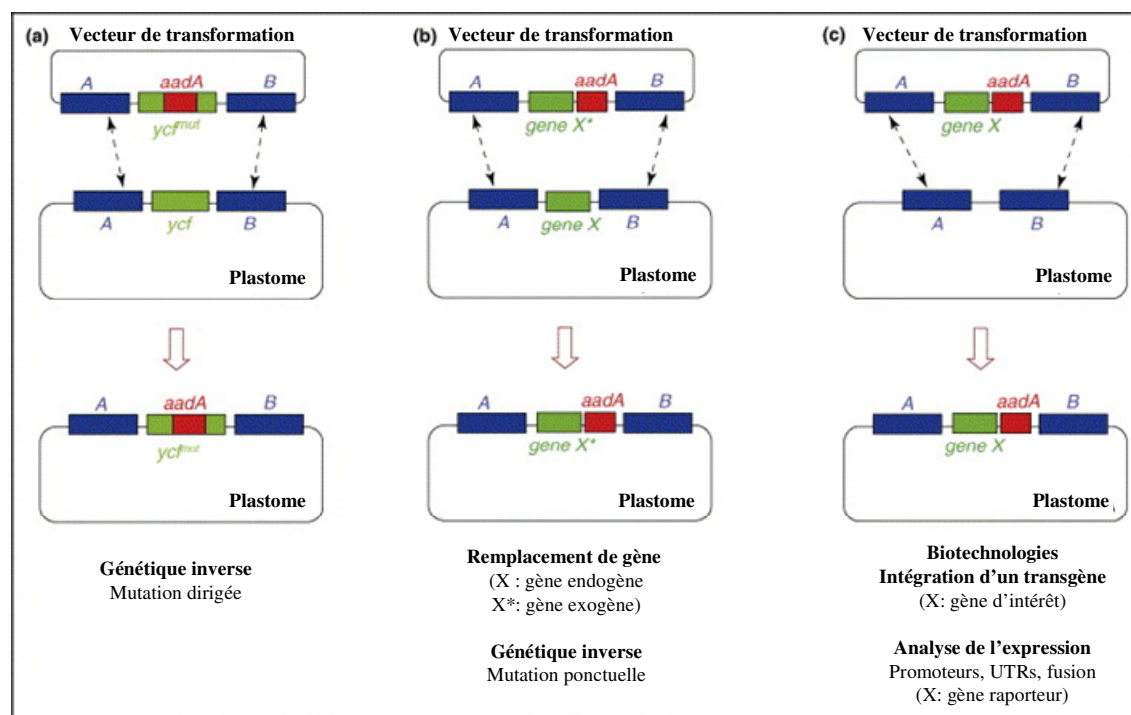


Figure I. 15 : Applications de la transformation chloroplastique. Figure adaptée d'après Bock, 2007.

(a) Utilisation du gène *aadA* pour la disruption de gènes plastidiaux de fonctions inconnues, Ycf : cadre de lecture ouverte plastidial, Ycf^{mut} : cadre de lecture ouverte muté, (b) remplacement de gène, un allèle d'un gène plastidial endogène est liée au marqueur de sélection *aadA* et va remplacer le gène endogène suite à la double recombinaison homologue. Cette stratégie peut-être utilisée pour introduire des mutations ponctuelles afin d'étudier la fonction de certains gènes, (c) l'expression d'un gène d'intérêt est possible après intégration de ce gène lié au gène *aadA* au niveau des régions de recombinaison du plastome. A,B : séquence flanquantes permettant l'intégration par recombinaison homologue.

Par exemple, des expériences de génétique inverse effectuées grâce à la transformation chloroplastique par disruption de gènes spécifiques ont été listées récemment par Maliga (2004). L'inactivation du gène plastidial *rpoB*, codant la sous-unité β de la polymérase PEP,

amenant à l'obtention de tabacs transplastomiques ayant un phénotype albinos, est un exemple de contribution majeure pour la compréhension des mécanismes de transcription au sein du compartiment plastidial (Allison *et al.*, 1996). La transformation plastidiale a aussi été utilisée pour étiqueter des sous-unités spécifiques de l'ARN polymérase, ou du complexe *ndh* de cet organite (Suzuki *et al.*, 2004 ; Rumeau *et al.*, 2005), permettant leur purification ultérieure par affinité. Si le gène n'est pas essentiel, des transformants homoplasmiques peuvent être obtenus. Dans le tabac, ceci a été impossible pour quatre gènes, dont *ycf1* et *ycf2* codant pour les deux plus grands ORF de fonction encore inconnue (Drescher *et al.*, 2000), la sous-unité protéasique *clpP* (Shikanai *et al.*, 2001), et la sous-unité *accD* de l'acétyl-CoA carboxylase (Kode *et al.*, 2005). Bien d'autres applications ont été menées à bien *via* la technique de transformation du génome chloroplastique, comme par exemple l'analyse de la répllication du génome plastidial (Kunnimalaiyaan et Nielsen, 1997) ou encore l'étude des gènes impliqués dans la photosynthèse (Andrews et Whitney, 2003).

4.2 DEVELOPPEMENTS BIOTECHNOLOGIQUES

Les progrès effectués pour comprendre les mécanismes qui gouvernent l'expression d'un transgène à partir du génome chloroplastique ont permis l'introduction de divers caractères d'intérêt agronomique dans les plantes supérieures (Tableau I. 2). On dénombre parmi ceux-ci, notamment, la tolérance à des herbicides, la résistance aux insectes ou aux maladies, la tolérance à la sécheresse, ou encore la phytoremédiation (Bock, 2007). Ces traits agronomiques commencent à être testés dans de nouvelles espèces pour lesquelles la transformation plastidiale est maîtrisée depuis peu, telles que la carotte ou le soja. Le système d'expression chloroplastique est également de plus en plus utilisé pour la production de protéines d'intérêt pharmaceutique, de vaccins ou encore d'anticorps (Daniell, 2006 ; Tableau I.2). Les niveaux d'expression de ces nombreux transgènes plastidiaux sont remarquablement élevés, ce qui illustre le potentiel extraordinaire de cette technologie d'expression d'une protéine recombinante dans les plantes. Ils ne sont exprimés que chez le tabac. L'extension de la maîtrise de cette application à de nouvelles espèces telles que la laitue, la carotte ou le chou est très prometteuse pour l'expression de vaccins oraux. Ces applications biotechnologiques ont été récemment répertoriées dans diverses revues (Maliga, 2004 ; Verma et Daniell, 2007). Ces données montrent une activité croissante dans le domaine de la transformation des génomes plastidiaux, illustrant les aspects attractifs de cet outil au niveau biotechnologique.

Cependant aucune application commerciale faisant appel à cette technologie n'a été reportée jusqu'ici.

	Traits/protéines	Gène	Promoteur, 5'/3' UTRs	Citation dans la littérature
Caractère agronomique	Résistances aux insectes	<i>cryIA c</i>	Prn/rbc L/rps 16	McBride <i>et al.</i> , 1995
		<i>cry 2Aa2</i>	Prn/ggagg native /psbA	Kota <i>et al.</i> , 1999
		<i>cry 2Aa2</i> operon	Prn/native 5' UTR/psb A	De Cosa <i>et al.</i> , 2001
		<i>cry 1Aa10</i>	Prn/native 5' UTR/psb A	Hou <i>et al.</i> , 2003
		<i>cry 1Ab</i>	Prn/T7 gene10/rbc L	Dufourmantel <i>et al.</i> , 2005
		<i>cry 9Aa2</i>	Prn/native 5' UTR/rbc L	Chakrabarti <i>et al.</i> , 2006
		<i>cry11a5</i>		Reddy <i>et al.</i> , 2002
		<i>cry1C</i>		Lin <i>et al.</i> , 2003
	Résistances aux herbicides	<i>aro A</i>	Prn/ggagg/psb A	Daniell <i>et al.</i> , 1998
		<i>hpd</i>	PpsbA/ TpsbA	Dufourmantel <i>et al.</i> , 2007
		<i>bar</i>	Prn/rbc L/psb A	Iamtham et Day 2000
	Résistances aux maladies	<i>MSI-99</i>	Prn/ggagg/psb A	DeGray <i>et al.</i> , 2001
	Résistances au stress hydrique	<i>TPS1</i>	Prn/ggagg/psb A	Lee <i>et al.</i> , 2003
	Phytoremédiation	<i>mer A/mer B</i>	Prn/ggagg/psb A	Ruiz <i>et al.</i> , 2003 ; Hussein <i>et al.</i> , 2007
	Tolérance saline	<i>badh</i>	Prn/ggagg/rps 16	Kumar <i>et al.</i> , 2004
	CMS	<i>pha A</i>	Prn/psb A/psb A	Ruiz et Daniell 2005
Protéine pharmaceutique	hST	<i>hST</i>	Prn/T7 gene10/Trps 16 PpsbA/Trps16	Staub <i>et al.</i> , 2000
	Insulin-like growth factor	<i>IGF-1n IGF-1s</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Daniell <i>et al.</i> , 2005
	IFN2b	<i>IFN2b</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Arlen <i>et al.</i> , 2007
	HSA	<i>hsa</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Fernandez-San Millan <i>et al.</i> , 2003
	IFN-	<i>Gus-IFN-</i>	Ppsb A/Tpsb A	Leelavathi et Reddy 2003
	Anticorps monoclonal	<i>Guy's 13</i>	Prn/ggagg/Tpsb A	Daniell <i>et al.</i> , 2004
	Protéine de fusion sous-unité B de la toxine du cholera/ insuline	<i>CTB-Pins</i>	Ppsb A/Tpsb A Prn/T7 gene10/Trps 16	Ruhlman <i>et al.</i> , 2007
	Peptide antimicrobien	<i>MSI-99</i>		De Gray <i>et al.</i> , 2001
	Aprotinine	<i>aprotinine</i>	PpsbA/TrbcL	Tissot <i>et al.</i> , 2008
Antigènes	Toxine du cholera	<i>ctx B</i>	Prn/ggagg/Tpsb A	Daniell <i>et al.</i> , 2001
	Toxine du tétanos	<i>tet C</i>	Prn/T7 gene 10/Trbc L atp B/Trbc L	Tregoning <i>et al.</i> , 2003
	CPV	CTB-2L21 GFP-2L21	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Molina <i>et al.</i> , 2004, 2005
	Anthrax PA	<i>pag</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Watson <i>et al.</i> , 2004 ; Koya <i>et al.</i> , 2005
	Amibiase	<i>lec A</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Chebolu et Daniell 2007
	Peste	<i>CaF1-Lcr V</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	H. Daniell (unpublished)
	Rotavirus	<i>VP 6</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Birch-Machin <i>et al.</i> , 2004
	Hépatite C	<i>NS 3</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Daniell <i>et al.</i> , 2005
	Maladie de Lyme	<i>Osp A Osp A-T</i>	Ppsb A/Tpsb A	Glenz <i>et al.</i> , 2006
	Polymère dérivé de l'élastine	<i>EG 121</i>	Prn/T7 gene 10/Tpsb A	Guda <i>et al.</i> , 2000
Biomatériaux	pHBA	<i>ubi C</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Viitanen <i>et al.</i> , 2004
	Polyhydroxybutyrate	Opéron phb	Ppsb A/Tpsb A	Lössl <i>et al.</i> , 2003
	Xylanase	<i>xyn A</i>	Ppsb A/Tpsb A	Leelavathi <i>et al.</i> , 2003
	Monelline	<i>monelline</i>	Prn/Ppsb A/Tpsb A	Roh <i>et al.</i> , 2006
Traits qualitatifs	Tryptophane	<i>ASA 2</i>	Prn/rbc L/rp L32 rbc L/acc D-ORF 184	Zhang <i>et al.</i> , 2001
	Carotène	Lycopene β-xylase <i>crY/carRA</i>	<i>Patpl/Trps16</i>	Wurbs <i>et al.</i> , 2007

Tableau I. 2: Traits agronomiques, protéines pharmaceutiques, antigènes et biomatériaux exprimés à partir de transgènes plastidiaux. Tableau adapté de Verma et Daniell, (2007).

Objectifs

La production de protéines dans les plantes représente une alternative attractive par rapport à d'autres systèmes d'expression et ce notamment grâce à la transformation chloroplastique. Cette technique très prometteuse permet la production de protéines en quantités importantes. Ce système procaryotique d'expression est-il cependant également adapté pour la production en masse de protéines recombinantes possédant des ponts disulfures dans leur structure native ? Cette question est d'autant plus d'actualité lorsque l'on sait qu'un grand nombre de molécules thérapeutiques nécessitent ces modifications post-traductionnelles pour être active. L'expression de seulement deux protéines recombinantes contenant des ponts disulfures avait été décrite dans la littérature au début de ce travail de thèse. Il s'agit de l'hormone de croissance humaine (Staub *et al.*, 2000) et de la sous-unité B du choléra (Daniell *et al.*, 2001b). Le potentiel du chloroplaste pour l'accumulation de protéines contenant des ponts disulfures méritait donc d'être clarifié. C'est dans l'optique de répondre à cette question que ce projet de thèse a été initié.

Pour cela nous avons choisi d'analyser la conformation d'une protéine témoin contenant des ponts disulfures, la phosphatase alcaline bactérienne (PhoA), dans le tabac transplastomique. L'activité et la stabilité de cette enzyme son dépendantes du repliement correct de deux ponts disulfures intramoléculaires. De plus, cette enzyme a déjà été utilisée dans certaines études comme témoin et/ou fusionnée à différents peptides signaux bactériens des systèmes d'exportation SEC (utilisé normalement par la phosphatase alcaline pour être sécrétée dans le périplasme) ou TAT (voie de translocation Twin-arginine qui exporte les protéines conformément repliées à travers la membrane du cytoplasme) (DeLisa *et al.*, 2002). Il existe de nombreuses similitudes entre les mécanismes bactériens d'exportation et les systèmes de sécrétion des protéines du stroma vers le lumen (systèmes TAT et SEC). Nous avons donc envisagé d'étudier le repliement de la protéine non seulement dans le stroma du plaste mais également au sein du lumen des thylacoïdes ce qui n'a jamais été analysé auparavant. Ainsi, la phosphatase alcaline a été exprimée, liée ou non à son peptide signal responsable de l'adressage dans le périplasme, en émettant l'hypothèse que celui-ci serait reconnu pour le transport de l'enzyme dans le lumen.

Dans un deuxième temps, pour compléter notre analyse, et avoir accès aux variations *in vivo* du potentiel redox dans le chloroplaste, nous avons utilisé une autre protéine modèle,

une GFP dont les propriétés de fluorescence dépendent du potentiel redox. L'utilisation de cette protéine a été récemment décrite pour les mitochondries chez *A. thaliana* (Jiang *et al.*, 2006).

En parallèle à ces travaux, nous avons anticipé sur le fait que les mécanismes de repliement des protéines exogènes au sein des plastes nécessiteraient la présence de chaperonnes particulières. Les enzymes responsables de la formation et de l'isomérisation des ponts disulfures sont bien connues chez les bactéries. Nous avons choisi d'exprimer DsbA et DsbC dans le tabac afin de tester leur effet sur l'accumulation et l'activité de protéines contenant des ponts disulfures, en particulier PhoA, produites par des chloroplastes recombinants.

Les résultats obtenus au cours de cette première partie de la thèse ont soulevé une problématique intéressante qui a réorienté la suite de nos recherches. Au vu du niveau important d'accumulation de la phosphatase recombinante dans le tabac transplastomique, nous nous sommes interrogés sur l'influence éventuelle de cette expression massive sur le métabolisme des plantes. La modification du génome du chloroplaste, un organe responsable de nombreuses fonctions vitales chez les végétaux supérieurs, pourrait avoir des effets collatéraux insoupçonnés liés à l'insertion du transgène dans le plastome ou à la forte expression de la protéine recombinante. Nous avons utilisé, pour cette deuxième partie du projet, non seulement les lignées exprimant la phosphatase alcaline, mais également des lignées disponibles au laboratoire montrant une très forte accumulation de deux autres protéines recombinantes, une « green fluorescent protein » (GFP) et une enzyme du métabolisme cible d'herbicides, la p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD). Le phénotype de ces plantes semble pourtant normal, comme dans le cas d'une toxine insecticide dont le niveau d'expression atteint pourtant 45% des protéines totales (De Cosa *et al.*, 2001). Curieusement, aucune étude n'avait été réalisée concernant l'impact de la transformation plastidiale sur la plante hôte. Les différentes lignées choisies ont été analysées pour leur phénotype et comparées au tabac sauvage, tout au long de leur croissance, de la germination à la floraison. Nous avons également entrepris l'évaluation du niveau d'accumulation des transcrits de certains gènes plastidiaux. En effet, l'insertion d'un transgène au niveau du plastome ne modifierait-elle pas l'expression des gènes chloroplastiques endogènes ? Qu'en est-il notamment pour les gènes *accD* et *rbcL* encadrant le gène inséré ? Nous avons ensuite procédé à une comparaison qualitative et quantitative des profils protéiques des tabacs transplastomiques. L'accumulation massive des protéines recombinantes se fait elle au

dépend des autres protéines de la cellule, ou de certaines protéines seulement ? Certaines voies métaboliques sont-elles affectées afin de permettre ce niveau extraordinaire d'accumulation ? Une analyse protéomique a donc été réalisée pour répondre à ces questions.

Chapitre II

Compétence des chloroplastes pour la formation de ponts disulfures dans les protéines recombinantes

L'expression de protéines recombinantes est une technologie utilisée pour de nombreuses applications industrielles auxquelles sont associées des contraintes spécifiques d'ordre scientifique, technique, commercial ou réglementaire, de sorte que les systèmes d'expression disponibles ne sont pas toujours adaptés. De nouveaux systèmes d'expression sont régulièrement développés ou optimisés grâce aux outils de génétique, notamment dans le domaine végétal. Le chloroplaste est devenu récemment un compartiment cellulaire particulièrement attractif pour l'expression de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique. Il permet non seulement un niveau d'expression élevé, mais également un confinement amélioré des transgènes puisqu'ils sont transmis à la descendance par hérédité maternelle et seulement rarement *via* le pollen (Ruf *et al.*, 2007 ; Svab et Maliga, 2007).

Un certain nombre de protéines recombinantes, et notamment des protéines d'intérêt thérapeutique, nécessitent des modifications post-traductionnelles pour leur bon repliement et une activité optimale. Ces modifications, telles que la glycosylation et la formation de ponts disulfures, peuvent faire défaut au sein des chloroplastes. En effet, selon la théorie endosymbiotique, ces organites dérivent d'une cyanobactérie (Margulis, 1975). Il a donc été anticipé que, de la même façon que pour les autres systèmes procaryotiques, les plastes ne seraient pas capables d'accumuler des protéines recombinantes correctement glycosylées ou contenant des ponts disulfures correctement formés. Ceci est vrai pour la glycosylation puisque même si plusieurs groupes ont déjà démontré la présence de glycoprotéines dans le chloroplaste, celles-ci sont codées dans le génome nucléaire et adressées au plaste après un passage dans le reticulum endoplasmique (Faye et Daniell 2006). En revanche, un nombre limité de protéines possédant des ponts disulfures a déjà été exprimé avec succès dans les chloroplastes, comme l'hormone humaine de croissance (Staub *et al.*, 2000), l'albumine humaine (HSA, Fernandez-San Millan *et al.*, 2003), ou encore l'interféron- α humain (Daniell *et al.*, 2004). Ces protéines se sont révélées actives dans la plupart des cas suggérant que le stroma du chloroplaste permet la formation des ponts disulfures nécessaires à leur bon repliement. Cependant, même pour ces exemples, il n'a pas toujours été démontré si ces ponts disulfures étaient correctement formés, et s'ils se sont formés *in planta* ou spontanément durant l'extraction des protéines. La possibilité d'exprimer des protéines contenant des ponts disulfures au sein du chloroplaste représente un intérêt majeur pour les applications de type « molecular farming ». Nous nous sommes donc proposés de clarifier cette situation à l'aide de protéines modèles, d'abord une phosphatase alcaline bactérienne (PhoA), puis une « green fluorescent protein » sensible aux variations redox de l'environnement (roGFP). Ces deux

protéines possèdent dans leurs structures des ponts disulfures indispensables pour leur activité et elles ont déjà été utilisées pour étudier la formation des ponts disulfures ou les états rédox dans divers organismes et compartiments cellulaires (Derman *et al.*, 1993 ; Stewart *et al.*, 1998 ; Dooley *et al.*, 2004 ; Jiang *et al.*, 2006).

D'autre part, chez les bactéries, la formation des ponts disulfures a lieu préférentiellement dans le périplasma, un compartiment plus oxydant que le cytoplasme, à l'aide de protéines catalyseurs. Les mécanismes bactériens d'exportation des protéines vers le périplasma présentent de nombreuses similitudes avec les systèmes de sécrétion des protéines du stroma vers le lumen des thylacoïdes (Settles et Martienssen, 1998), un compartiment dont le protéome est limité à environ 80 polypeptides (Kieselbach et Schröder, 2003). Il est donc apparu intéressant d'étudier si le lumen des thylacoïdes peut être, à l'instar du périplasma des bactéries, un compartiment du chloroplaste particulièrement propice pour l'expression de protéines recombinantes contenant des ponts disulfures. Ceci n'a jamais été étudié auparavant. C'est pourquoi nous avons choisi d'analyser l'expression des protéines recombinantes, liées ou non, à des peptides signaux de type bactérien potentiellement capables des les adresser au lumen des thylacoïdes du plaste.

Alors que pour certaines protéines le bon repliement des ponts disulfures est spontané, nombreuses sont celles qui nécessitent l'aide d'assistants spécifiques du repliement pour former des ponts corrects. La protéine disulfure isomérase (PDI) chez les eucaryotes, ou les protéines DsbA et DsbC chez les procaryotes, sont des enzymes qui catalysent la formation et l'isomérisation des ponts disulfures. Nous avons anticipé sur le fait que les protéines recombinantes du chloroplaste pouvaient nécessiter de telles protéines chaperonnes pour leur bon repliement. La coexpression de ces enzymes dans les plantes transplastomiques a donc été envisagée. Notre choix s'est porté sur les enzymes procaryotes, (DsbA et DsbC), sans doute plus apparentées aux origines bactériennes des chloroplastes. De plus, la littérature présente de nombreux exemples où la surexpression de protéines exogènes chez *E. coli* n'a été rendue possible qu'avec une co-expression des protéines DsbA ou DsbC (Bessette *et al.*, 1999 ; Kurokawa *et al.*, 2000 ; Jurado *et al.*, 2002 ; Maskos *et al.*, 2003). Les gènes codant ces enzymes ont été introduits dans le génome nucléaire. Ces chaperonnes recombinantes sont adressées dans les chloroplastes de tabacs préalablement transformés avec les protéines modèles. Ainsi, nous avons essayé de déterminer si ces enzymes spécifiques du repliement chez les procaryotes peuvent améliorer la formation des ponts disulfures des protéines surexprimées dans les chloroplastes.

1. LA PHOSPHATASE ALCALINE

1.1 CHOIX DE LA PROTEINE RECOMBINANTE, LA PHOSPHATASE ALCALINE

Dans la littérature, différentes protéines ont permis l'étude du repliement et de la mise en place des ponts disulfures au sein des protéines, chez les bactéries ou les eucaryotes, comme la RNase A (Wedemeyer *et al.*, 2000), l'activateur t-plasminogen (Qiu *et al.*, 1998) ou la phosphatase alcaline, une protéine modèle couramment employée pour l'étude du rôle des ponts disulfures dans les protéines (Sone *et al.*, 1997). La phosphatase alcaline (PhoA) appartient à une large famille de métalloenzymes dimériques présentes dans tous les organismes, de la bactérie à l'homme. Elle catalyse l'hydrolyse des phosphomonoesters (hydrolysant le radical phosphoryle porté par une liaison ester ou anhydride), en produisant du phosphate inorganique et un alcool (Figure II.1).

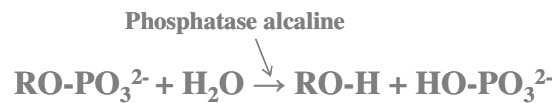


Figure II.1 : Réaction d'hydrolyse par la phosphatase alcaline sur les mono-esters

La phosphatase alcaline d'*E. coli* (EC 3.1.3.1) est codée par un seul gène. Elle est normalement localisée dans le périplasme d'*E. coli*. C'est un homodimère de 454 acides aminés par sous-unité. Sur chacune d'entre elles on retrouve un site actif qui contient trois sites de liaison pour des métaux, deux pour des atomes de zinc et le dernier pour un atome de magnésium.

Les deux monomères de la phosphatase alcaline contiennent deux ponts disulfures : Cys-168/Cys-178 et Cys-286/Cys-336 (Figure II. 2). Ils sont formés après exportation de la protéine dans le périplasme. La formation de ces ponts disulfures est essentielle pour le repliement de la phosphatase alcaline *in vivo* ainsi qu'*in vitro* (Akiyama et Ito, 1993). Le pont Cys-286/Cys-336 est nécessaire et suffisant pour l'activité de l'enzyme. Le pont Cys-168/Cys-178 est quant à lui indispensable pour la stabilité de la protéine mais pas pour son activité.

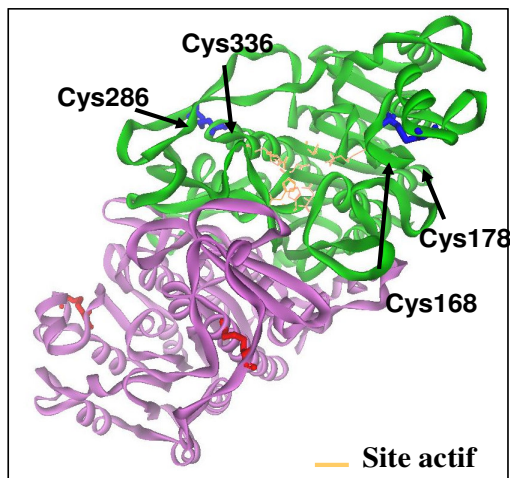


Figure II. 2 : La phosphatase alcaline

Les deux ponts sur chacune de ces sous-unités sont donc nécessaires pour que la phosphatase alcaline soit stable et fonctionnelle (Sone *et al.*, 1997). Du fait de cette propriété elle peut être considérée comme un marqueur de la formation des ponts disulfures. Elle a déjà été largement utilisée comme modèle pour étudier la formation des ponts disulfures dans différents organismes (Derman *et al.*, 1993 ; Stewart *et al.*, 1998), mais pas dans les chloroplastes.

Différentes analyses indiquent que la phosphatase alcaline, sans peptide signal, donc exprimée dans le cytoplasme d'*E. coli*, est instable et inactive dans ces conditions réductrices (Derman et Beckwith, 1991). Son expression dans le mutant *E. coli* *trx-*, *gor-* (mutant déficient en thiorédoxine réductase et glutathion réductase) produit cependant une protéine oxydée et active, les ponts disulfures se formant dans un cytoplasme plus oxydant (Bessette *et al.*, 1999). L'enzyme utilise chez les bactéries un peptide signal de type SEC pour sa sécrétion dans le périplasme où elle est active et stable. D'autres études montrent que sa fusion avec un peptide bactérien de type TAT (voie de translocation Twin-arginine capable d'exporter les protéines correctement repliées à travers la membrane du cytoplasme) ne donne une protéine active et bien repliée que dans le périplasme des bactéries mutées *E. coli* *trx-*, *gor-* (DeLisa *et al.*, 2003 ; Richter et Brüser, 2005).

Pour nos travaux sur le tabac, deux types de plantes transgéniques ont été produits, en utilisant le plastome comme récepteur du gène de la phosphatase alcaline (*PhoA*) :

- ✓ des plantes contenant le gène *PhoA* complet lié à la séquence nucléotidique codant son peptide signal bactérien (PhoA-L) ;
- ✓ des plantes contenant le même gène mais dépourvu de la séquence nucléotidique codant le peptide signal bactérien (PhoA-S).

Nous avons émis l'hypothèse que, dans le premier cas, la protéine sera transportée dans le lumen des thylacoïdes du plaste. Cela implique en principe la reconnaissance du peptide d'adressage dans le chloroplaste comme dans la bactérie par le système d'exportation SEC (DeLisa *et al.*, 2003). La reconnaissance et la fonctionnalité d'un peptide bactérien au

sein du chloroplaste n'ont jamais été démontrées *in vivo* avant ce travail de thèse. Dans le second cas, la protéine produite sera en principe localisée dans le stroma du plaste. Par cette approche, ce matériel nous permettra d'étudier *in planta*, et dans deux compartiments plastidiaux différents, l'accumulation et la conformation d'une protéine exogène dont la stabilité et l'activité enzymatique sont conditionnées par la présence de ponts disulfures.

1.2 CONSTRUCTION DES VECTEURS DE TRANSFORMATION PLASTIDIALE

La séquence codante du gène de la phosphatase alcaline a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique d'*E. coli* pour obtenir soit le gène naturel de la protéine avec son peptide signal (*PhoA-L*, 475aa, 52 kDa), soit le gène de la protéine dépourvue de son peptide d'adressage (*PhoA-S*, 455aa, 50 kDa) tous deux débutant par une méthionine (ATG). Ces gènes ont ensuite été clonés dans un vecteur destiné à la transformation chloroplastique (pCLT515 pour *PhoA-S* et pCLT516 pour *PhoA-L* ; Figures II. 3 et 4). Dans ces vecteurs, les transgènes sont placés entre deux séquences plastidiales *RHRR* et *LHRR*, (pour Right et Left Homologous Recombination Region). Cela permet une intégration ciblée par recombinaison homologue dans le génome plastidial de tabac entre les gènes *rbcL* et *accD*. Les gènes d'intérêt sont placés sous la dépendance du promoteur *PpsbA* de tabac (un promoteur fort qui contrôle la transcription du gène codant la protéine D1 du photosystème II) et possèdent en 3' le terminateur *rbcL* (terminateur du gène plastidial codant la grande sous-unité de la Rubisco). Le gène de sélection *aadA* (*ANT(3'')-I*) codant une aminoglycoside 3'' adényllyltransférase (EC 2.7.7.47), conférant la double résistance aux antibiotiques spectinomycine et streptomycine, permet la sélection des événements transformés. Ce gène *aadA* est également placé sous le contrôle d'éléments régulateurs de tabac : le promoteur *Prn*, promoteur constitutif fort de l'opéron des ARN ribosomiaux (16S), fusionné au site de fixation des ribosomes du gène *rbcL*, et le terminateur du gène *psbA* conférant une stabilité à l'ARNm (Svab et Maliga, 1993).

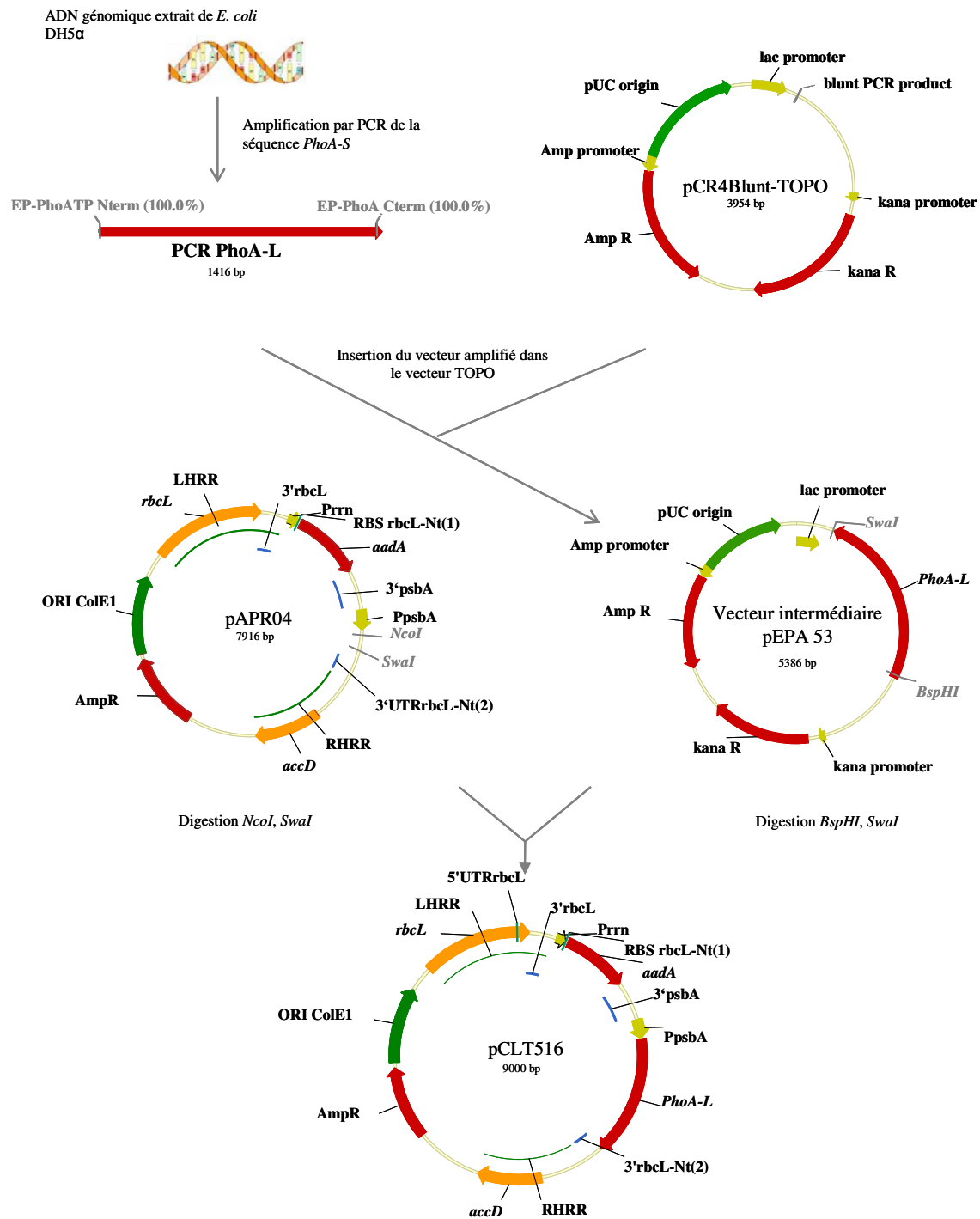


Figure II.3 : Construction du vecteur d'expression pCLT516, (PhoA-L)

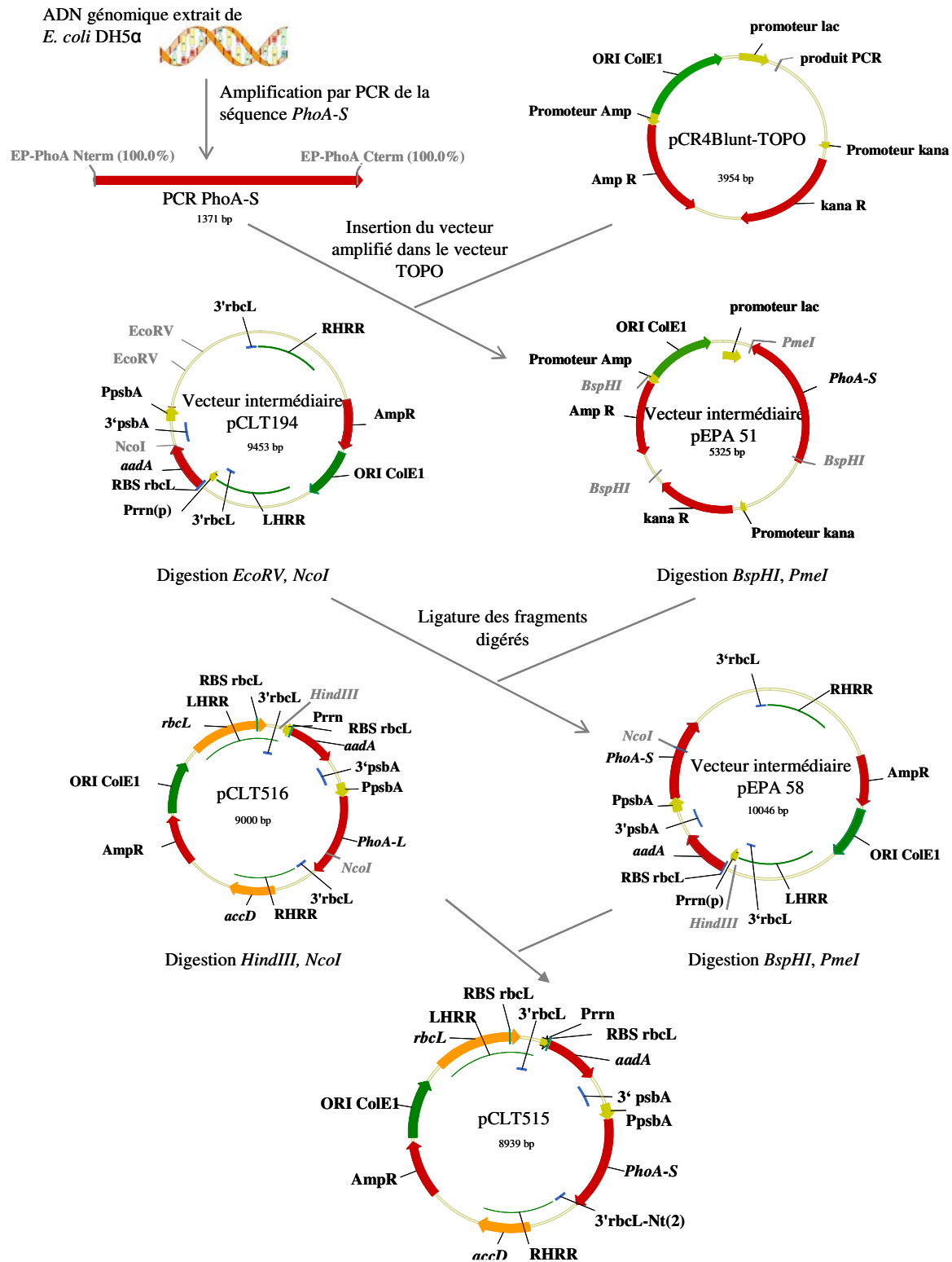


Figure II.4 : Construction du vecteur d'expression pCLT515, (*PhoA-S*)

1.3 TRANSFORMATION CHLOROPLASTIQUE

1.3.1 Transformation et sélection des transformants primaires

Dans le but d'exprimer la phosphatase alcaline dans les chloroplastes de tabac (cultivar PBD6), les constructions obtenues pour *PhoA-S* (pCLT515) et *PhoA-L* (pCLT516) ont été introduites par biolistique. Pour chacune des transformations, des cals résistants à la spectinomycine ont été générés (sept avec le vecteur pCLT515 et quatre avec le vecteur pCLT516), à partir desquels des plantules ont été régénérées.

La capacité à se développer sur milieu sélectif contenant un antibiotique tel que la spectinomycine ne permet pas de conclure avec certitude sur l'intégration du transgène dans le plastome. En effet, la résistance peut être également due à des intégrations nucléaires éventuelles du gène de résistance ou à des mutations de l'ARN 16S qui peuvent conférer une résistance à l'antibiotique de sélection (Svab et Maliga, 1991). La présence des transgènes dans le plastome a pu être vérifiée par amplifications PCR réalisées sur l'ADN génomique extrait à partir des 11 plantules sélectionnées, cultivées *in vitro*.

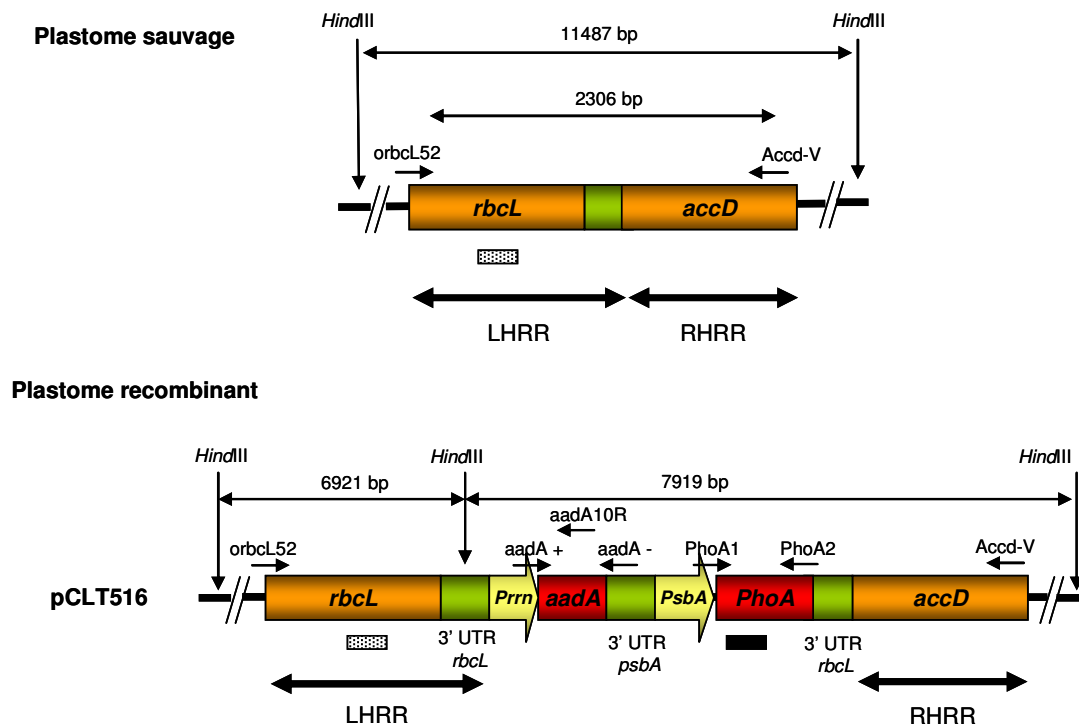


Figure II. 5 : Structure génétique des plastomes sauvages et recombinants. Les amorces utilisées pour l'analyse par PCR, ainsi que les fragments attendus après digestion pour le Southern blot ainsi que les sondes utilisées sont également représentés (*rbcL* et *PhoA*).

Pour cela, trois couples d'amorces ont été utilisés (Figure II. 5) :

- ✓ Un couple spécifique de la présence du transgène *aadA* (*aadA*+/*aadA*-, tableau IV.1) permettant de vérifier que nous nous trouvons bien en présence de transformants et non pas de mutations spontanées dans l'ARN 16S. Le gène de résistance à la spectinomycine est retrouvé pour tous les événements testés, sauf trois pour le vecteur pCLT515 (données non montrées) ;
- ✓ Un couple d'amorces (*PhoA1/PhoA2*, Tableau IV.1) permettant de vérifier la présence du transgène d'intérêt. La taille des fragments attendus est de 906 et 957 pb pour PhoA-S et PhoA-L respectivement. Les résultats de ces analyses PCR montrent que tous les événements analysés, sauf trois avec le vecteur pCLT515 (aussi négatifs pour le marqueur *aadA*), ont intégré la phosphatase alcaline (Figure II.6 a,b,c). Les trois événements qui sont non transformés correspondent vraisemblablement à des mutations conférant la résistance à la spectinomycine.

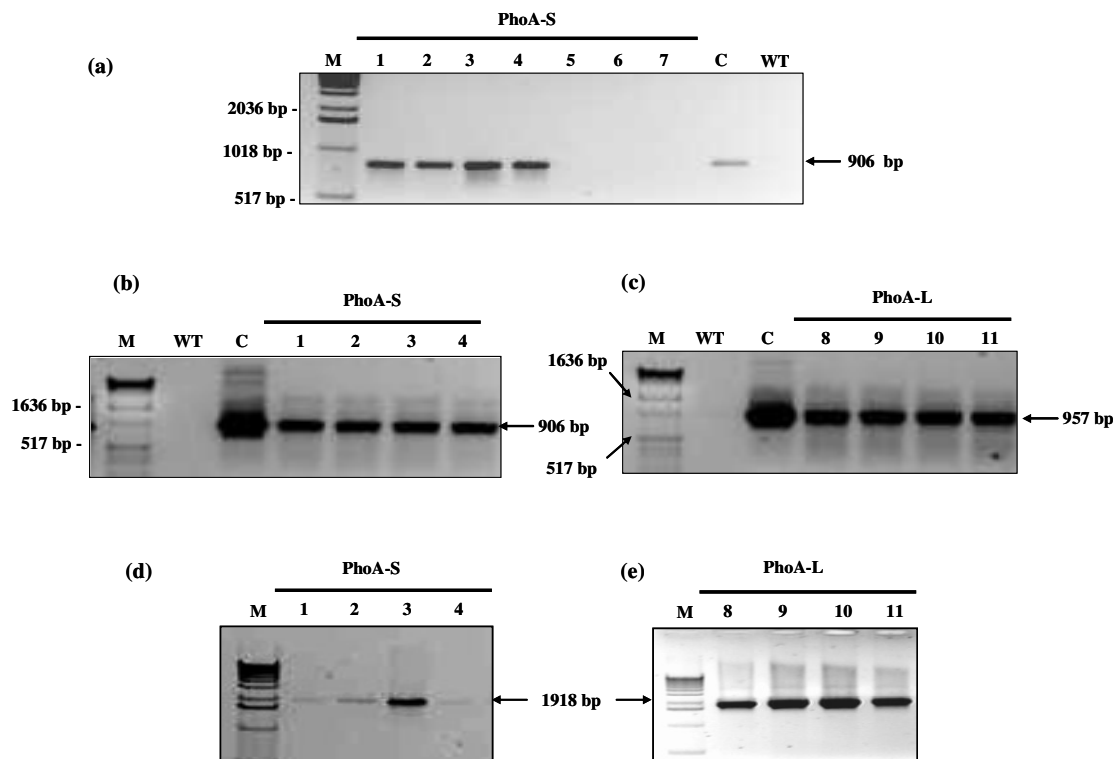


Figure II. 6 : Analyse PCR des lignées sélectionnées.

Les bandes obtenues à 957 pb et 906 pb, amplifiées avec les amorces *PhoA1/PhoA2*, confirment la présence de PhoA-S (a, b) et de PhoA-L (c) respectivement. Les bandes obtenues à 1918 pb, amplifiées avec les amorces *aadA10r/orbcl52* confirment l'intégration de PhoA-S (d) et de PhoA-L (e). WT, sauvage ; C, contrôle positif ; M, 1kb DNA Ladder.

✓ Un dernier couple d'amorces (*aadA10r/orbcl52*) permettant de confirmer l'intégration ciblée dans le génome chloroplastique, par l'utilisation d'une amorce s'hybridant au sein de la cassette de sélection et d'une autre s'hybridant sur le plastome de tabac en dehors des régions de recombinaison des vecteurs, n'autorisant ainsi l'amplification d'aucun fragment d'ADN dans le cas d'une intégration nucléaire. La taille des fragments attendus est de 1918 pb. Les huit plantules analysées (Figure II.6 d, 1-4 pour le vecteur pCLT515 et Figure II.6 e, 8-11 pour le vecteur pCLT516) se sont révélées positives pour l'amplification de ce fragment de 1918 pb. Pour chacune des transformations, quatre plantes transplastomiques ont donc été obtenues.

1.3.2 Régénération des lignées transplastomiques et analyse de l'homoplasmie

Après développement sur milieu sélectif et enracinement des plantules, les lignées transplastomiques ont été transférées en serre. Toutes ces lignées apparaissent phénotypiquement normales et fertiles. Une centaine de graines, obtenues par autofécondation des événements de première génération issus de chaque transformation, a été semée *in vitro* sur un milieu nutritif (MS00) contenant 500 mg/L de spectinomycine. Comme attendu pour un transgène plastidial, la descendance T_1 s'est révélée uniformément résistante à l'antibiotique.

Le niveau d'hétéroplasmie, à savoir le ratio de génome chloroplastique sauvage et transformé dans la même cellule, a été évalué par analyse PCR. Celle-ci a été réalisée sur la génération T_2 (Figure II.7), de manière à analyser également la stabilité du plastome recombinant dans la descendance. Des amorces s'hybridant de part et d'autres de son site d'insertion ont été choisies : une amorce s'alignant sur la séquence du gène *rbcL* (*orbcl52*) et une autre amorce s'hybridant sur la séquence du gène *accD* (*accD-V*) (Figure II.5).

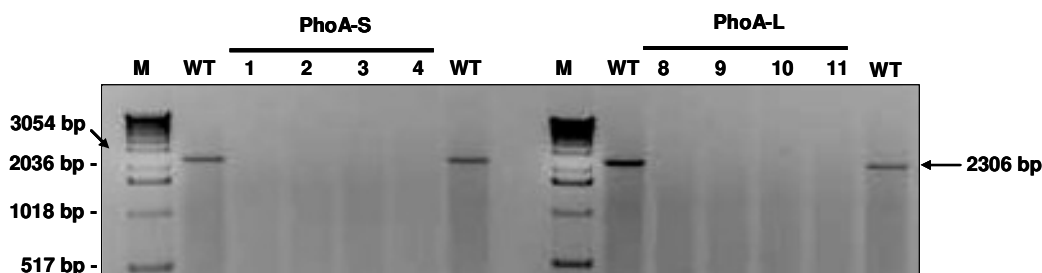


Figure II. 7 : Analyse de l'homoplasmie par PCR.

Les plantes sauvages donnent un fragment de 2306 pb (WT). Cette bande est absente pour les lignées transplastomiques PhoA-S (1-4) et PhoA-L (8-11). WT, sauvage; M, 1 kb DNA Ladder.

Un produit d'amplification de 2306 pb est attendu uniquement pour les plantes non transformées. Les résultats de l'analyse montrent clairement cette bande dans le cas du témoin sauvage. Pour les plantes transplastomiques, on ne retrouve pas cette bande à 2306 pb. Il n'y a donc pas de plastome sauvage résiduel chez ces plantes. Pour ces dernières, le produit d'amplification, de 5659 pb pour le pCLT516 et de 5590 pb pour le pCLT515, n'est pas obtenu avec nos conditions d'amplification. Elles sont homoplasmiques et les transgènes stablement transmis sur au moins deux générations.

L'homoplasomie a été confirmée par analyse Southern blot (Figure II.8). Les échantillons des lignées sélectionnées des générations T₀, T₁ et T₂ ont été digérés par l'enzyme de restriction *Hind III*, séparés sur gel, transférés sur une membrane et hybridés avec des sondes radioactives marquées couvrant les régions codantes *rbcL* et *PhoA* (Figure II.5). Des variations dans le profil des dépôts sont visibles. Dans le cas de l'échantillon issu des plantes sauvages, l'ADN semble être un peu dégradé. Pour les pistes 2 et 8, ces variations sont dues à une quantité d'ADN déposée trop faible par rapport aux autres pistes.

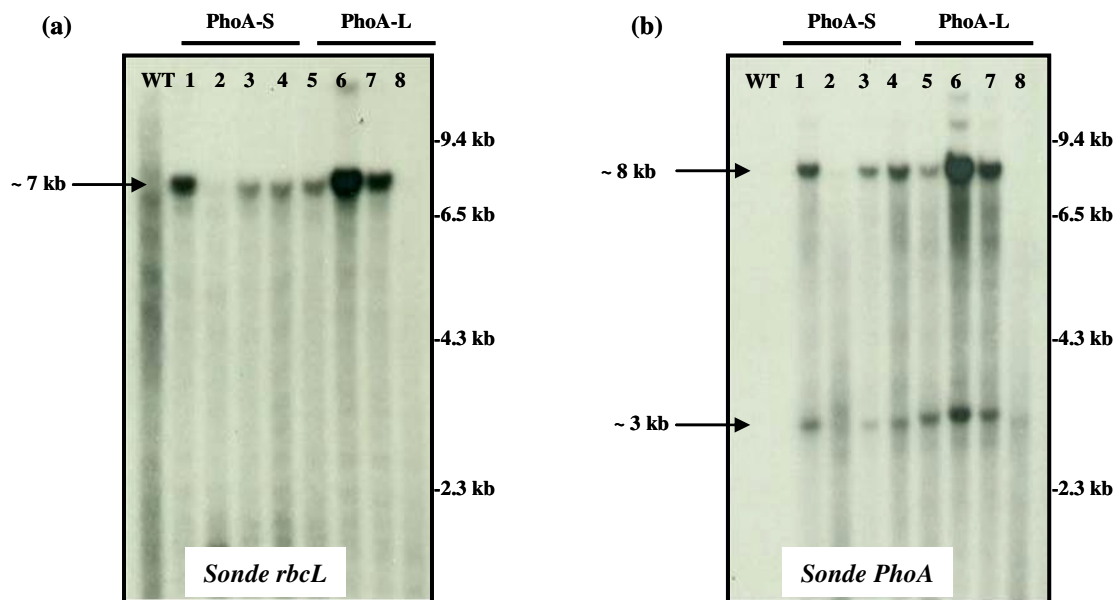


Figure II. 8 : Analyse par Southern blot.

L'ADN total extrait des plantes transformées exprimant PhoA-S (1-4) ou PhoA-L (5-8) a été analysé par Southern blot avec des sondes marquées pour *rbcL* (a) et *PhoA* (b). WT, sauvage.

Un fragment unique aux alentours de 7 kb est détecté pour tous les échantillons hybridés avec la sonde *rbcL*, confirmant l'introduction des transgènes entre les gènes *rbcL* et *accD* du plastome de tabac. Le fragment de 11,5 kb spécifique du plastome sauvage n'est retrouvé dans aucun événement transplastomique. La sonde *PhoA* révèle une bande majeure aux alentours de 8 kb pour les lignées transformées, démontrant la présence de la phosphatase alcaline dans le génome chloroplastique. Une bande de plus faible poids moléculaire, à environ 3 kb, est également détectée, dont l'intensité varie parallèlement à celle de la bande prédominante à 8 kb, pour toutes les lignées, excepté pour la plante sauvage. Cette bande inattendue pourrait correspondre à une recombinaison entre les séquences plastidiales introduites et résidentes du plaste (Eibl *et al.*, 1999). De tels événements ont déjà été détectés dans les premiers tabacs transplastomiques générés par Svab et Maliga (1993). Finalement, aucune différence n'est observée dans le profil des générations T₀, T₁ et T₂ via ces analyses de Southern blot, montrant ainsi que les transgènes introduits sont transmis de manière stable à la descendance.

1.4 ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE

L'accumulation de la phosphatase alcaline dans les feuilles de tabacs transformés a été examinée en génération T₁ par analyse protéomique et western blot, après séparation des protéines sur gel bi-dimensionnel en conditions dénaturantes (Figure II. 9). L'expression de PhoA-S et de PhoA-L a été détectée dans les deux cas sous forme de spots multiples de même poids moléculaire, à peu près 50 kDa correspondant à la taille de la phosphatase alcaline mature sous sa forme monomérique, et de points isoélectriques différents (Figure II. 9, c-f). Cette accumulation apparaît beaucoup plus forte pour PhoA-L (Figure II. 9, e, f). Elle semble sur ce gel même plus forte que l'accumulation de la grande sous-unité de la Rubisco, une des protéines les plus abondantes de la planète. Tous les spots détectés ont été isolés à partir d'un gel préparatif bi-dimensionnel, 6 pour PhoA-S (spots 1-6) et 12 pour PhoA-L (7-18), et caractérisés par chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS). Ces analyses ont identifié tous les polypeptides comme de la phosphatase alcaline d'*E. coli* (annexes 1 et 2). Pour PhoA-L, les spots 15 à 18 semblent avoir une masse moléculaire inférieure à celle des autres spots. Nous n'avons pas de données pour expliquer cette différence. La séquence N-terminale de la protéine recombinante PhoA-L codée par le

construit pCLT516 a été établie par dégradation d'Edman dans le but de déterminer si le peptide signal bactérien était correctement clivé dans les chloroplastes transformés.

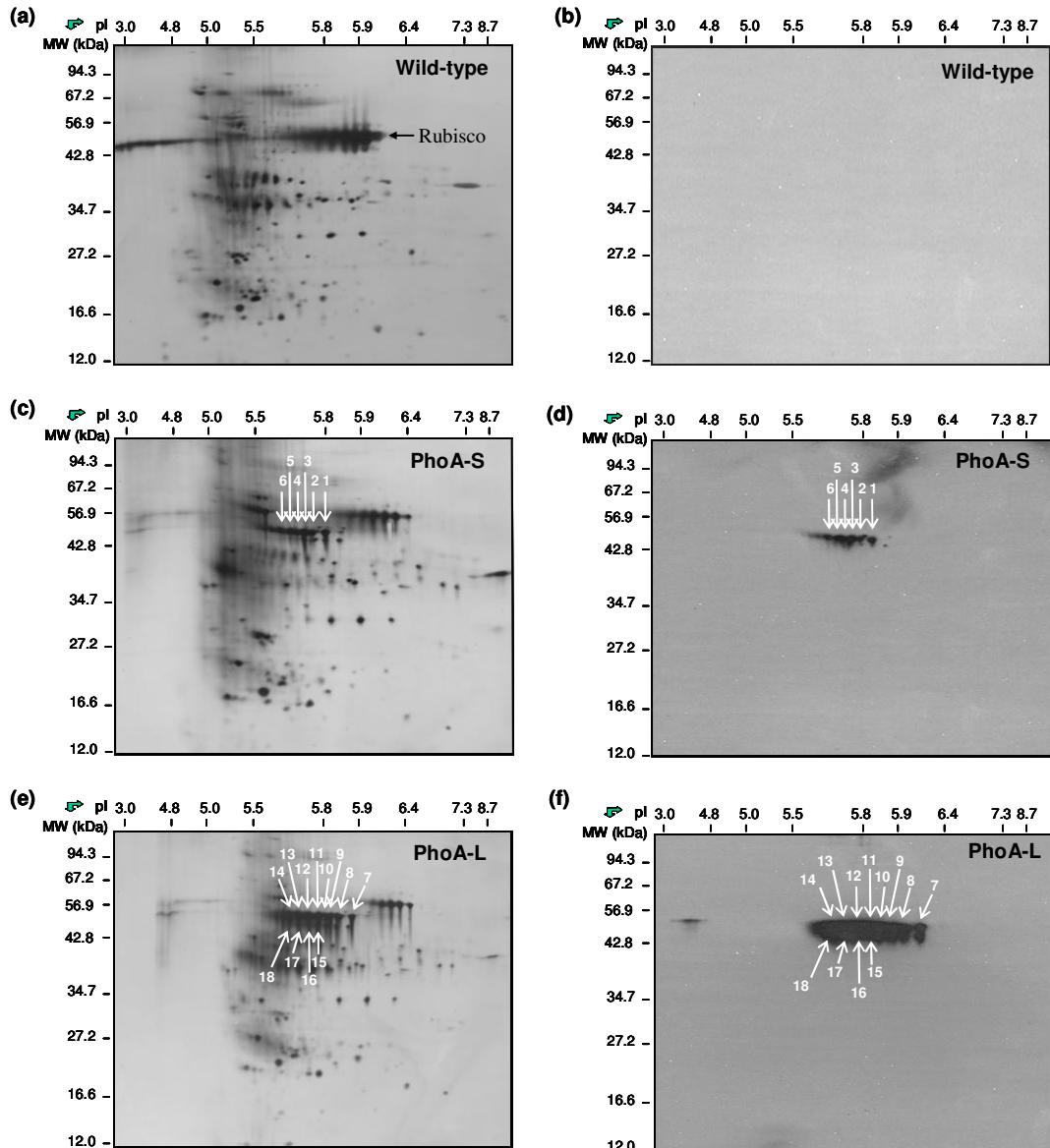
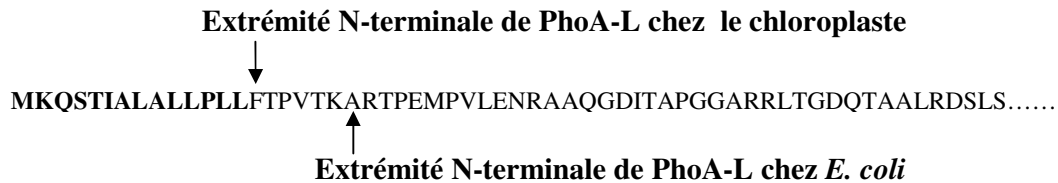


Figure II.9 : Accumulation de la phosphatase alcaline (PhoA) dans les chloroplastes.

Les extraits protéiques issus de feuilles de tabacs sauvages (a, b) et de tabacs transformés avec pCLT515 exprimant PhoA-S (c,d) ou avec pCLT516 exprimant PhoA-L (e,f) ont été séparés par électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines séparées ont été colorées au nitrate d'argent (a,c,e) ou analysées par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la phosphatase alcaline (b,d,f).

La séquence N-terminale de quatre spots (Figure II.9, 7-10) a été obtenue. Dans tous les cas, les séquences sont identiques et commencent avec les résidus FTPVTKAR, c'est-à-dire 15 acides aminés après le site d'initiation de la traduction.



Ce clivage spécifique du signal peptide bactérien survient, chez le chloroplaste, six acides aminés avant le site normal chez *E. coli*. Cela suggère que le peptide signal pourrait être reconnu et clivé par les équivalents chloroplastiques des peptidases bactériennes connues pour exister dans la membrane des thylacoïdes (Settle et Martienssen, 1998), mais que les sites de clivages sont différents chez le chloroplaste et la bactérie. La séquence N-terminale de la protéine recombinante PhoA-S est, comme attendue, MRTPEM. Elle a été obtenue pour les spots 1 et 2 (Figure II.9).

D'après ces résultats, cela exclut la possibilité que l'apparition de plusieurs spots de phosphatase alcaline, avec des points isoélectriques différents, soit due uniquement à l'hétérogénéité de la séquence N-terminale de la phosphatase recombinante. L'oxydation des méthionines est détectée dans de nombreux fragments tryptiques de PhoA-S et PhoA-L (annexes 1 et 2), mais cette modification n'a pas d'effet sur la charge de ces résidus. La carbonylation des protéines est souvent responsable de la formation de nombreux spots pour une unique protéine. C'est un phénomène qui peut-être révélé sur gel bi-dimensionnel comme des spots de poids moléculaires similaires à celui de la protéine étudiée mais séparés selon leur point isoélectrique (Ballesteros *et al.*, 2001). Cependant, dans notre cas ce phénomène n'est pas une explication de l'apparition de spots PhoA multiples car ces derniers ne sont pas révélés par coloration au 2,4-dinitrophénylhydrazine, un colorant qui permet la détection des groupements carbonyles (Ballestros *et al.*, 2001 ; Job *et al.*, 2005 ; données non montrées). L'apparition de ce train de protéines pourrait être dû à une hétérogénéité de la séquence C-terminale du polypeptide recombinant, bien qu'aucune différence significative de masse ne soit observée, ou encore, à d'autres modifications post-traductionnelles non détectées par les analyses effectuées ici, mais qui peuvent avoir un impact sur la charge de la protéine (Gianazza, 1995).

1.5 ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES BACTERIES RECOMBINANTES

Le promoteur *Ppsba* est utilisé par de nombreux auteurs pour la force avec laquelle il dirige la transcription (Svab et Maliga, 1993 ; Staub *et al.*, 2000 ; Kim et Mayfield, 2002). Il est, comme la plupart des promoteurs plastidiaux, fonctionnel chez *E. coli* (Brixley *et al.*, 1997). Aussi, il a été possible d'analyser dans les bactéries l'expression de la phosphatase alcaline codée dans les vecteurs de transformation plastidiale. Pour cela, deux souches différentes d'*E. coli* ont été utilisées. La première, BL21, est appropriée pour la production de protéines recombinantes. La deuxième est une souche BL21 mutée (Origami B) dans les gènes codant la thiorédoxine réductase et la glutathione réductase, et qui possède un cytoplasme plus oxydant, permettant ainsi la production de certaines protéines contenant des ponts disulfures (Prinz *et al.*, 1997 ; Bessette *et al.*, 1999). Des extraits de protéines préparés à partir des bactéries transformées avec les vecteurs pCLT515 (PhoA-S) et pCLT516 (PhoA-L) ont été analysés par électrophorèse sur gel bidimensionnel et western blot (Figure II.10), de la même manière que pour les extraits protéiques totaux de plantes précédemment analysés.

Le western blot montre à nouveau différents spots de masse moléculaire identique mais différents dans leur point isoélectrique. Ce profil suggère que les modifications qui affectent la protéine recombinante dans les chloroplastes ne sont pas spécifiques de ces organites végétaux. Cependant, ces phénomènes sont beaucoup moins prononcés chez les bactéries que chez les plastes. La phosphatase alcaline est fortement accumulée pour les bactéries transformées avec pCLT516 qui adresse la protéine au périplasme (Figure II.10 i-l). Le niveau d'accumulation de PhoA-S dans la souche BL21, adressant la protéine au cytosol, est beaucoup plus faible (Figure II.10 e,f). Comme cela a été décrit dans la littérature (Bessette *et al.*, 1999), la souche Origami B permet la production d'une quantité plus importante de PhoA-S dans le cytosol (Figure II.10 g,h) par rapport à la souche BL21.

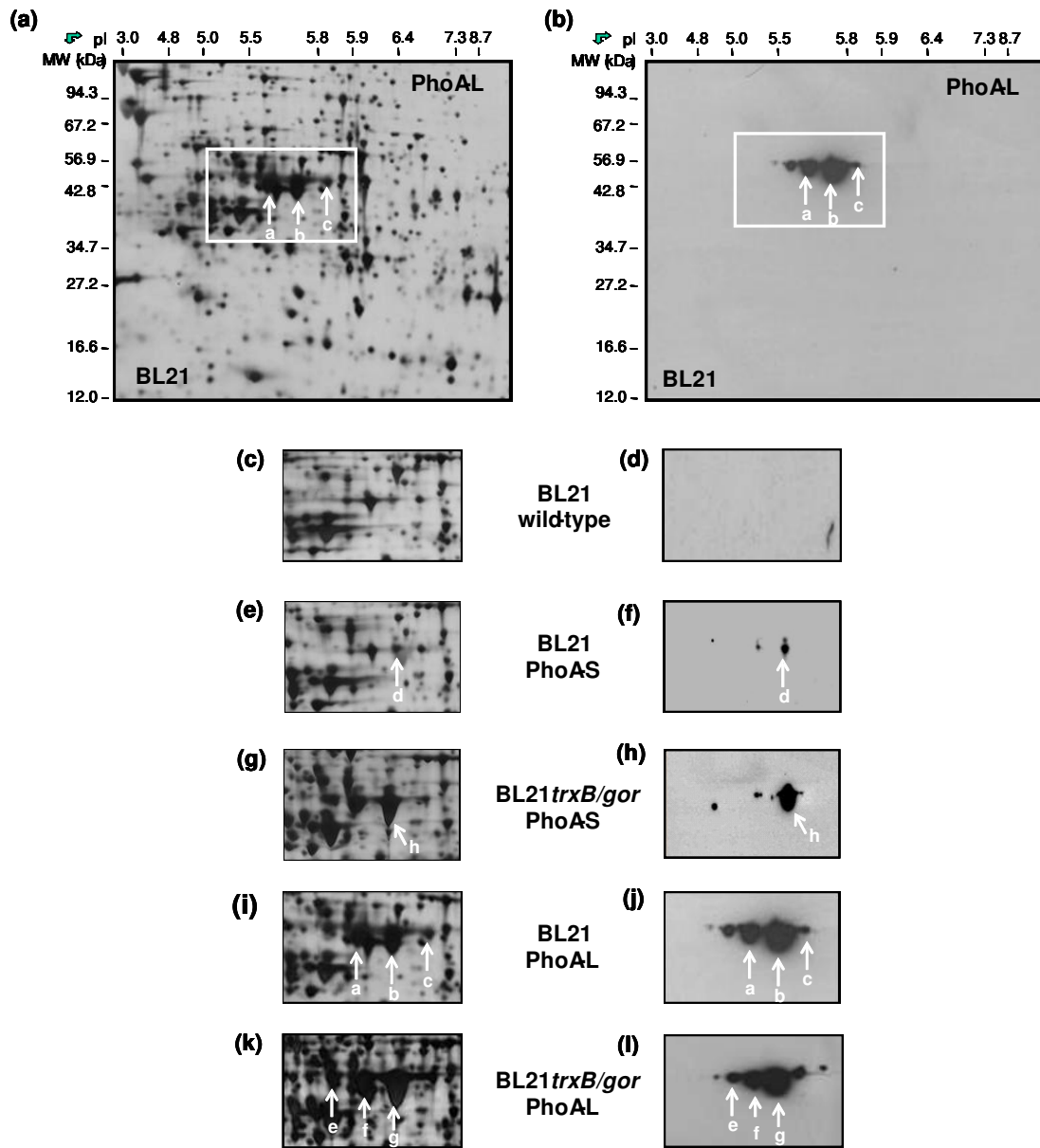


Figure II. 10 : Analyse protéomique de l'accumulation de la phosphatase alcaline (PhoA) dans les bactéries transformées.

Les extraits protéiques issus de bactéries sauvages (c,d) et de bactéries transformées avec pCLT515 codant pour PhoA-S (e,f pour BL21 ; g,h pour BL21 *trxB/gor*) ou avec pCLT516 codant pour PhoA-L (i,j - agrandissement de a,b - pour BL21 ; k,l pour BL21 *trxB/gor*) ont été séparés par électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines séparées ont été colorées au nitrate d'argent (a,c,e,g,i,k) ou analysées par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la phosphatase alcaline (b,d,f,h,j,l).

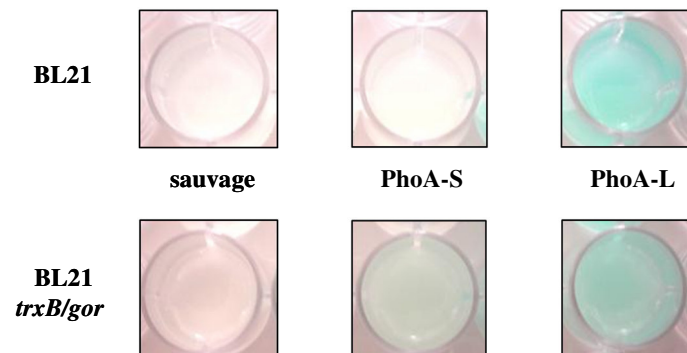
1.6 ACTIVITE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE

Afin d'analyser le bon repliement de la protéine au sein du chloroplaste, des tests d'activité ont été entrepris. En effet, pour avoir une activité optimale, les ponts disulfures doivent être correctement formés. Démontrer que la phosphatase est active *in vivo* permettrait de s'assurer que les ponts disulfures sont formés directement *in planta* et non lors de l'extraction. Les tests d'activité effectués *in vitro* vont permettre de quantifier l'activité de l'enzyme et de préciser les capacités du plaste pour l'accumulation d'une protéine correctement repliée. Ces tests ont été effectués en parallèle chez les bactéries recombinantes afin de pouvoir comparer les résultats dans ces deux systèmes procaryotes.

1.6.1 Activité de la phosphatase alcaline *in vivo*

L'activité de la phosphatase alcaline exprimée chez les bactéries BL21 (souche sauvage ou mutée) et chez les chloroplastes de tabac a été examinée *in vivo*. Les bactéries transformées ou des disques de feuilles de tabac transgénique ont été incubés en présence d'un substrat synthétique : le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), qui révèle l'activité de la phosphatase alcaline par une coloration bleue (Figure II.11). Les deux souches bactériennes transformées avec pCLT515 (*PhoA-S*) ou pCLT516 (*PhoA-L*) ont été mises en culture dans un milieu de croissance LB liquide supplémenté en BCIP. Pour les souches transformées avec pCLT515, une coloration bleue violette est observée uniquement dans le cas des bactéries mutées Origami B. Elle est plus forte que celle des bactéries sauvages et apparaît dans un temps beaucoup plus court. La protéine PhoA-S, localisée dans le cytoplasme, dépourvue du peptide d'adressage est donc active et correctement repliée, au moins partiellement dans cette souche, au contraire de la souche DH5 α , confirmant la nécessité d'un environnement oxydant pour la formation des ponts disulfures. Son activité est cependant moins forte que celle de la phosphatase périplasmique. En effet, pour la protéine dirigée dans le périplasma (*PhoA-L*), une forte activité est observée dans les deux souches transformées avec le pCLT516 (Figure II.11 a).

(a) Activité de la phosphatase alcaline recombinante dans les souches *E. coli*



(b) Activité de la phosphatase alcaline recombinante dans les chloroplastes de tabac transformés

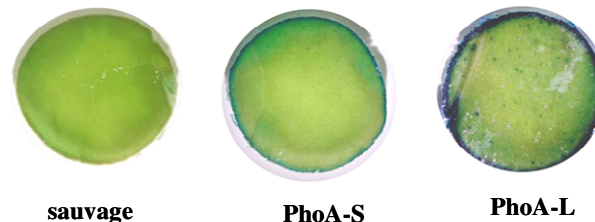


Figure II. 11 : Activité *in vivo* de la phosphatase alcaline recombinante (a) chez *E. coli*, (b) dans les chloroplastes de tabac.

Dans la même étude réalisée sur des disques foliaires de tabacs transplastomiques, la pénétration du substrat dans les tissus végétaux ne semble pas optimale car la coloration bleue apparaît uniquement à la périphérie des disques (Figure II.11 b). Cependant, on peut voir clairement que les disques de feuilles transformées par l'un ou l'autre des vecteurs montrent une coloration bleue violette qui n'est pas observée pour les disques de feuilles sauvages. Cela correspond donc bien à une activité phosphatase alcaline recombinante. Le marquage apparaît moins prononcé pour PhoA-S, indiquant une plus forte activité de PhoA-L. De façon cohérente avec l'analyse de l'expression par western blot, il semblerait donc que l'enzyme ait le même profil d'activité dans les chloroplastes et les souches BL21 mutées.

1.6.2 Activité de la phosphatase alcaline *in vitro*

L'activité de la phosphatase alcaline a été quantifiée sur des extraits protéiques de feuilles transplastomiques (matériel T₀ et T₁) et de bactéries recombinantes (BL21 et Origami B). Ces tests ont permis de préciser si les mesures d'activité spécifique permettaient de

constater des différences selon les organismes (plaste ou bactérie) et le compartiment (stroma ou lumen). Ils sont effectués en conditions non réductrices afin de ne pas inhiber l'activité enzymatique en cassant les ponts disulfures. Les extractions protéiques ont donc été réalisées dans un tampon d'extraction en absence de réducteurs tels que le DTT ou le β -mercaptoéthanol.

Les extraits protéiques issus des plantes ou des bactéries transformées ont été mis directement au contact d'un autre substrat de la phosphatase alcaline, le pNPP, en présence de $MgCl_2$. L'activité enzymatique de la phosphatase alcaline est alors révélée par une coloration jaune du produit, dont la densité optique est lue au spectrophotomètre à 405 nm. A partir de ces résultats et à l'aide d'une quantification sur western blot des extraits protéiques par rapport à une gamme de concentrations de phosphatase pure, l'activité spécifique de la protéine a pu être exprimée comme un pourcentage par rapport à une source commerciale de phosphatase alcaline (SIGMA ; Figure II. 12).

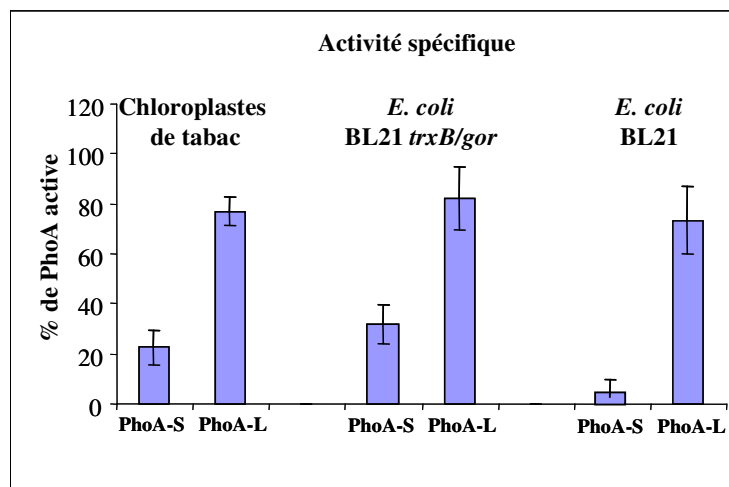


Figure II. 12 : Activité spécifique relative de la phosphatase alcaline recombinante dans les chloroplastes de tabac et les bactéries transformées

Les résultats obtenus montrent que l'activité spécifique de PhoA-S, accumulée dans le cytosol des bactéries, est très faible pour la souche BL21, sûrement le résultat des conditions réductrices de ce compartiment bactérien et de l'absence de catalyseurs du repliement des protéines (Derman et Beckwith, 1991). Cette activité de PhoA-S est plus forte à la fois dans le cytosol des bactéries Origami B et dans les chloroplastes. Cependant, elle reste deux à quatre fois moins élevée que celle mesurée dans les plantes et les bactéries transformées avec le vecteur pCLT516 exprimant PhoA-L (Figure II.12).

L'environnement redox du chloroplaste semble donc être très similaire à l'environnement oxydant de la souche BL21 mutée puisqu'en effet dans les bactéries sauvages l'environnement redox ne permet pas l'expression ni l'activité de la protéine contenant des ponts disulfures dans le cytoplasme, la protéine n'étant exprimée et active que dans le périplasme. Dans la souche mutée possédant un cytoplasme oxydant, on trouve une enzyme en partie correctement repliée dans le cytoplasme, et dans le périplasme comme attendu. Dans le chloroplaste, la protéine est retrouvée dans le stroma et, de la même façon que lorsqu'elle est sécrétée dans le périplasme des bactéries, elle apparaît encore plus présente et active lorsqu'elle est potentiellement sécrétée dans le lumen des thylacoïdes (Figure II.12).

Pour évaluer si l'enzyme recombinante était présente sous forme dimérique dans les plastes, des extraits protéiques ont été séparés en gel natif monodimensionnel. Les protéines ont été ensuite transférées sur une membrane et l'activité de l'enzyme révélée directement en présence d'une solution de BCIP (Figure II.13) lié au Nitroblue Tetrazolium (NBT).

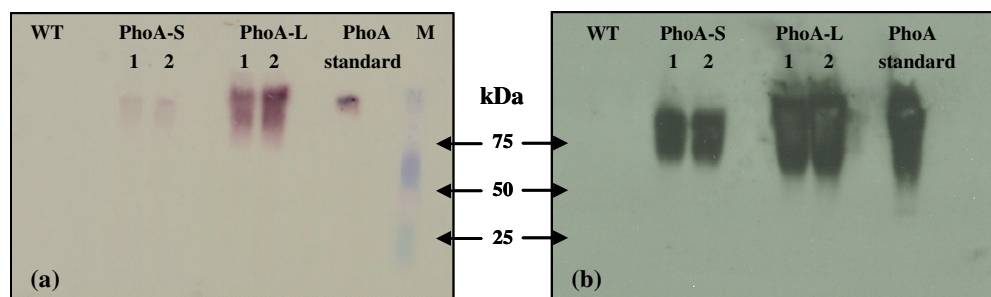


Figure II. 13 : Analyse de la phosphatase alcaline recombinante exprimée dans les chloroplastes après séparation en gel natif.

(a) Révélation de l'activité de l'enzyme, après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, par incubation avec le substrat NBT/BCIP. (b) Western blot correspondant révélé avec des anticorps dirigés contre la phosphatase alcaline. WT, sauvage ; PhoA standard (Sigma).

Une coloration forte apparaît pour PhoA-L et plus faiblement pour PhoA-S. Les bandes révélant cette activité sont obtenues pour une taille proche de 80-90 kDa. Cela démontre que la phosphatase alcaline est exprimée et active dans les chloroplastes de tabacs transformés vraisemblablement sous la forme attendue d'un homodimère. Il n'y a pas de signal supplémentaire qui puisse suggérer la présence de monomères de l'enzyme.

1.7 ETUDE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES COMPARTIMENTS PLASTIDIAUX

1.7.1 Localisation de la phosphatase alcaline dans différents compartiments du chloroplaste

Il existe au moins deux explications possibles quant aux différences d'accumulation et surtout d'activité spécifique des deux protéines recombinantes (PhoA-S et PhoA-L) au sein du chloroplaste :

- ✓ La première explication serait que les six acides aminés résiduels du peptide d'adressage bactérien contribuent au bon repliement de la protéine ou à sa stabilité ;
- ✓ La seconde hypothèse serait que les deux protéines recombinantes ne sont pas résidentes du même compartiment chloroplastique. Le peptide signal adresserait, comme cela était espéré, l'enzyme dans le lumen des thylacoïdes du plaste, qui serait un environnement plus approprié à la formation des ponts disulfures. Cela pourrait aussi suggérer que le lumen est plus oxydant que le stroma, par analogie avec le périplasme bactérien.

Dans le but de confirmer l'une ou l'autre de ces deux hypothèses et de déterminer la localisation précise de PhoA-L au sein du chloroplaste, des analyses d'immunocyto-localisation ont été réalisées sur des coupes fines de feuilles, mais malheureusement la résolution du marquage à l'or avec des anticorps commerciaux dirigés contre la phosphatase alcaline n'a pas été suffisante pour déterminer si PhoA-L était bien localisée dans le lumen des thylacoïdes du chloroplaste.

Nous avons donc isolé des chloroplastes intacts à partir des plantes transformées avec les deux vecteurs d'expression chloroplastique (Figure II. 14) et nous les avons fractionnés en extraits du stroma et du lumen des thylacoïdes.

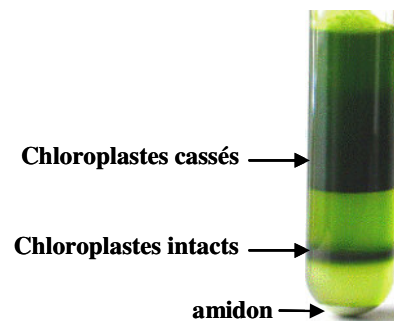


Figure II. 14 : Isolement de chloroplastes sur gradient de Percoll.

Les fractions isolées ont dans un premier temps été caractérisées par western blot avec des anticorps dirigés contre deux protéines spécifiques des différents compartiments du chloroplaste (Figure II.15) :

✓ Le premier anticorps est dirigé contre une protéine soluble TL29, un régulateur de la voie des ascorbates de 29 kDa. Cette protéine codée par un seul gène chez *Arabidopsis thaliana* (At4g09010) est localisée dans le lumen des thylacoïdes du chloroplaste (Kieselbach *et al.*, 2000), et sa séquence est fortement conservée entre espèces.

✓ Le second anticorps est dirigé contre une protéine localisée dans le stroma, l'acétohydroxyacide isoméroréductase (KARI). C'est une protéine homodimérique impliquée dans la voie de biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (Biou *et al.*, 1997 ; Dumas *et al.*, 2001) et dont le monomère de 57 kDa est également codé par un unique gène (At3g58610) chez *Arabidopsis thaliana*.

Ces protéines ont été retrouvées dans les extraits de chloroplastes totaux analysés par western blot (Figure II.15, a 1-2). Les fractions du stroma ont révélé une bande de forte intensité pour KARI et aucune pour TL29, démontrant ainsi que les extraits protéiques du stroma ne sont pas contaminés par des protéines du lumen des thylacoïdes (Figure II.15, a 3-4). Concernant les extraits du lumen, la protéine TL29, marqueur du compartiment lumenal, donne un signal intense. Cependant cet extrait est contaminé par le stroma puisque le western blot a révélé la présence de la protéine KARI également (Figure II.15, a 5-6).

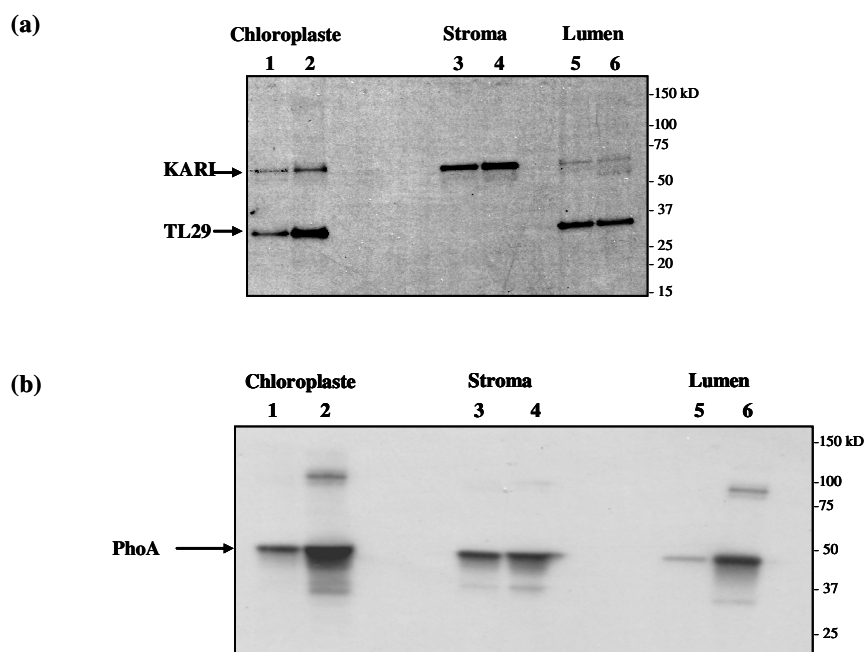


Figure II. 15 : Localisation de la phosphatase alcaline (PhoA) recombinante dans les compartiments plastidiaux.

Les western blots ont été effectués pour 20 µg d'extraits protéiques de plantes exprimant PhoA-S (1, 3, 5) ou PhoA-L (2, 4, 6) avec des anticorps dirigés contre KARI et TL29 (a) ou contre la phosphatase alcaline (b).

La contamination du lumen par le stroma est cependant faible. Une telle contamination a déjà été observée dans des études précédentes pour la majorité des compartiments cellulaires et même lors d'études détaillées de protéomique concernant les compartiments du plaste (Peltier *et al.*, 2000). Les fractions chloroplastiques, stromales et luminales ont été testées également avec des anticorps dirigés contre la phosphatase alcaline (Figure II.15, b). L'enzyme recombinante a clairement été détectée dans les fractions de chloroplastes totaux transformés avec le pCLT515 ou le pCLT516. Dans les fractions stromales, PhoA-S et PhoA-L ont toutes deux été révélées par l'anticorps utilisé. Aucune différence de poids moléculaire n'a été observée entre les deux protéines surexprimées, suggérant que la séquence signal N-terminale de PhoA-L a été clivée, probablement par la machinerie de sécrétion des thylacoïdes (Settle et Martienssen, 1998). En ce qui concerne les fractions du lumen, la protéine PhoA-S est détectée dans ces extraits, puisque une certaine contamination par le stroma a été mise en évidence. Cependant, la localisation de PhoA-L dans le lumen peut être démontrée par le fait que les quantités de PhoA-S et PhoA-L sont similaires dans la fraction stromale, alors que pour le lumen, la protéine PhoA-L est beaucoup plus abondante que la protéine PhoA-S, comme dans les fractions de chloroplastes totaux (Figure II.15). PhoA-L est donc présente à la fois dans le stroma et le lumen des thylacoïdes du chloroplaste.

1.7.2 Activité de la phosphatase alcaline dans les compartiments du chloroplaste

L'activité de la phosphatase alcaline a été analysée dans les mêmes extraits des différents compartiments du chloroplaste (Figure II.16), avec les mêmes moyens d'étude que dans les chloroplastes totaux ou les bactéries, décrits précédemment. L'activité est rapportée à la quantité de protéines des différents extraits.

PhoA-S est présente et active essentiellement dans le stroma. La détection de faibles activités dans le lumen peut être attribuée à la contamination du lumen par le stroma ou par une activité phosphatase endogène. Le profil est différent concernant la phosphatase alcaline exprimée avec son peptide signal puisqu'une forte activité est observée aussi bien dans la fraction du lumen que dans la fraction du stroma. La protéine est donc présente et active dans les deux compartiments.

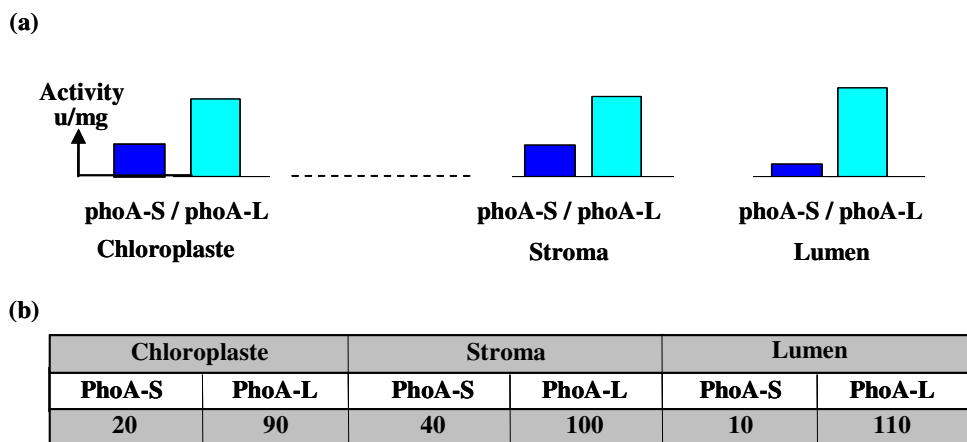


Figure II. 16 : Activité de la phosphatase alcaline dans les différents compartiments du chloroplaste.

(a) activité exprimée par mg de protéines (b) activité spécifique exprimée comme un pourcentage par rapport à une phosphatase alcaline standard.

1. 8 DISCUSSION / CONCLUSION

Pour étudier la formation des ponts disulfures dans le chloroplaste, nous avons généré des tabacs transplastomiques exprimant la phosphatase alcaline, une enzyme marqueur de la formation des ponts disulfures. Deux types de plantes ont été caractérisées : des plantes transformées avec la séquence de l'enzyme bactérienne mature (PhoA-S) ou avec la séquence de l'enzyme liée au peptide signal bactérien (PhoA-L). Dans les deux cas, l'accumulation de la protéine a été facilement détectée par séparation des extraits protéiques issus de ces plantes transformées en gel mono ou bidimensionnel. En conditions natives, PhoA-S et PhoA-L apparaissent sous forme de dimères. En conditions dénaturantes, le monomère PhoA est détecté à la même taille pour PhoA-L et PhoA-S. Cependant, le séquençage N-terminal de PhoA-L montre que le peptide d'adressage n'a pas été entièrement clivé puisque six résidus sont toujours présents. Des modifications post-traductionnelles qui influencent le point isoélectrique de la protéine apparaissent dans les deux cas sous la forme de spots multiples après séparation sur gel 2D. Un profil similaire a également été observé chez les bactéries, bien qu'il soit nettement moins marqué que chez les chloroplastes. Nous ne connaissons pas encore l'origine de ces variations. De nombreuses réactions ou modifications chimiques peuvent créer ces changements de point isoélectrique, comme des phosphorylations de la protéine, des déaminations ou encore des carbonylations (Gianazza, 1995). Pour d'autres enzymes exprimées dans les chloroplastes de tabacs comme pour la p-hydroxyphenylpyruvate

dioxygenase (hppd), une seule forme (un seul spot) de la protéine recombinante a été détectée sur gel bidimensionnel (Dufourmantel *et al.*, 2007). Cela indique que les modifications observées sont spécifiques de PhoA.

La séparation des chloroplastes isolés en fractions du stroma et du lumen nous a montré que PhoA-L était présente dans ces deux compartiments. Cela indique que le peptide bactérien de type SEC, qui adresse la protéine au périplasme chez les bactéries, est fonctionnel pour la sécrétion des protéines au travers des membranes du thylacoïde. Cette possibilité d'utiliser un peptide Sec bactérien pour le transport d'une protéine exogène au lumen n'avait encore jamais été mise en évidence *in planta*. Cette nouvelle technologie a fait l'objet d'un dépôt de brevet (EP06356090.8 Transplastomic Plants Expressing Lumen-Targeted Protein). L'inverse en revanche avait été démontré, c'est-à-dire que des peptides d'adressage chloroplastique vers les thylacoïdes sont fonctionnels chez les bactéries (Henry *et al.*, 1997). La phosphatase alcaline bactérienne est jusqu'à présent le premier exemple de protéine recombinante exprimée dans les chloroplastes dont la présence dans le lumen ait été démontrée. Il existe deux autres exemples dans la littérature de gènes bactériens codant des protéines sécrétées qui ont été exprimées dans les chloroplastes de tabac. Dans le premier cas, une xylanase thermostable de *Bacillus subtilis* est accumulée à un haut niveau dans les chloroplastes de tabacs transformés. Cette enzyme a été détectée en gel SDS-PAGE comme une bande unique à une masse moléculaire suggérant le clivage du peptide d'adressage. Cependant, la localisation de cette protéine au sein du chloroplaste n'a pas été examinée (Leelavathi *et al.*, 2003). Plus récemment, une lipoprotéine recombinante de *Borrelia burgdorferi* a été caractérisée dans des tabacs transplastomiques, et il a été montré que le peptide signal n'était pas clivé (Glenz *et al.*, 2006).

Deux possibilités peuvent expliquer la présence de PhoA-L à un niveau significatif dans le stroma des chloroplastes de tabacs transformés.

- ✓ Ce pool de PhoA-L peut correspondre à des molécules clivées au niveau de leur séquence N-terminale mais qui n'ont pas été sécrétées ;
- ✓ La séquence N-terminale de PhoA-L est clivée, la protéine est sécrétée dans le lumen des thylacoïdes mais redirigée vers le stroma du chloroplaste. Bien que cette possibilité apparaisse complexe, elle a récemment été mise en évidence dans le cas de deux protéines sécrétées par le système de transport TAT (Di Cola et Robinson, 2005).

Notre étude a également démontré que la phosphatase dépourvue de son peptide d'adressage bactérien était exprimée à un fort niveau dans le stroma et était active mais que son activité spécifique était faible. Cela indique que contrairement au cytosol réducteur des bactéries, les conditions redox de ce compartiment cellulaire permettent dans une certaine mesure une formation correcte des ponts disulfures nécessaires à l'activité de PhoA. Ces données complètent des travaux précédents décrivant l'expression correcte d'autres protéines recombinantes contenant des ponts disulfures dans le stroma de chloroplastes transformés (Staub *et al.*, 2000 ; Daniell *et al.*, 2001b, 2004 ; Fernandez-San Millan *et al.*, 2003 ; Mayfield *et al.*, 2003).

De plus, le lumen est apparu au cours de nos travaux comme un compartiment adapté pour l'accumulation de protéines recombinantes possédant des ponts disulfures. Chez les bactéries, le peptide signal adresse la phosphatase alcaline aux voies de sécrétion de type SEC (Robinson *et al.*, 2001). Le fait que dans le chloroplaste, le signal d'adressage ne soit pas clivé à la même position que chez *E. coli* indique une différence entre ces deux systèmes procaryotiques pour la sécrétion de PhoA. Il serait intéressant de déterminer si la sécrétion de la protéine utilise réellement, comme attendu, le système d'adressage SEC de type bactérien. Alternativement, d'autres voies de sécrétion comme la voie TAT (Derman *et al.*, 1993 ; Di Cola et Robinson, 2005) pourraient transporter une PhoA correctement repliée (Settles et Martienssen, 1998 ; Gutensohn *et al.*, 2006). Des études parallèles rapportent que des maïs mutés pour le gène *secA*, donc déficients en voie de sécrétion SEC, peuvent tout de même exporter une plastocyanine ou un cytochrome f à travers la membrane des thylacoïdes, bien qu'ils empruntent normalement la voie SEC (Robinson *et al.*, 2001).

Nous avons donc récemment entrepris de créer un vecteur de transformation chloroplastique possédant la séquence codant pour la phosphatase alcaline liée à un peptide d'adressage de type TAT bactérien. Cela pourra répondre à ces questions concernant l'adressage des protéines au lumen des thylacoïdes du chloroplaste. Les transformations sont actuellement en cours.

Enfin, en comparant les profils d'expression et d'activité de la phosphatase recombinante obtenus chez les bactéries ou chez le chloroplaste, il s'est avéré que les propriétés du stroma sont similaires de celles trouvées dans le compartiment cytosolique des bactéries Origami B qui favorise la formation de ponts disulfures (DeLisa *et al.*, 2003 ; Jack *et al.*, 2004). Il est possible que des chaperonnes impliquées dans le repliement des protéines participent activement à l'assemblage correct de la phosphatase alcaline recombinante dans le

stroma. La présence de ces enzymes, telles que les protéines disulfides isomérases eucaryotiques, pourrait être importante pour le repliement des protéines (Levitan *et al.*, 2005 ; Alergand *et al.*, 2006). On peut aussi supposer que les thiorédoxines du stroma, pour des raisons stériques et / ou de spécificité, ne soient pas capables de reconnaître une phosphatase alcaline bactérienne et donc de réduire les ponts disulfures de cette enzyme. Dans tous les cas, le stroma du chloroplaste permet la formation de ponts disulfures et apparaît plus oxydant que le cytoplasme d'une bactérie normale.

Pour étudier plus précisément l'état redox du stroma et en même temps le comparer à celui du lumen, des techniques couramment utilisées de marquage des groupements thiols libres des protéines, représentatifs d'un état réduit, ont été testées. Ainsi, le monobromobimane (mBBBr), un composé fluorescent (Balmer *et al.*, 2006), ou encore le PEG-maléimide, ont été utilisés. Ces tests n'ont cependant pas donné de résultats exploitables dans nos conditions.

En conclusion, nos travaux montrent que le lumen des thylacoïdes serait plus approprié que le stroma pour l'expression de protéines qui nécessitent des ponts disulfures : en effet, PhoA-L a une activité spécifique plus forte que PhoA-S dans les chloroplastes transformés. Les propriétés du lumen des thylacoïdes semblent similaires de celles du périplasme bactérien. Ces conditions favorables sont probablement le résultat d'un potentiel redox plus oxydant dans le lumen (Buchanan et Luan, 2005) et/ou de la présence de protéines spécifiques présentes dans le lumen aidant au repliement des protéines. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que certaines enzymes du lumen requièrent la formation de ponts disulfures pour une activité optimale (Gopalan *et al.*, 2004 ; Shapiguzov *et al.*, 2006). Au contraire, un certain nombre de protéines du stroma, en particulier lorsqu'elles sont liées à la photosynthèse, sont activées quand elles sont réduites par les thiorédoxines (Jacquot *et al.*, 2002).

Les résultats présents, bien que basés uniquement sur une seule protéine modèle, ont permis de mettre en évidence les capacités du plaste, et notamment du lumen des thylacoïdes, pour l'expression de protéines contenant des ponts disulfures. L'efficacité d'un peptide d'adressage de type bactérien pour l'export de protéines recombinantes vers le lumen des thylacoïdes a également été évaluée. Ces résultats mettent en évidence la possibilité d'utiliser le chloroplaste comme système d'expression pour des protéines possédant des ponts disulfures (majeure partie des protéines d'intérêt pharmaceutique par exemple).

De nombreux paramètres peuvent cependant influencer sur l'état redox du chloroplaste et faire varier l'état d'oxydation des protéines (différences d'intensité lumineuse, régulation jour/nuit, stress oxydant...). Il serait donc très intéressant d'analyser l'expression et l'activité de la protéine recombinante directement *in vivo* et d'étudier à travers ces analyses l'état redox du lumen et du stroma. Dans cette optique, nous avons testé un composé qui émet une fluorescence stable lorsqu'il est métabolisé par une phosphatase alcaline active (Jenfluor™ AP immunohistochemistry kit). Ainsi, il aurait été possible de visualiser *in vivo* l'activité de la protéine et d'étudier l'état redox dans les compartiments plastidiaux. Malheureusement, aucune observation n'a pu être effectuée car la chlorophylle présente dans les tissus à analyser interfère avec la fluorescence que nous devrions observer.

Pour analyser l'état redox du chloroplaste directement *in vivo*, une autre protéine modèle a alors été utilisée. Notre choix s'est tourné vers une GFP dont la fluorescence varie en fonction de l'état d'oxydation du compartiment dans lequel elle se trouve. Son activité pourrait être observée directement *in vivo* et nous permettre de faire bilan de l'état redox du chloroplaste.

2. UN AUTRE MODELE D'ETUDE DE L'ETAT REDOX CELLULAIRE, LA GFP REDOX

2.1 LA GFP REDOX, UNE GFP SENSIBLE AUX VARIATIONS REDOX DE L'ENVIRONNEMENT

Afin de compléter les résultats obtenus lors de l'analyse des chloroplastes de tabacs exprimant la phosphatase alcaline, une deuxième protéine recombinante a été choisie : une GFP sensible aux variations redox de l'environnement. Cette protéine permet une visualisation en temps réel de l'état du potentiel redox du compartiment dans lequel elle est localisée (Hanson *et al.*, 2004). Elle a été utilisée lors d'études antérieures pour mettre en évidence les changements d'état redox des mitochondries et du cytoplasme des cellules de mammifères (Dooley *et al.*, 2004) ou d'*A. thaliana* (Jiang *et al.*, 2006). Ces études ont été réalisées *in vivo* en observant les tissus par microscopie confocale. Selon une suggestion du Dr Michel Droux, l'utilisation de cette protéine marqueur nous permettrait ainsi d'obtenir plus d'informations sur la dynamique de l'état redox du stroma et du lumen des thylacoïdes du plaste.

La GFP, identifiée à partir d'extraits protéiques de la méduse *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962), est une petite protéine stable et soluble de 27 kDa. Elle est utilisée comme un indicateur de l'expression de gènes et de la localisation de protéines. Elle émet une lumière verte à la suite de l'excitation de son chromophore composé d'une séquence Ser-Tyr-Gly positionnée proche de la fin de la séquence de la protéine. L'excitation de la GFP peut être effectuée sous exposition à la lumière UV permettant une détection simple de son activité ne nécessitant pas l'utilisation de substrat spécifique (Feilmeier *et al.*, 2000). Elle possède deux pics d'excitation à ~ 400 et 490 nm, et le ratio de l'émission de fluorescence pour ces deux pics dépend de la structure de la molécule et des conditions externes (Björnberg *et al.*, 2006 ; Cannon et Remington 2005). Cette caractéristique a permis la construction d'indicateurs de concentration intracellulaire d'H⁺ ou de Ca²⁺ par exemple, qui peuvent être adressés à différents compartiments subcellulaires (Hanson *et al.*, 2002, Nagai *et al.*, 2001; Jayaramam *et al.*, 2000). C'est sur ce principe que des sondes GFP, sensibles aux variations redox, ont pu être développées, en introduisant dans la protéine un groupement pouvant être sous forme réduite ou oxydée et affectant les propriétés de fluorescence de la protéine (Ostergaard *et al.*, 2001 ; Hanson *et al.*, 2004). Pour notre étude, la protéine marqueur utilisée

est une GFP sensible aux variations redox qui a déjà été utilisée dans les plantes, la roGFP1 (Jiang *et al.*, 2006). Dans ce cas une paire de cystéines est introduite sur deux brins voisins des feuilletts β de la protéine, proches de son chromophore, permettant la formation de ponts disulfures (Figure II. 17). La formation des ponts disulfures entre ces cystéines favorise la protonation du chromophore et augmente l'émission de la fluorescence au pic d'excitation à 400 nm, au détriment du pic d'excitation à 490 nm. La réduction des ponts disulfures aura un effet inverse. Le ratio de fluorescence émise indique alors la mesure de l'oxydation de la roGFP et donc du potentiel redox du compartiment étudié (Hanson *et al.*, 2004 ; Cannon et Remington 2005 ; Björnberg *et al.*, 2006).

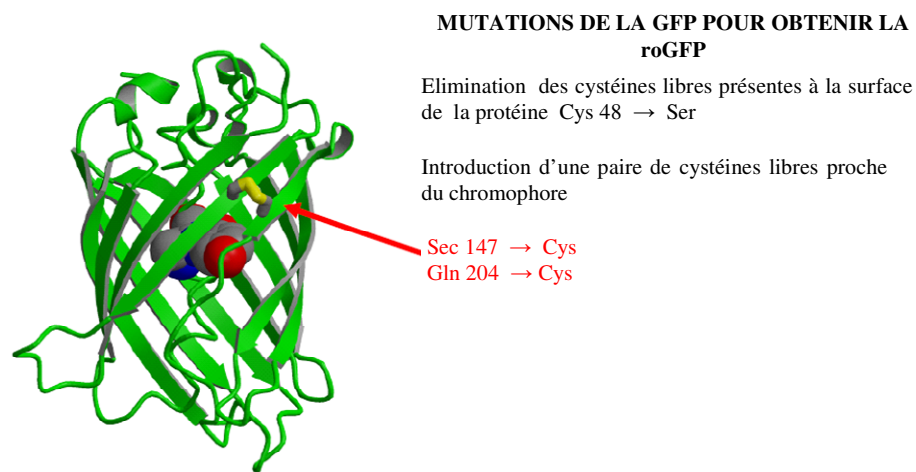


Figure II. 17 : Structure de la roGFP, (d'après Kadokura et Beckwith, 2002)

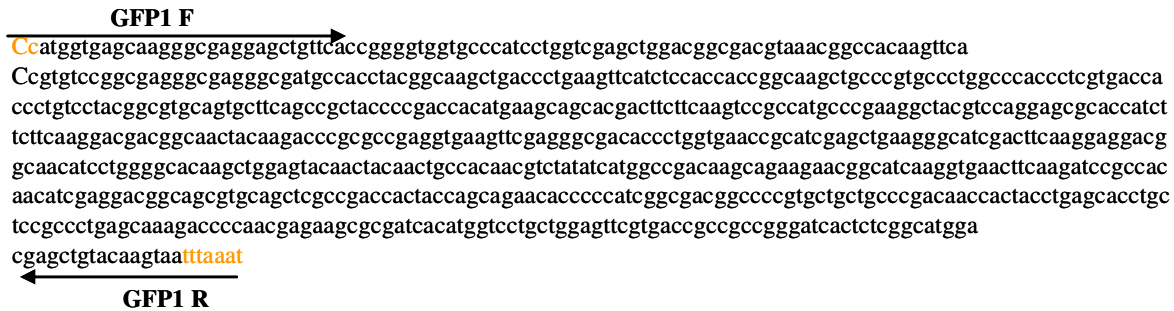
Nous avons utilisé cet outil pour poursuivre nos études. A cette fin, le gène codant cette protéine marqueur de l'état redox a été fusionné ou non à différentes séquences d'adressage bactériennes qui permettront un adressage de la protéine au périplasma des bactéries ou au lumen des thylacoïdes du plaste (de la même façon que pour PhoA). Ces travaux permettront en théorie d'avoir accès aux variations *in vivo* d'état d'oxydation du stroma et du lumen des thylacoïdes du plaste.

2.2 CONSTRUCTION DES VECTEURS POSSEDANT LE GENE DE LA roGFP

Un plasmide contenant le gène de la roGFP nous a été envoyé de l'université de Californie par Lewis Feldman (pCambia ; Jiang *et al.*, 2006). Nous avons amplifié directement la séquence du gène codant la roGFP à partir de différentes amorces introduisant

des séquences complémentaires qui permettront la fusion avec les peptides d'adressage bactériens par « overlap-PCR ». Plusieurs couples d'amorces ont été utilisés pour amplifier (i) la séquence de la roGFP uniquement, (ii) la séquence codant la roGFP liée à un peptide d'adressage de type TAT, ou encore (iii) la séquence de la protéine liée à un peptide d'adressage de type SEC (Tableau IV. 1, Figure II. 18).

Séquence roGFP



Séquence TATroGFP



Séquence SECroGFP

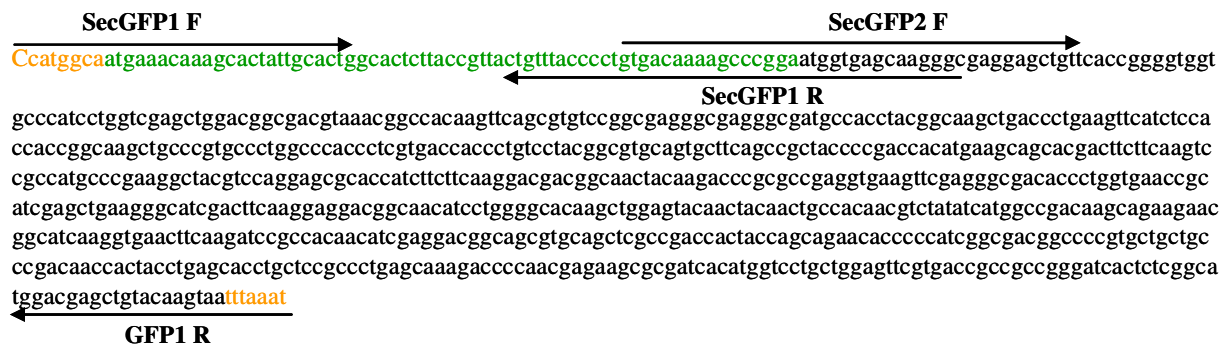


Figure II. 18 : Séquences roGFP, TATroGFP et SECroGFP après amplification PCR et overlap-PCR.

En orange, séquence ajoutée pour les sites de clivages *NcoI* en 5' et *SwaI* en 3'; en noir, séquence de la roGFP; en rouge séquence du peptide TAT et en vert, celle du peptide SEC.

Le peptide de type TAT utilisé pour l'adressage de la roGFP au lumen du chloroplaste est celui de la triméthylamine N-oxide (TMAO) réductase (TorA). C'est un peptide qui a déjà été employé pour l'exportation de la GFP dans le périplasme bactérien (Santini *et al.*, 2001 ; Thomas *et al.*, 2001). Le peptide signal de type SEC choisi est celui de la phosphatase alcaline (peptide bactérien de type SEC). Les trois séquences (*roGFP*, *TatroGFP* ou *SecroGFP*) ont été clonées dans des vecteurs destinés à la transformation chloroplastique, également fonctionnels chez les bactéries. Les constructions n'ont pas été bâties sur le même schéma que pour la phosphatase alcaline (Figure II. 19). Les cassettes d'expression que nous avons réalisées possèdent le gène marqueur *aadA*, sous le contrôle du promoteur *Prrn* complet, promoteur constitutif fort de l'opéron des ARN ribosomiaux (16S) de maïs (Kumar et Daniell, 2004). Cette version du promoteur contient les sites de fixation pour les deux polymérases plastidiales de type PEP et NEP. Elle permet donc la transcription de gènes recombinants à la fois dans les proplastides des cellules non photosynthétiques et dans les plastides différenciés de divers autres tissus. Ce choix du promoteur *Prrn* de maïs entraîne une diminution d'homologie de séquence des éléments régulateurs de l'expression introduits dans le plastome de tabac. Cela pourrait conférer une certaine stabilité au transgène en l'absence de sélection, en limitant les risques d'élimination de ce dernier par recombinaison homologue avec des séquences répétées directes endogènes du plastome de tabac (Reddy *et al.*, 2002).

Directement en tandem avec le gène *aadA*, nous avons inséré en amont des régions codantes une séquence RBS (G10L, ribosome binding site) fusionnée elle-même au gène d'intérêt (roGFP liée ou non à un peptide d'adressage). Cette séquence provient du bactériophage λ , et est décrite dans la littérature pour de nombreux travaux d'expression de protéines recombinantes chez les bactéries et les plastides (Olins et Rangwala, 1990 ; Levine *et al.*, 1995 ; Ye *et al.*, 2001). Il a été montré dans ces études que l'utilisation de ce site pouvait permettre une augmentation de l'accumulation de la protéine d'environ 40 fois chez les bactéries (Olins *et al.*, 1988) et d'environ 200 fois chez les plastides (Ye *et al.*, 2001). Les vecteurs obtenus (Figure II. 19) contiennent donc des dicistrons codant le gène de résistance *aadA* et le gène d'intérêt, encadrés par des séquences d'ADN plastidial permettant leur intégration par double recombinaison homologue au sein du plastome de tabac. Le promoteur *Prrn* pouvant être utilisé chez les bactéries, l'expression de la roGFP sera analysée chez ces organismes. Cela nous permettra de valider le choix de la roGFP comme protéine modèle, marqueur de l'état redox afin de pouvoir l'utiliser pour l'étude du plaste.

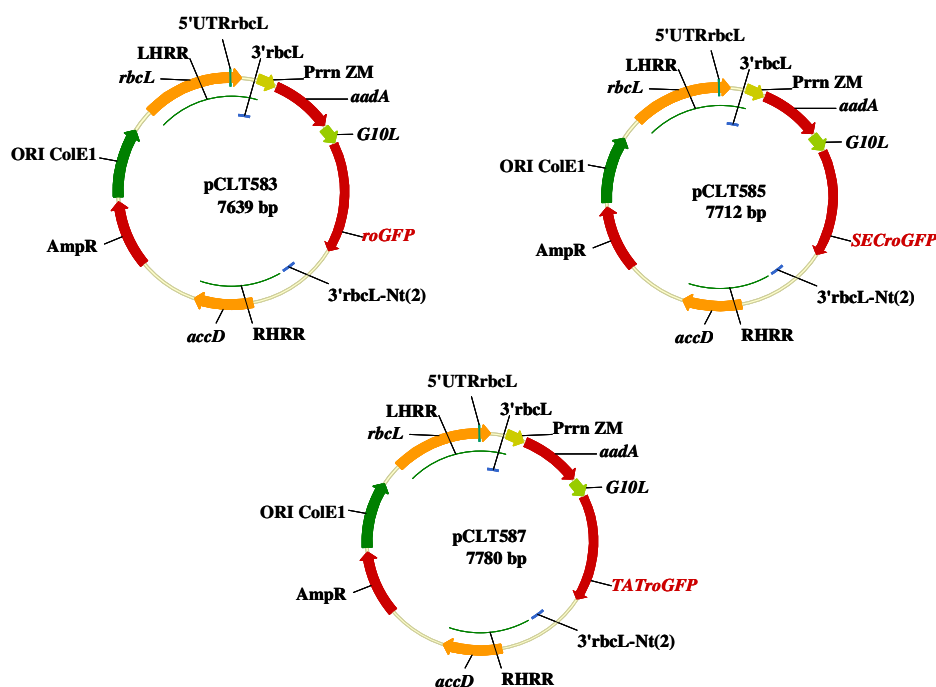


Figure II. 19 : Vecteurs d'expression de la roGFP

2.3 EXPRESSION DE LA roGFP DANS LES BACTERIES

2.3.1 Analyse de l'expression de la roGFP dans les souches bactériennes

Les vecteurs d'expression pCLT583, pCLT585, pCLT587 (Figure II. 19) ont été transférés dans les souches bactériennes BL21 et BL21 Origami. Des cultures de ces bactéries transformées ont été centrifugées et le culot bactérien repris dans un tampon d'extraction dénaturant avant d'être soniqué. Les extraits protéiques obtenus ont été analysés par électrophorèse en gel monodimensionnel et western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre la GFP (Figure II.20). Il apparaît clairement que les deux souches de bactéries transformées avec le vecteur pCLT583 expriment fortement la version cytosolique de la roGFP (Figure II. 20, 1 et 5).

L'accumulation de la protéine est nettement plus forte dans la souche BL21 mutée. Il est donc possible que cette accumulation soit influencée par la réduction du pont disulfure dans le cytoplasme de la souche BL21 ou son oxydation dans le cytoplasme de la souche BL21 *trx/gor*. Dans ce cas, la formation du pont disulfure dans le compartiment plus oxydé conduirait à une plus forte accumulation de la protéine.

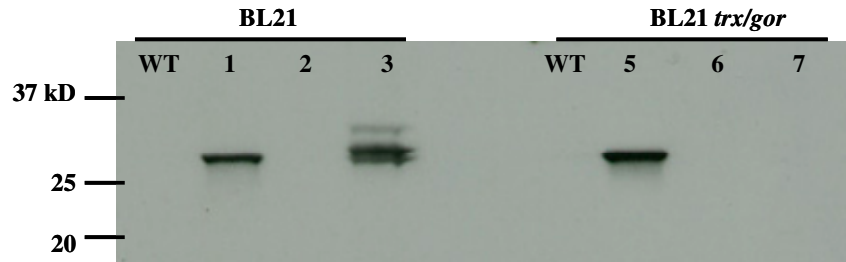


Figure II. 20 : Analyse western blot réalisée avec des protéines totales solubles extraites de bactéries BL21 et BL21 *trx/gor* transformées avec les vecteurs pCLT583 (1, 5), pCLT585 (2, 6) et pCLT587 (3, 5).

Dans les souches bactériennes transformées avec le vecteur pCLT585 (*SECroGFP*), l'expression de la protéine n'est pas détectée. Des résultats semblables ont déjà été décrits chez *E. coli* pour une GFP liée à un peptide signal de type SEC (Feilmeier *et al.*, 2000). La protéine ne pourrait pas être exportée par le système SEC (système qui n'exporte que des protéines mal repliées) et serait donc dégradée. La liaison avec un peptide d'adressage de type SEC entraînerait l'instabilité de la protéine et ainsi empêcherait son accumulation.

Pour les bactéries transformées avec le vecteur PCLT587 (TATroGFP) la protéine est détectée uniquement pour la souche BL21 sauvage. Le western blot montre plusieurs bandes. Ces différentes bandes pourraient correspondre à différentes formes de la roGFP : la roGFP liée au peptide signal (30 kDa) et la roGFP mature dont le peptide a été clivé (27kDa). De tels résultats ont été obtenus dans des études effectuées sur l'adressage de la GFP dans le périplasme des bactéries à l'aide d'un peptide de type TAT (Thomas *et al.*, 2001 ; Barrett *et al.*, 2003). Il est curieux d'observer qu'il n'y a aucune expression de la protéine dans la souche mutée transformée avec le vecteur pCLT 587 (TATroGFP). Le cytoplasme oxydant de cette souche devrait en effet favoriser la formation du pont disulfure introduit dans la séquence de la roGFP.

2.3.2 Activité *in vitro* de la roGFP dans les souches bactériennes

L'activité de la roGFP, représentée par sa fluorescence, a pu être facilement étudiée sur des extraits protéiques de bactéries sauvages ou transformées avec le vecteur pCLT583, dans le but de vérifier sa capacité à mettre en évidence les conditions redox de l'environnement. Les extractions ont été faites en conditions non réductrices afin de ne pas inhiber la formation du pont disulfure. La GFP redox possède deux pics d'excitation (~ 400 et 490 nm). Des spectres d'excitation de 350 à 450 nm (émission mesurée à 510 nm) ont été

réalisés directement sur ces extraits protéiques à l'aide d'un spectrofluoromètre. Celui-ci ne nous a cependant pas permis d'observer la fluorescence au second pic (une interférence se crée au niveau du pic d'excitation trop proche de la longueur d'onde d'émission).

La fluorescence émise est alors représentative de l'état d'oxydation de la protéine, indiquant l'état redox de l'environnement dans lequel elle se trouve. Ainsi, un environnement oxydant augmente la fluorescence émise au premier pic d'excitation au détriment du pic à 490 nm et inversement dans le cas d'un environnement réducteur (Hanson *et al.*, 2004 ; Cannon et Remington 2005). L'ajout d'agent réducteur (DTT) ou oxydant (H_2O_2) directement dans les extraits protéiques nous a permis de mettre en évidence des variations de fluorescence de la roGFP au niveau de son pic d'excitation à 400 nm (Figure II. 21).

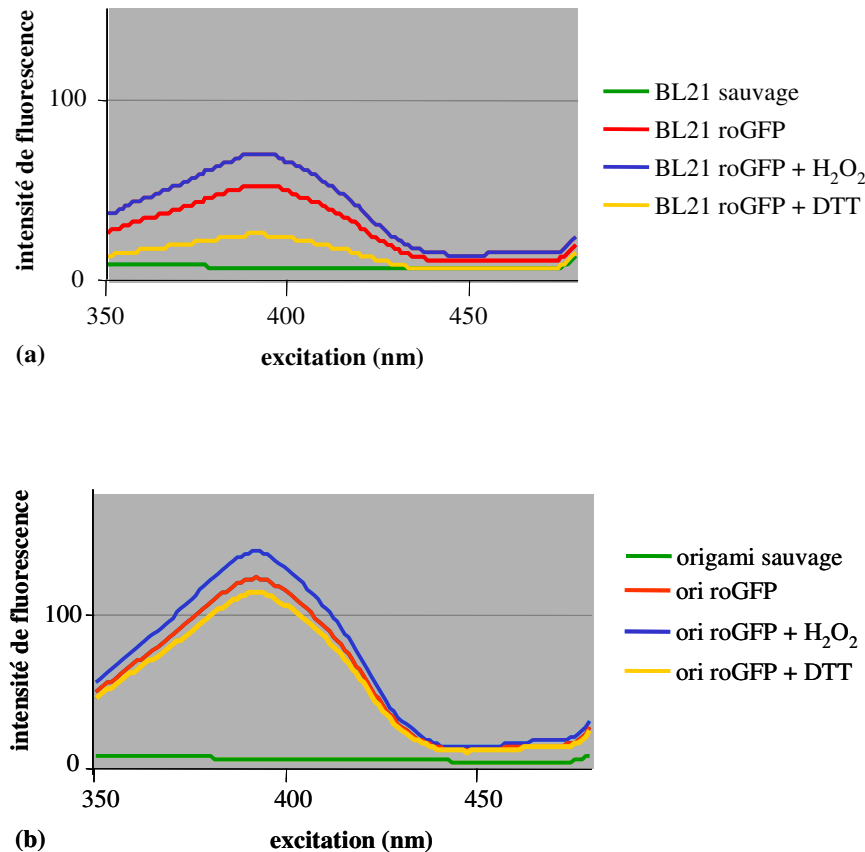


Figure II. 21 : Spectre d'excitation de la roGFP1 dans les extraits bactériens BL21 (a) et BL21 origami (b) transformés avec le vecteur pCLT583. Le graphique montre pour chaque transformation le spectre d'excitation initial, après ajout de 1 mM de DTT, ou après ajout de 1 mM d' H_2O_2 . λ : 510 nm.

L'étude du pic à 400 nm a permis de détecter des variations de fluorescence lors de l'ajout de DTT ou de peroxyde d'oxygène (H_2O_2). L' H_2O_2 rend le milieu environnant la

roGFP plus oxydant. Cela entraîne la formation du pont disulfure, un changement de l'état du chromophore et une émission de fluorescence plus élevée. L'effet inverse peut être obtenu avec l'ajout d'un agent réducteur tel que le DTT. Le signal de fluorescence des extraits de bactéries Origami, est plus intense que celui des bactéries BL21, en accord avec les différences de niveaux d'expression observés précédemment. Cette première analyse valide l'utilisation de la protéine comme un marqueur des changements redox de son environnement.

2.3.3 Activité *in vivo* de la roGFP dans les souches bactériennes

L'activité de la roGFP a par la suite été observée *in vivo* chez les bactéries BL21. Les bactéries transformées avec les vecteurs pCLT583 (roGFP), pCLT585 (SECroGFP) et pCLT587 (TATroGFP) ont été directement observées au microscope confocal (Figure II. 22). Les images de microscopie corroborent les résultats du western blot. On trouve une forte émission de fluorescence pour la protéine roGFP localisée dans le cytoplasme des bactéries BL21 non mutées (Figure II. 22, d).

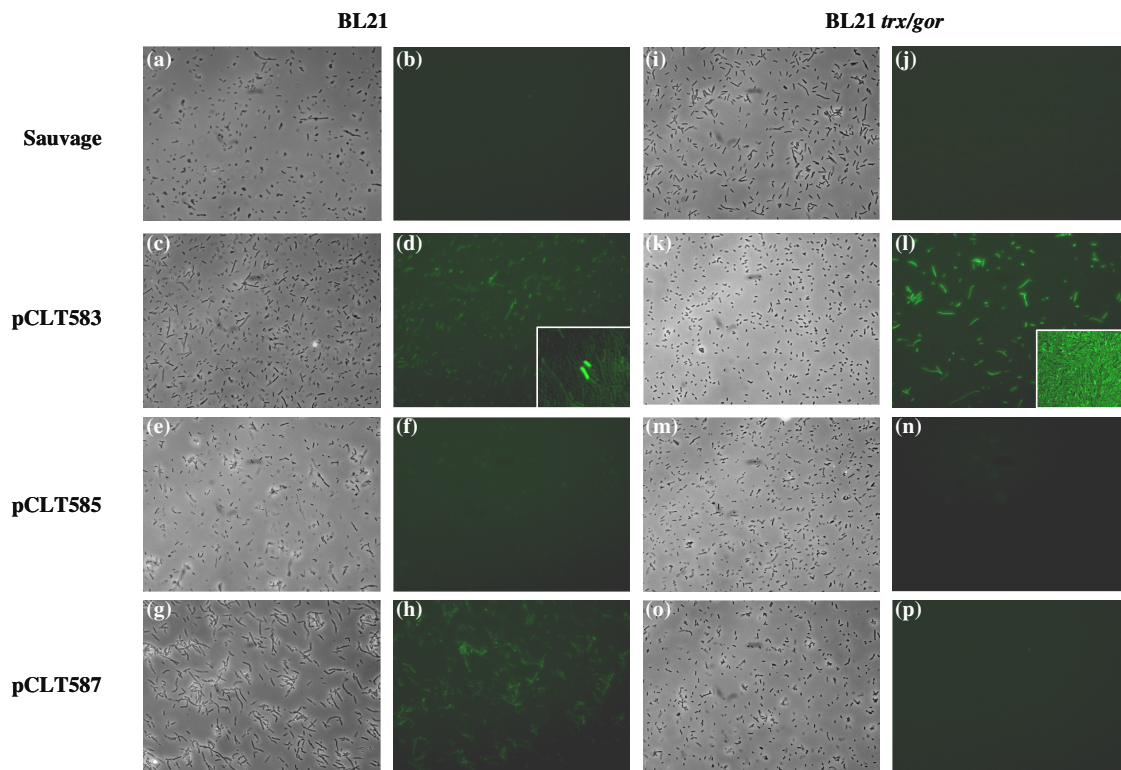


Figure II. 22 : Visualisation de la roGFP dans les bactéries transformées.

Des cultures de bactéries sauvages (a,b pour BL21; i,j pour BL21 *trx/gor*) et de bactéries transformées avec le vecteur pCLT583 codant la roGFP (c,d pour BL21; k,l pour BL21 *trx/gor*), avec le vecteur pCLT585 codant la SECroGFP (e,f pour BL21; m,n pour BL21 *trx/gor*) ou avec le vecteur pCLT587 codant la TATroGFP (g,h pour BL21; o,p pour BL21 *trx/gor*) ont été directement observées au microscope (400nm) à fluorescence. Les profils b,d,f,h,j,l,n et p correspondent aux images réalisées sous lumière UV; les profils a,c,e,g,i,k,m et o représentent les contrastes de ces images réalisées sous lumière normale.

La fluorescence émise par les bactéries BL21 *trx/gor* (Figure II. 22, l) est encore plus forte. Aucune fluorescence n'est observée dans les deux souches de bactéries transformées avec le vecteur pCLT585 (roGFP fusionnée au peptide de type Sec, figure II. 22 : i et n), en accord avec l'absence d'accumulation de la protéine mise en évidence par le western blot. De la même façon, pour la souche BL21 mutée transformée avec le vecteur pCLT587 (TATroGFP) on ne distingue pas de fluorescence (Figure II. 22 p).

Enfin la protéine adressée au périplasma des bactéries BL21 sauvages par le peptide TAT est active puisqu'elle émet une fluorescence sensiblement équivalente à celle émise par son homologue dans le compartiment cytoplasmique (Figure II. 22 h). Les résultats sont intéressants en ce qui concerne la TATroGFP (vecteur pCLT587) car elle est exprimée et active uniquement dans des bactéries BL21 non mutées. On devrait cependant s'attendre à une expression de la protéine et une fluorescence plus forte dans la souche mutée de la même façon que cela a été démontré pour la roGFP dépourvue de peptide d'adressage. Aucune explication simple n'est disponible, mais il est probable que la malformation du pont disulfure au niveau du cytoplasme de la bactérie BL21 *trx/gor* en soit responsable. Une hypothèse serait que le repliement du pont disulfure, faisant varier le chromophore de la GFP positionné en fin de séquence de la protéine, influe sur la séquence du peptide TAT. Ce dernier ne serait donc plus reconnu par la machinerie de sécrétion et la protéine serait alors dégradée. Une autre hypothèse serait que la protéine soit toxique dans le périplasma et donc soit dégradée lors de son arrivée dans ce compartiment.

Cette étude de la GFP redox dans les bactéries, préliminaire à l'analyse de la protéine au sein du compartiment plastidial, a permis de s'assurer que la protéine exprimée était active (cas de la roGFP et de la TATroGFP pour la souche BL21). Les résultats obtenus lors de son expression au niveau de deux cytoplasmes bactériens ayant des niveaux d'oxydation différents ont montré que son activité augmentait parallèlement à l'état d'oxydation du compartiment dans lequel elle est localisée. Son utilisation en tant que marqueur de l'état redox des compartiments du plaste est donc encourageante. Cependant, des difficultés ont été rencontrées lors de son adressage au périplasma, notamment à l'aide du peptide de type TAT (car elle est correctement repliée dans le cytosol) et chez les bactéries BL21 mutées. Ces difficultés pourraient freiner la poursuite de notre étude au niveau des chloroplastes de tabacs transformés. Il est possible que le transport de la protéine au lumen soit altéré de la même façon. Cependant, le système TAT découvert chez les plastes, avant d'être étudié chez les

bactéries, semblerait fonctionner différemment de ce qui est décrit chez les bactéries où il ne permet pas d'exporter plus de 50% des protéines (Creighton *et al.*, 1995 ; Berks 1996 ; Sargent *et al.*, 1998).

2.4 TRANSFORMATION CHLOROPLASTIQUE ET ANALYSE DES EVENEMENTS TRANSPLASTOMIQUES

La transformation des tabacs a été réalisée par biolistique avec les vecteurs pCLT583, pCLT585 et pCLT587, visant à générer des plantes transplastomiques pour les gènes *roGFP*, *SECroGFP* et *TATroGFP*, respectivement. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu nutritif en présence de spectinomycine, dans des conditions identiques à celles utilisées précédemment pour l'introduction du gène de la phosphatase alcaline dans le plastome de tabac.

2.4.1 Détection de la roGFP dans les feuilles de tabac transplastomique

Actuellement, sept événements transplastomiques indépendants ont été obtenus après bombardement du vecteur pCLT587 (*TATroGFP*). Après des résultats positifs obtenus par PCR démontrant la présence du transgène au niveau du plastome pour ces sept événements, une analyse par western blot a été réalisée en conditions réductrices et dénaturantes, avec les protéines totales solubles de chacun (Figure II. 23).

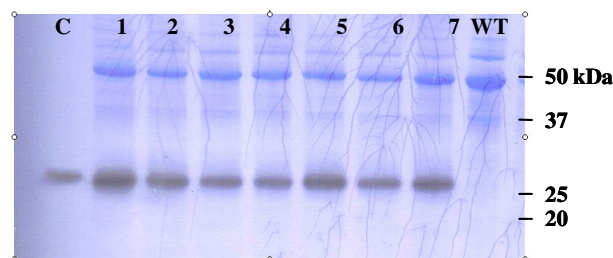


Figure II. 23: Analyses western blot réalisées avec des extraits protéiques de feuilles de tabacs transformés avec le vecteur pCLT 587.

(c) GFP commerciale témoin, (WT) sauvage, (1-7) plantes transformées. Le film révélé après western blot est superposé sur la membrane colorée au bleu.

Il apparaît clairement que les sept événements issus des transformations avec le vecteur pCLT587, expriment fortement la *TATroGFP*. Une bande de 27 kDa est détectée sur

l'immunoblot correspondant à la taille de la GFP dépourvue du peptide signal, taille identique à celle de la GFP commerciale utilisée comme contrôle. Il semblerait donc que la protéine adressée au lumen *via* la machinerie de sécrétion TAT soit exprimée, sans doute dans ce compartiment, et que le clivage du peptide ait été réalisé. Pour confirmer cette localisation de la protéine, une analyse des fractions stromales et lumenales purifiées à partir de chloroplastes intacts extraits directement de feuilles de tabac transplastomiques sera effectuée. La présence et la fluorescence de la protéine dans ces différents compartiments pourront être observées.

Pour les deux autres transformations, avec les vecteurs pCLT583 (*roGFP*) et pCLT585 (*SECroGFP*), les cals sont apparus plus tardivement. Des plantules commencent à se développer : six pour la transformation avec le gène *roGFP* et trois pour la transformation avec le gène *SECroGFP*. Les mêmes analyses que pour les plantes transformées avec le vecteur pCLT587 seront effectuées dès que les plantules seront suffisamment grandes.

2.4.2 Activité *in vivo* de la roGFP dans les tabacs transplastomiques

Les tissus des plantes transplastomiques exprimant la roGFP au niveau de leurs chloroplastes ont été examinés au microscope sous lumière UV. Pour les lignées possédant le vecteur pCLT587 (TATroGFP), une fluorescence verte (absente dans les plantes non transformées) a pu être détectée. Indépendamment du tissu analysé, le profil de fluorescence observé est cependant très faible car diminué par la présence de chlorophylle. Les analyses au microscope confocal n'ont permis dans nos conditions aucune détection de la GFP. Pour mener à bien cette partie des travaux, il serait donc nécessaire d'étudier les tissus non verts afin de ne pas être gênés par la présence de la chlorophylle. Pour ce faire, les graines issues des premières générations de plantes transformées avec le vecteur pCLT587 ont été semées sur un milieu nutritif supplémenté en dikétonitrile (DKN) dérivant de l'isoxaflutole. C'est un herbicide systémique qui n'a aucun effet *in vitro* sur la croissance cellulaire et n'entraîne qu'un blanchiment des tissus diminuant la présence de chlorophylle. D'autre part, une collaboration avec l'équipe de L. Feldman de l'université de Californie, nous permettra de profiter de leurs techniques et outils d'analyse microscopique déjà bien développés sur des plantes (*A. thaliana*) transformées avec la même GFP (Jiang *et al.*, 2006).

2.5 DISCUSSION / CONCLUSION

Dans le but de pouvoir analyser l'état redox du chloroplaste directement *in vivo*, une GFP dont la fluorescence varie en fonction de l'état d'oxydation du compartiment dans lequel elle se trouve a été utilisée : la roGFP. Dans un premier temps, l'emploi de la roGFP comme protéine marqueur des variations redox a été validé directement dans les bactéries. L'expression et la fluorescence de la protéine dans différentes souches bactériennes, à savoir BL21 et BL21 *trx/gor*, ont été analysées. La caractérisation de la protéine SECroGFP n'a pas été possible, son accumulation et sa fluorescence n'étant pas détectées. Pour les deux autres cas, roGFP et TATroGFP, une forte expression ainsi qu'une forte activité ont pu être facilement détectées dans la souche BL21. Des variations du niveau de fluorescence ont pu être observées lors de l'ajout d'agents réducteur ou oxydant dans les extraits protéiques, indiquant la fonctionnalité de la protéine en tant que marqueur. Ces résultats ont été vérifiés *via* les mêmes analyses effectuées dans une souche de bactéries BL21 mutées, possédant un cytoplasme plus oxydant que celui des bactéries de souche non mutée. Les variations d'oxydation induites par l'utilisation de souches différentes entraînent des variations du niveau d'expression et de fluorescence de la protéine. Ainsi, pour la roGFP localisée dans le cytoplasme (roGFP, pCLT583) une forte augmentation de l'accumulation de la protéine, et de sa fluorescence, ont pu être observées dans la souche BL21 *trx/gor*. A l'inverse, pour la protéine TATroGFP (pCLT587), adressée au périplasme bactérien, aucune expression, ni aucune trace de fluorescence, n'a pu être détectée. Il se pourrait donc que nous rencontrions des problèmes quant à l'expression de la protéine dans le lumen des thylacoïdes, d'après le parallèle établi dans la première partie de cette thèse, entre les compartiments des bactéries Origami et du chloroplaste, à savoir le cytoplasme et le stroma ou encore le périplasme et le lumen, du plaste. Des lignées de plantes transplastomiques contenant le gène de la roGFP fusionné à une séquence d'adressage de type TAT ont été générées par bombardement. L'analyse par western blot effectuée à partir d'extraits protéiques de feuilles de ces lignées transplastomiques a permis de détecter une forte accumulation de la protéine, contrairement à ce que l'on aurait pu attendre d'après les résultats obtenus chez les bactéries. Il faudra donc vérifier la localisation de la protéine ainsi que son activité au sein du chloroplaste. Le système TAT utilisé chez le plaste pourrait fonctionner différemment de celui des bactéries. Il est également possible que la protéine soit reconnue par un autre système de transport propre à cet organelle. D'autres lignées possédant les gènes codant la protéine marqueur fusionnés ou non à une séquence d'adressage de type SEC sont actuellement en cours de développement.

L'obtention de ces différentes plantes transplastomiques et l'utilisation de la roGFP codée par les différents vecteurs d'expression chloroplastique (pCLT583, pCLT585 et pCLT587) directement dans le stroma et le lumen des thylacoïdes permettront de préciser l'état redox et de suivre *in vivo* les variations de potentiel redox dans ces deux compartiments du chloroplaste. Cela pourra renforcer nos connaissances sur les propriétés du lumen quant à la formation des ponts disulfures.

3. OPTIMISATION DU REPLIEMENT DES PONTS DISULFURES

Parallèlement aux travaux effectués sur la surexpression de protéines modèles dans les chloroplastes, nous avons anticipé sur le fait que ces protéines recombinantes puissent nécessiter pour leur bon repliement des modifications post-traductionnelles qui pourraient faire défaut dans les chloroplastes, système d'expression de type bactérien. La formation des ponts disulfures notamment, est indispensable pour la stabilité et l'activité de nombreuses protéines. Pour pallier une absence de catalyseur de ce mécanisme au sein du chloroplaste, nous avons tenté de co-exprimer dans des plantes transplastomiques produisant des protéines recombinantes à ponts disulfures, des enzymes que l'on sait responsables de la formation des ponts disulfures chez les bactéries.

Les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse ont montré que l'activité spécifique de la phosphatase alcaline recombinante, possédant des ponts disulfures dans sa structure native, était plus faible lorsque la protéine était localisée dans le stroma (PhoA-S) plutôt que dans le lumen (PhoA-L). Cela indiquant *a posteriori* que le processus de formation des ponts disulfures n'est effectivement pas optimal dans le stroma. Ces travaux sont d'autant plus importants que la plupart des protéines d'intérêt sont généralement exprimées directement dans le stroma des chloroplastes. Ainsi, au cours de différentes études, Bayer CS a produit des tabacs modifiés au niveau de leurs chloroplastes, pour l'expression dans le stroma de protéines porteuses de ponts disulfures, avec plus ou moins de succès concernant leur niveau d'accumulation. Par exemple, l'héliomycine, un petit peptide lytique qui peut s'intégrer dans la membrane cytoplasmique et créer une porosité létale pour de nombreux microorganismes fongiques, voire même bactériens, possède une activité strictement dépendante du bon repliement de ses trois ponts disulfures (Lamberty *et al.*, 2001). La présence du transgène codant ce peptide antimicrobien, ainsi que sa localisation transplastomique ont pu être démontrées, mais l'expression de la protéine dans les végétaux n'a pas été détectée. L'hypothèse a été émise que le peptide serait rapidement dégradé en raison d'une mauvaise conformation des ponts disulfures. D'autres protéines riches en ponts disulfures, telles que l'aprotinine, un inhibiteur de protéases, ou encore des anticorps complets (IgG), ont été produites dans les chloroplastes de tabacs, à des niveaux variables, parfois très faibles. Afin de déterminer s'il est possible d'intervenir sur la formation des ponts disulfures de ces protéines recombinantes au sein du compartiment plastidial et ainsi d'augmenter leur

accumulation, des enzymes responsables du repliement des ponts disulfures dans le périplasma bactérien, ont été surexprimées dans les tabacs déjà transformés au niveau de leurs chloroplastes avec les gènes codant ces protéines.

3.1 CHOIX DES PROTEINES DSBA ET DSBC

Les ponts disulfures sont des liaisons covalentes qui apparaissent comme le résultat d'un processus oxydatif liant deux cystéines. Cette liaison est catalysée par des protéines disulfures oxydoréductases ou isomérases, trouvées dans toutes les cellules vivantes. Un grand nombre de ces protéines appartiennent à la famille des thiorédoxines qui sont définies par un site actif Cys-X-X-Cys (Gelhay *et al.*, 2005).

Chez les procaryotes, la formation de ponts disulfures a lieu préférentiellement dans le périplasma et est catalysée par des enzymes résidentes de ce compartiment parmi lesquelles les protéines DsbA et DsbC (Figure II. 25). DsbA est responsable, *via* des processus d'oxydation, de la formation des ponts disulfures des protéines nouvellement synthétisées qui sont secrétées dans le périplasma bactérien. Le mécanisme consiste en une cascade d'oxydations de cystéines de la protéine cible jusqu'à l'oxygène du cytoplasme. L'oxydation de la protéine cible est réalisée en présence de la protéine DsbA (Fränd *et al.*, 2000 ; Kadokura *et al.*, 2003). La protéine DsbA est ensuite réoxydée afin de pouvoir catalyser la formation d'un autre pont disulfure.

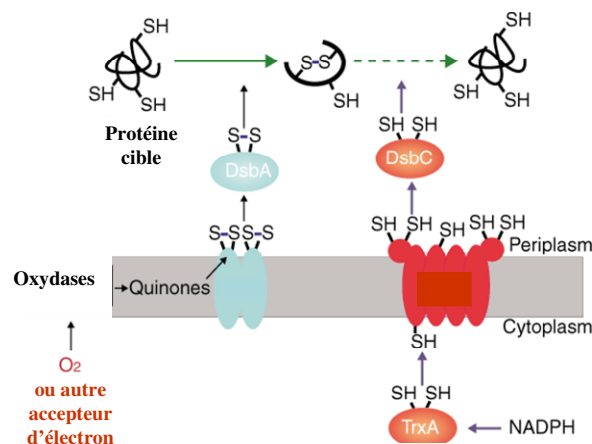


Figure II. 24 : Modèle de la formation des ponts disulfures chez les procaryotes (Kadokura et Beckwith, 2002).

Cependant, l'oxydation de protéines ayant plus d'un pont disulfure résulte souvent en la formation de ponts mal repliés. Le réarrangement de ces ponts disulfures mal formés, à savoir l'isomérisation, est une fonction spécifique de la protéine DsbC. Elle est sous forme réduite dans le périplasme (27 kDa). Le maintien de cette forme réduite dépend d'autres protéines appartenant à la famille des thiorédoxines (Raina et Missikias, 1997; Rietsch et Beckwith, 1998). Chez tous les eucaryotes, la formation des ponts disulfures est catalysée par des protéines disulfure isomérases (PDI). Ces protéines, généralement localisées dans le reticulum endoplasmique (RE), catalysent à la fois l'oxydation et l'isomérisation des ponts disulfures des protéines nouvellement formées. Elles contiennent des sites actifs de type thiorédoxine (Cys-X-X-Cys) qui peuvent former entre eux un pont disulfure intramoléculaire. Dans ce cas, l'enzyme est sous sa forme oxydée et peut participer à la formation des ponts disulfures des protéines substrats. Cette formation résulte en la réduction des sites actifs des PDI qui peuvent alors jouer leur second rôle d'isomérisation des ponts mal repliés (Wilkinson et Gilbert, 2004).

Peu de données sur ce mécanisme au sein du chloroplaste sont actuellement disponibles. On sait que le génome des plantes contient de nombreuses séquences homologues aux PDI dont certaines sont chloroplastiques. Notamment, une protéine chloroplastique, RB60, a été identifiée chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et chez une plante supérieure, *Pisum sativum* (Trebish *et al.*, 2001). Le génome d'*A. thaliana* contient 11 séquences homologues codant des PDI, dont une serait localisée dans le chloroplaste (Kim et Mayfield, 2002). Ces PDI découvertes chez les végétaux possèdent des domaines thiorédoxines, mais rien ne certifie qu'elles les utilisent pour les fonctions d'oxydation et d'isomérisation de protéines cibles.

Du fait de l'origine procaryotique du chloroplaste, pour la coexpression d'oxydoréductases catalysant la formation des ponts disulfures, notre choix s'est tourné vers les enzymes procaryotiques DsbA et DsbC. L'expression et l'activité de certaines protéines nécessitant la formation de ponts disulfures pour leur repliement a déjà été rendue possible à l'aide d'une coexpression de ces enzymes périplasmiques, dans le cytoplasme bactérien où la formation des ponts disulfures est défavorisée (Bessette *et al.*, 1999 ; Locker et Griffiths 1999 ; Levy *et al.*, 2001). De plus, la production de certaines protéines d'intérêt, difficilement secrétées dans le périplasme bactérien sous leur forme active, a été largement optimisée par

une coexpression avec les protéines « Dsb » (Qiu *et al.*, 1998 ; Kurokawa *et al.*, 2000). L'expression de ces enzymes procaryotes dans les tabacs transplastomiques possédant le gène de la phosphatase alcaline, de l'aprotinine, de l'héliomycine ou d'anticorps IgG, nous permettra d'observer si elles peuvent avoir un effet sur l'accumulation de l'activité des protéines recombinantes localisées dans les chloroplastes.

3.2 CONSTRUCTIONS DES VECTEURS DE TRANSFORMATION POUR L'EXPRESSION DES PROTEINES « Dsb »

Les construits ont été réalisés pour une transformation des plantes par *Agrobacterium tumefaciens* et une expression nucléaire des protéines DsbA ou DsbC. Cela permettra d'obtenir différents niveaux d'expression de ces protéines puisque dans le cas d'une intégration nucléaire l'expression des transgènes est directement dépendante de son site d'intégration. Nous avons fait en sorte que ces protéines codées par le génome nucléaire soient adressées au niveau du chloroplaste. Les plantes contenant les gènes Dsb au niveau de leur génome nucléaire pourront servir lors de croisements afin de tester les effets des protéines DsbA et/ou DsbC sur l'expression des différentes protéines recombinantes.

Les gènes *DsbA* et *DsbC* ont été amplifiés par PCR à partir de vecteurs commerciaux à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau V.1). Ces vecteurs, pET39-b(+) pour DsbA et pET40-b(+) pour DsbC, sont normalement destinés à l'expression bactérienne de protéines fusionnées à DsbA ou DsbC (Novagen). Les gènes *DsbA* et *DsbC*, amplifiés sans leurs peptides d'adressage, ont été clonés pour donner les vecteurs finaux pEPA56 et pEPA54 respectivement (Figure II. 25 a et b). Ce sont des vecteurs binaires pouvant se répliquer aussi bien chez *E. coli* que chez *A. tumefaciens*. Notre projet implique que les protéines DsbA et DsbC, codées par les vecteurs d'expression nucléaire obtenus (pEPA56 et pEPA54), soient adressées au chloroplaste. Cela est rendu possible par l'utilisation d'un peptide de transit dit optimisé (OTP), ciblant efficacement le chloroplaste (Lebrun *et al.*, 1992), que nous avons introduit dans le vecteur de transformation. Le gène *DsbA* est sous le contrôle du promoteur eucaryotique inductible à la lumière SSU HA, promoteur de la petite sous-unité de la Rubisco de tournesol (Figure II. 25 a). Le gène *DsbC* est sous le contrôle du promoteur constitutif fort CaMV 35S, issu du virus de la mosaïque du chou fleur, largement utilisé en transgénèse végétale (Figure II. 25 b). Le choix de promoteurs différents pour chacun des construits a été décidé dans l'optique de pouvoir associer l'action des deux protéines DsbA et DsbC dans la

même plante en évitant les phénomènes de silencing. Les vecteurs pEPA54 et pEPA56 possèdent tous deux le gène *nptII* conférant la résistance à la kanamycine afin de faciliter la sélection des transformants nucléaires. A l'inverse des constructions chloroplastiques, celles-ci ne sont pas fonctionnelles chez les bactéries puisque les promoteurs sont d'origine eucaryote. L'efficacité de leur expression ne pourra donc être vérifiée que dans la plante.

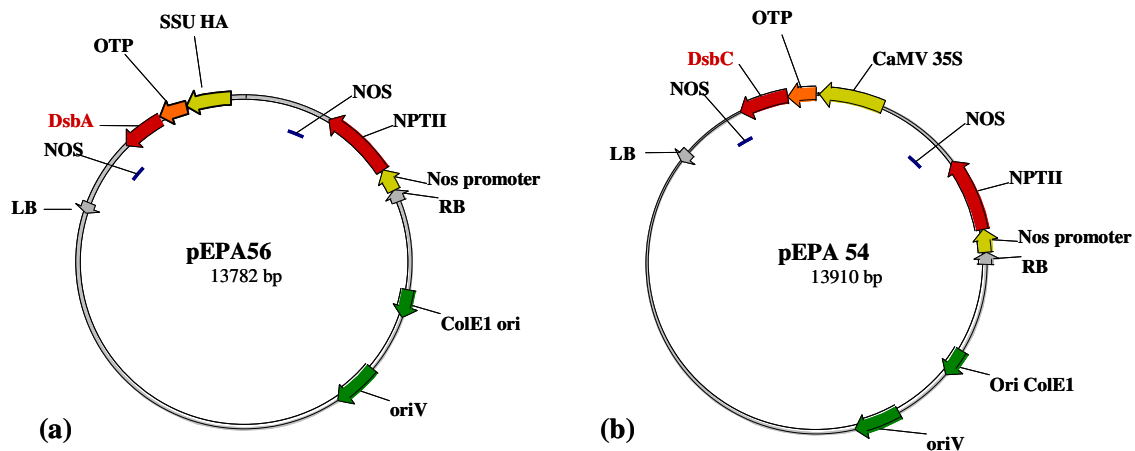


Figure II. 25 : Vecteurs d'expression de DsbA, pEPA56 (a) et DsbC, pEPA54 (b)

3.3 OBTENTION DE TRANSFORMANTS NUCLEAIRES

La transformation nucléaire nécessite l'introduction des plasmides binaires obtenus, pEPA54 et pEPA56, dans une souche d'*A. tumefaciens*. Cette transformation a été effectuée dans les bactéries EHA105 par électroporation (Hood *et al.*, 1986). Des disques de feuilles de tabacs PBD6 sauvage, ont été transformés avec les agrobactéries EHA105 recombinantes, puis repiqués sur milieu MS nutritif supplémenté en kanamycine. Des cals résistants ont commencé à se développer deux à trois semaines après la transformation. Les plantules régénérées ont été fixées pour avoir au final des lignées monolocus homozygotes exprimant l'une ou l'autre des protéines recombinantes. Ces lignées ont été analysées par western blot.

3.3.1 Préparation des anticorps anti-Dsb

Les plantes transgéniques ont été analysées par western-blot avec des anticorps Dsb. Nous savons qu'il existe des anticorps anti-DsbA disponibles dans le commerce, cependant il n'existe pas d'anticorps dirigés contre DsbC. La préparation de ces anticorps à partir de

protéines DsbC purifiées a été réalisée, en parallèle de celle des anticorps anti-DsbA afin d'avoir une homogénéité dans nos travaux pour l'étude de ces deux enzymes.

Afin de préparer des anticorps anti-Dsb, les protéines DsbA et DsbC ont été produites en grande quantité dans la souche BL21(DE3)pLysS transformée par l'un ou l'autre des vecteurs commerciaux, pET39-b(+) pour DsbA et pET40-b(+) pour DsbC. Dans ces vecteurs les protéines possèdent, à leur extrémité N-terminale, une extension His-Tag (six résidus histidines) permettant leur purification sur une colonne Ni-NTA agarose. Les fractions protéiques éluées ont alors été déposées sur gel pour vérifier le niveau de purification de la protéine (Figure II. 26). Avant purification sur colonne Ni-NTA agarose (Figure II. 26, 1) on constate la présence de très nombreuses protéines. Une grande partie de ces protéines est éliminée après le passage des fractions sur la colonne. Cependant, il reste encore un grand nombre de protéines contaminantes qui n'ont pas été éliminées par cette première étape de purification (Figure II.26, 2 et 6).

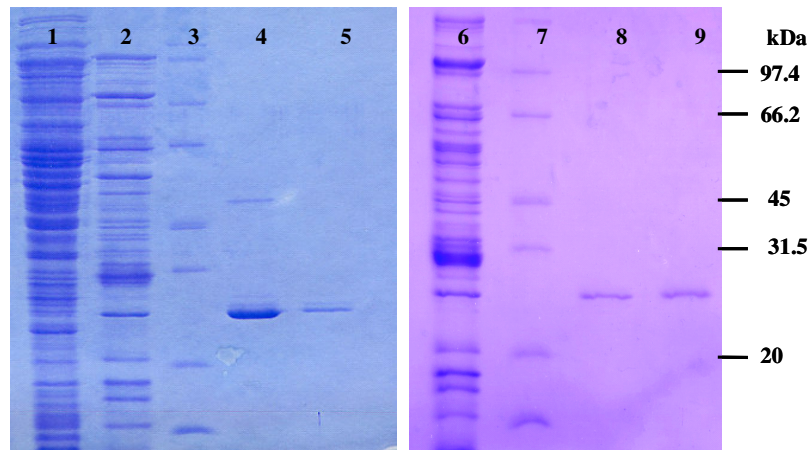


Figure III. 26 : Analyse électrophorétique en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des différentes fractions protéiques obtenues à l'issue des étapes de purification des protéines DsbA et DsbC recombinantes.

(1) Protéines totales extraites des bactéries BL21 contenant le plasmide pET39 avant élution, (2 et 6) protéines éluées sur la colonne Ni-NTA agarose extraites des bactéries transformées avec le vecteur pET39 (DsbA) et pET40 (DsbC) respectivement, (4 et 5) protéines éluées de la colonne Superdex 200 extraites des bactéries transformées avec le vecteur pET39 (DsbA) et (8 et 9) le vecteur pET40 (DsbC). (3 et 7), marqueurs de masse moléculaire.

Les fractions éluées ont ensuite été déposées sur colonne MonoQ HR 55 couplée à un système FPLC. Cette étape permet de séparer les protéines en fonction de leur charge. Les résultats montrent la protéine DsbA à environ 24 kDa (Figure II. 26, pistes 4 et 5) ou la protéine DsbC à environ 27 kDa (Figure II. 26, pistes 8 et 9) correctement purifiées dans les

deux cas. Une électroélution a ensuite permis de récupérer les protéines après migration en gel SDS-PAGE. Ces enzymes purifiées ont servi pour l'immunisation de cobayes en vue de la préparation d'anticorps anti-DsbA et DsbC réalisée par le centre de Bioexpérimentation Valbex (IUT A Villeurbanne). La spécificité et la sensibilité des sérums obtenus a été vérifiée par dot blot pour être finalement utilisés à la dilution 1/5000°.

3.3.2 Fixation de lignées monolocus homozygotes et détection de l'accumulation des protéines DsbA et DsbC dans les feuilles de tabac

Pour les transformations effectuées séparément avec les vecteurs pEPA54 et pEPA56 (DsbC et DsbA respectivement), une dizaine de transformants indépendants issus des cals résistants à la kanamycine, ont été régénérés à chaque fois. Afin d'obtenir un matériel génétiquement uniforme utilisable en croisement, les lignées transgéniques monolocus ont été fixées. La ségrégation du marqueur de sélection (résistance à la kanamycine) a été examinée pour toutes les plantes en génération T1, obtenue par autofécondation. Celles qui ségrégent le marqueur dans la descendance avec un ratio 3:1 ont été retenues. Pour chacune de ces lignées monolocus, huit à dix plantes T1 ont alors été cultivées en serre. Parmi celles-ci, les plantes homozygotes ont été repérées par test de leur descendance T2 (par autofécondation) sur milieu supplémenté en kanamycine (100% de plantules T2 résistantes). Au total, nous avons ainsi fixé génétiquement huit lignées pour le vecteur pEPA56 et dix lignées pour le vecteur pEPA54.

3.3.3 Détection de l'accumulation des protéines DsbA et DsbC dans les feuilles de tabac

La détection de la protéine recombinante a été effectuée par western blot directement sur des extraits protéiques issus des huit lignées homozygotes obtenues pour le gène *DsbA* et des dix lignées homozygotes retenues pour le gène *DsbC* (Figure II. 27).

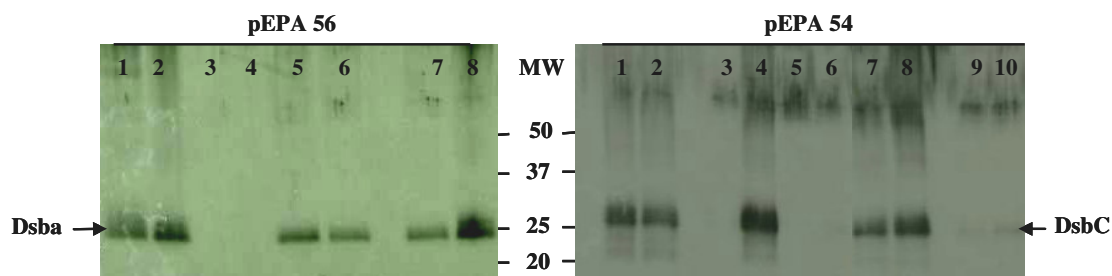


Figure II. 27 : Détection des protéines DsbA et DsbC par western blot.

L'analyse a été réalisée avec des protéines totales solubles extraites de feuilles de plantes homozygotes issues de la fixation de lignées transformées avec les vecteurs pEPA56 (DsbA) et pEPA54 (DsbC).

Les résultats montrent l'expression des protéines DsbA ou DsbC à différents niveaux dans les lignées fixées. Ainsi, nous avons obtenu pour chaque transformation, des plantes accumulant fortement DsbA (pEPA56 2,8) ou DsbC (pEPA54 1,2,4,7,8), des plantes accumulant plus faiblement DsbA (pEPA56 1,5,6,7) ou DsbC (pEPA54 9,10) et des plantes ne montrant aucune accumulation de la protéine (pEPA56 3, 4 et pEPA54 3,5,6).

3.4 ANALYSE DE L'EFFET DES PROTEINES DSB

3.4.1 Transformation nucléaire de plantes transplastomiques possédant le gène de l'aprotinine et de l'héliomycine

En parallèle à ces travaux de fixation des lignées, nous avons profité du matériel disponible au laboratoire pour réaliser directement des transformations nucléaires avec les gènes *Dsb* sur des tabacs déjà transformés au niveau de leurs chloroplastes. Ces analyses ont été réalisées afin d'étudier plus rapidement l'impact des enzymes DsbA et DsbC sur le repliement des protéines recombinantes qui, lors de précédentes analyses, n'ont pas montré une expression optimale dans les chloroplastes. Des tabacs transformés avec le vecteur pCLT184 possédant le gène de l'héliomycine ou avec le vecteur pAPR09 possédant le gène de l'aprotinine ont donc été transformés avec les vecteurs pEPA54 et pEPA56 *via A. tumefaciens*. A l'issue de ces transformations, l'ADN des plantes régénérées sur milieu de sélection a été analysé par PCR. Les couples d'amorces ayant déjà servi à l'amplification des gènes *DsbA* et *DsbC* ont été utilisés (tableau amorces). Toutes les plantes analysées ont montré une intégration de l'un ou l'autre des transgènes. Après s'être assuré de la présence des transgènes, l'analyse de l'expression de l'héliomycine et de l'aprotinine a été effectuée par western blot. Les protéines solubles des feuilles de tabac transplastomiques régénérés après transformation nucléaire, ont été extraites et séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les résultats obtenus n'ont montré aucun changement dans le profil d'expression des petites protéines d'intérêt à l'issue de la transformation. Ces résultats ont été répétés. Des techniques optimisées pour l'extraction des petites protéines ont été utilisées, comme par exemple l'extraction au Trizol. Les résultats sont restés identiques, l'expression de l'aprotinine reste très faible et aucune accumulation de l'héliomycine n'a pu être détectée. Aucun effet de DsbA ou de DsbC n'a pu être démontré dans cette première partie des analyses.

3.4.2 Croisements des lignées fixées homozygotes avec les plantes transplastomiques : obtention et analyse d'hybrides exprimant les protéines DsbA et DsbC

En même temps que ces travaux de transformation directe, des plantes homozygotes, obtenues à l'issue des transformations nucléaires avec les vecteurs pEPA54 ou pEPA56, ont été croisées avec les plantes transplastomiques disponibles au laboratoire, cette analyse ayant pour but de vérifier l'impact des protéines Dsb sur les protéines recombinantes exprimées dans le chloroplaste (Figure II.28). Ainsi, les étamines des fleurs de tabacs exprimant les protéines Dsb (représentant les parents mâles) ont été recueillies et leur pollen mis au contact direct des stigmates des fleurs des tabacs transplastomiques (parents femelles). Les graines issues de ces croisements ont été récoltées puis semées pour analyse.

PARENT MALE		X	PARENT FEMELLE	
Forte accumulation de DsbA	pEPA56 2		Expression de PhoA-S	pCLT515
Faible accumulation de DsbA	pEPA56 1, pEPA56 6, pEPA56 7		Expression de PhoA-L	pCLT516
Pas d'accumulation de DsbA Contrôle négatif	pEPA56 3,		Expression des IgG	pACI
Forte accumulation de DsbC	pEPA54 2, pEPA54 7, pEPA54 8			
Faible accumulation de DsbC	pEPA54 9			
Pas d'accumulation de DsbC Contrôle négatif	pEPA54 5			

Figure II. 28 : Croisements effectués. Chacune des plantes mâles issues des transformations nucléaires est croisée avec chacune des plantes femelles disponibles.

Actuellement, seules les plantes issues des croisements avec les plantes femelles exprimant PhoA ont été obtenues et ont pu être analysées. Dans un premier temps, elles ont été analysées par PCR afin de vérifier la présence de *DsbA* ou *DsbC* avec les mêmes amorces que pour l'amplification initiale des deux transgènes (non montré). Une fois cette intégration démontrée, les effets des protéines DsbA ou DsbC sur les protéines recombinantes (PhoA-S et PhoA-L) exprimées dans les chloroplastes ont été observés dans ces plantes. Pour cela, des tests d'activité ont été effectués sur les plantes hybrides exprimant la phosphatase alcaline. Ces tests d'activité spécifique ont été réalisés avec le substrat de la phosphatase alcaline, le

pNPP, de la même façon que lors de l'étude des protéines PhoA-S et PhoA-L exprimées au sein du chloroplaste. Ils ont permis d'évaluer si les enzymes coexprimées, responsables du repliement des protéines chez les procaryotes, peuvent changer le niveau d'activité de la protéine. Les extraits protéiques issus des plantes hybrides ont été mis directement au contact du pNPP, dans un tampon en présence de $MgCl_2$. L'activité enzymatique de la phosphatase alcaline est alors révélée comme dans les expériences précédentes par une coloration jaune du produit dont la densité optique est lue au spectrophotomètre à 405 nm. A partir de ces résultats et à l'aide d'une quantification sur western blot des extraits protéiques par rapport à une gamme de concentration de phosphatase, l'activité spécifique de la protéine a pu être exprimée comme un pourcentage par rapport à une phosphatase alcaline commerciale. Ces analyses ont été répétées plusieurs fois afin de valider les résultats.

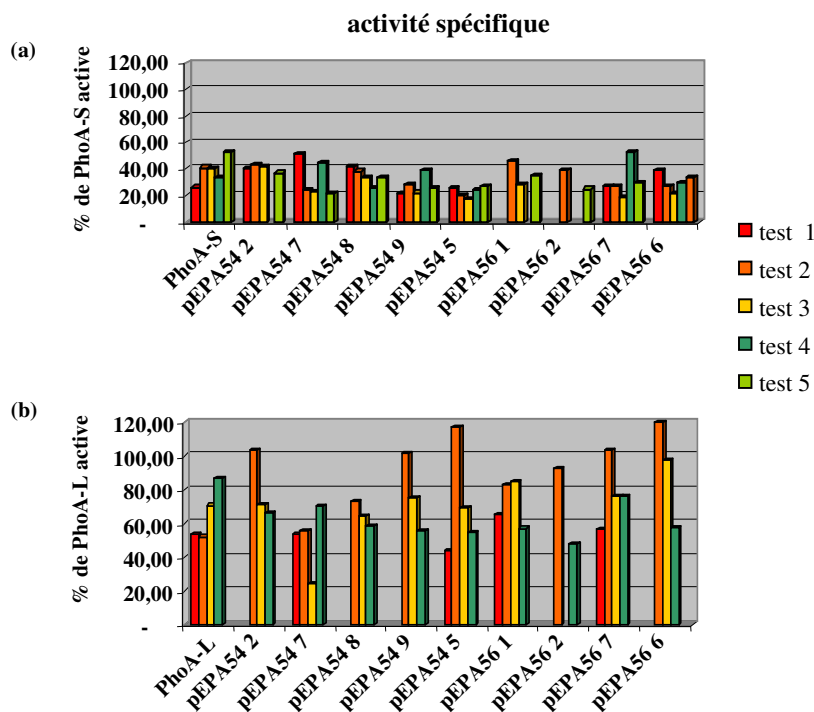


Figure II. 29: Activité spécifique relative de la phosphatase alcaline dans les plantes hybrides.

Les tests ont été répétés pour cinq plantes différentes issues d'un même croisement. (a) Activité de PhoA-S dans les plantes issues des croisements avec DsbC (pEPA54 2,7,8 et 9) et DsbA (pEPA56 1,2,7 et 6), (b) activité de PhoA-L dans les plantes issues des croisements avec DsbC (pEPA54 2,7,8 et 9) et DsbA (pEPA56 1,2,7 et 6).

Les résultats montrent toujours cette même différence précédemment observée entre le niveau d'activité de PhoA-S (localisée dans le stroma) et le niveau d'activité beaucoup plus élevé de PhoA-L (localisée en partie dans le lumen). D'après les cinq tests effectués, aucune action significative de DsbA ou DsbC n'a pu être mise en évidence.

Ainsi, comme dans le cas de l'héliomycine et de l'aprotinine, les analyses effectuées sur les plantes hybrides n'ont pas montré d'effet de DsbA ou DsbC sur l'activité des protéines au sein du chloroplaste et donc sur leur repliement. Nous avons dans un premier temps pensé à un mauvais adressage des enzymes procaryotes. Leur localisation chloroplastique a été confirmée par western blot sur des extraits protéiques issus de purifications chloroplastiques des plantes transformées (non montré). Il est donc possible que l'action de ces enzymes ne soit pas fonctionnelle au sein du chloroplaste. Il se peut également qu'une collaboration entre les deux protéines soit nécessaire pour exercer un effet sur le repliement des ponts disulfures. Actuellement, des lignées exprimant à la fois DsbA et DsbC sont en cours de fixation pour répondre à ces questions.

3.5 DISCUSSION / CONCLUSION

Ces premiers travaux d'optimisation de la formation des ponts disulfures au sein du compartiment plastidial par l'intermédiaire de croisements entre différentes plantes transformées restent à approfondir.

Les tests effectués sur la phosphatase alcaline avec les enzymes, DsbA ou DsbC, responsable du repliement chez les procaryotes n'ont pas permis d'observer une optimisation de l'activité de la protéine. Cependant nous avons réussi précédemment à démontrer l'accumulation de la protéine, dans le lumen des thylacoïdes du plaste, sous sa forme active donc correctement repliée et qui de ce fait ne nécessiterait pas l'aide de ces chaperonnes. Toutefois, la même protéine localisée dans le stroma pourrait avoir besoin de molécule chaperonne pour un meilleur repliement et une activité optimale. Il en est de même pour la plupart des protéines recombinantes du stroma, telles que l'aprotinine, l'héliomycine ou encore les IgGs, dont les niveaux d'accumulation se sont avérés variables et souvent très faibles lors de travaux antérieurs effectués au sein du laboratoire. Il donc semble nécessaire d'optimiser le système de repliement des ponts disulfures. Le matériel pour mener à bien ces travaux est désormais disponible.

Il est prévu par la suite de faire des croisements entre les plantes transplastomiques et les plantes contenant à la fois DsbC et DsbA. En effet, ces protéines interagissent l'une et l'autre dans la formation de ponts disulfures dans le périplasme des bactéries. Il se pourrait qu'il soit nécessaire de les avoir toutes deux exprimées ensemble afin d'avoir un impact sur la formation des ponts disulfures des protéines exogènes exprimées dans les chloroplastes. De

plus, ces enzymes ont besoin pour leur activité d'autres protéines, les protéines DsbB et DsbD, afin d'assurer le transfert d'électrons nécessaire à la réduction ou à l'isomérisation des ponts. Etant donné qu'il a été possible de former des ponts disulfures au sein de la phosphatase alcaline recombinante dans les chloroplastes, nous espérons donc la présence de partenaires tels que les thiorédoxines ou le glutathion pouvant se substituer aux protéines DsbD et DsbB. Il faudrait également tester d'autres enzymes responsables du repliement des ponts disulfures telles que les PDI chloroplastiques ou utiliser d'autres stratégies pour la coexpression de chaperonnes aidant au repliement des ponts disulfures. Il serait intéressant également de regarder l'impact de ces enzymes sur des protéines résidentes du chloroplaste, et notamment du stroma, et non pas seulement sur des protéines recombinantes.

Chapitre III

Conséquences de l'expression massive de protéines recombinantes par le génome chloroplastique

Au cours de ces dernières années l'utilisation de la transformation chloroplastique est devenue de plus en plus fréquente aussi bien en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée, pour la compréhension du fonctionnement du génome chloroplastique, de son interaction avec le génome nucléaire, ou pour la production de protéines à haute valeur ajoutée. Dans ce dernier cas, le chloroplaste apparaît particulièrement attractif comme système d'expression de transgènes. Il permet notamment un haut niveau d'accumulation de protéines correctement repliées. C'est le cas de la phosphatase alcaline étudiée dans la première partie de cette thèse (Bally *et al.*, 2008). L'expression de la protéine recombinante s'est avérée être très élevée, proche parfois du niveau de la Rubisco qui représente environ 50% des protéines de feuilles des plantes supérieures et est de ce fait la protéine la plus abondante de la biosphère (Ellis, 1979). Des résultats semblables ont été décrits dans la littérature lors de l'expression de divers autres gènes d'intérêt dans les plantes par l'intermédiaire de la transformation chloroplastique. Ce fut le cas, par exemple, du gène codant la protéine insecticide Cry2Aa2 (45% des protéines solubles totales ; De Cosa *et al.*, 2001).

L'introduction de transgènes codant des caractères d'intérêt agronomique ou pharmaceutique au niveau du génome plastidial présente un réel intérêt lié à cette possibilité d'un niveau élevé d'accumulation de la protéine ciblée. Il nous a donc semblé important, après l'obtention de tels résultats, d'analyser les effets collatéraux éventuels de cette expression massive des protéines recombinantes au sein du chloroplaste tant au niveau phénotypique qu'au niveau biochimique. Cet organe est en effet responsable non seulement des réactions de photosynthèse mais également de fonctions vitales du métabolisme primaire des plantes telles que la biosynthèse de l'amidon, de nombreux acides aminés, des lipides ou encore des tétrapyrroles. Il joue également un rôle essentiel pour le développement de la plante, dans l'assimilation de l'azote et du soufre (Neuhaus et Emes, 2000). La modification génétique du chloroplaste pourrait entraîner une modification de ces fonctions du métabolisme.

A ce jour, il n'existe aucune donnée, à notre connaissance, sur les conséquences que peut avoir la surexpression d'un transgène sur ces différentes voies et donc sur la physiologie de la plante. Il a été rapporté de façon très surprenante, que les plantes transplastomiques conservent un phénotype normal malgré l'accumulation des protéines recombinantes en grande quantité (De Cosa *et al.*, 2001 ; Leelavathi *et al.*, 2003 ; Fernandez San-Millan *et al.*, 2003 ; Dufourmantel *et al.*, 2007). D'autres cas ont révélé une altération du phénotype des

plantes transformées, mais cela était lié directement ou indirectement à l'effet de la protéine recombinante (Lössl et al, 2003 ; Magee *et al.*, 2004). Cependant, aucune étude globale n'a été réalisée, concernant les conséquences de la forte expression des transgènes sur celle des gènes résidents du plastome, ni sur le métabolisme du plaste.

Nous avons donc entrepris, dans cette deuxième partie, des recherches pour répondre à ces questions et analyser les conséquences de la surexpression de différentes protéines dans le génome chloroplastique de tabac. De telles études pourraient révéler certaines protéines induites ou inhibées lors de l'accumulation de protéines exogènes. Pour ce faire, des tabacs transplastomiques disponibles au laboratoire et montrant différents niveaux d'expression de protéines recombinantes ont été utilisés. Ainsi, nous avons étudié l'impact de la surexpression de quatre protéines de taille, structure et fonction différentes (possédant ou non des ponts disulfures) au sein du chloroplaste : la phosphatase alcaline (sous ses deux formes PhoA-S et PhoA-L) utilisée dans la première partie de nos travaux, la GFP, une protéine marqueur couramment utilisée en biologie moléculaire ou cellulaire végétale, et l'HPPD, une enzyme cible d'herbicides.

Les plantes transgéniques ont été analysées à plusieurs niveaux. Tout d'abord, une étude phénotypique a été réalisée depuis la germination jusqu'à la floraison. Cette première étape de notre étude a permis de déterminer si le phénotype des plantes transformées était affecté par les modifications du génome plastidial, entraînant des changements évidents, discernables visuellement. Une analyse de la transcription des gènes endogènes plastidiaux, et des transgènes, a été réalisée par RT-qPCR de manière à évaluer l'impact de la forte expression de ces transgènes sur l'expression des gènes résidents du chloroplaste. Nous avons ensuite approfondi la question par l'étude du protéome foliaire des différentes plantes transgéniques et sauvages. Pour compléter notre approche, l'étude de différents aspects, qualitatifs et quantitatifs (acides aminés, lipides, glucides, protéines etc.), des plantes surexprimant les protéines recombinantes a été abordée.

1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET ACCUMULATION MASSIVE DE PROTEINES RECOMBINANTES DANS LES PLANTES

1.1 PROTEINES RECOMBINANTES ET VECTEURS DE TRANSFORMATION

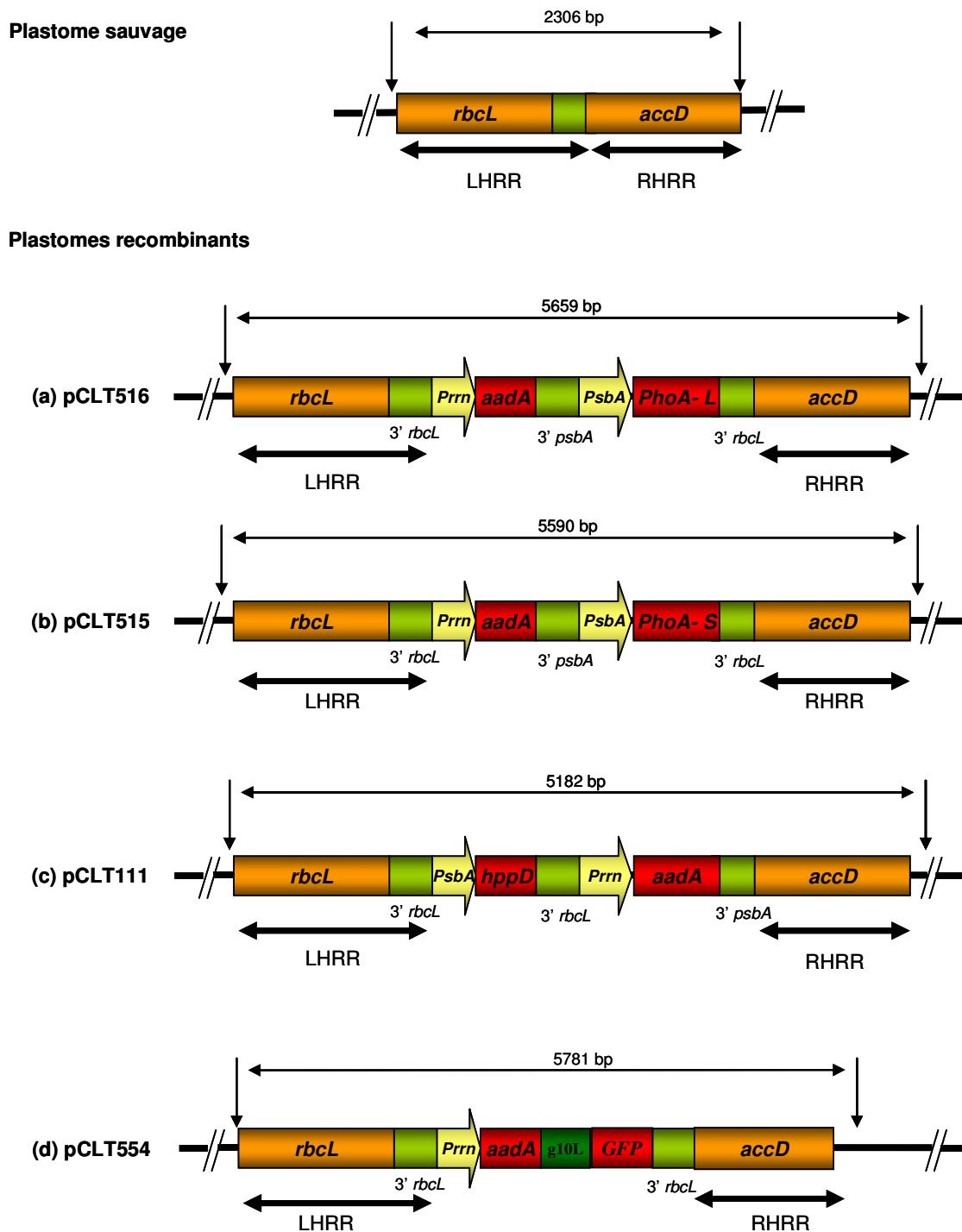
Pour analyser les effets éventuels de la transformation chloroplastique sur la physiologie et le métabolisme des plantes, quatre lignées transplastomiques de tabac ont été retenues. Le choix de ces transformants a reposé sur plusieurs critères. Nous avons profité du matériel disponible au laboratoire, déjà caractérisé, et exprimant fortement des protéines recombinantes qui diffèrent considérablement pour chaque lignée dans leur structure, leur activité biologique, leur taille ou encore leur localisation au sein du chloroplaste. Les vecteurs de transformation correspondant à chacune de ces lignées sont représentés sur la figure III.1.

1.1.1 La phosphatase alcaline

Les plantes étudiées dans le chapitre précédent, exprimant **la phosphatase alcaline** au niveau de leur chloroplaste, **PhoA-S** ou **PhoA-L**, ont été utilisées. Cela a permis de baser notre étude sur l'analyse d'une protéine connue, un homodimère dont chaque sous-unité de 50 kDa possède des ponts disulfures dans sa structure native. Deux formes de cette protéine sont disponibles, s'exprimant dans un compartiment différent du chloroplaste : PhoA-S, localisée dans le stroma, (vecteur pCLT515) et PhoA-L, localisée en partie dans le lumen des thylacoïdes (vecteur pCLT516). La protéine recombinante sous le contrôle du promoteur *psbA* ne s'exprime que dans les tissus chlorophylliens.

1.1.2 La p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD)

Nous avons également retenu des plantes surexprimant fortement un gène conférant une tolérance à certains herbicides, le gène de *Pseudomonas fluorescens* codant **la p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase, HPPD** (Dufourmantel *et al.*, 2007 ; vecteur pCLT111). L'enzyme de 40 kDa, qui ne contient pas de ponts disulfures dans sa structure native, est présente à un faible niveau chez les organismes photosynthétiques où elle est impliquée dans le catabolisme de la tyrosine et la biosynthèse des prénylquinones (Figure III. 2). Elle catalyse la formation d'homogentisate à partir du p-hydroxyphénylpyruvate (hpp).

**Figure III. 1 : Organisation des vecteurs de transformation.**Vecteurs contenant le gène *PhoA-S* (a), *PhoA-L* (b), *HPPD* (c), *GFP* (d).

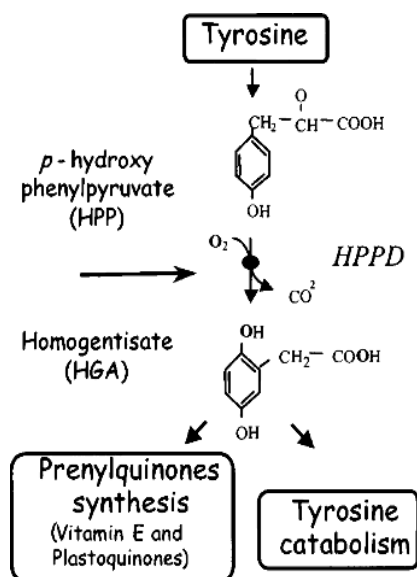


Figure III. 2 : Implication double de l'HPPD dans la biosynthèse des prénylquinones et dans le catabolisme de la tyrosine (d'après Matringe *et al.*, 2005).

L'homogentisate est le précurseur aromatique dans le catabolisme de la tyrosine et il participe à la synthèse des prénylquinones : vitamines E et plastoquinones (Matringe *et al.*, 2005). La surexpression dans les plantes de l'enzyme HPPD leurs confère une tolérance aux herbicides tels que l'isoxaflutole, ou les sulcotriones, responsables du blanchiment des tissus végétaux. Des plantes transplastomiques montrant une très forte accumulation de l'HPPD au niveau de leurs chloroplastes ont été générés lors d'études antérieures au laboratoire (Dufourmantel *et al.*, 2007). La descendance de ces plantes a été utilisée pour la suite de nos travaux.

1.1.3 La green fluorescent protein (GFP)

D'autres plantes transplastomiques surexprimant fortement une **GFP**, un marqueur utilisé pour des études d'expression génique et d'adressage des protéines dans les cellules vivantes (Tsien, 1998), ont été étudiées (non publié). La protéine recombinante dépourvue d'activité enzymatique est de petite taille (27 kDa) et ne contient pas de ponts disulfures dans sa structure. Les plantes possèdent le gène de la GFP en tandem avec le gène de sélection *aadA* sous forme dicistronique, construction bâtie de la même façon que dans la première partie de l'étude pour la roGFP. Dans ce cas, la protéine est potentiellement exprimée non seulement dans les chloroplastes, mais également dans les autres types de plastes car le gène est sous le contrôle du promoteur complet de l'ARN16S de maïs, incluant le site de reconnaissance de la NEP (nuclear encoded polymerase).

1. 2 PROFIL D'EXPRESSION DES PROTEINES RECOMBINANTES

Les plantes transplastomiques exprimant l'une ou l'autre de ces quatre protéines, PhoA-S, PhoA-L, HPPD ou GFP, ont toutes été analysées précédemment à cette étude. Elles se sont avérées fertiles et ont donné des graines par autofécondation. Des gels de protéines

(Figure III. 3) et des immunoblots sur ces mêmes plantes ont montré une accumulation massive des protéines recombinantes, notamment pour l'HPPD, la GFP et PhoA-L (Figure III.3). PhoA-S est plus faiblement exprimée et sa détection est rendue plus compliquée par sa migration trop proche de la grande sous-unité de la Rubisco (notée ici GSU).

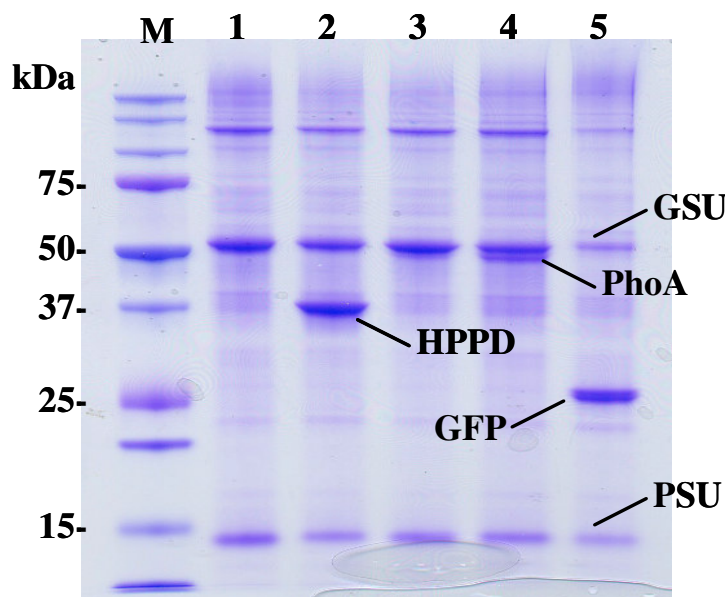


Figure III. 3 : Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie

Tabac sauvage (1), tabac transplastomique exprimant l'HPPD (2), PhoA-S (3), PhoA-L (4), la GFP (5). Une quantité de 20 µg de protéines totales a été déposée sur le gel pour chaque échantillon. GSU, grande sous-unité de la Rubisco ; PSU, petite sous-unité de la Rubisco.

Le gel permet d'observer des profils modifiés au niveau de certaines autres protéines endogènes. En particulier, une diminution de l'accumulation des deux sous-unités de la Rubisco est visible lors de l'expression à un niveau élevé de protéines recombinantes telles que l'HPPD ou notamment la GFP. Ces données ont été analysées et les protéines recombinantes ainsi que les deux sous-unités de la Rubisco ont été soumises à une étude densitométrique directement sur le gel monodimensionnel à l'aide du logiciel Image Master 2D. Les résultats montrent que plus le niveau d'accumulation de la protéine recombinante est important plus le niveau de la grande sous-unité de la Rubisco diminue (Figure III. 4 a). La petite et la grande sous-unité de la Rubisco suivent toutes les deux ce même profil. L'augmentation des valeurs moyennes de quantité de la grande sous-unité s'accompagne d'une augmentation des valeurs moyennes de celle de la petite sous-unité. Une bonne corrélation linéaire a été obtenue, représentée sur la figure III. 4 b par une droite ayant une pente de $0,27 \pm 0,05$ ($r^2 = 0,916$).

Sachant que la masse moléculaire de la grande sous-unité et de la petite sous-unité de la Rubisco approchent respectivement 53 kDa et 14 kDa, et en faisant l'hypothèse que l'intensité de la coloration de ces protéines en gel sera proportionnelle à leur masse moléculaire, une pente théorique de 0,25 est attendue. Cette valeur est très proche de la valeur expérimentale obtenue (0,27) et cette analyse valide notre approche quantitative montrant la relation négative entre l'accumulation des deux sous-unités de la Rubisco et l'accumulation de la protéine recombinante. Une quantification du niveau d'expression du protéome sera effectuée plus tard dans cette étude après séparation des protéines sur gel bidimensionnel permettant une analyse plus approfondie.

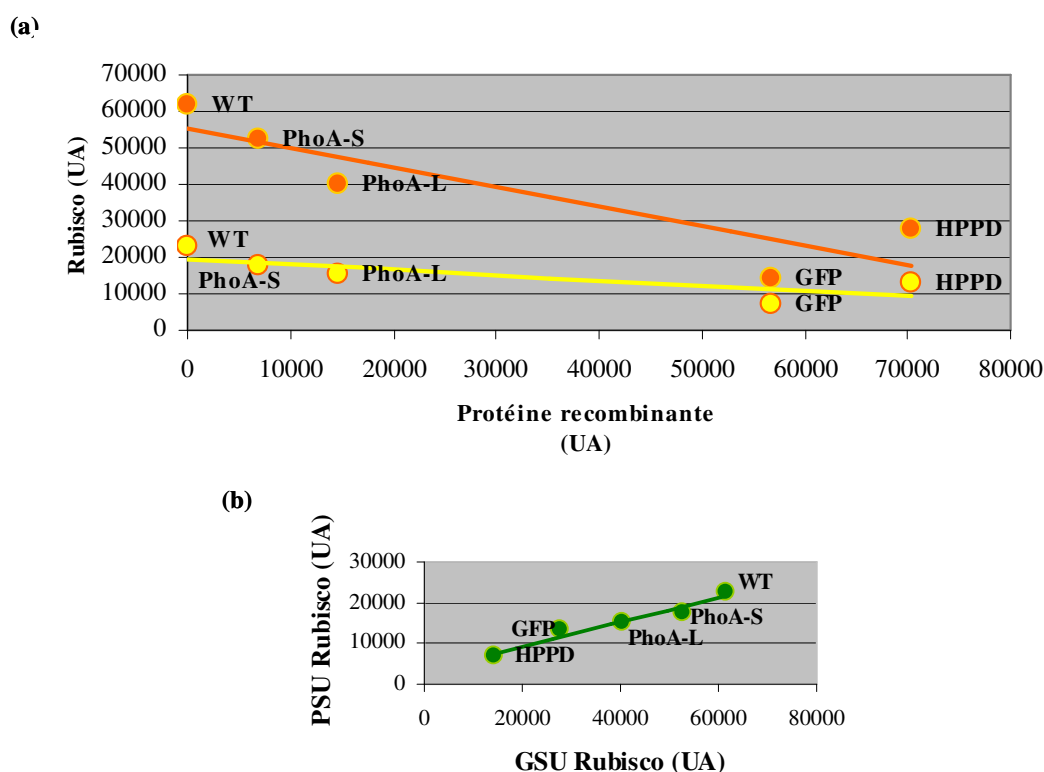


Figure III. 4 : Quantification des protéines recombinantes et de la Rubisco.

(a) Graphique représentant la quantité relative du volume des bandes évalué en gel SDS-PAGE, en unité aléatoire (UA), de la Rubisco (grande sous-unité, GSU, en rouge et petite sous-unité, PSU, en jaune) en fonction de la quantité relative de la protéine recombinante. Les corrélations linéaires suivantes ont été obtenues : pente GSU = $-0,58 \pm 0,14$; r^2 GSU = 0,859 ; pente PSU = $-0,14 \pm 0,06$; r^2 PSU = 0,625. (b) Graphique représentant la quantité relative du volume des bandes évalué en gel SDS-PAGE, en unité aléatoire (UA), de la grande sous-unité de la Rubisco (GSU) en fonction de la quantité relative de la petite sous-unité de la Rubisco (GSU) selon la protéine recombinante exprimée dans la plante. La corrélation linéaire suivante a été obtenue : pente = $0,27 \pm 0,05$; r^2 = 0,916.

1.3 ETUDE PHENOTYPIQUE DES PLANTES TRANSPLASTOMIQUES

Pour cette étude phénotypique, nous avons comparé la croissance des plantes transformées avec celle des plantes sauvages tout au long d'un cycle de vie, de la graine jusqu'à la floraison. Les graines accumulent de nombreuses réserves au cours de leur maturation sur la plante mère après la floraison. Grâce à ces réserves, la graine pourra assurer un métabolisme hétérotrophe lors de sa germination pour donner une plantule : au cours de ces étapes de germination, les processus métaboliques sont ré-initiés. La germination des graines de tabacs obtenues par autofécondation a donc été étudiée, les résultats sont décrits au paragraphe 6.2.1. Nous avons ensuite suivi la croissance des plantes transformées en comparaison avec celle de plantes non transformées jusqu'à leur floraison. Ces analyses macroscopiques du phénotype des plantes transplastomiques, ont été effectuées afin de vérifier si l'introduction d'un transgène dans le génome chloroplastique et la forte accumulation des protéines recombinantes dans les plantes pouvaient entraîner des modifications discernables visuellement, dans nos conditions de culture.



Figure III. 5 : Lignées de tabacs cultivés en serre.

(a) 9 jours après semis, (b) 21 jours après semis, (c) 70 jours après semis, (d) 95 jours après semis.

1.3.1 Développement des plantes en serre

Une centaine de graines par lignée transplastomique ainsi qu'une cinquantaine de graines issues de tabac sauvage (PBD6) ont été semées directement en terre. Les graines ont germé de façon synchrone (Figure III. 5 (a), et paragraphe 6.2.1). Pour chaque lignée, cinq plantes ont été repiquées et menées à graine. Toutes ces lignées ont une croissance normale, comparable à celle du témoin sauvage, et ne montrent de différences ni dans la pigmentation des feuilles (Figure III. 5 b, c et d), ni dans leur morphologie (taille identique et aucune feuille de type mosaïque indiquant une hétérogénéité du génome plastidial).

1.3.2 Floraison

La floraison des plantes transformées et sauvages s'est produite de façon simultanée. La seule différence évidente concerne les fleurs des plantes exprimant l'HPPD, avec une absence totale de pigments, résultant en des pétales blancs (Figure III.6 a). Les anthocyanes, appartenant à la classe des flavonoïdes, sont des pigments naturels de couleur rouge à bleue, donnant leur coloration à la corolle des fleurs de tabacs. Aucune différence de pigmentation n'apparaît pour les fleurs des autres plantes transplastomiques étudiées. L'HPPD est donc seule responsable de ce blanchiment des pétales. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse des plastoquinones et des tocophérols/tocotriénols (vitamines E) par l'intermédiaire de l'homogentisate.

Une interdépendance entre les tocophérols et les anthocyanes a été démontrée au cours d'études antérieures. Dans celles-ci, l'inhibition de la synthèse des tocophérols entraîne une augmentation de l'expression des anthocyanes (Hofius *et al.*, 2004 ; Munné-Bosch, 2005). Il semble donc y avoir un phénomène de compensation entre les deux voies métaboliques. Une accumulation très importante de l'HPPD recombinante pourrait donc mener à une baisse de la quantité d'anthocyanes, et à l'obtention de fleurs blanches (Figure III.6 a). Mais cette affirmation doit être pondérée car des travaux effectués par Collakova et DellaPenna (2003) indiquent que la sur-accumulation de la vitamine E chez les plantes n'est pas associée avec une variation de leur contenu en anthocyanes. Des études physiologiques fines ainsi que des analyses biochimiques détaillées seraient nécessaires pour mieux cerner l'impact de l'accumulation de l'HPPD dans les plantes. Dans cette optique, les protéines des fleurs de tabac ont été extraites et séparées sur gel de manière à mettre en évidence une modification du profil protéique notamment au niveau des fleurs HPPD (Figure III.6 b).

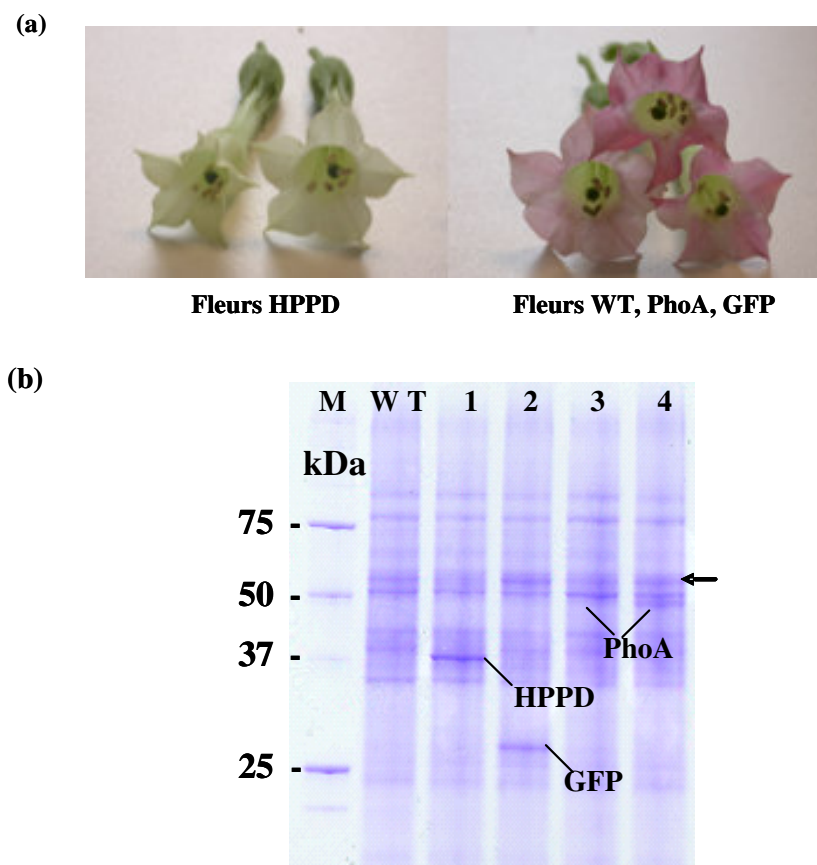


Figure III. 6 : Fleurs de tabacs.

(a) Fleurs de tabac sauvage ou transplastomique exprimant la phosphatase alcaline, la GFP (fleurs roses) ou l'HPPD (fleurs blanches) ; (b) Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie montrant l'accumulation des protéines recombinantes dans les fleurs de tabac. Fleur de tabac sauvage (WT), de tabac transplastomique exprimant l'HPPD (1), la GFP (2), PhoA-S (3) et PhoA-L (4). Une quantité de 15 µg de protéines totales a été déposée sur gel pour chaque échantillon.

L'accumulation des protéines recombinantes est visible sur le gel et les autres protéines observent le même profil. Une seule bande, correspondant à une protéine non caractérisée pour le moment et présente pour toutes les lignées (indiquée par une flèche sur la figure III. 6), semble diminuer au niveau des plantes HPPD. Il est à noter également que le profil protéique des fleurs tabac est proche de celui observé pour les feuilles en gel monodimensionnel, mais avec une expression plus faible de la Rubisco et des protéines recombinantes.

Ces premiers résultats biochimiques ne montrent donc pas beaucoup de variations des protéines extraites des fleurs HPPD et ce, malgré un phénotype spectaculaire. Une analyse des métabolites des fleurs sauvages et des fleurs de plantes accumulant fortement l'HPPD permettrait de mieux cerner les gènes perturbés par la transformation.

2. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES PLANTES TRANSFORMÉES

Une étude du niveau des transcrits de plusieurs gènes ou transgènes plastidiaux a été réalisée par RT-qPCR à la fois pour les plantes transgéniques et les plantes sauvages, de manière à mesurer l'impact éventuel de l'expression de ces transgènes sur celle des transcrits endogènes. Cette analyse a été faite sur les ARN totaux extraits des feuilles de plantes des différents événements transplastomiques, récoltées au même stade. La transcription des gènes plastidiaux est assurée par deux ARN polymérases ADN-dépendantes différentes, la NEP (nuclear-encoded polymerase) et la PEP (plastid-encoded polymerase), ciblant des promoteurs de nature différente (Hess et Börner, 1999 ; Lebs-Mache, 2000). La NEP transcrit préférentiellement les gènes de ménage et les gènes codant les sous-unités de l'ARN polymérase PEP. L'ARN polymérase PEP peut alors transcrire les gènes de ménage et les gènes photosynthétiques codés par le génome chloroplastique. Différents couples d'amorces ont été choisis de façon à pouvoir mesurer une modification possible du niveau de certains transcrits synthétisés par l'une ou l'autre des polymérases (NEP ou PEP).

Couples d'amorces sélectionnés (Tableau IV.2) hybridant dans certaines séquences spécifiques :

- ✓ Transgènes: *PhoA-S* (PEP), *PhoA-L* (PEP), *HPPD* (PEP), *GFP* (NEP + PEP).
- ✓ Séquence de l'ADNr16S (NEP + PEP).
- ✓ Séquences des gènes plastidiaux codant des protéines impliquées dans la photosynthèse : *psbA* (PEP) codant la protéine membranaire D1 du photosystème II, *atpH* (PEP) codant la sous-unité III de l'ATPase du plaste, *rbcL* (PEP) codant la grande sous-unité de la Rubisco.
- ✓ Séquences de gènes plastidiaux codant des protéines impliquées dans les fonctions de traduction : *rps14* (PEP), *rps16* (NEP + PEP) et *rps18* (NEP) codant des protéines ribosomiques.
- ✓ Séquences de gènes plastidiaux impliqués dans le métabolisme : *accD* (NEP) sous-unité de l'acétyl-CoA carboxylase et *ClpP* (NEP + PEP) sous-unité protéasique plastidiale.

Ces couples d'amorces, amplifiant un fragment de petite taille conduisent à l'amplification d'un seul et unique produit de la taille attendue et spécifique de la séquence recherchée. Le niveau des transcrits a été normalisé par rapport à celui de l'ADNr16S dont le transcrit est le plus abondant. Les résultats présentés correspondent à la valeur moyenne de

trois répétitions effectuées à partir d'un seul échantillon d'ARN pour tous les transcrits. Les valeurs sont exprimées en Cp « crossing point », ce dernier correspondant à la détermination du nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détecté à un niveau seuil arbitraire, en phase exponentielle d'amplification. Les ΔCp représentés correspondent aux différences de Cp entre l'ARN16S, qui sert alors de gène de référence, et le gène cible étudié. Plus le ΔCp est faible, plus le niveau d'ARN est élevé.

Il apparaît clairement que les transgènes codant PhoA, l'HPPD ou la GFP sont particulièrement abondants dans les échantillons testés issus des plantes transplastomiques correspondantes (Figure III.7). Mais le niveau d'accumulation de ces transcrits est jusqu'à 16 fois moins élevé que celui de l'ARN16S ($\Delta\text{Cp} \approx 4$). Il est deux à quatre fois plus bas que celui des transcrits *psbA*, les plus abondants dans les chloroplastes après l'ARN16S. Suivent ensuite par ordre décroissant les transcrits des gènes *rbcL* et *atpH* de la même classe que le gène *psbA* impliqués dans la photosynthèse, puis les transcrits *ClpP*. Les gènes impliqués dans les fonctions de traduction, *rps14* et *rps16*, présentent une accumulation des transcrits un peu moins élevée. Enfin, les gènes *rps18* et *accD* sont les transcrits les plus rares.

(a)

	PhoA	HPPD	GFP	psbA	atpH	rbcL	rps14	rps16	rps18	accD	ClpP
plante WT	BF	BF	BF	2,3	9	5,6	11	11,1	15,5	12,5	10,2
plante PhoA-S	4	BF	BF	2,5	7,6	5,7	10,8	10,9	17,6	13,1	7,9
plante PhoA-L	4	BF	BF	1,8	9,8	5,7	11,4	9,9	15,5	15,5	8,4
plante HPPD	BF	3,5	BF	2,1	9,5	5,5	12,1	11,2	14,5	11,3	9,1
plante GFP	BF	BF	4,1	1,3	9,8	5,1	10,9	11,1	15,7	13	9,7

(b)

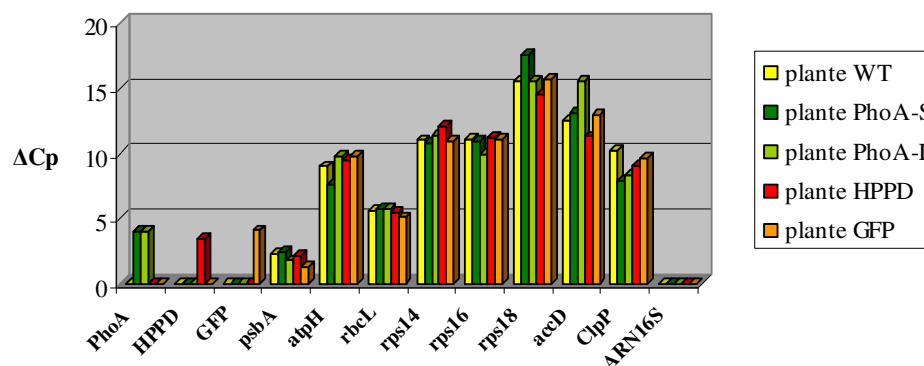


Figure III. 7 : Analyse des transcrits plastidiaux par RT-qPCR.

(a) Tableau des valeurs obtenues pour les ΔCp (Crossing point du gène cible/crossing point du gène contrôle endogène ARN16S), (b) Représentation graphique des ΔCp . BF est le bruit de fond correspondant à une amplification obtenue pour plus de 20 cycles.

Ces différences dans le niveau d'expression des classes de gènes transcrits sont indépendantes de la transformation des génomes plastidiaux. En effet, le profil d'expression des gènes endogènes de tabac sauvage ne diffère pas, ou très peu, de celui des gènes endogènes des différentes plantes transplastomiques analysées ($\Delta C_p \leq 2$). Les différences minimales entre le niveau d'expression de certains gènes endogènes qui peuvent être observées dans certains cas ne sont sans doute pas significatives. L'expression des gènes *accD* et *rbcL* entre lesquels sont insérés les transgènes ne semble pas perturbée. Par ailleurs, il faut noter que *PhoA-S*, *PhoA-L* et *HPPD* sont sous le contrôle du promoteur *pPsbA* mais que le niveau de transcription du gène *psbA* endogène change peu. Il n'y a donc pas non plus de compétition visible pour ce promoteur ou de perturbation de la stabilité des transcrits *psbA*. De plus, aucune différence notable entre les lignées n'est observée pour les gènes transcrits par la PEP ou par la NEP. Toutefois, on remarque de façon prévisible que les gènes transcrits exclusivement par la NEP montrent un niveau d'accumulation plus faible (*accD*, *rps18*) que ceux transcrits par la PEP. Les transcrits de la grande sous-unité de la Rubisco (*rbcL*) montrent une accumulation élevée qui ne varie pas d'une plante à l'autre contrairement à ce qui a été observé pour leur profil protéique sur gel monodimensionnel. On ne peut donc faire aucune conclusion concernant l'accumulation des protéines dans les plantes en regard de nos résultats, mais on peut tout de même affirmer qu'il n'y a aucune différence dans la transcription des divers gènes chloroplastiques étudiés entre les différentes lignées. Il conviendrait de compléter cette analyse des transcrits par une quantification de quelques ARN codés par le génome nucléaire et dont les protéines sont exportées dans les chloroplastes.

Si la surexpression de transgènes ne semble pas perturber le niveau des ARN endogènes du plaste, en est-il de même au niveau protéique ?

3. ETUDE PROTEOMIQUE DES PLANTES TRANSPLASTOMIQUES

L'analyse du protéome des feuilles de tabac a été entreprise après séparation en gel 2D. Cette étude protéomique découle des premières observations effectuées, lors de la mise en évidence de l'accumulation des protéines recombinantes en gel SDS-PAGE monodimensionnel, révélant une baisse des sous-unités de la Rubisco dans les lignées transgéniques exprimant fortement les protéines recombinantes (Figure III.3). D'Autres protéines sont elles également affectées ? A notre connaissance, ce sont les premiers résultats de protéomique basés sur des gels bidimensionnels obtenus pour des feuilles de tabac. Les analyses ont été effectuées à partir de protéines extraites sur le même matériel (feuilles matures) que pour l'étude des transcrits. Les protéines solubles totales de chaque échantillon ont été séparées par électrophorèse en deux dimensions (Figure III.8).

L'accumulation des protéines recombinantes est très importante, notamment pour la GFP et l'HPPD qui atteignent des niveaux supérieurs à celui de PhoA-L. Excepté pour l'HPPD, toutes les protéines recombinantes apparaissent sous la forme de spots multiples, résultat de modifications post-traductionnelles non expliquées (Bally *et al.*, 2008). Les colorations ont été effectuées avec le nitrate d'argent. Bien que ce colorant soit réputé pour son défaut de linéarité (c'est-à-dire que les spots les plus fortement accumulés sont sous-estimés car saturés) nous l'avons utilisé pour révéler les protéines mineures du protéome. Ainsi, cela nous a permis d'analyser de manière plus approfondie l'impact de la transgénèse sur diverses classes de protéines des feuilles.

Après comparaison visuelle des gels, des cartes protéiques ont donc pu être réalisées à partir de trois gels préparatifs différents effectués avec trois extraits protéiques indépendants provenant de chaque lignée. Des spots appartenant aux différentes protéines observables sur les gels ont été analysés par spectrométrie de masse (Figure III.9 ; Annexe 3). Parmi l'ensemble de ces 179 spots analysés, la majorité donne une identification multiple (identification de deux protéines ou plus), 39 spots sont associés de façon non ambiguë à des protéines uniques et 71 spots n'ont permis aucune identification. Environ 65% des spots identifiés représentent des protéines chloroplastiques dont 12 contiennent des protéines codées par le génome plastidial (correspondant à *rbcL*, les protéines D2 et 44kD du PSII ou encore le cytochrome f). Les autres spots identifiés correspondent pour 10% à des protéines mitochondriales, 4% à des protéines sécrétées et 21% à des protéines de localisation cytosolique et 12 spots aux protéines

recombinantes. Seuls les spots associés à des protéines uniques (regroupant des protéines de chaque catégorie) ont été soumis à une étude densitométrique par l'intermédiaire du logiciel Image Master 2D. Les 39 protéines étudiées ont été classées selon les fonctions du métabolisme dans lesquelles elles sont impliquées ou selon leur nature (Tableaux III.1 et III.2).

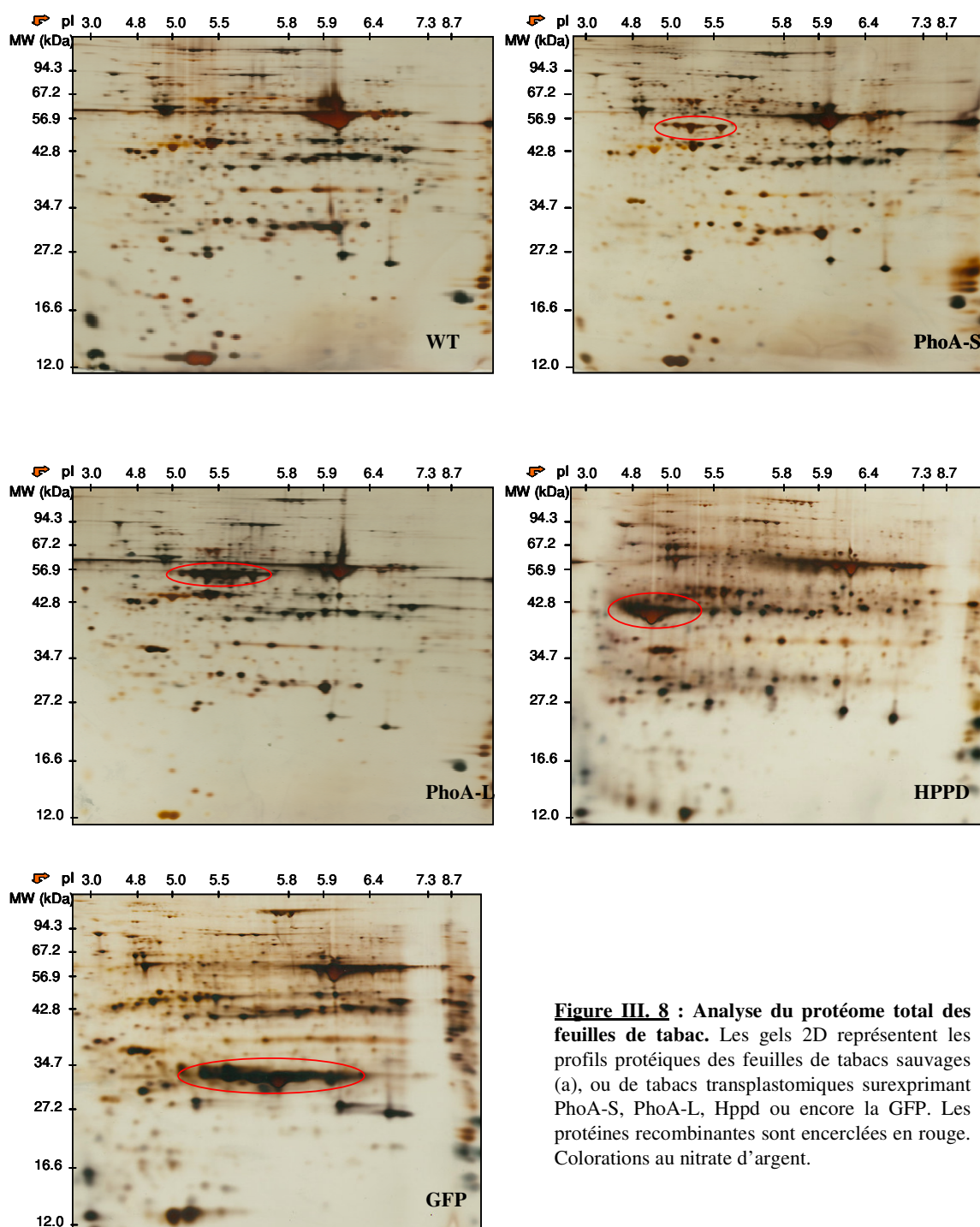


Figure III. 8 : Analyse du protéome total des feuilles de tabac. Les gels 2D représentent les profils protéiques des feuilles de tabacs sauvages (a), ou de tabacs transplastomiques surexprimant PhoA-S, PhoA-L, Hppd ou encore la GFP. Les protéines recombinantes sont encadrées en rouge. Colorations au nitrate d'argent.

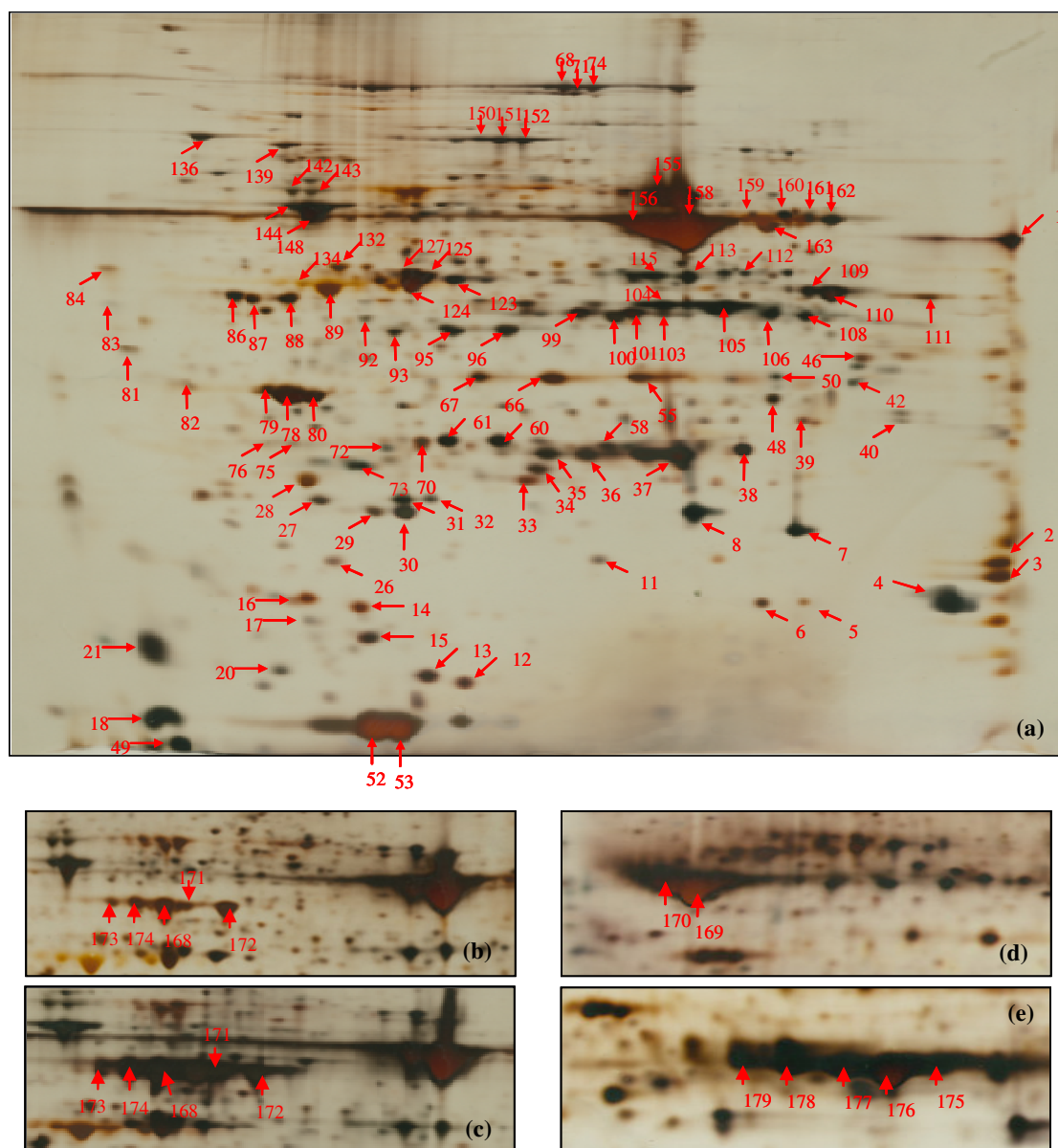


Figure III. 9 : Spots analysés par spectrométrie de masse. Les gels 2D représentent les profils protéiques des feuilles de tabacs sauvages (a), ou de tabacs transplastomiques surexprimant PhoA-S (b), PhoA-L (c), Hppd (d) ou encore la GFP (e). La liste des protéines identifiées est présentée en annexe (.3)

L'accumulation **des protéines recombinantes** a été examinée après séparation par électrophorèse bidimensionnelle (Figure III.9). Les spots soumis à une analyse densitométrique correspondant aux protéines recombinantes illustrent une nouvelle fois l'accumulation massive de ces protéines, en particulier pour l'HPPD. Les spots 171, 172, 173, 174 et 168 correspondent aux spots observés pour les trains de protéines recombinantes PhoA-S ou PhoA-L (Figure III.9, b et c). La quantification relative de ces spots valide la différence de niveau d'accumulation

entre les deux phosphatases recombinantes (Tableau III.1). La protéine HPPD, spot 169, montre un niveau d'accumulation supérieur à toutes les autres protéines sous la forme d'un spot unique (Figure III.9, d et Tableau III.1). Seulement trois spots pour la protéine GFP ont été quantifiés, spots 175, 176 et 178 (Figure III.9 e et Tableau III.1).

	spot	Description	WT ±	PhoA-S ±	PhoA-L ±	HPPD ±	GFP ±
Phosphatase alcaline	172	Alkaline phosphatase precursor[<i>Escherichia coli</i>]	6 1	1137 158	1402 375	13 3	9 0
	171	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i>]	3 1	250 12	3412 654	9 1	9 3
	173	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i>]	5 2	266 26	1227 340	9 2	8 3
	174	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i>]	4 1	496 99	635 /	7 1	8 7
	168	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i>]	6 3	756 265	1378 295	8 2	7 6
HPPD	169	Crystal Structure of HPDD [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	8 7	8 1	12 7	6424 825	14 12
GFP	176	Green Fluorescent Protein [<i>Aequorea victoria</i>]	3 0	11 2	12 6	14 8	3144 228
	178	Green Fluorescent Protein [<i>Aequorea victoria</i>]	18 11	32 18	22 8	31 17	1600 302
	175	Green Fluorescent Protein [<i>Aequorea victoria</i>]	147 48	234 4	189 107	44 6	1214 274

Tableau III.1 : Quantification des protéines recombinantes, cartographiées par spectrométrie de masse.

La majorité des autres protéines identifiées par spectrométrie et ayant fait l'objet d'une quantification sont des **protéines impliquées dans la photosynthèse** (Tableau III.2). Pour celles-ci, la quantification montre parfois une diminution ou une augmentation de la valeur moyenne mais qui ne dépasse pas, généralement, un facteur deux ou trois. Il n'y a pas une tendance générale dans le profil de ces variations. Ces résultats sont compatibles avec le phénotype normal des plantes transplastomiques, identique à celui d'un tabac non transformé.

Des résultats semblables ont été obtenus pour les autres protéines chloroplastiques (spots 127, 83, 93, et 3, tableau III.2). En revanche des variations plus importantes ont été mises en évidence pour les **protéines impliquées dans le stress oxydatif**, telles que la peroxydase ou encore une superoxyde dismutase, (Tableau III.2, spots 11, 42, 24 et 32). Les enzymes semblent le plus souvent fortement induites, parfois plus de dix fois, notamment dans les lignées exprimant la GFP ou l'HPPD. Ceci traduirait l'existence de stress oxydant généré par l'expression du transgène.

Les profils des quantités relatives des sous-unités de **la Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase – oxygénase)** et de **la Rubisco activase** montrent des variations très importantes

(spots 89, 52, 53, 158 et 156, tableau III.2). La Rubisco activase est responsable de l'activation de la Rubisco favorisant la réaction de carbamylation. Elle semble fortement sous accumulée dans le cas de plantes surexprimant l'HPPD. La quantité relative de 1245 dans les plantes sauvages diminue d'un facteur 3 pour atteindre 395 dans ces plantes transplastomiques. Cette diminution coïncide avec la disparition presque totale d'une des petites sous-unités de la Rubisco pour laquelle la quantité relative n'est que de 4 (spot 53 Tableau III.2). Les petites sous-unités de la Rubisco sont codées par le génome nucléaire et leur assemblage avec les grandes sous-unités catalytiques, codées par le génome chloroplastique, a lieu au sein du chloroplaste. La disparition presque totale d'une des petites sous-unités (spot 53 Tableau III.2) pourrait être le résultat d'un rétrocontrôle du plaste au noyau ou d'une dégradation spécifique de cette protéine lorsqu'elle arrive au niveau du plaste. Ce phénomène ne survient que dans le cas des plantes surexprimant l'HPPD. Hormis cette disparition, le profil protéique général de la Rubisco (petites et grandes sous-unités) a tendance à diminuer pour toutes les plantes transplastomiques, confirmant ainsi nos premiers résultats en SDS-PAGE monodimensionnel (Figure III.3), et ce malgré le problème de saturation des spots fortement accumulés rencontré avec le nitrate d'argent. Pour la petite sous-unité, cette diminution est très forte au niveau des plantes transformées par l'HPPD et par PhoA-L : leur quantification relative totale montre une diminution allant de 5920 dans le cas des plantes sauvages à 2338 et 2788 respectivement (somme des spots 52 et 53, Tableau III.2). La diminution de la grande sous-unité est accrue pour les plantes transformées par la GFP et l'HPPD : leur valeur relative totale obtenue passe de 9291 à 6261 et 4533 respectivement (somme des spots 156 et 158, Tableau III.2). Ces résultats semblent donc indiquer que les protéines recombinantes interfèrent avec le métabolisme de la plante et notamment de la Rubisco.

	spot	Description	WT ±	PhoA-S ±	PhoA-L ±	HPPD ±	GFP ±
Photosynthèse	78	Oxygen-evolving enhancer protein 1, OEE1 (photosystem II) [Nicotiana tabacum]	1175 40	559 44	981 184	479 70	1135 143
	36	beta-carbonic anhydrase [Nicotiana tabacum]	164 13	667 12	243 22	298 44	392 41
	37	beta-carbonic anhydrase [Nicotiana tabacum]	1896 98	1095 182	1535 632	661 86	1200 70
	60	beta-carbonic anhydrase [Nicotiana tabacum]	390 26	711 31	198 66	104 8	101 19
	61	beta-carbonic anhydrase [Nicotiana tabacum]	362 74	657 20	483 25	153 13	38 9
	113	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplast precursor (NADP-dependent) [Nicotiana tabacum]	223 11	264 32	204 69	219 27	439 63
	104	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor (NADP-dependent) [Nicotiana tabacum]	1245 48	667 42	1327 121	395 26	1085 110
	143	ATP synthase subunit alpha (F1 sector) [Nicotiana tabacum]	197 22	213 12	220 24	366 85	282 34
	144	ATP synthase CF1 beta subunit [Nicotiana sylvestris]	122 5	84 1	222 36	237 21	105 7
	148	ATP synthase CF1 beta subunit [Nicotiana sylvestris]	2455 117	1341 124	2010 86	1799 229	1156 72
	34	Ribulose-phosphate 3-epimerase, chloroplast precursor (Pentose-5-phosphate 3-epimerase)	475 32	736 42	997 97	1552 308	1613 184
Stress oxydant	11	peroxiredoxine	4 1	60 6	17 9	4 1	13 4
	42	Peroxidase [Nicotiana tabacum]	71 12	172 16	185 22	632 13	53 14
	24	thioredoxin peroxidase [Nicotiana tabacum]	53 6	96 9	215 33	275 29	693 52
	32	superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (Fe)-curled-leaved tobacco [Nicotiana plumbaginifolia]	33 6	279 23	167 33	298 76	25 9
Rubisco	89	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplast precursor [Nicotiana tabacum]	1245 48	667 42	1327 121	395 26	1085 110
	53	Putative ribulose biphosphate carboxylase small subunit protein precursor [Nicotiana tabacum]	4359 325	2124 9	1052 216	4 1	2447 213
	52	Putative ribulose biphosphate carboxylase small subunit protein precursor [Nicotiana tabacum]	1561 173	1828 358	1286 128	2784 182	2245 281
		total PSU	5920	3952	2338	2788	4692
	158	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor [Nicotiana acuminata]	5962 576	5536 810	5516 409	1820 168	3883 575
	156	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Nicotiana tabacum]	3329 404	2247 252	2765 312	2713 270	2378 467
		total GSU	9291	7783	8282	4533	6261
Autres protéines chloroplastiques	127	chloroplast elongation factor TuB (EF-TuB) [Nicotiana sylvestris]	108 6	150 8	258 60	146 33	69 8
	83	plastid fibrillin 2	250 19	100 3	114 10	24 4	160 32
	93	plastidic aldolase [Nicotiana paniculata]	45 5	122 40	119 36	9 5	235 53
	3	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor (PSI-D) [Nicotiana sylvestris]	346 61	217 33	299 218	105 26	7 4
Divers...	84	ankyrin-repeat protein HBPI [Nicotiana tabacum]	164 6	175 20	250 104	10 1	236 10
	110	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (Glycine cleavage system T protein) (GCVT) [Solanum tuberosum]	1235 88	642 33	649 398	678 71	342 76
	76	cysteine protease [Nicotiana tabacum]	558 34	256 61	478 473	227 33	801 55
	33	Proteasome subunit beta	61 93	72 5	446 23	7 2	166 12

Tableau III.2 : Quantification des protéines de feuilles de tabac cartographiées par spectrométrie de masse.

4. LA RUBISCO

La Rubisco est une protéine capitale pour la plante. La perte de la Rubisco est concomitante avec une diminution de la fixation photosynthétique de carbone qui pourrait être fatale. Les premières analyses effectuées ont mis en évidence des modifications dans le profil de la Rubisco, mais il semble pourtant n'y avoir aucune répercussion sur le phénotype de la plante. Il est cependant difficile de quantifier une protéine aussi abondante notamment sur gel coloré à l'argent. La saturation des protéines qui nous intéresse est très vite observée. Une autre méthode de coloration permettant d'éviter cela a donc été employée pour étudier l'accumulation de la Rubisco par rapport à celles des protéines recombinantes fortement exprimées. Des expériences supplémentaires ont été entreprises afin de caractériser ces modifications et de comprendre les mécanismes qui peuvent palier à la diminution de cette protéine dans les plantes transplastomiques.

Dans un premier temps nous avons précisé les résultats obtenus lors des quantifications précédentes en utilisant une méthode de coloration des protéines permettant d'éviter une possible saturation des spots correspondant aux protéines ayant un haut niveau d'accumulation (cas des protéines recombinantes et de la Rubisco) lors de la coloration des gels bidimensionnels à l'argent. Une nouvelle série de gels 2D a donc été réalisée avec les mêmes échantillons, puis ces gels ont été colorés au bleu de Coomassie colloïdal, un colorant qui permet une révélation rapide, et qui, bien que moins sensible que le nitrate d'argent, est plus linéaire en concentration. Les protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle ont été analysées et de nouveau soumises à une étude densitométrique par l'intermédiaire du logiciel Image Master 2D. Seuls les profils protéiques des plantes transplastomiques ont été utilisés pour cette étude. Une dizaine de protéines (indiquées par des flèches noires, Figure III. 10 a) dont le profil est constant sur chacun des gels réalisés ont été quantifiées de façon à permettre une analyse se rapportant à une valeur fixe. La densité des protéines recombinantes et des différentes sous-unités de la Rubisco (encerclées sur la figure en rouge et orange / jaune respectivement) a ensuite été quantifiée et normalisée par rapport aux résultats obtenus avec ces protéines constantes prises comme références (Figure III.10 b et c).

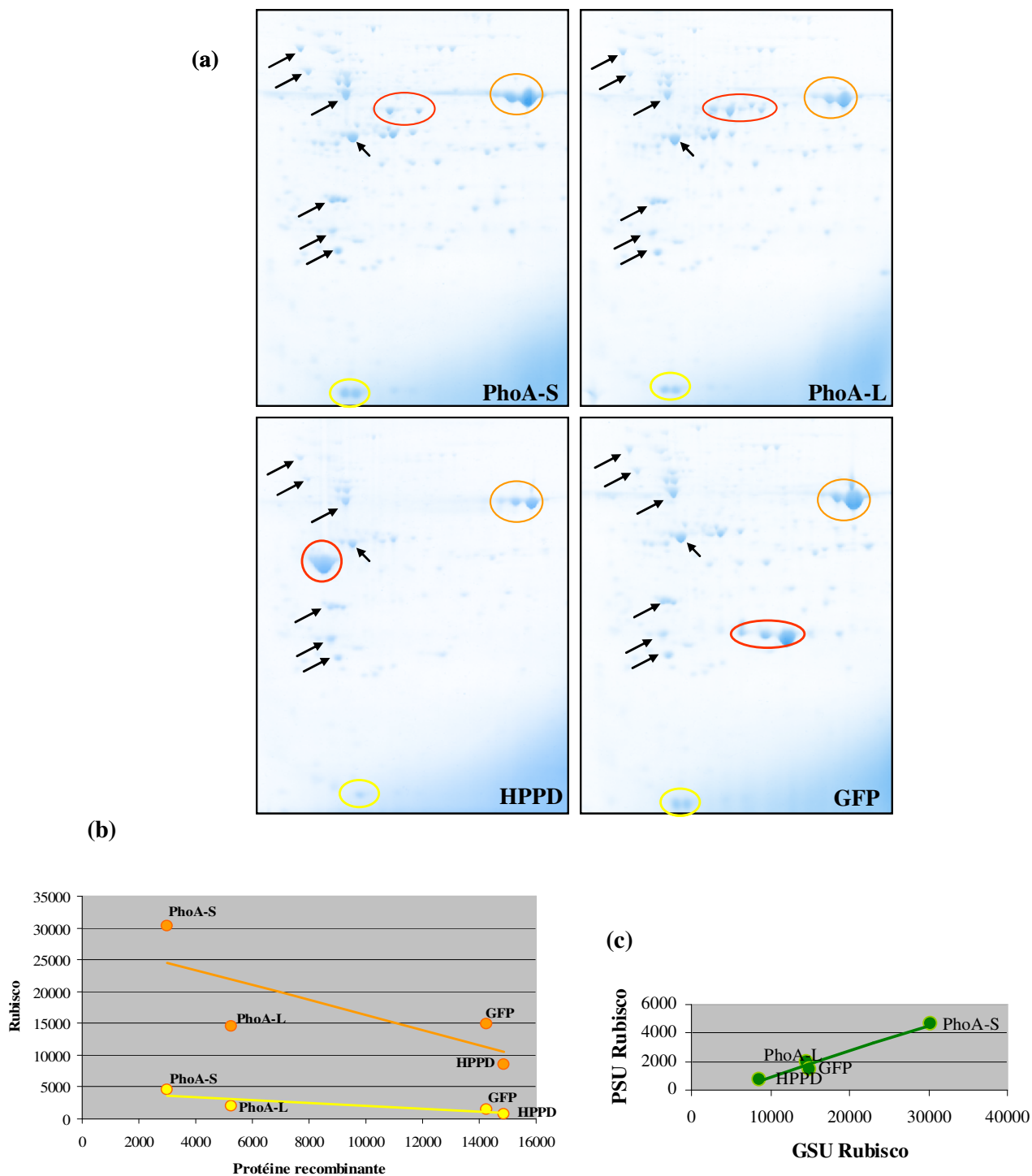


Figure III.10 : Quantification relative de la Rubisco dans les lignées transplastomiques.

(a) Gels 2D colorés au bleu de Coomassie représentant les profils protéiques des feuilles de tabacs transplastomiques exprimant PhoA-S, PhoA-L, HPPD ou GFP. Les protéines recombinantes sont encadrées en rouge, la petite sous-unité de la Rubisco est encadrée en jaune et la grande sous-unité de la Rubisco en orange. Les protéines témoins ayant servi à la quantification sont indiquées par des flèches. (b) Graphique représentant la quantité relative de la Rubisco (grande sous-unité en orange et petite sous-unité en jaune) en fonction de la quantité relative de la protéine recombinante. (c) Graphique représentant la quantité relative de la grande sous-unité de la Rubisco (GSU) en fonction de la quantité relative de la petite sous-unité de la Rubisco (PSU) selon la protéine recombinante exprimée dans la plante transformée.

Les graphiques montrent une diminution des petites et grandes sous-unités de la Rubisco proportionnellement à l'augmentation de la protéine recombinante. Les sous-unités de l'enzyme varient ensemble, c'est-à-dire qu'une diminution des valeurs moyennes de la grande sous-unité s'accompagne d'une diminution des valeurs moyennes de la petite sous-unité. Il est clair à nouveau que l'accumulation des deux sous-unités de la Rubisco est impactée par l'accumulation des protéines recombinantes. Cependant, les plantes n'ont pas de phénotype visible. Il a été montré au cours d'études antérieures que la réduction de la Rubisco de 40% a un très faible effet sur le taux de croissance des plantes et leur phénotype (Quick *et al.*, 1991b). Les plantes dont la Rubisco diminue sont capables de compenser en activant totalement le reste de l'enzyme, typiquement, seulement 50 à 60 % de la protéine est activé chez les plantes sauvages. Il semble donc y avoir des phénomènes de compensation de la perte de Rubisco au sein de la plante.

5. CONDITIONS DE CARENCE EN AZOTE

Les plantes acquièrent leur azote à partir du sol sous la forme de nitrate qui est converti en ammonium par l'action de réduction séquentielle de la nitrate et de la nitrite réductase (Miflin et Lea, 1980). La production de grandes quantités de Rubisco requiert un investissement considérable en azote. Dans de telles conditions, on peut s'interroger sur la synthèse de cette protéine en conditions de carence en azote lorsque la plante considérée accumule une protéine recombinante en masse comme c'est le cas dans nos plantes transplastomiques. Comment s'effectue alors l'allocation des ressources entre les protéines résidentes et les protéines recombinantes ?

Pour analyser les différentes informations obtenues dans les études précédentes et obtenir des données supplémentaires sur les mécanismes qui permettent de conserver un phénotype sauvage des plantes, elles ont été soumises à un test de carence en azote.

Une centaine de graines par lignée transplastomique et sauvage (PBD6) ont été semées en terre dans nos conditions normales de culture en serre. Les graines ont germé et donné des plantules. Pour chaque lignée, trois semaines après le semis, quatre séries de douze plantes ont été déterrées, lavées, repiquées dans des pots de vermiculite, et irriguées tous les trois jours à l'aide de solutions nutritives identiques mais de concentrations de nitrate d'ammonium différentes : 0 mM (condition 1), 0.2 mM (condition 2), 2 mM (condition 3) et 20 mM (condition 4). Le nitrate d'ammonium constituant la seule source d'azote.

Cinq jours déjà après repiquage, les plantes carencées en azote (conditions 1 et 2 notamment) montrent un développement plus lent que les plantes supplémentées avec du nitrate d'ammonium (Figure III.11 a). Cette différence de croissance a pu être clairement observée au bout de cinq semaines (Figure III.11 b). A ce stade, les plantes privées d'azote se sont à peine développées et ont pâli (Figure III.11 b, 1 et 2). Lorsqu'une source d'azote est ajoutée le développement des feuilles et la taille de la plante augmentent (Figure III.11 b, 3 et 4). Quelle que soit la dose d'azote fournie, aucune différence de croissance n'a été constatée entre les différentes lignées (sauvage et transplastomiques).



Figure III. 11 : Tabacs transplastomiques et sauvages carencés ou non en azote et traités avec une solution nutritive supplémentée avec 0 mM (1), 0.2 mM (2), 2 mM (3) et 20mM (4) de nitrate d'ammonium, 5 jours (a) et 5 semaines (b) après traitement.

Les protéines des feuilles de tabacs soumis aux différentes concentrations de source azotée ont été extraites et séparées par SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie (Figure III.12). Le niveau des deux sous-unités de la Rubisco semble proportionnellement plus faible pour les protéines extraites de feuilles de tabacs carencés en azote (Figure III.12 WT 1, 2 et 3). Cette tendance est exacerbée dans les tabacs transplastomiques, alors que l'accumulation des protéines recombinantes ne semble pas être affectée par la carence en azote. Le profil

d'expression de ces protéines recombinantes est assez stable. Dans ces conditions, la Rubisco est synthétisée en moindres quantités ou préférentiellement métabolisée pour servir de source d'azote à la plante indépendamment du fait que celle-ci soit transformée ou sauvage. Pour une concentration d'azote élevée (20 mM, Figure III.12 WT, 4), la Rubisco est fortement accumulée. Dans les plantes transplastomiques accumulant fortement les protéines recombinantes, le haut niveau d'expression des deux sous-unités n'est cependant pas totalement restitué (Figure III.12 HPPD, 4).

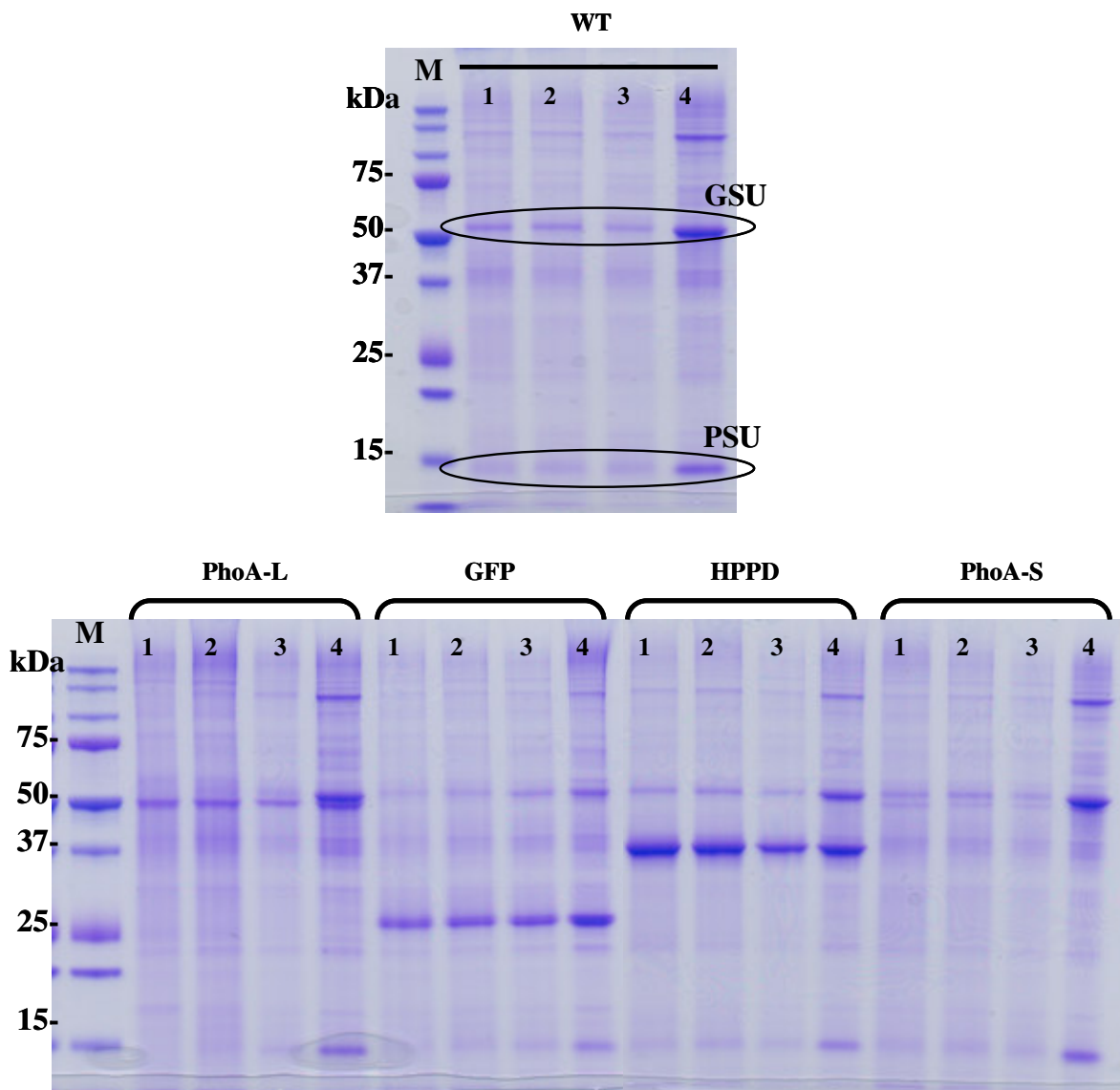


Figure III. 12 : Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie représentant les profils protéiques des feuilles de tabacs sauvages (WT) ou transplastomiques (PhoA-S, PhoA-L, GFP et HPPD) traités avec 0 mM (1), 0.2 mM (2), 2 mM (3) et 20 mM (4) de nitrate d'ammonium.

Les protéines ont été déposées à des concentrations identiques de 20 µg pour chacun des échantillons. GSU, grande sous-unité de la Rubisco ; PSU, petite sous-unité de la Rubisco.

En conditions de carence en azote, la protéine recombinante (PhoA-L, HPPD ou GFP) devient la protéine la plus abondante de la cellule végétale ; il y a donc conservation de l'intégrité de ces protéines recombinantes au dépend des autres protéines et notamment de la Rubisco.

6. ANALYSES PHENOTYPIQUES ET BIOCHIMIQUES DE LA GERMINATION

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que dans nos conditions, l'accumulation importante d'une protéine recombinante dans une plante n'a pas d'influence notable sur son phénotype, même lorsque celle-ci est cultivée en condition de carence azotée. Nos résultats suggèrent que la production massive de protéine recombinante est permise car les plastes disposent d'un « tampon » pour la synthèse de protéines. Celui-ci est la Rubisco, la protéine la plus importante de la biosphère et procure à la plante une réserve d'acides aminés lui permettant de pallier à des demandes particulières et ainsi d'assurer l'homéostasie des protéines. Ceci n'avait cependant jamais été démontré dans une plante transgénique. En revanche, il est connu que lors de la sénescence des feuilles, qui est une mort programmée, les protéines de ces feuilles sont dégradées par des protéases et l'azote est remobilisé pour la maturation des graines, notamment pour la constitution des protéines de réserve qui serviront à la mise en place d'une nouvelle plantule après germination. L'exportation de l'azote foliaire devient particulièrement importante. Le besoin des graines en azote est tel qu'il ne peut être satisfait par la seule absorption dans le sol. L'azote additionnel doit provenir des organes végétatifs et notamment des feuilles. La Rubisco est alors utilisée comme source d'azote (Matile, 1992). Il se pourrait que la diminution de la Rubisco observée dans les plantes transplastomiques entraîne une carence en azote chez les graines en formation. Nous avons donc évalué avec précision l'impact de la transformation chloroplastique sur la vigueur germinative et la composition protéique des graines.

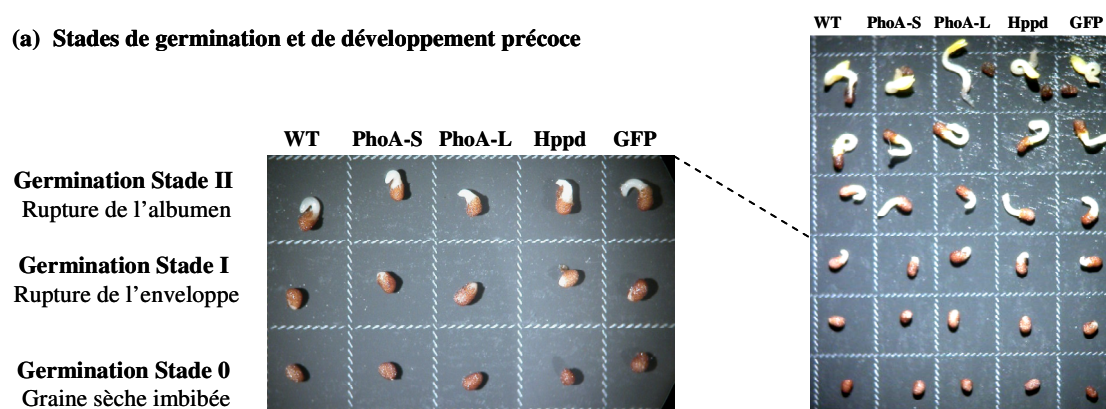
6.1 TEST DE GERMINATION

Les graines de tabacs sauvages ou transplastomiques ont été mises à germer à 25°C en présence d'eau, dans des boîtes de Pétri. La germination est classiquement décrite comme comportant trois phases de prise d'eau au cours desquelles la graine s'imbibe (phase 0), réinitie les processus métaboliques (phase 1) avant l'émergence de la radicule (phase 2). Les différents stades de germination ont pu être analysés.

Aucune différence de germination n'a été observée (Figure III. 13). Il semblerait que la germination d'une graine issue d'une plante transplastomique ne soit pas différente de celle

d'une graine issue d'un tabac non transformé. L'introduction d'un transgène dans le plastome d'une plante n'entraînerait donc pas de changements dans la cinétique de germination des graines. Ces tests, répétés à trois reprises, pour une centaine de graines de chaque lignée, ont donné à chaque fois le même résultat. Des conditions de germination différentes ont alors été testées (non montré), notamment des températures inférieures, de 4°C à 16°C et même dans des conditions extrêmes aucune différence dans la cinétique de germination n'a pu être décelée entre les graines de tabac sauvages et les graines de tabacs transformés.

(a) Stades de germination et de développement précoce



(b)

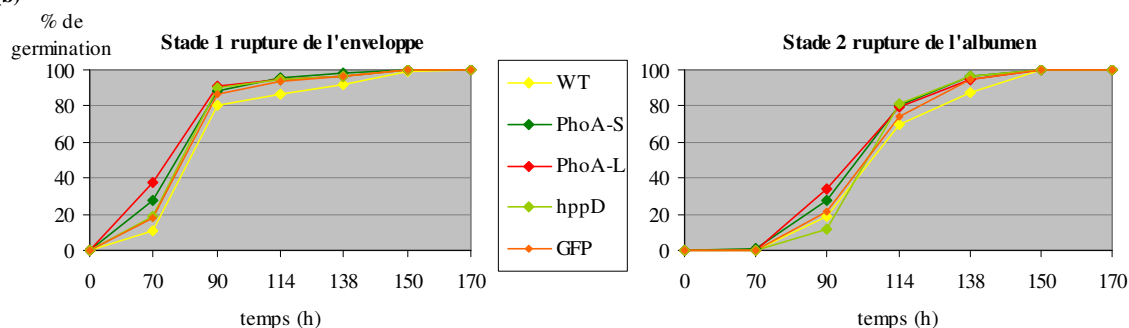


Figure III. 13 : Germination et développement des plantules de tabac sauvage et transformées.

(a) Analyse des différents stades de germination et (b) courbes de germination obtenues pour les deux stades de germination observés (rupture de l'enveloppe et rupture de l'albumen = apparition d'une vraie racicule).

6.2 ANALYSE PROTEOMIQUE

Selon la nomenclature d'Osborne (1924), il existe différentes classes de protéines dans les graines, et notamment des protéines de réserves majeures, qui peuvent être regroupées en fonction de leur solubilité : des albumines (essentiellement des enzymes) solubles dans l'eau,

des globulines solubles dans les solutions salines diluées, des prolamines solubles dans les mélanges eau-alcool et des glutélines solubles dans la soude. Les globulines sont les protéines de réserve des graines et n'ont pas d'autre rôle que de fournir les acides aminés nécessaires au redémarrage du métabolisme (Müntz 1998). Il est donc important d'analyser le contenu protéique des graines et notamment d'évaluer le profil des globulines car elles sont la forme principale des ressources nécessaires au développement des plantes.

L'analyse protéomique a été effectuée à deux niveaux : une première analyse du protéome total des graines de tabac sauvage ou transformés et une analyse protéomique des différentes classes de protéines contenues dans ces graines.

6.2.1 Analyse protéomique totale des graines de tabacs transplastomiques

Dans un premier temps, les protéines totales solubles ont été extraites à partir de graines matures sèches et analysées par électrophorèse bidimensionnelle afin de comparer leur profils.

Les rendements d'extraction des protéines préparées à partir des échantillons de graines de tabac sauvages et transplastomiques se sont avérés identiques, indiquant que la transformation du génome chloroplastique n'a pas d'effet évident sur le niveau total des protéines accumulées dans les graines matures sèches. Sur les gels obtenus à partir des extractions protéiques de graines issues de l'autofécondation des tabacs transformés, la protéine recombinante n'est pas détectée (Figure III.14 b, c, d et e) car les plastes des graines ne sont pas encore différenciés en chloroplastes et les promoteurs utilisés (*Ppsba* et *Pprrn*) sont peu fonctionnels.

Les profils protéiques révélés sur ces gels sont sensiblement identiques au profil obtenu pour l'extraction de graines issues de tabac sauvage (Figure III.14 a). Ces premières analyses semblent donc ne montrer aucune variation du profil des protéines des graines de tabac. Suite à ces résultats l'analyse du profil des protéines de graines de tabac sauvages et de tabac transplastomique a été envisagée. Pour cela, nous avons procédé à des analyses plus développées en étudiant les profils protéiques des différentes classes de protéines de graines séparément.

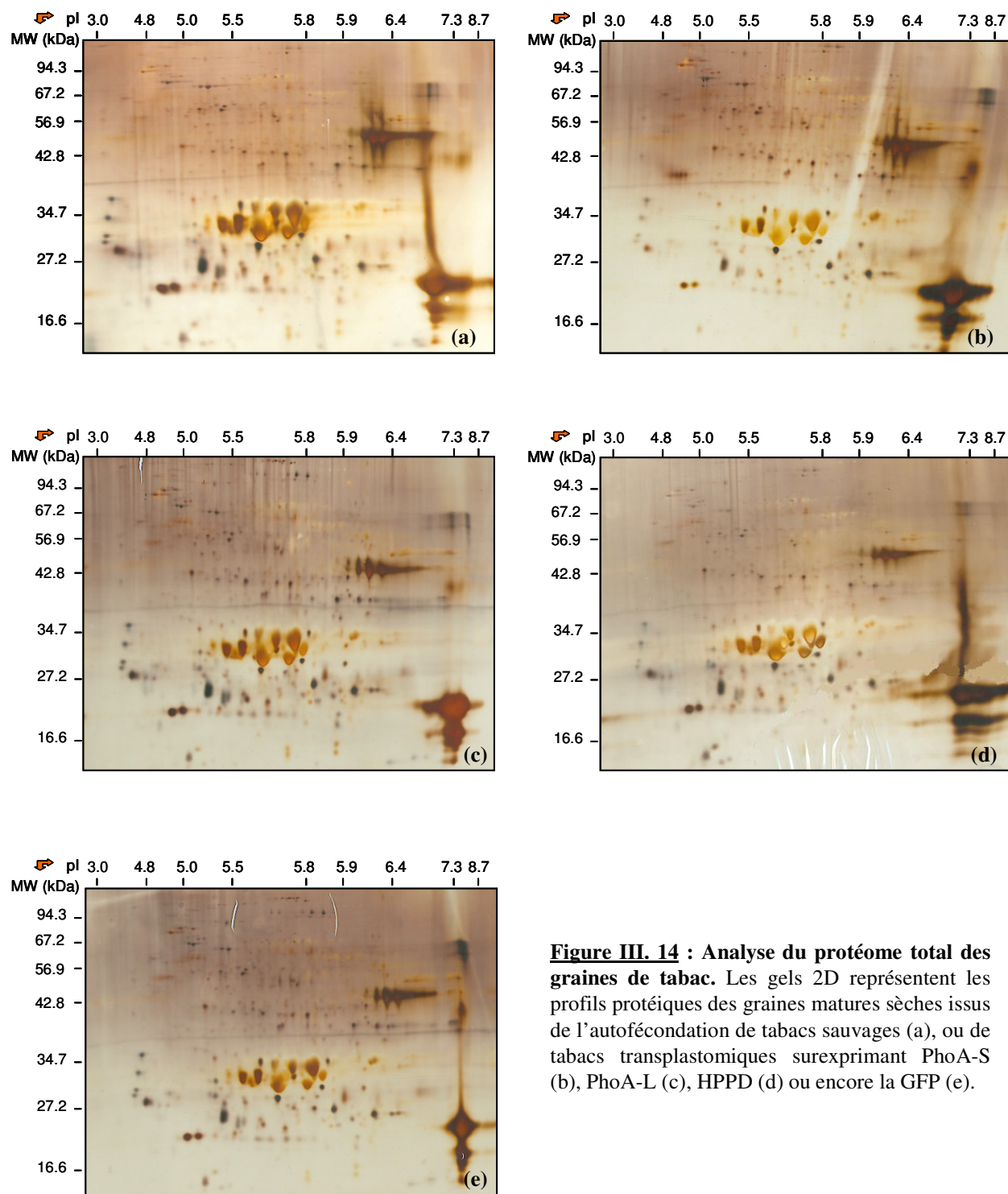


Figure III. 14 : Analyse du protéome total des graines de tabac. Les gels 2D représentent les profils protéiques des graines matures sèches issus de l'autofécondation de tabacs sauvages (a), ou de tabacs transplastomiques surexprimant PhoA-S (b), PhoA-L (c), HPPD (d) ou encore la GFP (e).

6.2.2 Analyse protéomique séquentielle des graines de tabacs transplastomiques

Une analyse protéomique a été entreprise pour la fraction des globulines, des albumines et des glutélines (Figure III. 15). Une extraction différentielle des protéines a ainsi été effectuée pour séparer les protéines selon leur classe afin de pouvoir analyser leur profil protéique en gel bi-dimensionnel. L'extraction des prolamines n'a pas été observée, en accord avec la littérature indiquant que cette classe de protéines de réserve n'est présente que chez les graines de céréales (Shewry, 1995). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III. 15. S'agissant des glutélines, le profil protéique montre une plus faible quantité de protéines. Encore une fois, aucune variation des protéines n'a été mise en évidence dans les différentes fractions analysées.

En conclusion, la diminution du profil de la Rubisco au sein des feuilles des plantes analysées, induite par l'accumulation massive des protéines recombinantes, n'a pas d'impact sur le développement des graines. Ces données sont en adéquations avec des études récentes concernant l'expression d'un inhibiteur de protéase dans des sojas transformés par *Agrobacterium*, et pour lesquels aucune modification de la composition protéique des graines, et de leur qualité nutritionnelle, n'a été mise en évidence (Livingstone *et al.*, 2007). Des mécanismes au sein de ces graines permettent un ajustement et une régulation de la composition et de la quantité de leurs protéines.

Les résultats obtenus quant à l'analyse des graines de tabacs montrant des profils protéiques semblables à ceux de tabacs non transformés, indiquent également que les protéines des plantes transgéniques et notamment la Rubisco et les protéines recombinantes sont régulées et remobilisées lors de la formation des graines.

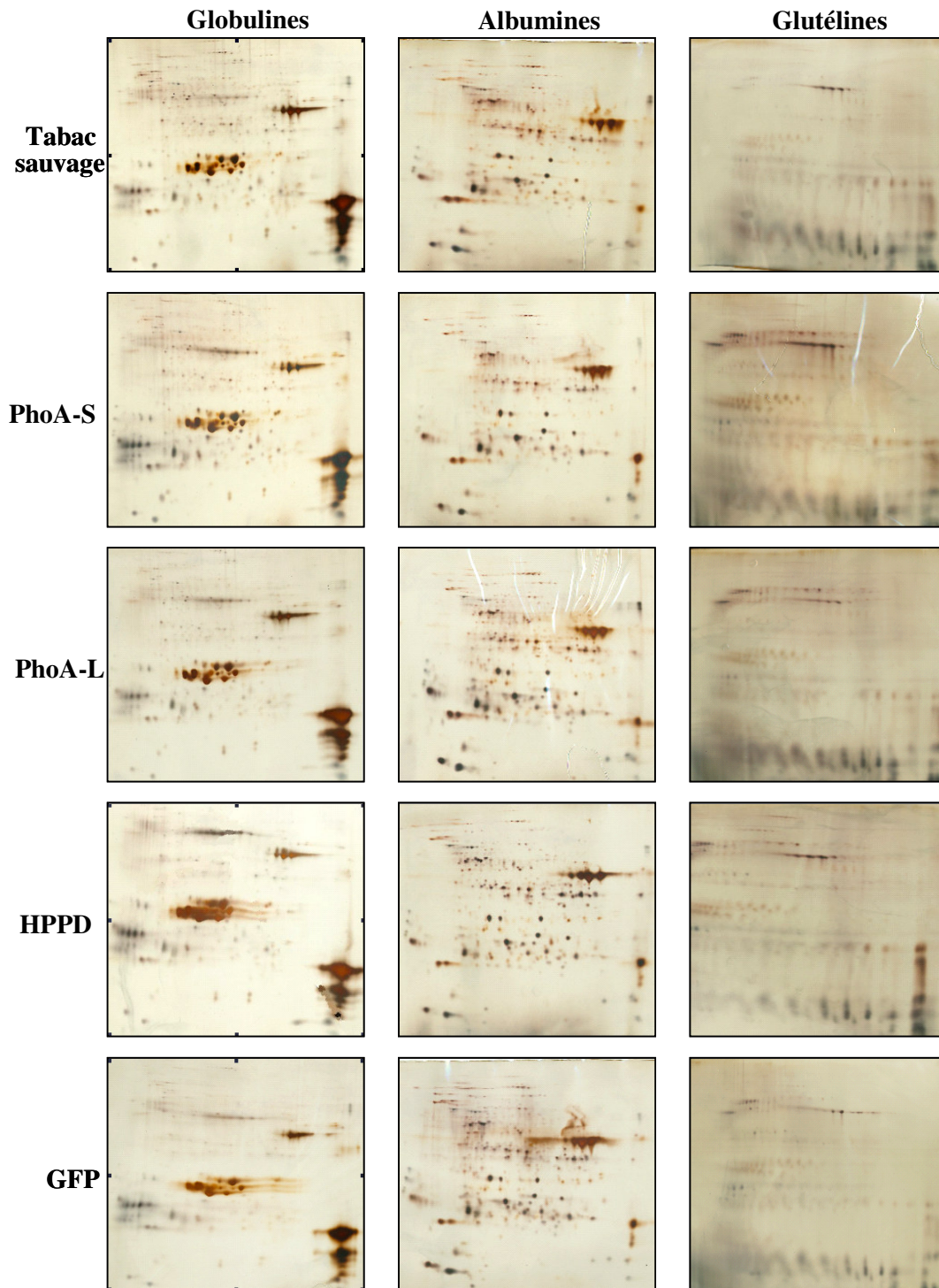


Figure III. 15 : Analyse protéomique des différentes classes de protéines de graines de tabac sauvages ou transformées.

7. DISCUSSION / CONCLUSION

Nous avons analysé des plantes transplastomiques accumulant fortement des protéines recombinantes afin de détecter d'éventuels effets de l'introduction d'un transgène dans le génome chloroplastique sur la composition, le métabolisme et la qualité des plantes. Une étude phénotypique a d'abord été réalisée pour comparer la croissance des plantes transformées par rapport à celui des plantes sauvages. Toutes les plantes observent le même développement. C'est seulement au moment de la floraison que la présence de fleurs blanches pour les tabacs accumulant la protéine HPPD a révélé une modification liée à la l'introduction d'un transgène dans le génome du plaste spécifique de cette lignée. Une telle modification n'a pas été observée sur les autres lignées.

Une analyse des transcrits de certains gènes plastidiaux et des transgènes a été réalisée et aucune différence significative n'a été mesurée entre les lignées sauvages et transplastomiques, indiquant que la transformation chloroplastique n'a pas d'incidence sur les mécanismes de transcription au sein du plaste. Cependant, ces analyses des transcrits devront être complétées avec celles d'autres gènes et notamment des gènes codés par le génome nucléaire et dont les protéines sont exportées au chloroplaste.

L'analyse comparative des protéines de feuilles de tabac, sauvages et transplastomiques, qui a suivi n'a montré que peu de variation pour des protéines de localisation chloroplastiques, ou d'autres protéines, impliquées dans des fonctions importantes du métabolisme de la cellule végétale. Les systèmes de traduction des plantes transplastomiques ne semblent donc pas être saturés par la synthèse massive d'une protéine exogène. En revanche, le niveau de la petite et de la grande sous-unité de Rubisco ou encore la Rubisco activase, varie fortement avec une tendance à diminuer dans les lignées transgéniques. La Rubisco étant l'enzyme majeure de la photosynthèse, il est alors surprenant que cette diminution ne se répercute pas sur le phénotype de la plante, sur sa photosynthèse ou encore sur sa croissance. Des études effectuées sur des plantes transformées ont montré que l'accumulation de la Rubisco pouvait être réduite jusqu'à 40% avant que le taux de la photosynthèse soit lui-même réduit significativement (Quick *et al.*, 1991a,b). Les plantes qui ont une diminution de la Rubisco sont capables de compenser cette déficience en activant le reste de l'enzyme ; typiquement, seulement 50 à 60 % de la protéine est activé chez les plantes sauvages. Il semble donc y avoir des phénomènes de compensation de la perte de Rubisco au sein de la plante et plus précisément du chloroplaste. La Rubisco constitue ainsi

une réserve d'acides aminés utilisables par la plante pour palier à des situations particulières que cette dernière peut rencontrer telle que des variations jour/nuit ou des limitations en azote du sol (Matt *et al.*, 2002). Il semblerait que dans notre cas la Rubisco joue un rôle de sources utilisées par la plante lorsque la synthèse d'une protéine recombinante est induite au sein du chloroplaste en grande quantité. Pour compléter ces données, des analyses de la composition en acides aminés des feuilles de tabac transplastomiques, soumis ou non à un stress de carence en azote, sont actuellement en cours. Une étude qualitative de ces plantes a également été initiée afin de déterminer d'éventuelles variations de leur quantité de protéines totales, ou encore de leur ratio glucides/lipides/protéines.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a été initié, en collaboration avec le laboratoire mixte CNRS/Bayer, au sein de l'équipe Bioscience, Bayer CropScience. Cette équipe porte ces efforts d'innovation sur l'expression de protéines d'intérêt thérapeutique dans les plantes par l'utilisation de la transformation plastidiale. C'est dans le cadre de cette thématique que le présent projet a été développé.

Il s'agissait dans un premier temps d'étudier le repliement de protéines recombinantes modèles dans le chloroplaste et plus précisément d'analyser les capacités de cet organelle pour la formation de ponts disulfures. Nous avons choisi pour cela la phosphatase alcaline bactérienne, une enzyme dont l'activité et la stabilité sont dépendantes de la formation de deux ponts disulfures intramoléculaire sur chacune de ses sous-unités. Le résultat de l'expression de cette enzyme était imprévisible, car dépendant du potentiel redox du chloroplaste et éventuellement de la présence de chaperonnes capables d'assister le repliement de la phosphatase. Des transformations de chloroplastes de tabac ont donc été effectuées avec les gènes codant la phosphatase alcaline, liée ou non à son peptide signal bactérien de type SEC. Il est connu que de nombreuses protéines sont adressées au lumen par un système de transport homologue au système SEC procaryotique. Nous avons émis l'hypothèse que le peptide signal de la phosphatase, ciblant efficacement le périplasme chez les bactéries, pourrait adresser la protéine au lumen des thylacoïdes. Ce compartiment cellulaire est très peu connu mais potentiellement propice à la formation des ponts disulfures. Des plantes transplastomiques exprimant une enzyme partiellement active dans le stroma des plastes ont été obtenues. Ceci illustre la capacité du plaste pour la mise en place de ponts disulfures dans les protéines recombinantes. Cependant le repliement de la phosphatase dans le stroma n'est pas optimal. Il pourrait être amélioré, par exemple à l'aide de protéines chaperonnes.

La fonctionnalité du peptide bactérien pour la sécrétion de protéines exogènes à travers les membranes des thylacoïdes a été validée. Cela a permis l'obtention de plantes transplastomiques montrant un niveau extraordinairement élevé de phosphatase alcaline sous une forme pleinement active au sein du lumen. Ce compartiment s'avèrerait donc plus approprié que le stroma pour la mise en place correcte des ponts disulfures au sein des protéines recombinantes. De ce point de vue, un parallèle peut être établi entre le lumen du chloroplaste et le périplasme des bactéries. Il serait cependant important de compléter ces analyses avec d'autres protéines recombinantes et dans des conditions physiologiques différentes. Il est connu que l'état redox au sein du chloroplaste varie avec les conditions de lumière. Il a été suggéré que le stroma, un compartiment réducteur lors de la photosynthèse,

deviendrait plus oxydant à l'obscurité, et que la régulation inverse affecterait le lumen des thylacoïdes (Buchanan et Luan, 2005).

De façon inattendue, une fraction importante de la phosphatase alcaline exprimée au sein du chloroplaste avec son peptide bactérien a été retrouvée au niveau du stroma. Ce phénomène n'a pas été observé dans le cas de l'aprotinine, une autre protéine recombinante contenant des ponts disulfures, également adressée au lumen des thylacoïdes (Tissot *et al.*, 2008). La totalité de l'aprotinine recombinante est accumulée dans le compartiment lumenal. Le niveau d'expression de cet inhibiteur de protéase est cependant bien plus faible (0,2 à 0,5% des protéines totales solubles) que celui de la phosphatase alcaline. Il se pourrait que la capacité du lumen soit limitante et que lors d'une forte expression du transgène, la relocalisation de la protéine recombinante au niveau du stroma devienne nécessaire. Pour l'expression de l'aprotinine, la stratégie d'adressage au lumen a fait usage de peptides signaux (de type SEC ou TAT) dérivés de gènes nucléaires d'*A. thaliana* dont les produits sont adressés vers les thylacoïdes, et non de peptides signaux bactériens. Le clivage de ces peptides lors du passage au niveau des thylacoïdes s'est avéré parfait, alors que celui de la phosphatase alcaline bactérienne survient six acides aminés avant le site normal chez *E. coli*. Bien que le système de sécrétion de type SEC bactérien soit fonctionnel pour le transport des protéines au lumen des thylacoïdes, il semblerait que des différences existent entre les deux machineries de sécrétion, concernant notamment le clivage. Un vecteur de transformation chloroplastique possédant la séquence codant pour la phosphatase alcaline liée à un peptide d'adressage de type TAT bactérien est en cours de réalisation afin d'étudier si, comme dans le cas de l'aprotinine, la phosphatase alcaline peut également être adressée dans le lumen par le système TAT, si le niveau d'expression est également important, et si le site de clivage observé est celui attendu. Ce type d'analyses a d'importantes implications biotechnologiques, en particulier pour la production dans les chloroplastes de protéines recombinantes dont le premier acide aminé n'est pas une méthionine. Elles compléteront nos données qui ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (EP06356090.8 Transplastomic Plants Expressing Lumen-Targeted Protein).

Nos travaux avec la phosphatase alcaline ne nous ont pas permis d'avoir accès à certaines informations importantes. Il était par exemple prévu de pouvoir déterminer au niveau moléculaire la présence ou l'absence des ponts disulfures grâce au blocage des groupements thiols libres avec différents composés (iodoacétamide, PEG-maléimide, mBBR), et de pouvoir différencier les formes réduites et oxydées de la phosphatase par des différences

de migration sur gel. Ceci nous aurait permis d'avoir une image instantanée des conditions redox du stroma et du lumen. Ce type d'expériences s'est cependant avéré plus difficile techniquement que prévu. De plus nos observations *in vivo* sont restreintes à la visualisation de l'activité phosphatase par colorimétrie sur disques foliaires de tabac. C'est pourquoi, pour étudier plus à fond les propriétés redox des différents compartiments du plaste, nous avons eu recours à une autre protéine modèle, permettant des observations directement *in planta*. Il s'agit de la roGFP, un marqueur visuel des variations redox. Les propriétés de cette GFP varient selon l'état d'oxydation de son environnement. Lors de la construction des vecteurs de transformation, le gène codant cette protéine a été placé sous le contrôle du promoteur plastidial fort de l'ARNr16S de maïs. Ce promoteur présente l'avantage d'être actif également dans les plastes non chlorophylliens, alors que dans le cas de la phosphatase alcaline, placée sous le contrôle du promoteur *psbA*, l'expression était limitée aux chloroplastes. L'évaluation de l'état redox pourra donc se faire dans tous les organes et tissus des plantes exprimant la roGFP. Des peptides d'adressage bactériens de type SEC et TAT ont été également ajoutés du côté N-terminal, pour adresser la protéine dans le lumen des thylacoïdes. Cette approche est prometteuse puisque nous avons mis en évidence *in vitro* et *in vivo* dans des souches bactériennes (présentant différents niveaux d'oxydation) des variations importantes de fluorescence de la roGFP recombinante. Cette étude a validé l'utilisation de la protéine comme indicateur des conditions redox de son environnement. Ce travail a été entrepris dans la dernière année de thèse et c'est pourquoi seuls des résultats préliminaires sont disponibles.

Des plantes transformées au niveau de leurs chloroplastes ont été générées. L'accumulation de la protéine dans les plastes a été étudiée dernièrement pour les lignées correspondant à la roGFP stromale et la version avec adressage TAT. Il semble que le niveau d'expression soit faible, et seule la roGFP lumenale a été détectée. Il se pourrait que la séquence codante que nous avons utilisée, correspondant de façon optimale à un usage de codons nucléaire, ne soit pas appropriée pour l'expression par le génome plastidial. Un recodage serait peut être judicieux. Nous ne savons pas non plus si la roGFP détectée est effectivement localisée comme attendu dans les thylacoïdes. Des analyses plus approfondies seront effectuées dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de L. Feldman de l'université de Californie. Nous pourrions profiter de leurs outils d'analyse microscopique déjà bien développés sur plantes (*A. thaliana*) exprimant la même GFP (Jiang *et al.*, 2006).

D'autre part, en vue des résultats obtenus dans cette première partie des travaux concernant la phosphatase alcaline, il semblerait que le repliement des protéines dans le

stroma ne soit pas optimal. Nous avons envisagé d'optimiser ce mécanisme. Ceci est d'autant plus important que la plupart des protéines d'intérêt produites par l'intermédiaire de la transformation chloroplastique sont localisées dans ce compartiment. Des tabacs ont été transformés par *Agrobacterium* avec les gènes *DsbA* ou *DsbC*, codant des protéines impliquées dans la formation et l'isomérisation des ponts disulfures chez les procaryotes. Nous avons fait en sorte que ces protéines chaperonnes soient adressées au chloroplaste par l'intermédiaire d'un peptide de transit (OTP). Des lignées transgéniques monolocus ont été fixées et la localisation chloroplastique des produits des deux transgènes a été démontrée. Des plantes homozygotes exprimant *DsbA* ou *DsbC* à différents niveaux ont été croisées comme parents mâles avec les tabacs transplastomiques générés précédemment pour la phosphatase alcaline. Aucun effet significatif n'a été constaté sur l'accumulation ou l'activité de l'enzyme stromale. Il serait nécessaire, dans une prochaine étape, de vérifier que les protéines *DsbA* et *DsbC* sont actives dans le chloroplaste, cet organe pouvant potentiellement avoir un potentiel redox défavorable à leur activité. Il est aussi envisageable que l'absence des partenaires bactériens habituels de ces enzymes (*DsbB* et *DsbD*) ne soit pas compensée par les thiorédoxines ou protéines disulfide isomérases résidentes du plaste (Kim et Mayfield, 2002). Nous ne savons pas non plus si ces enzymes bactériennes (*DsbA* et *DsbC*) peuvent avoir pour substrat des protéines endogènes. En tous cas, le phénotype de ces plantes semble normal. Chez les bactéries, les protéines *DsbA* et *DsbC* ont largement été coexprimées pour l'optimisation du repliement de certaines protéines d'intérêt dans le périplasma mais également dans le cytosol. Les lignées transgéniques fixées et exprimant *DsbA* et *DsbC* représentent un matériel intéressant et désormais disponible pour l'étude et l'optimisation du repliement des protéines dans le chloroplaste.

L'accumulation massive de protéines recombinantes distingue la transgénèse plastidiale des autres systèmes d'expression disponibles. Nous avons en effet constaté cela avec la phosphatase alcaline étudiée dans la première partie de cette thèse. Le fait que ces plantes montrent un phénotype normal nous a interpellé. Comment est-ce possible qu'un tel niveau d'accumulation soit observé sans conséquence apparente sur la plante ? Cette question n'a pas été abordée jusqu'à présent dans la littérature, alors quelle est cruciale, surtout pour l'utilisation commerciale de cette technologie à des fins agronomiques. Il est important que les ressources dédiées à la synthèse de la protéine recombinante ne se fasse pas au dépend des

autres constituants de la cellule, ce qui aurait un impact plus ou moins subtil quantitativement et qualitativement sur la plante.

La suite du travail de thèse a donc été réalisée en tirant profit du matériel transplastomique caractérisé précédemment et de lignées transformées disponibles au laboratoire pour lesquelles un fort niveau d'expression du transgène avait été mis en évidence. Nous nous sommes concentrés sur l'étude plus en détail de plantes transplastomiques exprimant la phosphatase alcaline (PhoA-S et PhoA-L), une p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD) ou encore une protéine verte fluorescente (GFP). Ces protéines recombinantes atteignent des niveaux d'accumulation avoisinant ou dépassant parfois celui de la Rubisco, la protéine la plus abondante du règne végétal.

Aucune variation notable concernant le phénotype des plantes transplastomiques, hormis l'absence de pigmentation des fleurs de tabac exprimant l'HPPD n'a été observée. De même, aucun changement significatif n'a été constaté lors de l'analyse quantitative d'un échantillon représentatif de transcrits plastidiaux. Il conviendrait de compléter cette étude transcriptomique avec d'autres gènes, en particulier codés par le génome nucléaire et dont le produit est importé dans le chloroplaste. Au niveau du protéome, le résultat essentiel concerne la diminution assez spécifique et spectaculaire de la Rubisco, proportionnellement à l'accumulation de la protéine recombinante.

L'accumulation en masse d'une protéine se fait donc au détriment de la Rubisco sans engendrer de modification phénotypique visible. La diminution de la Rubisco pourrait être le résultat d'une protéolyse accrue ou d'une réduction spécifique de sa synthèse. Cette observation n'a jamais été mentionnée dans les articles relatant des travaux similaires. En revanche, le même phénomène apparaît de façon évidente dans le cas de plantes infectées par des virus recombinants (Marillonnet *et al.*, 2005). Des gels colorés au bleu de Coomassie montrent une chute progressive de la Rubisco parallèlement à la synthèse massive de la protéine recombinante. La Rubisco, du fait de son abondance, constituerait alors une réserve que la plante utiliserait de façon préférentielle en cas de besoin. Les ressources en azote de la cellule, seraient alors allouées pour la synthèse de la protéine recombinante. Ces résultats rappellent ce qui est observé lors de la sénescence des feuilles et de la formation des graines. Les protéines foliaires, en particulier la Rubisco, sont alors hydrolysées et l'azote remobilisé pour la synthèse des protéines de réserves des graines (Hirel et Gallais, 2006).

Comment l'allocation des ressources entre les protéines endogènes et la protéine recombinante évolue-t-elle lorsque les plantes transplastomiques sont soumises à une carence en azote ? Nous avons clairement observé une diminution accentuée de la Rubisco alors que la quantité des protéines recombinantes reste stable. L'HPPD ou la GFP deviennent ainsi les protéines les plus abondantes des feuilles. Tout se passe comme si la cellule n'avait pas la capacité de dégrader la protéine exogène pour pallier au manque d'azote. Le métabolisme de la plante, quel que soit le niveau de carence, semble pouvoir s'adapter au puit supplémentaire que représente la protéine recombinante. En effet, en serre, aucune différence phénotypique n'est visible entre lignées transgéniques et sauvages. Il est possible cependant, voire même logique, que des différences de croissance soient révélées dans des conditions de luminosité plus forte pour lesquelles l'activité photosynthétique de la Rubisco serait limitante. Les lignées caractérisées fournissent un modèle physiologique unique où le métabolisme doit s'adapter à une contrainte interne.

Toujours dans le domaine végétal, on trouve une situation similaire dans le cas de l'expression de protéine recombinante dans les graines, avec un ajustement entre les protéines de réserve endogènes et la protéine étrangère (Livingstone *et al.*, 2007). Globalement on trouve peu de données dans la littérature relatant les conséquences de l'expression massive d'une protéine recombinante sur le transcriptome ou le protéome d'autres organismes. Dans la plupart des systèmes d'expression, en particulier microbiens, il n'existe pas de protéine tampon comme la Rubisco. Chez *E. coli*, il a été montré que l'accumulation d'une protéine exogène peut entraîner une réaction de stress conduisant à (i) une diminution de la synthèse de certaines protéines indispensables au métabolisme et en contrepartie à (ii) une augmentation de la synthèse de protéines impliquées dans la gestion du stress oxydatif (Han *et al.*, 2001). Curieusement, lors de l'analyse protéomique effectuée au cours de ce travail de thèse nous avons de la même façon, mis en évidence des variations quantitatives de certaines protéines impliquées dans le stress oxydatif. La production élevée de protéines recombinantes au sein du plaste pourrait engendrer un stress oxydatif.

Nos travaux ont apporté de nombreuses réponses aux questions que nous avons soulevées mais ont également suscité de nouvelles interrogations qui nécessiteront des analyses supplémentaires. Parmi ces points encore obscurs, nous pouvons notamment citer le chapelet de protéines recombinantes obtenu lors de la séparation en gel bidimensionnel des protéines des différentes plantes transplastomiques étudiées. Tous les profils protéiques,

excepté pour l'HPPD, ont montré ce phénomène, résultant de modifications post-traductionnelles qu'il nous reste à éclaircir. Une autre problématique majeure que nous avons abordée récemment concerne l'analyse à un niveau qualitatif des plantes transplastomiques. La synthèse de la protéine recombinante se fait-elle uniquement au dépend des protéines endogènes ou est-ce que la quantité totale en protéines est augmentée ? Avons-nous modifié de façon significative la composition en acides aminés, lipides, glucides, ou autres métabolites au niveau foliaire ?

Les résultats de toutes ces analyses ont un impact biotechnologique important, et nous renseignent sur les mécanismes fondamentaux permettant à la cellule végétale de maintenir son homéostasie lors d'une situation extrême. De plus, ils illustrent l'étonnante plasticité du métabolisme des plantes et du chloroplaste.

Chapitre IV

Matériels et méthodes

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1 MATERIEL VEGETAL

Deux cultivars de tabac (*Nicotiana tabacum* PBD6 ou *Petit Havana*) ont été cultivés en serre à une température de 25°C en journée, 18°C la nuit, avec un éclairage journalier de 16 h sous une lampe à vapeur de mercure et avec un pourcentage d'hygrométrie de 70%.

La culture des tissus *in vitro* est réalisée à 24°C sous un éclairage journalier de 16 h également. Avant leur passage en serre, les plantules sont acclimatées dans une cellule maintenue à une température de 27°C avec une humidité relative de 70%. Le cultivar PBD6 est un tabac brun issu du croisement Paraguay P48XBEL61-10 (Altadis). Il produit une biomasse importante et est donc utilisé pour la production de protéines d'intérêt en plus grande quantité. Le cultivar Petit Havana a l'avantage par rapport au tabac PBD6 de présenter un cycle de développement plus rapide et a une taille réduite.

1.2. SOUCHES BACTERIENNES

Les cultures bactériennes ont été réalisées dans un milieu Luria Bertani (LB, 10 g/L de bacto-tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl), liquide (ou solide, + 15 g/L agar), supplémenté avec un ou plusieurs agents de sélection antibiotique selon la résistance du vecteur plasmidique contenu dans la souche : carbénicilline (100 mg/L), kanamycine (100 mg/L) ou spectinomycine (500 mg/L). La croissance des souches transformées a été effectuée à une température de 37°C (*E. coli*) ou 28°C (*A. tumefaciens*) et leur conservation se fait à -80°C dans une solution de glycérol (16.6% v/v final).

1.2.1 *Escherichia coli*

DH5 α (Invitrogen®) : La souche d'*E. coli* DH5 α TM, de génotype F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 (*lacZYA*-argF) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk-,mk-) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ - a été utilisée pour réaliser les étapes de clonage et pour amplifier l'ADN plasmidique. En effet, ne

possédant pas d'activité endonucléase I (*endAI*), elle permet d'obtenir des mini-préparations d'ADN plasmidique de bonne qualité. La stabilité de l'insert est augmentée grâce à la déficience de son système de recombinaison homologue (*recA1*) (Hanahan D, 1983).

BL21 (DE3) pLysS (Novagen) : La souche d'*E. coli* BL21, de génotype F- *ompT hsdSB* (rB-mB-) *gal dcm* (DE3) pLysS (CamR), est utilisée pour la surproduction de protéines recombinantes. Elle possède un gène codant le lysozyme T7, porté par le plasmide pLysS, qui bloque l'activité de l'ARN polymérase du bactériophage T7, réduisant ainsi la capacité à transcrire des gènes cibles dans les cellules non induites. De plus, cette souche est déficiente pour les protéases Lon et OmpT qui pourraient dégrader les protéines recombinantes exprimées.

Origami B (Novagen) : Cette souche dérive de la souche BL21. Son génotype est F- *ompT hsdSB*(rB- mB-) *gal dcm lacY1 ahpC* (DE3) *gor522:: Tn10 trxB* (KanR, TetR). En plus des avantages de la souche BL21 pour l'expression de protéines recombinantes (*lon*⁻ et *ompT*⁻), elle porte des mutations au niveau des gènes codant la thiorédoxine réductase (*trxB*) et la glutathione réductase (*gor*), ce qui favorise la formation des ponts disulfures dans le cytoplasme (Bessette *et al.*, 1999 ; Prinz *et al.*, 1997). Les mutations *trxB* et *gor* sont sélectionnables en présence de kanamycine et de tétracycline.

1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

EHA 105 : C'est une bactérie phyto-pathogène Gram négative du sol qui porte une forte virulence et dérive de la souche EHA 101 composée de la région *vir* L,L-succinamopine (SAP) et de l'ADN-T octopine. Elle est « désarmée » et ne possède donc pas d'oncogènes (Hood *et al.*, 1986).

1. 3. VECTEURS PLASMIDIQUES

1.3.1 Vecteurs de transformation chloroplastique

Pour la transformation chloroplastique, les gènes d'intérêt sont clonés dans des vecteurs permettant l'obtention d'un nombre de copies élevé du fait de leur origine de répllication (ColE1). Ils possèdent tous le gène *bla*, gène de résistance à l'ampicilline. Dans ces

plasmides, les transgènes sont sous le contrôle du promoteur *Ppsba* (le gène *psbA* code la protéine D1 du photosystème II) et du terminateur *rbcL* du tabac (le gène *rbcL* code la grande sous-unité de la Rubisco). En plus de ces motifs, les vecteurs utilisés possèdent également un gène de résistance à la spectinomycine (*aadA*), sous la dépendance d'un promoteur de tabac (*Prrn*), dérivé de l'opéron codant l'ARN 16S ribosomique de chloroplaste. Les transgènes sont encadrés par deux séquences plastidiales HRR (Homologous Recombination Region), permettant leur insertion ciblée entre les gènes *rbcL* et *accD*, dans le plastome de tabac, par recombinaison homologue.

1.3.2 Vecteur de transformation nucléaire

Le plasmide pBI 121 (Jefferson *et al.*, 1987) est un vecteur binaire se répliquant chez *E. coli* et *A. tumefaciens*. Il possède les caractéristiques générales des plasmides de transformation, renfermant les bordures droite et gauche du T-DNA ainsi qu'une cassette de sélection composée du gène de résistance à la kanamycine (*nptII*) sous le contrôle du promoteur du gène *nos* (nopaline synthase, PNos) et du terminateur de ce même gène (Depicker *et al.*, 1982). Le gène d'intérêt est encadré, pour nos travaux, par un promoteur fort (CaMV35S ou SSU HA), un peptide de transit optimisé (OTP) ciblant les chloroplastes (ref patent), et le terminateur Nos. Les gènes d'intérêt, une fois clonés dans ce plasmide, sont introduits dans le génome nucléaire végétal *via Agrobacterium* EHA 105.

1.3.3 Vecteur de clonage des produits PCR

pCR^R 4blunt-TOPO (Invitrogen) : Ce plasmide est utilisé pour le clonage de fragments d'ADN, en particulier ceux amplifiés par PCR (fragments à bouts francs amplifiés par une ADN polymérase haute fidélité de type *Pfu*). Ce vecteur permet le clonage rapide de produits de PCR sans étape de purification. Il ne fait pas appel à une ligase classique mais à la topoisomérase I du virus *Vaccinia*. Elle reconnaît la séquence de l'extrémité 3' du vecteur linéarisé (Figure IV. 1) et forme une liaison covalente avec le groupement phosphate de la thymidine en 3'. Le vecteur est fourni sous forme linéarisée, avec la topoisomérase I liée au phosphate de chaque extrémité 3'. Le vecteur peut ainsi lier de l'ADN avec des extrémités franches.

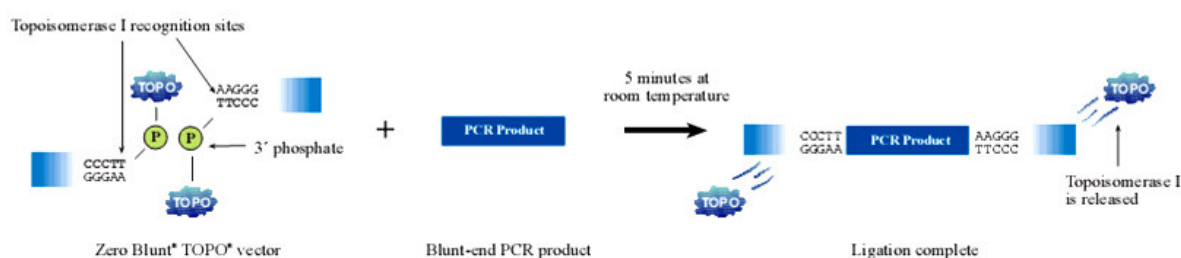


Figure IV. 1 : Ligation d'un fragment d'ADN à bouts francs avec la topoisomérase I (Invitrogen)

Le vecteur possède les gènes de résistance à la kanamycine (*neo*) et à l'ampicilline (*bla*) pour la sélection des bactéries transformées. Il permet l'obtention d'un nombre élevé de copies du plasmide (origine de répllication ColE1). Il contient également une portion du gène *lacZ* (*lacZα*) codant la partie amino-terminale (peptide α) de la β -galactosidase en fusion avec le gène *ccdB*, sous le contrôle du promoteur *Plac* (inductible à l'IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). Le gène d'*E. coli ccdB* code pour la protéine CcdB, marqueur de sélection négatif : cette protéine est un analogue naturel des antibiotiques quinolone (ciprofloxacine, enoxacin, etc.), se liant à la sous-unité A de la gyrase codée par le gène *gyrA* (Bahassi *et al.*, 1999). Cette fusion permet de sélectionner les vecteurs ayant intégré un fragment d'ADN dans le cadre de lecture du gène *ccdB*, empêchant ainsi la synthèse de la protéine CcdB toxique.

pCR^R 4 TOPO (Invitrogen) : Ce plasmide présente les mêmes caractéristiques que le vecteur pCR 4blunt-TOPO précédemment décrit, à la seule différence qu'il permet de cloner des fragments d'ADN amplifiés par PCR avec des extrémités présentant des A (Adénine) sortant (fragments d'ADN amplifiés par une Taq polymérase) (Figure IV. 2)

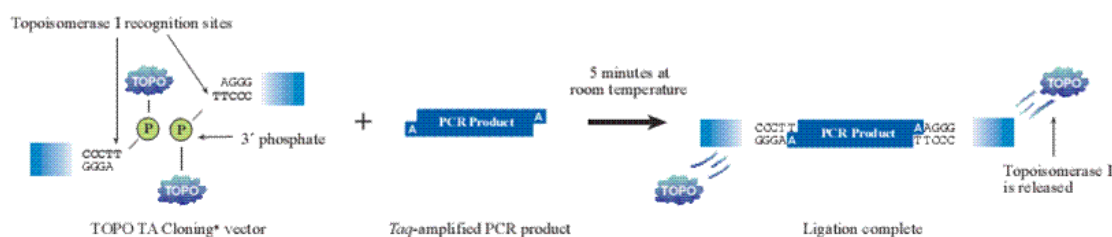


Figure IV. 2 : Ligation d'un fragment d'ADN à bouts sortants avec la topoisomérase I. (Invitrogen)

2. BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.1 METHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES

2.1.1 Extraction et purification d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique est réalisée sur des cultures bactériennes après lyse alcaline de la paroi des bactéries selon la méthode de Birnboim et Doly (1979). Concrètement, l'extraction et la purification de l'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide des kits Hispeed Plasmid Mini, Midi ou Maxi (Qiagen) en fonction du volume initial de culture et selon la quantité d'ADN souhaitée :

✓ pour un plasmide à nombre de copies élevé :

2 ml de culture pour une « mini-préparation » pour 10 µg d'ADN plasmidique ;

25 ml de culture pour une « midi-préparation » pour 75 à 100 µg d'ADN plasmidique ;

100 ml de culture pour une « maxi-préparation » pour 300 à 500 µg d'ADN plasmidique.

✓ pour un plasmide à nombre de copies faibles :

10 ml de culture pour une « mini-préparation » pour 10 µg d'ADN plasmidique ;

50 ml de culture pour une « midi-préparation » et pour 10 à 50 µg d'ADN plasmidique ;

250 ml de culture pour une « maxi-préparation » et pour 50 à 250 µg d'ADN plasmidique.

La purification est effectuée sur résine échangeuse d'anions. L'ADN plasmidique est élué avec un tampon à basse concentration en sels, avant d'être concentré par précipitation à l'éthanol si besoin. Les cultures d'*E. coli* (ensemencées avec une colonie bactérienne isolée sur milieu solide) sont centrifugées à 10 000 g pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est repris dans du tampon de suspension contenant du Tris-HCl 50 mM, pH 8, de l'EDTA 10 mM, et de la RNase A 100 µg/L (250 µL pour une mini, 4 mL pour une midi, 10 mL pour une maxi). La lyse alcaline de la paroi bactérienne est ensuite réalisée par ajout de tampon de lyse contenant du NaOH 200 mM, 1% de SDS. Cette lyse est faite à température ambiante, pendant 5 min. La réaction est stoppée avec un tampon de neutralisation contenant de l'acétate de potassium 3 M, pH 5,5, et le mélange est incubé 10

min à 4°C de manière à permettre une renaturation de l'ADN plasmidique et la précipitation de l'ADN chromosomique et des protéines. Une centrifugation à 10 000 g pendant 15 min, ou une filtration permet de récupérer le lysat clair, contenant l'ADN plasmidique, dans une solution à concentration saline adaptée.

Le matériel peut ensuite être récupéré de deux manières différentes :

✓ Par précipitation classique à l'éthanol ou l'isopropanol. Il faut alors ajouter 2,5 volumes d'éthanol 100% ou 0,7 volume d'isopropanol au lysat clair et laisser la précipitation se faire pendant 30 min à -20°C. L'ajout de sel ($1/10^{\text{ème}}$ du volume en acétate de sodium 3 M, pH 5,4) n'est pas nécessaire car les tampons précédemment utilisés sont riches en sels. Le culot d'ADN est récupéré après une centrifugation à 10 000 g, de 20 à 30 min. Ce culot est ensuite lavé avec de l'éthanol 70%. Après une centrifugation à 10 000 g pendant 15 min, le culot d'ADN est séché à l'air libre avant d'être repris dans un volume adéquat d'H₂O milliQ (ou H₂O Sigma ultra-pure stérilisée par autoclave) ou de tampon d'élution TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM).

✓ Par fixation sur résine échangeuse d'anions ou sur membrane de silice. Le lysat clair est chargé dans la colonne, fixé sur la membrane de silice pour les mini-préparations ou sur résine échangeuse d'anions préalablement équilibrée pour les midi et les maxi-préparations, après une étape de centrifugation de 1 min à 10 000 g. L'ADN est lavé avec un tampon de lavage (MOPS 50 mM, pH 7,0, NaCl 1 M, isopropanol ou éthanol 15%).

Pour les mini-préparations d'ADN, la membrane est séchée par centrifugation (2 min à 10 000 g). L'ADN est enfin élué avec de l'eau milliQ (ou H₂O Sigma ultra-pure stérilisée par autoclave). Pour les midi- et les maxi-préparations, l'ADN fixé sur la résine échangeuse d'anions est élué avec un tampon QF riche en sels (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 1,25 M et isopropanol 15%). Les sels sont ensuite éliminés par précipitation de l'ADN avec de l'isopropanol. L'ADN est finalement repris dans de l'eau ou du tampon TE, après lavage du culot avec de l'éthanol 70%.

2.1.2 Extraction et purification d'ADN génomique de plante

Les extractions d'ADN génomique de plante peuvent être réalisées à partir de tissus congelés à l'azote liquide immédiatement après leur prélèvement, selon deux techniques différentes.

La première est une méthode d'extraction qui suit le protocole développé par Edwards *et al.* (1991). Les tissus congelés dont l'ADN génomique doit être extrait sont broyés à froid,

en présence d'azote liquide pour éviter toute décongélation qui peut entraîner une rapide dégradation du matériel. Le broyage d'environ 100 mg de tissus s'effectue dans un mortier avec 400 µL de tampon d'extraction (NaCl 1,4 M, Tris HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, CTAB 2%). Après centrifugation de l'extrait (10 000 g pendant 2 min), le surnageant est récupéré et précipité avec 0,7 volume d'isopropanol. Après 2 min d'incubation à température ambiante et centrifugation à nouveau pendant 5 min, le culot d'ADN génomique obtenu est lavé à l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 100 µL d'eau.

La seconde technique fait appel au kit «DNeasy Plant Mini » (Qiagen). Elle permet l'isolement d'ADN total à partir de tissus de plante sans utiliser de détergents tels que le CTAB, qui peuvent inhiber les réactions enzymatiques que l'on souhaite effectuer avec les échantillons. Le broyage des tissus congelés est effectué à froid en présence d'azote liquide, dans un vibro-broyeur Mixer Mill MM300 (Retsch) à l'aide de billes en inox de 5 mm de diamètre. Les tissus finement broyés (100 mg) sont repris dans 400 µL de tampon de lyse contenant une RNase A, incubés 10 min à 65 °C. Les protéines et polysaccharides sont ensuite précipités au cours d'une incubation de 5 min dans la glace, après ajout de 130 µL de tampon contenant de l'acide acétique. Une centrifugation à 10 000 g pendant 5 min permet d'éliminer les débris. Le surnageant est ensuite déposé sur un filtre de manière à éliminer les débris et précipités formés. Du tampon contenant de la guanidine hydrochloride (Gn-HCl) et de l'éthanol (1,5 volumes de tampon AP3/E) est ensuite ajouté au filtrat, tampon mettant l'ADN dans les conditions salines idéales pour sa fixation sur la membrane de silice. L'ADN contenu dans ce lysat clair est ensuite fixé sur la membrane par centrifugation (10 000 g pendant 5 min). Deux lavages successifs sont effectués avec un tampon contenant de l'éthanol (dépôt de la solution de lavage sur la colonne et centrifugation de 1 min à 10 000 g). Une étape de lavage supplémentaire avec de l'éthanol absolu est optionnelle. L'ADN est ensuite élué avec un tampon d'éluion à faible teneur en sel ou avec de l'eau milliQ (Sigma ultra-pure stérilisée par autoclave). La quantité maximale d'ADN purifié est de l'ordre de 50 µg.

2.1.3 Extraction et purification des ARN totaux de plante

Cette extraction est réalisée en utilisant le kit «RNeasy Plant Mini » (Qiagen). Ce système permet de purifier jusqu'à 100 µg d'ARN total (de taille supérieure ou égale à 200 nucléotides) à partir de 100 mg de tissus finement broyés. Elle nécessite un matériel et des solutions « sans RNase ». Le matériel utilisé est donc traité avec un spray « RNase ZAP » (Sigma). Les tissus broyés sont repris dans 450 µL de tampon de lyse (tampon RLC,

contenant de la Gn-HCl et du β -mercaptoéthanol, inhibant les RNases). La lyse se déroule pendant 10 min à température ambiante, après un mélange vigoureux au vortex. Une centrifugation de 5 min à 10 000 g permet d'éliminer les débris cellulaires. Le matériel insoluble gélatineux est ensuite retiré par filtration, avec une étape de centrifugation de 2 min à 10 000 g au travers d'une colonne. Le filtrat, contenant les ARN totaux, est ensuite mis dans des conditions optimales pour sa fixation sur une membrane de silice par ajout de 0,5 volume d'éthanol 100%. Les ARN totaux sont ensuite fixés sur la membrane de silice (dépôt du lysat sur la colonne et centrifugation de 30 s à 10 000 g). L'ADN également fixé sur la membrane est dénaturé. Après un rinçage avec 350 μ L de solution de lavage RW1, 10 μ L de DNase I dilués dans 70 μ L de tampon RDD sont déposés sur la membrane. La lyse se déroule à température ambiante pendant 20 min. La Dnase I est ensuite retirée par une étape de lavage avec 350 μ L de tampon RW1. Un dernier lavage avec 500 μ L de tampon RPE est ensuite effectué avant l'élution des ARN totaux avec 30 μ L d' H_2O milliQ sans RNase.

2. 2 DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

2.2.1. Par mesure de l'absorbance avec un spectrophotomètre

Le dosage des acides nucléiques purifiés est réalisé en mesurant l'absorbance des échantillons à 260 nm, dans un spectrophotomètre (Genequant Pro), en utilisant des micro-capillaires en quartz (Biochrom). La pureté des échantillons peut être évaluée avec l'absorbance à 280 nm (protéines) et en calculant le rapport des absorptions: A_{260}/A_{280} qui doit être voisin de 2 pour de l'ADN pur. Des rapports d'absorbance plus faibles indiquent une contamination en protéines.

2.2.2 Par analyse sur un gel d'agarose

Les acides nucléiques peuvent être visualisés directement sur un gel d'agarose (de 0,8 à 2% (p/v), selon la taille des fragments attendus). Le tampon utilisé pour la réalisation du gel et pour la migration électrophorétique est du TBE (Q-Biogene) : Tris-HCl 90 mM, pH 8,0, borate 90 mM, EDTA 2 mM. L'agarose 0,8 à 2,5 % (p/v) Agarose « electrophoresis grade » Invitrogen) est dissous par chauffage au four à micro-ondes, dans le TBE, puis du bromure d'éthidium (BET, Eurobio), un agent intercalant de l'ADN, est ajouté. Le tampon est refroidi à 50°C avant d'être coulé sur un support. La migration est réalisée sous tension entre 80 et

130 V. Un tampon de charge contenant du bleu de bromophénol (bluejuice 10X Gibco) est additionné aux échantillons afin de permettre le dépôt et de visualiser le front de migration. Les acides nucléiques, chargés négativement, vont migrer vers l'anode (pôle +) lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique. Grâce au BET, les acides nucléiques sont visualisés sous lumière UV. L'intensité étant fonction de la quantité, il est possible de quantifier les acides nucléiques en les comparant à des quantités préalablement définies d'ADN. Une autre molécule intercalante peut-être utilisée : le Gelstar® (Invitrogen), elle permet d'intensifier d'un facteur dix le niveau de détection obtenu avec du BET.

2. 3. AMPLIFICATION D'UNE SEQUENCE D'ADN PAR PCR

Le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est basé sur l'amplification enzymatique spécifique *in vitro* d'un fragment d'acide nucléique de séquence connue, par extension d'amorces au cours d'une succession de cycles d'hybridation, de polymérisation et de désappariement des brins néosynthétisés. Cela impose de connaître la séquence des régions délimitant le segment d'ADN à amplifier. Des oligonucléotides complémentaires de 10 à 15 bases au minimum sont synthétisés (Tableau IV.1). Ces oligonucléotides (MWG, Allemagne) sont donc spécifiques de la matrice que l'on veut amplifier, et ont parfois à leurs extrémités 5' des extensions introduisant des sites de restriction permettant le clonage ultérieur des produits d'amplification dans les vecteurs appropriés. Cette technique requiert l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable. Différentes enzymes ont été utilisées au cours de ce travail. La Taq polymérase (isolée de *Thermus aquaticus*, une bactérie thermophile) permet une amplification rapide de fragments d'ADN avec des résidus A (adénine) sortants, et ne possède pas d'activité de correction des erreurs. Elle est utilisée pour les expériences de criblage par PCR pour lesquelles une grande fidélité de l'enzyme n'est pas requise (ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix, Sigma). La Pwo DNA polymérase (Roche, isolée de *Pyrococcus woesei*) et la Pfu DNA polymérase (Stratagene, isolée *Pyrococcus furiosus*) ont toutes deux une plus grande fidélité dans l'amplification d'une séquence d'ADN (elles possèdent une activité de vérification/correction 3' → 5' exonucléase) et ont, à ce titre, été utilisées pour amplifier des fragments d'ADN dont l'exactitude de la séquence est importante (amplification des divers éléments nécessaires pour réaliser les vecteurs de transformation).

OLIGONUCLÉOTIDE	SEQUENCE 5'→3'	UTILISATION
EP-PhoA C	GGGATTTAAATTATTTCAGCCCCAGAGCGG	Amplification PhoA-L, PhoA-S
EP-PhoA N	GGGTCATGAGGACACCAGAAATGCCTGT	Amplification PhoA-S
EP-PhoATP N	GATATCATGAAACAAAGCACTATTGCACTGGC	Amplification PhoA-L
aadA+	TATGGATCCCGAAGCGGTGATC	Criblage des transformants
aadA -	GATCGCTAGATTATTGCGGACTA	Criblage des transformants
PhoA1	GCATGCCGCAATGTTGTTG	Criblage des transformants
PhoA2	ATGAGGACACCAGAAATGCCTGT	Criblage des transformants
aadA10R	GTTGATACTTCGCGCATACCGCTTC	Criblage des transformants
Accd-V	ACTGCCCATTGATTTATTAGCCC	Criblage des transformants
orbL52	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Criblage des transformants
EP-DsbA Cterm	CGCAAGCTTCATTTTTCTCGCTTAAGTATTTC	Amplification DsbA
EP-DsbA Nterm	TAAGGATCCGGTGCATGGCGCAGTGAAGATGGT	Amplification DsbA
EP-DsbC Cterm	CTCGAGCTCTATTTACCGCTGGTCATTTTTTGG	Amplification DsbC
EP-DsbC Nterm	GAACGTCTCATGCATGGATGACGCGCAATTCAACA	Amplification DsbC
GFP1 F	CGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Amplification roGFP
GFP1 R	ATTTAAATTACTTGTACAGCTCGT	Amplification roGFP, TAT et SECroGFP
TorGFP2 F	GCGGCGCAAGCGCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Amplification TATroGFP
SecGFP1 F	CCATGGCAATGAAACAAAGCACTATTGC	Amplification SEC
SecGFP1 R	ATTTAAATTACTTGTACAGCTCGTCCATG	Amplification SEC
SecGFP2 F	TGACAAAAGCCCGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Amplification SECroGFP
TorGFP1 F	CCATGGCAATGGCAATGAACAATAAC	Amplification TAT
TorGFP1 R	GCCCTTGCTCACCATCGCCGCTTGCG	Amplification TAT

Tableau IV. 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour réaliser des amplifications PCR

L'amplification résulte de la répétition d'un cycle "dénaturation, hybridation, extension". A chaque cycle le nombre de brins d'ADN est théoriquement doublé. Après une étape initiale de dénaturation de l'ADN double brin (2 min à 95°C), les réactions d'amplification sont effectuées au cours de 30 à 35 cycles comprenant :

- ✓ Une étape de dénaturation à 95°C (30 s à 2 min) pour séparer les deux brins matrices de l'ADN.
- ✓ Une étape d'hybridation des amorces à une température spécifique selon la composition en bases du couple d'amorces utilisé, en général entre 50° et 70°C (30 s à 2 min). Elle est légèrement inférieure (environ de 5°C) à la valeur de T_m qui est la température de demi-dénaturation du double brin. A la température T_m , une séquence donnée d'ADN est présente à 50% sous forme double brin et à 50% sous forme simple brin. Le T_m dépend donc directement du nombre de liaisons hydrogène engagées dans cette hybridation. Les paires de bases GC font intervenir trois liaisons hydrogène, les paires de bases AT seulement deux. Ainsi une séquence riche en paires de bases GC est thermiquement plus stable qu'une séquence riche en paires de bases AT.

✓ Une étape d'élongation à 72°C ou 68°C selon la polymérase utilisée. Le temps d'élongation dépend de la processivité de la polymérase et de la taille du fragment à amplifier (1 kb/min pour la Taq polymérase). Une étape d'élongation finale est effectuée à 72 °C pendant 10 min à la fin des cycles d'amplification, de manière à terminer l'élongation des brins amplifiés.

La réaction est réalisée dans un thermocycleur (MJ Research PTC-200). La réaction est effectuée dans un volume final variant de 20 à 100 µL. Le mélange réactionnel est constitué du tampon de l'enzyme, de l'ADN matrice (1 ng de plasmide est suffisant, alors que 150 à 300 ng d'ADN total extrait de plante sont requis pour amplifier respectivement un fragment d'ADN plastidial ou nucléaire), des amorces (100 nM chacune), des désoxyribonucléotides (dNTP à 250 µM chacun) et de la polymérase (2,5U).

2. 4. REALISATION DE CONSTRUCTIONS MOLECULAIRES OU CLONAGES

2.4.1 Digestion de fragments d'ADN par des enzymes de restriction

La coupure de l'ADN est l'étape préliminaire aux manipulations de clonages. Elle est réalisée par des endonucléases de restriction qui reconnaissent une séquence spécifique d'ADN. Ces enzymes permettent de générer des extrémités franches ou cohésives. Chaque enzyme de restriction requiert du magnésium pour son activité et nécessite des conditions opératoires de température et de forces ioniques qui lui sont propres, recommandées par le fournisseur (BioLabs).

Le milieu réactionnel d'une digestion enzymatique (de 20 à 30 µL final) comprend :

- ✓ l'ADN substrat à digérer : de 1 à 2 µg ;
- ✓ l'enzyme de restriction, en général une unité d'enzyme est suffisante pour la digestion complète de 1µg d'ADN en une heure ;
- ✓ le tampon de l'enzyme utilisée ;
- ✓ parfois l'albumine de sérum bovin (BSA à 100 µg/mL final) qui permet de stabiliser l'enzyme.

La réaction enzymatique de digestion peut-être stoppée par inactivation de l'enzyme à la chaleur, classiquement 20 min à 65 °C. Si l'enzyme n'est pas inactivée par la chaleur, on peut alors séparer l'ADN en le purifiant sur gel d'agarose ou en réalisant une extraction au phénol/chloroforme. Dans ce dernier cas, les acides nucléiques sont extraits avec 0,5 à 1

volume d'une solution de chloroforme-alcool isoamylique (24/1). Le phénol dénature les protéines et l'extraction au chloroforme enlève les traces de phénol. Après une étape de centrifugation à 14 000 g pendant 10 min, l'ADN contenu dans la phase aqueuse supérieure est récupéré. L'ADN est ensuite précipité avec de l'éthanol ou de l'isopropanol comme précédemment décrit. Des précautions propres à chaque enzyme de restriction sont à prendre en compte. Certaines enzymes possèdent par exemple des activités dites parallèles («activités star») comme par exemple la capacité à couper en dehors de leur site spécifique de reconnaissance. Ces dernières requièrent une attention particulière quant à leur durée d'utilisation, température et concentration.

2.4.2 « Remplissage » des extrémités cohésives

Cette étape est nécessaire lorsque les extrémités à lier ne sont pas compatibles. On réalise alors une étape de remplissage des extrémités cohésives pour les rendre compatibles. Pour cela, le kit End-It DNA Repair (Epicentre) est utilisé selon les instructions du fournisseur. Il est basé sur l'activité 5' → 3' exonucléase de l'ADN polymérase T4, ainsi que sur la phosphorylation en 5' catalysée par la polynucléotide kinase T4. Le mélange est incubé 45 min à température ambiante, puis inactivé à 70°C pendant 10 min.

2.4.3 Déphosphorylation

Dans le cas où l'ouverture par digestion d'un vecteur de clonage génère des extrémités franches ou des extrémités cohésives compatibles, une déphosphorylation de celui-ci est possible afin d'éviter lors de la ligature, sa re-circularisation. Cette réaction s'effectue à l'aide d'une phosphatase alcaline de crevette (SAP, USB). La quantité ajoutée est de 0,2 unité pour 2 à 3 µg d'ADN après la digestion. La réaction dure une heure à 37°C et la SAP est inactivée à 65°C pendant 20 min.

2.4.4 Electrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN (générés par digestion enzymatique ou par PCR) sont analysés par migration électrophorétique sur gel d'agarose, réalisé comme indiqué précédemment pour le dosage des acides nucléiques. La vitesse de migration des molécules d'ADN dépend de leur taille. Selon la concentration en agarose, des fragments de tailles différentes pourront être séparés : les petits fragments (< 200 pb) sont séparés dans des gels avec un fort pourcentage en agarose (1,5 à 2%) et les gros fragments sont à l'inverse mieux séparés dans des gels à

faible teneur en agarose (0,8%). Un marqueur de taille (Ready-Load™ 1 kb DNA ladder, Invitrogen) constitue une échelle permettant de visualiser la taille des fragments d'ADN séparés.

2.4.5 Isolement d'un fragment d'ADN après migration sur gel

L'extraction des fragments d'intérêt du gel est effectuée à l'aide du kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen) pour des fragments de 70 bp à 10 kb ou à l'aide du kit Qiaex II Agarose gel extraction (Qiagen) pour des fragments de 40 bp à 50 kb. Le principe de l'extraction repose dans les deux cas sur la fixation de l'ADN à une membrane ou des particules de silice dans des conditions de haute salinité.

L'ensemble des impuretés présentes dans les acides nucléiques telles que les protéines, l'agarose, le BET et les sels sont éliminés lors de plusieurs lavages successifs. Après fixation, l'élution de l'ADN est réalisée dans des conditions de faible salinité et à pH neutre ou basique (tampon TE pH 8,0, Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM). Les fragments d'ADN ainsi purifiés sont quantifiés par dépôt d'une fraction aliquotée sur gel d'agarose, de manière à vérifier la taille du fragment purifié et la présence non désirée de contamination par un autre fragment d'ADN de taille différente.

2.4.6 Ligature des brins d'ADN

La ligature de deux fragments d'ADN, est réalisée avec la T4 DNA ligase (Roche) du phage T4, par l'intermédiaire du kit de ligation Fast-Link™ DNA Ligation Kit (Epicentre). Cette enzyme catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre le groupement phosphate de l'extrémité 5' et le groupement hydroxyle de l'extrémité 3' de l'ADN double brin, en présence d'ATP. Les réactions de ligature sont réalisées pendant 2 à 3 heures à température ambiante ou à 16°C sur la nuit, dans un volume compris entre 15 et 20 µL. Le mélange réactionnel est composé du tampon de l'enzyme (Tris-acétate 33 mM, pH 7,8, acétate de potassium 66 mM, acétate de magnésium 10 mM et DTT 0,5 mM), des fragments d'ADN à lier, (le ratio vecteur/insert optimal pouvant varier), ainsi que de deux unités de ligase et d'ATP 0,5 à 1 mM final. A la fin de la réaction, l'enzyme est inactivée par la chaleur (70°C pendant 15 min).

Après ligature, il est parfois possible de linéariser, par digestion enzymatique, les plasmides n'ayant pas incorporé l'insert, tout en conservant ceux qui le possèdent. Pour ce faire, les produits de ligature sont digérés par une enzyme dont le(s) site(s) de restriction est

(sont) présent(s) sur le vecteur d'origine, mais non présents dans la construction suite à l'introduction de l'insert. Cela empêche ainsi la réplication de vecteurs s'étant refermés sur eux mêmes.

2.4.7 Clonage des fragments PCR

Les fragments PCR sont généralement directement clonés dans un vecteur intermédiaire tel que le vecteur pCR®4Blunt-TOPO ou encore le vecteur pCR-TOPO. Ces vecteurs sont spécialement conçus pour cloner, respectivement, des fragments d'ADN à bout franc amplifiés avec la Pwo polymérase et des fragments d'ADN amplifiés par PCR à l'aide de la Taq polymérase (comme décrit ci-dessus). Le mélange réactionnel est composé de 4 µL maximum de produit PCR, d'1 µL de solution saline (NaCl 0,12 M; MgCl₂ 6 mM final) et d'1 µL de vecteur linéarisé. La réaction se déroule à température ambiante, pendant 5 min. Aucune inactivation n'est requise : le produit de ligature peut être utilisé directement pour transformer des bactéries. Dans ce cas, la transformation est effectuée à l'aide des bactéries thermocompétentes *E. coli* (One-shot TOP 10) fournies dans le kit.

2.4.8 Introduction d'ADN plasmidique dans une bactérie

Transformation par choc thermique : Cette technique, utilisée pour transformer les souches DH5α, BL21 et Origami B d'*E. coli*, permet d'introduire de l'ADN dans une cellule hôte bactérienne dont la paroi a été rendue perméable par un traitement au calcium (Inoue *et al.*, 1990). La culture bactérienne est réalisée dans 200 mL de milieu LB. La croissance est suivie jusqu'à l'obtention d'une absorbance égale à 0,6 (mesure à 600 nm) en phase exponentielle de croissance. La culture est alors placée 15 min sur la glace, puis centrifugée à 4°C, pendant 10 min à 4 000 g. Le culot est délicatement repris dans 100 mL d'une solution de CaCl₂ 50 mM à 4°C. Les cellules en suspension sont laissées dans la glace pendant 20 min, avant d'être à nouveau centrifugées. Le culot est finalement repris dans 20 mL d'une solution de CaCl₂ 50 mM et 15% de glycérol à 4°C. Les bactéries ainsi rendues compétentes pour la transformation sont fractionnées en aliquotes (200 µL) puis congelées rapidement dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

La transformation est effectuée sur une aliquote de ces bactéries thermo-compétentes après addition de l'ADN (0,1 à 1 µg d'ADN circulaire). L'ensemble est laissé sur la glace pendant 15 à 30 min, pour laisser l'ADN s'adsorber à la paroi des bactéries. Un choc

thermique de 45 s à 42°C permet à l'ADN de pénétrer dans les bactéries. Après un retour sur la glace d'environ 5 min, 800 µL de milieu de culture riche (SOC medium, 20 g/L de bacto-tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 0,5 g/L de NaCl) sont ajoutés aux bactéries. La culture est ensuite placée à 37°C, pendant 30 à 60 min, pour permettre aux bactéries transformées d'exprimer le gène de sélection. Enfin, différentes quantités de cette culture sont étalées sur un milieu de culture LB solide contenant l'agent de sélection, et placées dans une étuve à 37°C sur la nuit.

Transformation par électroporation : Cette technique, utilisée pour transformer les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA105, permet d'introduire de l'ADN plasmidique dans une cellule hôte par un choc électrique. La préparation des bactéries électrocompétentes correspond à des lavages successifs pour éliminer les sels qui diminuent la résistance électrique du milieu. La culture bactérienne au stade de croissance exponentielle est placée 10 min sur la glace. Une série de trois centrifugations (4000 g, 15 min à 4°C) permet alors de sédimenter les bactéries et d'effectuer deux lavages successifs dans 0,5 volume d'eau stérile à 4°C. Le culot bactérien est finalement repris dans un faible volume d'une solution de glycérol 10%. Les bactéries ainsi rendues compétentes pour la transformation sont fractionnées en aliquotes (50 µL) puis congelées rapidement dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

La pénétration de l'ADN recombinant dans ces bactéries électrocompétentes est réalisée sous l'influence d'un courant électrique appliqué au travers des parois conductrices d'une cuve spéciale (appareil Bio-Rad Gene Pulser, 15 kV/cm, 25 µF, 200Ω). La perturbation du potentiel transmembranaire induit par le courant augmente la perméabilité de la paroi des bactéries (formation de pores, phénomène réversible). Un à 3 µL de la réaction de ligation sont mis en présence de 100 µL de bactéries électrocompétentes. Après la décharge électrique, 800 µL de milieu de culture riche (LB ou SOC) sont ajoutés aux bactéries. La culture est ensuite mise à 28°C, pendant 2 heures, pour permettre aux bactéries transformées d'exprimer le gène de sélection. Enfin, différentes quantités (50 µL, 200 µL et le reste) de cette culture sont étalées sur un milieu de culture solide riche (LB + 15 g/L d'agar) contenant l'agent de sélection, et placées dans une étuve à 28°C.

2.4.9 Analyse des bactéries recombinantes

Les bactéries capables de pousser sur un milieu sélectif ont intégré un vecteur contenant un gène marqueur codant une résistance à un agent de sélection. Une dernière étape consiste à

extraire l'ADN plasmidique de ces colonies bactériennes, et à vérifier la nature de ce plasmide. L'ADN des clones est digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction afin de vérifier leur profil en gel d'agarose. Cette analyse permet de discriminer le construit recherché des deux parents qui ont permis sa construction. Un clone est sélectionné puis validé par 8 à 10 digestions enzymatiques différentes. Le clone recombinant retenu est alors parfois confirmé par séquençage nucléotidique. Les fragments d'ADN d'intérêt sont séquencés sur un seul brin (MWG Biotech) sur le principe de Sanger de l'incorporation de didéoxyribonucléotides.

2. 5. ANALYSE DE L'ADN TOTAL DE PLANTES PAR SOUTHERN BLOT

2. 5. 1 Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse

L'ADN total extrait des feuilles de tabac est digéré par des enzymes de restriction permettant de générer des fragments de taille exploitable. Pour les transformants plastidiaux de tabac, environ 1 à 1,5 µg d'ADN est digéré pendant 4 heures, à la température adéquate (recommandée par le fournisseur de l'enzyme), avec 5 unités d'enzyme pour 1 µg d'ADN. Un gel de 350 mL d'agarose (QA Agarose TM Multipurpose, QBiogene) à 0,8%, contenant du BET, est réalisé avec du tampon TAE (Invitrogen): Tris-acétate 40 mM, pH 8,3, EDTA 10 mM. L'ADN digéré ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (λ HindIII, Lifetechnology) sont déposés dans les puits du gel. La migration s'effectue dans du TAE, à 90 V pendant 15 min pour permettre à l'ADN de pénétrer dans le gel, puis à 55 V sur la nuit.

2.5.2 Transfert de l'ADN sur une membrane de Nylon

L'ADN séparé sur gel d'agarose est visualisé sous UV pour vérifier la digestion enzymatique. Une empreinte du gel est prise, de manière à pouvoir positionner les puits et les différentes bandes du marqueur de poids moléculaire.

Le gel est ensuite incubé pendant 15 min, sous agitation, dans une solution de dépurination (HCl 0,25 M). Cette étape sert à casser les gros fragments d'ADN qui de par leur taille, transfèrent difficilement sur la membrane. Après un rinçage rapide avec de l'eau, le gel est immergé dans une solution de dénaturation (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) pendant 15 min sous agitation. Un second bain de neutralisation est réalisé (15 min). L'ADN est alors transféré par capillarité sur une membrane de Nylon à l'aide du dispositif suivant :

- une plaque en verre ;
- deux papiers Whatman humidifiés dans la solution de dénaturation ;
- le gel (avec le fond des puits orientés sur le dessus du dispositif, au contact avec la membrane de nylon) ;
- la membrane de nylon, humidifiée dans la solution de dénaturation ;
- deux papiers Whatman humidifiés dans la solution de dénaturation ;
- 10 cm de papier absorbant ;
- une plaque en plastique ;
- un poids de 0,5 kg.

Aucune bulle d'air ne doit être piégée entre le gel et la membrane. Le transfert est réalisé pendant 4 heures à température ambiante. Le dispositif est démonté après le transfert. La membrane est identifiée : la position des puits ainsi que le côté de la membrane où l'ADN est fixé sont indiqués. La membrane est rapidement rincée dans une solution saline 2X SSC (SSC 20X contenant du NaCl 3 M, et du citrate sodium 0,3 M), et peut ensuite être conservée entre deux feuilles de papier Whatman, à l'abri de la poussière jusqu'à l'hybridation.

2.5.3 Marquage de la sonde

Le kit « Megaprime DNA Labelling System » (Amersham) a été utilisé pour marquer les sondes. Les sondes ont, dans un premier temps, été synthétisées par PCR. Après purification et quantification, 50 ng de chaque sonde ont été marqués par amorçage aléatoire.

Un mélange de sonde double-brin et d'oligodesoxynucléotides de séquences aléatoires, est dénaturé à 100 °C. Un retour lent à température ambiante permet aux oligonucléotides de se fixer sur les sondes simple-brin. Des dNTP, du dCTP radio marqué $\alpha^{32}\text{P}$ ainsi que l'enzyme de Klenow et son tampon sont ajoutés au mélange et incubés à 37°C pendant au moins 30 min. L'enzyme va ainsi allonger les oligonucléotides en incorporant des dCTP radioactifs. Les sondes ainsi marquées sont ensuite purifiées par filtration sur colonne G50 (Amersham), les dNTP restant retenus dans la colonne. Enfin, ces sondes sont dénaturées par chauffage de 5 min à 100°C, avant d'être ajoutées dans le tampon d'hybridation.

2.5.4 Hybridation de la membrane

La membrane est saturée pendant au moins 1 heure à 65°C dans un four à hybridation, sous agitation, dans une ampoule contenant 50 mL de solution de pré-hybridation [SSC 6X, SDS 0,1%, Denhardt's 5X (Ficoll 2%, Polyvinylpyrrolidone 2%, BSA acétylée 2%), 100

µg/mL de « carrier » DNA dénaturé pendant 5 min à 100°C]. La sonde radioactive dénaturée, est alors ajoutée au tampon de pré-hybridation. L'hybridation de la membrane est ensuite réalisée sur la nuit à 65°C dans un four à hybridation.

2.5.5 Exposition et révélation par autoradiographie

Les membranes subissent plusieurs lavages de 30 min, toujours sous agitation à 65°C dans le four à hybridation, avec différentes solutions de stringence croissante, toutes préchauffées à 65°C :

- 1 lavage avec une solution 6X SSC ;
- lavages avec une solution 2X SSC, SDS 0,1% ;
- 1 ou 2 lavages avec une solution 0,1X SSC, SDS 0,1%.

Les membranes sont ensuite protégées dans un film plastique, avant d'être mises en cassette, avec un film Biomax MS (Kodak) et un écran intensificateur Biomax MS (Kodak). L'exposition dure de 10 min à 12 heures selon l'intensité du marquage et se déroule à - 80°C. Les membranes peuvent être dés-hybridées en les incubant successivement dans une solution bouillante de SDS 0,5%, puis dans une solution de 2X SSC.

2. 6 « REVERSE TRANSCRIPTION » OU SYNTHÈSE D'ADN COMPLEMENTAIRE

La synthèse d'ADNc est réalisée avec le kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen), à partir de 750 ng à 1,5 µg d'ARN total extrait des feuilles de tabac selon la méthode précédemment décrite. L'ARN matrice, en présence d'amorces (oligo-désoxynucléotides de séquences aléatoires), ainsi que de dNTP (1 mM final), est dénaturé par chauffage à 95°C. Un lent refroidissement sur la glace permet aux amorces de s'hybrider sur les matrices. L'ARN est ensuite converti en ADNc simple-brin par une transcriptase reverse ThermoScript™ RT (15 unités) supplémentée de DTT 0,01 M, de RNase OUT (40 unités) qui empêche la lyse des ARN par les RNases, et de tampon de synthèse permettant le fonctionnement des enzymes. La réaction a lieu dans un thermocycleur, à 25°C pendant 10 min, puis à 50°C pendant 1 heure et est terminée par une étape à 80°C pendant 5 min. Les ADNc sont ensuite conservés à - 20°C.

2.7 PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

2.7.1 Principe de la PCR quantitative en temps réel

La PCR correspond à une amplification d'un fragment d'ADN spécifique, délimité par des « amorces ». L'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe sigmoïde (figure IV.3). Cette courbe peut être divisée en deux phases.

La première correspond à une amplification exponentielle, alors que la seconde correspond à un plateau. La phase d'amplification est directement liée au nombre de copies initiales du fragment d'ADN amplifié. En effet, la quantité de produit PCR obtenue à chaque moment de cette phase est directement fonction de la quantité d'ADN initiale du fragment d'ADN amplifié, selon la formule : nombre de copies d'ADN au cycle n = nombre de copies d'ADN initiales $\times 2^n$. La phase de plateau représente un ralentissement de l'amplification, qui peut être dû à l'épuisement des différents réactifs de la PCR (amorces, dNTP, enzyme devenue moins active...). Cette phase n'est pas modélisable et souvent non reproductible.

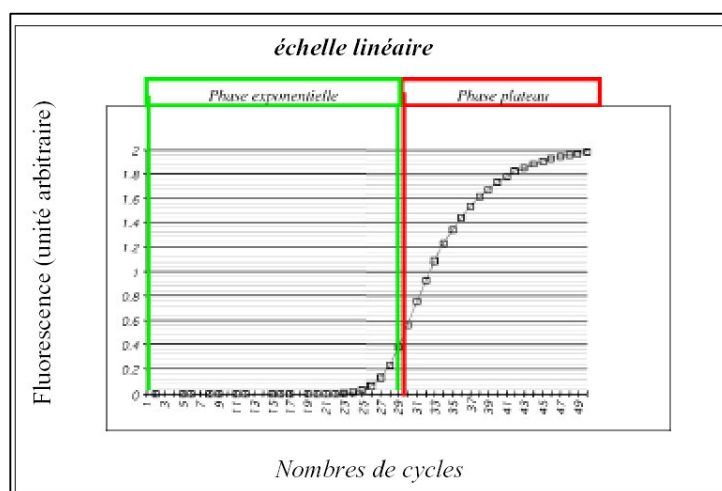


Figure IV. 3 : Courbe d'amplification d'une réaction de qPCR

La PCR quantitative permet de mesurer précisément, de façon relative (comparaison d'états biologiques) et/ou absolue, le niveau d'expression de gènes d'intérêt. Un échantillon sert de référence et la quantification des autres sera faite relativement à cette référence. Lorsque le nombre de molécules n'est pas connu, on attribue une valeur arbitraire à la référence (1 ou 100 %) et une valeur relative à cette référence sera assignée aux autres échantillons. On parle alors de PCR quantitative relative ou semi-quantitative. La

quantification réalisée par « PCR en temps réel » consiste à obtenir des courbes d'amplification contenant au moins une partie de la phase exponentielle. Cette mesure est effectuée dans un thermocycleur : LightCycler (Roche Molecular Biochemicals), en détectant la fluorescence émise par le fluorophore SYBRGreen (à 550 nm), un agent intercalant de l'ADN, ne fluorescent que lorsqu'il est intégré au sein de l'ADN double brin (1 molécule de SYBRGreen pour 25 pb) (FastStart DNA Master SYBR Green 1 - Roche Molecular Biochemicals). C'est un agent intercalant très stable car après 30 cycles, 6% de son activité seulement est perdue.

On définit un seuil, correspondant à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle, et suffisamment haut pour être au dessus du bruit de fond. Le moment où le signal atteint ce seuil de fluorescence correspond à un certain nombre de cycles appelé : Ct (Threshold Cycle) ou Cp (Crossing point) (Figure IV. 4). Pour deux quantités d'ADN initiales différentes, on obtiendra deux Cp différents. La différence de Cp sera proportionnelle au logarithme du rapport de ces quantités initiales :

$$Cp2 - Cp1 = \text{coefficient} \times \log(N2/N1).$$

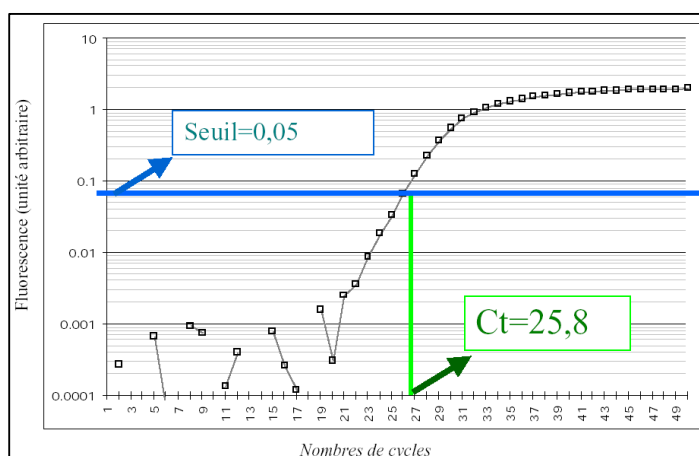


Figure IV. 4 : Principe du Cp

2.7.2 Etapes de la PCR quantitative

La PCR quantitative utilise des techniques classiques de PCR avec des cycles (répétés 40 à 50 fois) en trois grandes étapes incluant la dénaturation par la chaleur à 95°C de l'ADN double brin en ADN simple brin, l'hybridation des amorces spécifiques à la matrice d'ADN (5 s à 50-60°C) simple brin pour la polymérisation et l'élongation (10 s à 72°C). La réaction est effectuée avec 5 ng d'ADNc matrice, et en présence de MgCl₂, d'amorces spécifique et

d'un tampon contenant la Taq polymérase, les dNTP et le fluorophore. Un contrôle qualité est réalisé systématiquement après chaque amplification en temps réel. Ce contrôle, appelé aussi courbe de fusion, correspond à une augmentation de température jusqu'à 95°C puis une diminution progressive de celle-ci jusqu'à 40°C en 10 min. Cette courbe de fusion permet de détecter la formation d'amplicons aspécifiques (Brownie *et al.*, 1997 ; Wittwer *et al.*, 1997).

2.7.3 Détermination et optimisation des amorces

Les amorces sont synthétisées de façon appropriée pour la technologie de PCR quantitative à l'aide du logiciel Primer express® (Applied Biosystem, USA). Le logiciel crée, à partir de la région 3' de l'ADNc matrice, un couple d'amorces dont le T_m , (qui doit être entre 58°C et 60°C) permet une hybridation optimale dans les conditions de PCR utilisées. Ces amorces sont également calculées pour donner des amplicons courts afin de faciliter l'amplification. Chaque couple d'amorce a été testé pour sa spécificité : le produit d'amplification a été déposé sur gel d'agarose, pour vérifier qu'il n'y ait bien qu'un seul et unique produit d'amplification à la taille attendue.

oligonucléotide	séquence 5' → 3'	utilisation
PhoA-F	CAAGTTGAAGGTGCGT	Détection PhoA-S et PhoA-L en QPCR
PhoA-R	TCCTCTTCGGAGTTCCC	Détection PhoA-S et PhoA-L en QPCR
GFP-F	AAGACACGAGCTGAAGT	Détection GFP en QPCR
GFP-R	GGAAGCAATACAGTCCA	Détection GFP en QPCR
Hppd-F	CGCCAGACACTTATTACG	Détection Hppd en QPCR
Hppd-R	CAATACACCACGACGC	Détection Hppd en QPCR
psbA-F	CTGAATAGGGAGCGGC	Détection psbA en QPCR
psbA-R	CGTGAGTGGGAGCTTAG	Détection psbA en QPCR
accd-F	CACATTAATAGTTGCA	Détection accd en QPCR
accd-R	TCATTAGAACTTTCTC	Détection accd en QPCR
rbcL-F	TATGGTCGTCCCCTGT	Détection rbcL en QPCR
rbcL-R	CCTGTTTCAGCCTGTG	Détection rbcL en QPCR
ClpP-F	CAAACGTCTAGCATTCCC	Détection ClpP en QPCR
ClpP-R	GGGCTTCTGTTGCTGA	Détection ClpP en QPCR
atpH-F	AAGTGCTAATGCTACAACC	Détection atpH en QPCR
atpH-R	CTGGATTGGCCGTAGG	Détection atpH en QPCR
rps14-F	TCACGAAGTATGTGTCCG	Détection rps14 en QPCR
rps14-R	AGGGAGAAGAAGAGGC	Détection rps14 en QPCR
rps16-F	ATGTGGTAGAAAGCAACG	Détection rps16 en QPCR
rps16-R	AACCTCCGCCTTCTTA	Détection rps16 en QPCR
rps18-F	TTTCGTAGCGTTTGC	Détection rps18 en QPCR
rps18-R	CCAGTAGTTCTAGCGGTC	Détection rps18 en QPCR
16S-F	TCAGGATGAACGCTGGCG	Détection ARN16S en QPCR
16S-R	AGCTATTGCCTCACCA	Détection ARN16S en QPCR

Tableau IV. 2 : Oligonucléotides utilisés pour la PCR quantitative

3. BIOCHIMIE

3.1. PREPARATION D'EXTRAITS PROTEIQUES

3.1.1 Extraction des protéines totales de bactéries

Les protéines totales de bactéries sont obtenues à partir de cultures bactériennes de 2 mL en milieu LB sélectif. Les bactéries sont culottées par centrifugation à 4 000 g pendant 20 min. Le culot bactérien est repris dans 500 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, inhibiteurs de protéases (1 comprimé de « complete mini protease inhibitor cocktail tablets » Roche pour 50 ml de tampon), avec ajout ou non de DTT (0,04% p/v). Les bactéries sont ensuite lysées par sonication pendant 5 min sur la glace (traitement intense par ultrasons avec le sonicateur haute densité, Bioblock Scientific, pulsations de 0,1 s). Les débris membranaires ainsi que les particules insolubles sont ensuite éliminés par une étape de centrifugation à 14000 g pendant 30 min. Les protéines totales solubles contenues dans le surnageant sont dosées par la méthode de Bradford (1976), puis conservées à -80°C.

3.1.2 Extraction des protéines totales de plantes

Extractions rapides : Environ 200 mg de tissus finement broyés dans l'azote liquide sont repris dans du tampon d'extraction identique à celui utilisé pour l'extraction protéique totale de bactéries (volume variant selon la nature du tissu). La solution est alors incubée pendant 10 min sur la glace, puis centrifugée 10 min à 14000 g et à 4°C. Cela permet de séparer : les débris membranaires et les protéines insolubles des protéines totales solubles contenues dans le surnageant. Les protéines totales solubles contenues dans le surnageant sont dosées par la méthode de Bradford (1976), puis conservées à -80°C.

Il est possible de réaliser des extractions natives de protéines en enlevant du tampon d'extraction les agents dénaturants ou réducteurs tels que le DTT. L'extraction sera réalisée de la même façon que celle décrite précédemment.

Extractions au Trizol (Invitrogen) : Cette technique d'extraction permet de séparer les ARN, ADN et protéines d'un échantillon. Elle permet notamment de récupérer les peptides de faibles poids moléculaires ce qui pose parfois problème avec la méthode d'extraction rapide.

Les tissus finement broyés sont repris dans 1 mL de trizol. Le trizol, une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate, maintient l'intégrité des ARN tout en lysant les cellules et en dissolvant les composés cellulaires. Une centrifugation à 12 000 g à 4°C pendant 10 min permet de sédimenter les débris membranaires, les polysaccharides et les ADN de haut poids moléculaire. Le surnageant est alors incubé 5 min à 30°C, ce qui entraîne la dissociation des complexes nucléoprotéiques. L'ajout de 200 µL de chloroforme, suivi d'une agitation de 15 s, d'une incubation de 3 min à 30°C et d'une centrifugation à 12 000 g pendant 15 min à 4°C permet ensuite de séparer les ARN contenus dans la phase aqueuse supérieure, des ADN et protéines contenus dans la phase organique inférieure. L'ADN est ensuite précipité en ajoutant 300 µL d'éthanol à la phase organique. Après un mélange par inversion, le milieu réactionnel est incubé pendant 2 à 3 min à température ambiante et centrifugé à 2000 g pendant 5 min à 8°C. Les protéines contenues dans le surnageant sont récupérées et précipitées par ajout de 1 mL d'isopropanol, suivi d'une incubation de 10 min à température ambiante. Après une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C, les protéines sont récupérées dans le culot. Le culot est repris dans 2 mL d'une solution contenant la guanidine hypochloride 3 M et l'éthanol 95%, incubé 20 min à 15-30°C, puis centrifugé à 7500 g pendant 10 min à 4°C. Un dernier lavage est effectué avec 2 mL d'éthanol 100% dans les mêmes conditions. Le culot protéique est finalement séché à l'air libre, puis repris dans 50 à 100 µL de SDS 1%.

Extractions au TCA-Acétone : Cette technique d'extraction (Méchin *et al.*, 2007) a été utilisée pour la réalisation de gels bidimensionnels sur des extraits protéiques totaux de feuilles et graines de tabac. En effet, la préparation des extraits protéiques est l'étape clef de l'électrophorèse bidimensionnelle, et le choix du tampon d'extraction est déterminant pour optimiser l'état structural des protéines (Rabilloud, 1999a). Pour une bonne séparation bidimensionnelle, les protéines doivent être dénaturées et complètement solubilisées.

Les tissus végétaux (200 mg) finement broyés à froid, sont repris dans 1,8 mL d'une solution de TCA-βME-Acétone (Trichloroacétylène TCA 10% (w/v), β-mercaptoéthanol 0,07% (v/v), dans de l'acétone froid). Le TCA et l'acétone dénaturent et précipitent les protéines. La solution utilisée inactive les phénol-oxydases et les oxydases empêchant l'oxydation des phénols, ce qui transforme les protéines en complexes insolubles. La solution inhibe également les protéases présentes dans les tissus végétaux. L'acétone solubilise les

pigments, les lipides et les terpènes présents dans les tissus. Le β -mercaptoéthanol empêche la formation de ponts disulfures pendant la précipitation.

Une centrifugation de 10 min à 10 000 g et à 4°C permet de séparer les protéines ayant précipité du reste de l'extrait. Trois lavages du culot sont ensuite effectués avec une solution de β ME-Acétone (β -mercaptoéthanol 0.07% (v/v), dans de l'acétone froid), afin d'éliminer l'acidité causée par le TCA. Le culot contenant les protéines est alors séché sous hotte pendant 1 heure ou dans un SpeedVac pendant 20 à 30 min pour éliminer totalement l'acétone.

Les protéines sont alors reprises dans un tampon de solubilisation (urée 7 M, thiourée 2 M, 3[3-cholaminopropyl diethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS 2% (w/v)), Triton X-100 0,2% (v/v), DTT 20 mM, Trizma base 14 mM, Trizma hydrochlorure 18 mM, ampholytes pH 3-10, 1% (p/v), inhibiteurs de protéases (1 comprimé de « complete mini protease inhibitor cocktail tablets », Roche pour 50 ml de tampon). La solution est légèrement chauffée pour permettre la solubilisation des protéines et de l'urée. Le mélange urée/thiourée, le CHAPS et le Triton améliorent considérablement la solubilité des protéines. Le CHAPS protège également l'état natif des protéines, c'est un détergent zwitterionique qui permet d'éviter l'agrégation due à des interactions hydrophobes. Le tampon de solubilisation comprend du Trizma base et du Trizma HCl afin de maintenir le pH et tamponner la solution, ainsi que les ampholytes. Cet homogénat est agité pendant 1 heure à 4°C. Lorsque la solubilisation des protéines est achevée, une dernière étape de centrifugation permet de récupérer une solution clarifiée de protéines concentrées qui sera utilisée pour séparation par électrophorèse bidimensionnelle. L'extrait protéique est stocké à -80°C afin d'éviter toute dégradation des protéines.

3.1.3 Extraction différentielle des protéines de graines

L'extraction des protéines de graines de tabac utilise la solubilité différentielle propre à chacune des différentes classes de protéines, albumines, globulines et glutélines. Cette classification décrite par Osborne (1924) est fonction de la composition en acides aminés des protéines présentes dans la graine leur conférant des degrés divers de solubilité. Ainsi les protéines de graines peuvent être solubles dans l'eau, les sels, les bases ou encore les solvants hydro-organiques. Deux méthodes d'extraction ont été testées pour cette étude. La première est basée sur la littérature (Osborne, 1924) et la seconde a été mise au point au sein du laboratoire mixte CNRS/Bayer CropScience (UMR 5240). Cette dernière technique est

disponible sur Internet à l'adresse <http://www.seed-proteome.com>. Les deux méthodes utilisent les mêmes techniques mais diffèrent par la nature des solutions utilisées pour solubiliser les différentes classes de protéines.

Extraction selon Osborne : L'extraction selon Osborne est une méthode de référence pour les travaux effectués sur les graines. Elle permet d'extraire successivement quatre grandes classes de protéines, les albumines dans l'eau, les globulines dans les sels, les prolamines dans l'alcool et les glutélines dans la soude. Les globulines, glutélines et prolamines sont des protéines de réserve de la graine utilisées pour le redémarrage du métabolisme lors de la germination (Bewley et Black, 1994). Dans notre cas, l'extraction relative aux prolamines ne sera pas effectuée car ce sont des protéines présentes uniquement chez les graminées. On ne les trouve pas dans les graines de tabac. Les albumines correspondent à l'ensemble des protéines solubles de la cellule, par exemple les enzymes du métabolisme.

Lors de l'extraction, toutes les manipulations sont effectuées à 4°C. Les graines sont finement broyées à froid, de manière à obtenir 100 mg de poudre fine. Le broyat obtenu est mélangé avec 8 mL d'eau osmosée pendant 30 min sous agitation, puis la suspension est centrifugée pendant 15 min à 7500 g. Le surnageant contenant les albumines est récupéré. Le culot restant est lavé trois fois à l'eau, puis solubilisé avec 8 mL de NaCl 0,5 M sous agitation pendant 30 min. Après centrifugation à 7500 g pendant 15 min, le surnageant contenant les globulines a été recueilli et le culot lavé de la même manière que précédemment mais avec du NaCl 0,5 M. La troisième extraction, celle des glutélines est réalisée en solubilisant le culot lavé au NaCl avec 8 mL de NaOH à 0,2%. Après agitation pendant 30 min et centrifugation 15 min à 7500 g, le surnageant obtenu, contenant les glutélines est prélevé. Pour concentrer les protéines et éliminer des contaminants pouvant interférer avec les analyses à suivre (comme par exemple les polyphénols), les fractions protéiques sont précipitées sur la nuit à -20°C avec une solution TCA-DTT-Acétone (TCA 20% (w/v), DTT 10 mM, dans de l'acétone froid 80%). Après leur précipitation les solutions sont centrifugées à 7500 g pendant 15 min et lavées deux fois avec une solution de DTT-Acétone (DTT 10 mM, dans de l'acétone froid 80%). Ainsi les échantillons extraits en présence de solutions à fortes concentrations salines, tels que les extraits de globulines ou de glutélines, sont dessalés. Les culots ainsi lavés sont séchés sous hotte pendant 1 heure ou 2 min au Speed Vac puis repris dans un volume de tampon de réhydratation (urée 7 M, thiourée 2 M, CHAPS 4%, Triton X-100 2% (v/v), DTT

20 M, ampholytes pH 3-10 1% (p/v), bleu de bromophénol saturé) permettant d'obtenir une concentration finale en protéines de 5 µg/µL (Figure IV. 5).

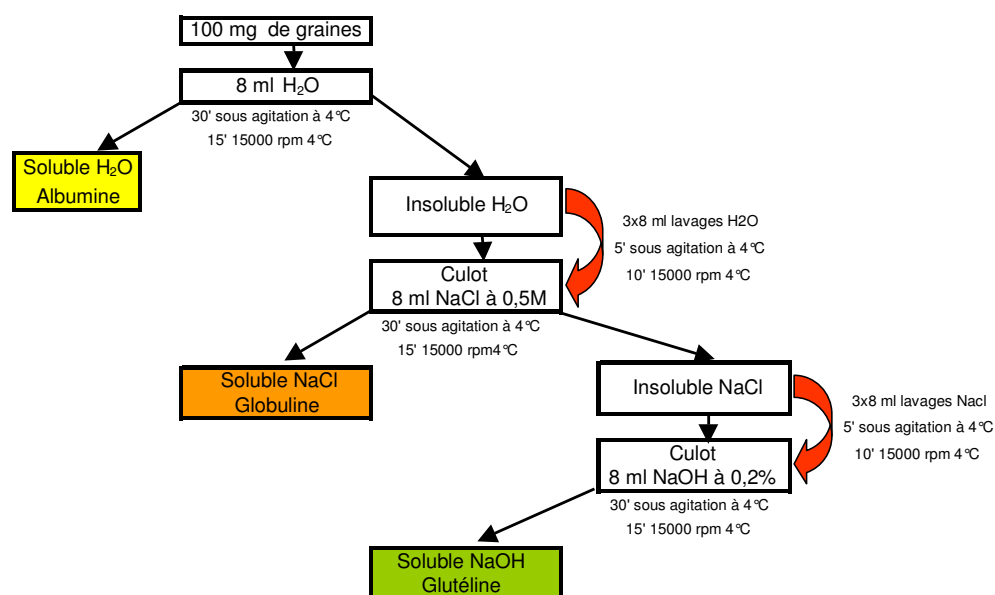


Figure IV. 5 : Extractions protéiques successives selon Osborne (1924)

Extraction selon une technique développée au laboratoire : La technique utilisée au laboratoire a été mise au point lors de travaux antérieurs sur l'analyse des graines d'*Arabidopsis*. C'est une combinaison de la méthode d'Osborne (1924) décrite ci-dessus et de la méthode d'extraction de Lawrence *et al.* (1990), non utilisée pour nos travaux. Cette méthode est réalisée pour permettre l'extraction des protéines dans des conditions compatibles avec l'analyse protéomique et garantir la qualité des extraits, par exemple en évitant l'action des protéases (Gallardo *et al.*, 2002 ; Rajjou *et al.*, 2004). L'extraction est basée sur l'utilisation de deux tampons, l'un nommé HE (HEPES 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 9,0) qui est un tampon de faible force ionique solubilisant notamment les albumines et l'autre dit ARA (urée 7 M, thiourée 2 M, CHAPS 60 mM, Triton X-100 0,2% (v/v), DTT 14 mM, ampholytes pH 3-10, 1% (p/v), Trizma base 14 mM, Trizma-HCl 18 mM), qui permet l'extraction des protéines solubles totales de la graine qui n'étaient pas extractibles par le tampon HE. Ces deux tampons sont complétés avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 comprimé de « complete mini protease inhibitor cocktail tablets », (Roche) pour 50 mL de

tampon). Toutes les opérations sont réalisées à 4°C. Les graines sont finement broyées à froid, de manière à obtenir 100 mg de poudre fine. Le broyat obtenu est mélangé avec 8 mL de tampon HE. Après 30 min sous agitation, une centrifugation de 15 min à 7500 g est effectuée.

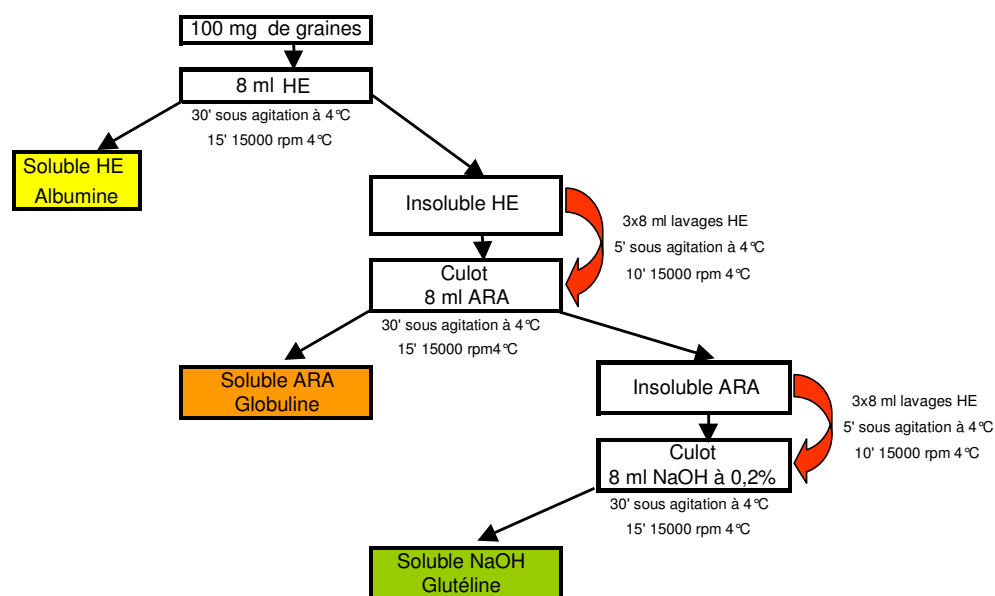


Figure IV. 6 : Extractions protéiques successives selon la méthode du laboratoire

Le surnageant contient la fraction des protéines solubles à faible concentration en sels, les albumines. Le culot est lavé trois fois avec 8 mL de ce même tampon HE, puis solubilisé avec le tampon ARA pendant 30 min sous agitation. La solution est centrifugée 15 min à 7500 g pour récupérer le surnageant contenant les globulines. Le culot est de nouveau lavé à trois reprises avec le tampon HE puis une dernière étape est effectuée avec 8 mL de NaOH à 0,2% pour récupérer la fraction des glutélines (Figure IV. 6).

3. 2 PURIFICATION DES PROTEINES

3.2.1 Purification par chromatographie sur colonne Ni-NTA agarose

Cette méthode a permis une purification rapide des protéines recombinantes DsbA et DsbC. C'est une méthode utilisée lorsque la protéine à purifier est fusionnée à une extrémité composée de six résidus histidines (His-Tag, Hochuli *et al.*, 1987). La purification est effectuée par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel : colonne Ni-NTA agarose (Qiagen). Elle est composée d'ions nickel, immobilisés par des groupements nitroacétique,

l'ensemble étant couplé à de la Sépharose, une matrice insoluble. La fixation de la protéine sur la colonne se fait par l'intermédiaire des noyaux imidazole, contenus dans la structure des histidines de l'extrémité His-Tag et qui se lient aux ions nickel de la matrice. Le surnageant protéique est déposé au sommet de la colonne, préalablement équilibrée avec le tampon utilisé pour la préparation de l'extrait protéique. Les lavages, permettant d'éliminer des fixations non spécifiques, et l'élution de la protéine sont effectués avec des tampons de concentration croissante en imidazole (20 mM et 250 mM). Ce composé dont la structure est proche de celle de l'histidine est capable de se lier seul au nickel en remplaçant les interactions histidine-nickel déjà formées.

La fraction protéique obtenue après élution est alors immédiatement dessalée sur une colonne PD10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) préalablement équilibrée avec du tampon Hepes-NaOH 50 mM pH 7,5 et Na₂-EDTA 1 mM. Cette dernière étape permet de supprimer les traces d'imidazole pouvant déstabiliser la protéine purifiée.

3.2.2 Purification par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions

La purification des protéines recombinantes a nécessité une deuxième étape de purification. Celle-ci a été réalisée par séparation des fractions protéiques sur une colonne FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de type chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q HR 5/5 ; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) équilibrée en tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. La solution est chargée à un débit de 1 mL/min. Les protéines sont ensuite éluées au même débit, d'abord en tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, ensuite selon un gradient linéaire de NaCl de 0 à 0,75 M. L'éluât est collecté par fraction de 1 mL. La densité optique à 280 nm est mesurée pour chaque fraction. Les fractions les plus riches sont analysées.

3. 3 DOSAGE DES PROTEINES

3.3.1 Dosage à 280 nm

L'absorption maximale des acides aminés aromatiques se situe au voisinage de 280 nm. Une unité d'absorption à 280 nm correspond à une concentration moyenne en protéine d'environ 1 mg/mL.

3.3.2 Dosage par la méthode de Bradford

Les protéines extraites sont dosées selon la méthode de Bradford (1976). C'est une méthode basée sur une réaction colorimétrique des protéines en présence de bleu de Coomassie : il y a modification de la longueur d'onde d'absorption maximale du bleu de Coomassie lorsqu'il se fixe sur les protéines (de 460 à 595 nm). Les dosages sont réalisés avec différents volumes d'extrait protéique (1µL, 2µL et 5µL), 200 µL de réactif de Bradford (Bio-Rad) et 800 µL d'eau. L'absorption est mesurée à 595 nm. La concentration des protéines est alors obtenue par rapport à une courbe étalon réalisée à l'aide de la protéine BSA.

3. 4 PRECIPITATION DES PROTEINES AU TCA

Les protéines peuvent être trop diluées pour leur utilisation ultérieure. Une précipitation au TCA permet alors de les concentrer. Du TCA 20% est ajouté aux échantillons protéiques et ramené à une concentration finale de 5%. Après une incubation de 20 min sur la glace, les protéines sont sédimentées par une centrifugation de 10 min à 14000 g. Le culot protéique est alors repris avec une solution de Na₂CO₃ 0,5 M, de manière à neutraliser le pH.

3. 5 SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE

L'analyse des protéines d'un extrait est réalisée par séparation électrophorétique en gel de polyacrylamide, sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines vont être séparées selon leur masse moléculaire dans un gel d'acrylamide, de concentration adaptée. On peut réaliser des électrophorèses en conditions dénaturantes (en présence de SDS, les sous-unités protéiques seront dissociées), ou en conditions natives (pas de dissociation des sous-unités protéiques).

3.5.1 Séparation des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

En conditions dénaturantes, les protéines extraites et dosées sont reprises dans du tampon de charge 1x (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, SDS 1%, glycérol 50%, βME 5% et bleu de bromophénol) puis chauffées à 100°C au bain-marie pendant 5 min. Les protéines ainsi

traitées, seront séparées en gel de polyacrylamide-SDS (Laemmli, 1970) selon leur masse. En fonction de la nature des protéines à analyser, des gels de concentrations fixes ou en gradient sont utilisés. Les gels en gradients sont utiles car ils permettent une séparation plus fine des protéines.

Les gels de séparation les plus couramment employés sont des gels verticaux précoulés (Criterion XT Bis-Tris precast gels, Bio-Rad) dont le pourcentage peut être fixe (en général 12%) ou sous forme de gradient (10/20%). Il est également possible, lorsque cela est nécessaire, de faire des gels de pourcentage en acrylamide personnalisés (dans le cas de gels en gradients deux solutions à différents pourcentages seront nécessaires pour établir le gradient). Ces gels sont préparés à partir d'une solution de séparation, ou deux dans le cas d'un gradient, contenant du Tris-HCl 0.376 M, pH 8,8, du SDS 0,1%, de l'acrylamide de 10 à 20% en général, du persulfate d'ammonium (APS) de 0,03 à 0,05% et du tetraméthyl-ethylenediamine (TEMED) pour polymériser le gel (10 μ L dans 12 mL). La polymérisation de ce premier gel se fait pendant 30 à 45 min à température ambiante, sous une couche d'éthanol pour isoler le gel de l'oxygène. Après polymérisation, le gel est surmonté par un gel dit de concentration, de composition identique au gel de séparation mais avec un faible pourcentage en acrylamide (en général 3, 4 ou 5%).

Les extraits protéiques traités sont déposés dans les puits du gel à côté de marqueurs moléculaires (BioRad ; prestained SDS-Page standards low range, Kaleidoscope Polypeptide Standards). L'électrophorèse est conduite à température ambiante, à un voltage constant pouvant aller de 90 à 150 V (voltage appliqué à l'aide d'un appareil Bio-Rad criterion system), dans un tampon de migration 1x TGS (mM Tris 25, mM glycine 192, SDS 0,1%), 1X MOPS (acide morpholinopropane sulfonique, XT MOPS running buffer, Bio-Rad) ou encore dans un tampon 1x MES (acide morpholinoéthane sulfonique, XT MES running buffer, Bio-Rad). Ce tampon est choisi en fonction de la taille des protéines que l'on veut mettre en évidence et de la concentration du gel en acrylamide.

3.5.2 Séparation des protéines en conditions natives

En conditions natives, les protéines extraites sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide de la même façon que des protéines séparées en conditions dénaturantes. On prend soin cependant d'effectuer toute la manipulation en absence d'agents dénaturants ou réducteurs (le SDS, le DTT ou encore le β -ME ne seront pas utilisés dans le tampon d'extraction, dans le tampon de charge etc...). Cette technique permet de séparer des

protéines dans leur configuration native (sous forme de dimère par exemple) en conservant leur activité intacte.

3.5.3. Visualisation du profil protéique

Après migration des protéines, les gels sont immergés pendant 30 min dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie (méthanol 40%, acide acétique 10% et bleu de Coomassie R-250 (Bio-Rad) 2,5%), puis décolorés dans plusieurs bains successifs d'éthanol 40%, acide acétique 10%. Ils sont alors conservés dans une solution d'éthanol 10%, acide acétique 10%. Le seuil de détection des protéines au bleu de Coomassie est d'environ 100 ng. Avant son séchage, le gel est incubé 30 min dans une solution de Gel Drying Solution (Bio-Rad) pour éviter qu'il ne rétrécisse. Enfin, le séchage est effectué à 80°C sous vide pendant 20 min (Gel Dryer model 543, Bio-Rad).

3.5.4. Electroélution et dialyse à partir d'un gel SDS-PAGE

L'électroélution est une méthode utilisée pour extraire les protéines d'un gel d'électrophorèse. Les protéines que l'on souhaite purifier sont séparées par électrophorèse. La bande du gel contenant la protéine d'intérêt est alors découpée et fractionnée en petits dés de 1 mm/1 mm environ afin de faciliter l'extraction. Ces échantillons sont alors placés dans un boudin de dialyse, lequel est alors directement introduit dans une cuve contenant du tampon (SDS 0,1% et bicarbonate d'ammonium 50 mM). Un courant est alors appliqué, appelant la molécule à la surface pour son extraction et son analyse ultérieure.

3. 6 IMMUNODETECTION DES PROTEINES

3.6.1 Préparation d'anticorps polyclonaux de cobaye

Les anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines Dsb ont été préparés au Centre de Bioexpérimentation Valbex (Dr A. Dorier, IUT A, Villeurbanne). Un cobaye est immunisé par deux injections successives de 100 µg de protéine recombinante purifiée et mélangée à de l'adjuvant de Freund. Le sérum est collecté 10 jours après la dernière immunisation et conservé à -20°C.

3.6.2 Western blot

Après séparation par électrophorèse, les protéines contenues dans le gel sont transférées sur une membrane sous l'effet d'un champ électrique. Deux types de membranes peuvent être utilisées : la membrane de nitrocellulose (« pure nitrocellulose membrane » 0,2 μ m Trans-Blot® Transfer Medium, Bio-Rad) ou la membrane PVDF (« Immuno-Blot™ PVDF membrane » 0,2 μ m, Bio-Rad). Cette dernière, plus résolutive, est hydrophobe et nécessite une étape de pré-activation par passage dans une solution de méthanol. Le transfert des protéines est conduit à l'aide d'un appareil de transfert liquide (Criterion Blotter, BioRad), à 100 V pendant 1 heure dans du tampon de transfert (1x TGS, éthanol 20%).

Après transfert la membrane est placée dans une solution de saturation TBS Tween (Tris-base 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, Tween 0,1%) avec 1% d'agent bloquant, (western blocking reagent, Roche), 2 heures à 20°C ou une nuit à 4°C, sous agitation. Cette première étape est une étape de saturation des sites actifs de la membrane qui pourraient réagir avec les anticorps. La membrane est lavée plusieurs fois avec du TTBS (TBS + Tween 0,1%) puis est incubée pendant 2 heures à 20°C ou une nuit à 4°C, sous agitation, avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine à mettre en évidence. L'incubation se fait dans du TTBS avec 1% d'agent bloquant. La membrane est de nouveau lavée dans du TTBS puis incubée 2 heures à 20°C avec l'anticorps secondaire et 1% d'agent bloquant. L'anticorps secondaire est couplé à la phosphatase alcaline qui va catalyser une réaction chimioluminescente lors de la révélation de la membrane. Les derniers lavages sont effectués avec du TTBS puis du TBS. La membrane est incubée pendant 10 min dans une solution substrat (Immun-star™ AP, Biorad), nécessaire à la réaction de chimioluminescence, avant d'être exposée différents temps au contact de films radiographiques (Hyperfilm™ ECL, Amersham).

3.6.3 Dot blot

Le dot-blot permet de quantifier un ARN ou fragment d'ADN donné sans séparation préalable sur gel d'électrophorèse. Cette technique consiste à déposer des protéines sur une membrane (nitrocellulose ou PVDF) sous forme de points puis à effectuer les étapes d'un Western blot classique. Nous avons utilisé le système Bio-dot® microfiltration apparatus (Biorad) qui permet de transférer les protéines sur la membrane par aspiration sous vide. Le dépôt a été réalisé directement avec différentes concentrations d'échantillons issus de cultures bactériennes. Les sérums contenant les anticorps dirigés contre les protéines Dsb ont été

évalués par cette méthode puis utilisés comme anticorps primaires à différentes concentrations.

3. 7 ANALYSE DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) décrite par O'Farrel en 1975 est une méthode combinant deux séparations séquentielles en gel de polyacrylamide (Figure IV. 7).

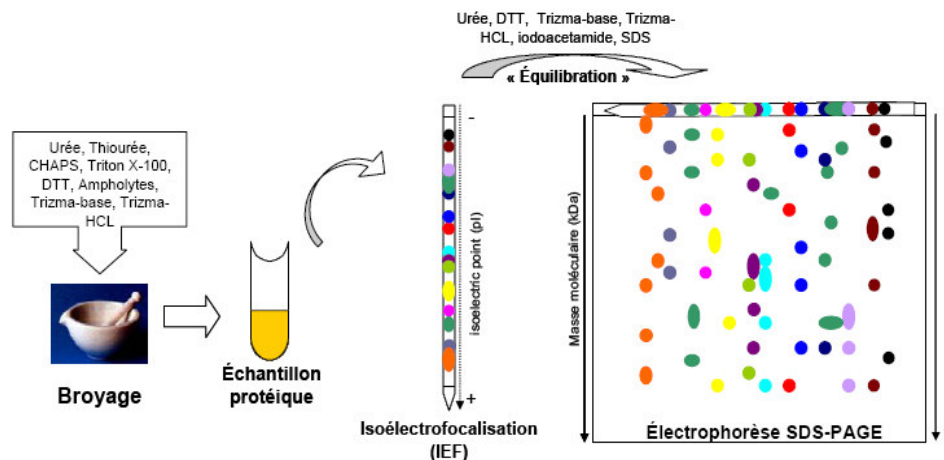


Figure IV. 7 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle

Séparation des protéines en fonction de leur charge au cours de l'IEF. Équilibration en SDS, réduction des ponts disulfures par le DTT et blocage des SH par l'iodoacétamide. Séparation des protéines en fonction de leur masse dans une seconde dimension en gel SDS-PAGE.

- ✓ La première dimension (IEF) correspond à une séparation des protéines, selon leur point isoélectrique (pI), dans un gel contenant un gradient de pH immobilisé réalisé par coulage de solutions d'Immobilines co-polymérisant avec un gel d'acrylamide (Bjellqvist *et al.*, 1982). Les protéines soumises à un champ électrique constant migrent dans le gel jusqu'à la position où le pH du milieu est égal au pI de la protéine pour laquelle sa charge globale est nulle.
- ✓ La deuxième dimension correspond à une séparation en SDS-PAGE. Entre les deux se situe une étape dite d'équilibration des gels d'isoélectrofocalisation qui permettra aux polypeptides de se charger en SDS. Dès lors, les molécules sont séparées en fonction de leur masse apparente. Les spots sont ensuite révélés par coloration au nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie.

Pour chaque échantillon de protéines, les gels 2D ont été réalisés au minimum en trois exemplaires et à partir de deux extractions différentes en utilisant l'équipement Multiphor II

et IsoDalt (Amersham Pharmacia Biotech), permettant de conduire les électrophorèses à partir simultanément de 10 gels de manière reproductible.

3.7. 1 Réhydratation des gels d'IEF

L'IEF est réalisée à partir d'un volume constant de chaque extrait protéique. Les extraits pour les gels analytiques (colorations au nitrate d'argent) contiennent environ 100 µg de protéines. La quantité est doublée pour les gels préparatifs, colorés au nitrate d'argent modifié selon Schevchenko *et al.* (1996). Au moment du dépôt, le volume de chaque échantillon a été complété à 450 µL avec une solution de solubilisation (urée 7M, thiourée 2M, CHAPS 2%, Triton X-100 2% (v/v), DTT 20 mM, ampholytes pH 3-10 1% (p/v), inhibiteurs de protéases, dans de l'eau stérile) contenant une trace de bleu de bromophénol pour vérifier la séparation électrophorétique des protéines au cours de l'IEF. Chaque homogénat est réparti uniformément dans une rangée de la chambre de réhydratation des strips (Reswelling Tray, Amersham Pharmacia Biotech). Le film en plastique souple recouvrant des bandelettes d'acrylamide contenant un gradient de pH immobilisé (Immobiline™ DrySrips, Amersham Biosciences), de pH 3-10 non linéaire, est délicatement enlevé et les strips sont ensuite plongés dans les rangées de la chambre de réhydratation sur les extraits protéiques. Le but de cette opération est plus de charger les strips en protéines des extraits que d'effectuer une simple réhydratation. Dix réhydratations peuvent être simultanément réalisées, pendant 14 heures à 20°C. Pour éviter toute évaporation, de l'huile minérale doit être rajoutée dans chaque rangée. Le contrôle de la température est important car il évite les réactions de carbamylation modifiant la charge nette des protéines. Ces réactions sont dues à l'urée qui, sous forme soluble, donne du cyanate d'ammonium très actif au niveau des fonctions amines des protéines surtout à des températures élevées.

3. 7. 2 Migration en première dimension : Isoélectrofocalisation (IEF)

L'IEF est réalisée avec le système Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech) relié à un générateur et programmeur (Electrophoresis Power Supply-EPS 3501 XL, Amersham Pharmacia Biotech). Pour établir un transfert de chaleur entre l'appareil Multiphor II et la cassette d'électrophorèse, du kérosène est ajouté sur ce système où la cassette est déposée. Les strips sont ensuite placées sur la cassette, face plastique au contact du support et extrémité avec le signe « + » (pH acide) du côté de l'anode. Pour assurer le contact électrique, deux bandelettes de papier filtre épais (Filter Paper Extra Thick, Bio-Rad) d'environ 4 cm de

largeur sont hydratées avec de l'eau Milli-Q puis déposées à chaque extrémité des strips sur environ 2 mm du gel. Les électrodes sont ensuite placées sur ces bandelettes de papier filtre. Au cours de l'IEF, le papier filtre va absorber les sels des extraits qui sont susceptibles de perturber la migration des protéines. Les strips sont ensuite recouvertes d'huile minérale puis l'IEF a lieu en trois étapes. La première étape dure 1 min à 500 V, et la deuxième 1 h 30 min à 3500 V, 2 mA et 5 W. Puis une troisième étape de migration identique à la deuxième est réalisée pendant 17 h. Au terme de cette étape, les protéines se sont réparties dans les strips selon leurs points isoélectriques et suivant le gradient de pH immobilisé.

3. 7. 3 « Equilibration » des protéines

A l'issue de l'IEF, l'« équilibration » des protéines consiste à équilibrer les protéines en charge, c'est-à-dire à leur donner une charge négative homogène ainsi qu'à les maintenir dans un état dénaturé afin d'éviter tout type d'agrégation, conditions requises pour la migration en SDS-PAGE en deuxième dimension de l'électrophorèse, méthode décrite par Görg *et al.* (1987). Cette étape se réalise en présence de SDS qui va permettre aux protéines de se charger négativement proportionnellement à leur taille, et de DTT qui va réduire les ponts disulfures. Ainsi la mobilité électrophorétique des protéines traitées sur les strips va dépendre uniquement de leur masse moléculaire. Une solution A, composée de DTT 50 mM, SDS 2,5% (p/v), urée 6 M, bis-Tris 0,15 M, HCl 0,1 M et glycérol 30% (v/v), est mise au contact des strips chargées en protéines, pendant 20 min sous agitation douce dans la cassette d'électrophorèse. Les strips sont rincées avec la même solution A dépourvue de DTT puis rééquilibrées pendant 20 min dans la solution A, où le DTT est remplacé par de l'iodoacétamide 220 mM. Cet agent d'alkylation des thiols libres bloque les réductions réalisées par le DTT.

3. 7. 4 Migration en deuxième dimension

La seconde dimension est effectuée verticalement en gels SDS-PAGE [acrylamide 10% (v/v), pipérazine diacrylamide (PDA) 0,33% (p/v), Trizma base 165 mM, HCl 0,1 M, persulfate d'ammonium 0,07% (p/v), Temed 0,035% (v/v)]. Le PDA remplace le bis-acrylamide. Grâce à son meilleur pouvoir de réticulation des monomères d'acrylamide, le PDA rend les gels plus résistants. Jusqu'à 25 gels (25,5 cm de largeur, 20,5 cm de longueur, 1 mm d'épaisseur) sont préparés verticalement dans le système Hoefer Isodalt (Amersham Pharmacia Biotech) en prenant soin de laisser environ 5 mm au-dessus des gels. Après

polymérisation, une solution d'agarose dénaturante [agarose "low melting" 1% (p/v), SDS 0,4%, bis-Tris 0,15 M, HCl 0,1 M, traces de bleu de bromophénol (pour suivre le front de migration)] est ajoutée dans les puits. Les strips, équilibrées en tampon A, sont rapidement déposées dans l'agarose. L'électrophorèse est ensuite réalisée à 10°C, dans une cuve Isodalt (Amersham Pharmacia Biotech), en présence d'un tampon (pH 8,0) composé de Trizma base 25 mM, taurine 200 mM, SDS 0,1% (p/v) et de thiosulfate de sodium (pentahydrate) 0,125% (p/v), pendant 6 h à 50 V et 15 h à 100 V. La présence du thiosulfate de sodium dans le tampon d'électrophorèse diminue le bruit de fond des gels lors de la coloration au nitrate d'argent. Une fois le front de migration arrivant à l'extrémité du gel, la migration est arrêtée.

3.7. 5 Méthodes de coloration des protéines sur gel 2D

A l'issue de la migration en deuxième dimension, les gels sont délicatement démoulés des plaques de verre. Ils sont ensuite plongés dans une solution de fixation contenant de l'éthanol 30% (v/v) et de l'acide acétique 5% (v/v), pendant 1 heure sous agitation. Les protéines sont ainsi fixées dans les gels SDS-PAGE évitant toute diffusion des protéines pendant les différentes étapes de révélation. De plus, au cours de cette étape de fixation, des substances interférant avec la coloration à l'argent (ions, dénaturants, détergents) sont éliminés des gels. Les protéines sont alors révélées en utilisant les cuves de l'appareil « Autostainer Hoefer® Processor Plus » (Amersham Pharmacia Biotech) qui peut-être programmé pour délivrer automatiquement et de manière reproductible les solutions requises pour la conduite des différents protocoles de coloration des protéines.

Coloration au nitrate d'argent (gels analytiques) : Le protocole de coloration de Blum *et al.* (1987) est utilisé. Les gels 2D, en général deux par cuve, sont lavés quatre fois 10 min dans de l'eau MilliQ et incubés 1 min 30 s dans du thiosulfate de sodium pentahydrate. Après deux lavages de 1 min à l'eau MilliQ, les gels sont incubés 10 min dans la solution de coloration composée de nitrate d'argent 12 mM et de formaldéhyde 0,01% (p/v). Le nitrate d'argent réagit avec le thiosulfate de sodium pour former un complexe qui, à pH basique, est réduit par le formaldéhyde pour donner une coloration brune. Le seuil de détection de cette coloration est de l'ordre du ng de protéine (Rabilloud 1999b ; Chevallet *et al.*, 2006). Après deux lavages de 1 min à l'eau MilliQ, la révélation est effectuée dans une solution basique composée de carbonate de potassium 3% (p/v), formaldéhyde 0,01% (p/v) et de thiosulfate de sodium 0,0012% (p/v). Le développement de la coloration est stoppé par incubation de 10

min dans une solution d'EDTA $\text{Na}_2 \text{2H}_2\text{O}$ 40 mM qui complexe les ions argent non réduits par le formaldéhyde. Les gels colorés sont alors placés pendant une heure dans une solution de conservation contenant 35% (v/v) de glycérol et 65% d'eau MilliQ puis séchés à température ambiante entre deux feuilles de cellophane (Bio-Rad, model « Gel Dryer ») tendues sur un cadre plexiglas.

Coloration au bleu de Coomassie colloïdal (gels analytiques et préparatifs) : Les gels préalablement fixés sont colorés pendant au moins une heure dans une solution de bleu de Coomassie colloïdal G-250 (GelCode[®] blue, Pierce) puis rincés dans l'eau MilliQ afin d'éliminer le bruit de fond. L'analyse des protéines par spectrométrie de masse peut-être directement réalisée à partir des spots protéiques mis en évidence selon cette méthode de coloration. Les gels peuvent être conservés plusieurs mois à 4°C dans de l'eau MilliQ. Après une incubation d'une heure dans une solution de conservation composée de d'éthanol (30% v/v), de glycérol 5% et d'eau MilliQ 65%, ils sont séchés à température ambiante entre deux feuilles de cellophane comme décrit pour les gels colorés au nitrate d'argent.

Coloration de Schevchenko *et al.* (1996) (gels préparatifs) : Cette coloration mise au point par Schevchenko *et al.* (1996) est également une coloration à l'argent mais son intérêt réside dans sa parfaite compatibilité avec les analyses par spectrométrie de masse. Les gels préparatifs qui vont servir au prélèvement de spots sont lavés 10 min dans de l'eau MilliQ, incubés 2 min avec une solution de thiosulfate de sodium 0,02%, et lavés deux fois à l'eau pendant 1 min. Ils sont ensuite colorés pendant 20 min avec une solution composée de nitrate d'argent 0,1% et de formaldéhyde 0,04%, puis lavés deux fois avec de l'eau Milli-Q pendant 1 min. Enfin, les protéines contenues dans les gels sont révélées avec une solution contenant du carbonate de sodium 2% (p/v) et du formaldéhyde 0,04% (v/v). Le développement de la coloration est stoppé par une incubation de 10 min dans une solution d'acide acétique 5%. Les gels sont conservés dans une solution de stockage contenant de l'acide acétique 1% en chambre froide à 4°C jusqu'à leur utilisation pour prélèvement des spots.

3. 8 ANALYSE DENSITOMETRIQUE DES GELS 2D

Pour déterminer les modifications du taux d'accumulation des protéines dans les différentes conditions analysées, les gels ont été scannés puis les images ont été analysées en utilisant le logiciel Image Master 2D Elite version 4 (Amersham Pharmacia Biotech).

3. 8. 1 Acquisition de l'image

Les gels analytiques colorés à l'argent ou au bleu de Coomassie ont été scannés avec le scanner Image relié à un ordinateur équipé du logiciel scanner UMAX (Amersham Pharmacia Biotech). Ce logiciel permet de régler les paramètres d'acquisition de l'image et quantifie les différents niveaux de gris vus par le scanner au travers des gels 2D avec une résolution de 300 dpi (depth per inch). Les images sont archivées au format tif.

3. 8. 2 Détection des spots protéiques (« Spotting »)

Pour chaque analyse d'un groupe de gels 2D (par exemple des réplicats ou une cinétique), une expérience d'analyse d'image a été créée en passant par « File » puis « New Experiment » ainsi que proposé par le logiciel Image Master 2D, en sélectionnant les gels à analyser qui ont été scannés et enregistrés au format tif. La première étape consiste à détecter les protéines, ou spots, dans les gels 2D. Dans la barre de menu du logiciel, le mode de détection des spots est activé (« Detect Spots »). Pour que la détection des spots soit simultanée sur tous les gels, la fonction « Process all gels » doit être activée. Puis l'outil « Wizard », qui propose neuf niveaux de détection de spots avec des sensibilités et tailles de vecteurs (ou opérateurs) différentes, est utilisé pour détecter de manière automatique les spots. La taille du vecteur définit les contours des spots, donc l'aire de ces spots. Lorsqu'un niveau de détection est choisi dans « Wizard », neuf autres fenêtres sont alors proposées avec des niveaux de détection plus précis. Une bonne détection représente l'ensemble des spots entourés avec la plus grande précision. Cependant, la détection automatique des spots doit ensuite être vérifiée soigneusement sur chaque gel en raison de difficultés éventuelles (distorsion des gels, spots de formes complexes). Cette détection automatique peut être corrigée sur seulement un gel, grâce à l'outil « Advanced », après sélection du gel à corriger et désélection de la fonction « Process all gels ». Cet outil permet de modifier indépendamment les paramètres de détection tels que la sensibilité, la taille de l'opérateur et le bruit de fond. Une correction manuelle de la détection des spots peut ensuite être réalisée à l'aide des outils

disponibles permettant de rajouter, d'enlever ou de mieux séparer des spots non correctement traités par le logiciel. Il est possible de visualiser la détection des spots sur tous les gels dans la fenêtre de montage nommée « Montage window ». Pour cela, il est nécessaire de revenir en mode « Sélection » et de cocher « Show spot montage area » dans la fenêtre « Further display options » du logiciel Image Master 2D. Après avoir cliqué au centre de la zone à comparer, les bordures du cadre sont élargies jusqu'à la périphérie de cette zone. La fenêtre « Montage » permet d'observer cette même zone sur tous ou seulement quelques gels. Les gels sont sélectionnés en utilisant la fonction « Select gels ». Il faut noter que cette analyse indispensable est un lourd travail à mener, sachant qu'un gel coloré à l'argent montre plus de 1000 spots protéiques.

3. 8. 3 Comparaison automatique des images des gels (« Matching »)

Les images des gels peuvent être comparées entre elles en utilisant le mode « matching » du logiciel qui détermine les spots communs entre différents gels. Le gel contenant le plus grand nombre de spots est généralement choisi comme référence en passant par « Edit » puis « Choose reference gel ». Le nombre de spots dans chaque gel apparaît dans la fenêtre « Measurements Window ». Tous les gels sont ensuite automatiquement comparés à cette référence. Les deux fenêtres d'images sont alors ouvertes (l'une pour la référence, l'autre pour l'image en cours de traitement) et toutes les options, à l'exception de la grille, sont validées dans « Display Options ». La fonction « Match » est ensuite activée. L'assortiment des spots (« matching ») est correct lorsque tous les vecteurs, représentés sous forme de traits roses, sont dirigés dans le même sens. Dans ce cas, les spots protéiques communs dans les différents gels sont reconnus. Au contraire, lorsque les vecteurs roses sont désordonnés, les spots n'ont pas reconnu leurs homologues dans les différents gels. C'est le cas lorsque des gels dont la migration n'est pas exactement identique sont comparés. Le matching peut alors être corrigé manuellement en utilisant des marqueurs internes. Comme noté précédemment, cette correction manuelle indispensable est un très lourd travail à mener en raison du grand nombre de spots protéiques détectés. Si ces étapes d'entourage de spots et de matching représentent les étapes les plus fastidieuses de l'analyse protéomique, de leur bonne réalisation dépendront la signification statistique des mesures quantitatives et finalement l'interprétation des résultats. Après correction, les spots seront numérotés en passant par « Edit » puis « Synchronise Spot Numbers ». Ainsi, les spots communs dans les différents gels porteront le même numéro. Il faut ensuite s'assurer que les spots qui n'ont pas reconnu

leurs homologues (« unmatched spots ») sont bien spécifiques de certains échantillons. A cette fin, chaque spot « unmatched » est sélectionné dans le tableau de valeurs de la fenêtre « Measurement window » et le spot correspondant s'entoure de vert dans la fenêtre d'image du gel. Si ce spot n'a pas été détecté pour une raison artefactuelle, la détection et le matching pourront être corrigés. La fonction « Modify Reference » est utilisée pour rajouter des spots dans le gel de référence.

3. 8. 4 Étalonnage de l'intensité des spots

L'intensité des spots, c'est-à-dire la valeur de densité optique mesurée par le scanner au travers des spots, peut être étalonnée en utilisant la bandelette Kodak « Photographic step tablet n°3 » représentant un dégradé de niveaux de gris. Le mode d'étalonnage « Intensity calibration » est sélectionné et l'image de la bandelette Kodak, scannée et enregistrée en format tif, est insérée en passant par « File » puis « Add Gels » dans l'expérience. La fonction « Apply calibration to all gels » est ensuite activée. Les différentes valeurs de densité optique préenregistrées se positionnent alors sur les niveaux de gris correspondants. Cet étalonnage permet au logiciel de déterminer les volumes des spots en fonction de la densité optique mesurée et de l'aire des spots mesurée par le scanner. La bandelette Kodak peut ensuite être retirée de l'expérience en passant par « File » puis « Remove Gels ».

3. 8. 5 Soustraction du bruit de fond

Le bruit de fond des gels au voisinage de chaque spot peut être soustrait du volume des spots par la fonction « Background subtraction ». Le mode « Lowest on Boundary » soustrait le bruit de fond le plus faible localisé à la périphérie de chaque spot. L'intensité des spots soustraite de l'intensité du bruit de fond est visualisée sur l'image des gels après sélection de « Minus background » dans la fenêtre « Display Options » du logiciel Image Master 2D.

3. 8. 6 Normalisation du volume des spots

Les volumes des spots sont indiqués dans le tableau de valeurs de la fenêtre « Measurements Window ». Ces volumes peuvent être normalisés en passant par « Analysis » puis « Normalisation ». Le mode « Total Spot Volume » normalise le volume d'un spot par rapport au volume total correspondant à l'ensemble des spots détectés dans le gel. Il faut sélectionner l'option « Multiply by total area » et multiplier les valeurs par un facteur que l'on fixe manuellement de manière à avoir des valeurs correspondant à des nombres entiers. Nous

avons choisi de normaliser avec « Total Spot Volume » en multipliant par un facteur 100 000 afin de s'affranchir des petites valeurs obtenues par ce choix de normalisation.

3. 8. 7 Gels moyens et expression des résultats

Des gels moyens ont été créés à partir d'au moins trois répétitions de chaque échantillon en utilisant le mode « Averaged Gels ». Un nom peut être donné au gel moyen puis les trois gels du même échantillon sont sélectionnés. Sur chaque gel moyen, on applique le traitement « Standardise spot shape » pour améliorer la détection des spots. Le logiciel Image Master 2D calcule automatiquement les volumes normalisés moyens. Les variations des volumes normalisés sont ensuite recherchées entre différents gels moyens en utilisant le mode « Spot Filtering ». Ce mode sélectionne les spots dont le niveau d'accumulation varie dans les différents gels analysés. Les tableaux de la fenêtre « Measurements Window » peuvent être directement exportés dans le logiciel Excel qui permet, grâce à l'utilisation de filtres appropriés, de retrouver les spots variables.

3. 9 ANALYSE DES PROTEINES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Cette stratégie consiste à digérer de manière enzymatique une protéine et à mesurer les masses des différents peptides issus de cette digestion. La protéine est identifiée dans les banques de données publiques directement à partir de la carte massique ainsi obtenue.

3.9.1 Prélèvement des spots

Les analyses de spectrométrie de masse sont réalisées directement à partir des spots prélevés sur des gels 2D dits « préparatifs » colorés à l'argent par le protocole de Schevchenko *et al.*, (1996). Pour éviter toute contamination par la kératine, les prélèvements des spots sont réalisés sous une hotte à flux laminaire. Chaque spot est excisé à l'aide d'un cône stérile de pipette découpé, avec des ciseaux désinfectés, puis déposé dans un tube Eppendorf stérile. Les spots sont conservés à -80°C jusqu'à leur analyse par spectrométrie de masse.

3.9.2 Spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse permet de déterminer avec une bonne précision et une sensibilité élevée un paramètre intrinsèque des molécules: leur masse. Elle permet aujourd'hui, grâce à des progrès considérables en instrumentation et en méthodologie, d'identifier rapidement une protéine isolée par un gel 2D ou d'autres moyens de séparation. En fait, l'analyse par spectrométrie de masse ne permet pas de déterminer toute la séquence de la protéine à analyser. Celle-ci est identifiée grâce aux masses caractéristiques des peptides (empreintes peptidiques massiques, MALDI-TOF) ou par fragmentation de ses peptides (Informations de fragmentation, MS-MS) fournissant des informations sur la séquence en acides aminés. L'identification d'une protéine est réalisée par comparaison avec les séquences contenues dans les bases de données peptidiques ou génomiques. La spectrométrie de masse est devenue aujourd'hui un outil incontournable pour l'analyse des protéines (Wilm, 2000). Un spectromètre de masse est un outil analytique qui permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux, puis de les séparer en fonction de leur rapport de masse/charge, noté m/z , pour déterminer leur masse moléculaire m , où m est la masse du composé et z sa charge. L'appareillage est toujours constitué des parties suivantes :

- une source d'ions dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse (vaporisation / sublimation / désorption) de l'échantillon à analyser, l'ionisation des molécules, mais aussi la décomposition des ions,
- un analyseur qui permet de trier les ions en fonction de leur rapport m/z ,
- un détecteur qui compte les ions en leur associant leur rapport m/z ,
- un enregistreur pour le traitement du signal et la visualisation des spectres,
- un système d'étalonnage qui permet de corrélérer la grandeur réelle mesurée par l'instrument et le rapport m/z .

Ce n'est que grâce au développement en 1988 de deux nouvelles techniques d'ionisation pour la spectrométrie de masse, l'électrospray (ESI pour ElectroSpray Ionization, découvert par John Fenn) et le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, découvert par Koichi Tanaka), que l'étude des peptides et de protéines ne prirent leur essor. John Fenn et Koichi Tanaka ont ensemble reçu le prix Nobel de Chimie en 2002 pour le développement de méthodes pour « l'identification et l'analyse structurale des macromolécules biologiques » et « le développement de méthodes douces de désorption et d'ionisation pour l'analyse par spectrométrie de masse de macromolécules biologiques » (Fenn *et al*, 1989 ; Tabet et Rebuffat, 2003). Ces méthodes d'ionisation sont dites « douces », car l'énergie communiquée

à l'ion moléculaire au cours de l'ionisation sous forme d'énergie interne est faible. Ceci permet d'éviter dans la source une fragmentation massive des biomolécules, qui sont relativement fragiles.

3. 10 ANALYSE ENZYMATIQUE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE

Deux tests différents sont effectués pour tester l'activité de la phosphatase alcaline. Ils sont basés tous deux sur l'activité déphosphorylante de cette enzyme.

3.10. 1 Test NBT BCIP

Le BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) est un substrat utilisé pour une détection sensible de la phosphatase alcaline (Mc Gadey, 1970). La déphosphorylation du BCIP par cette enzyme donne un produit oxydé bleu-violet. (Figure IV. 8). Le BCIP est utilisé sous forme du complexe qu'il forme avec le NBT (Nitroblue Tetrazolium), ce composé sert d'oxydant et donne également une couleur bleu-violet. De ce fait il intensifie la coloration du produit et rend la détection encore plus sensible (Wolf, 1973). Le complexe est disponible en tablettes dans le kit NBT/BCIP ready-to-use tablets (Roche) ou encore sous forme de poudre (Calbiochem). Sous l'une ou l'autre des formes disponibles, le BCIP, dilué dans de l'eau stérile est utilisé directement par introduction dans le milieu de culture bactérien afin de produire sur boîte d'agarose une coloration des colonies exprimant la phosphatase alcaline active, ou par addition sur les membranes PVDF après transfert, de façon à révéler la présence de l'enzyme active.

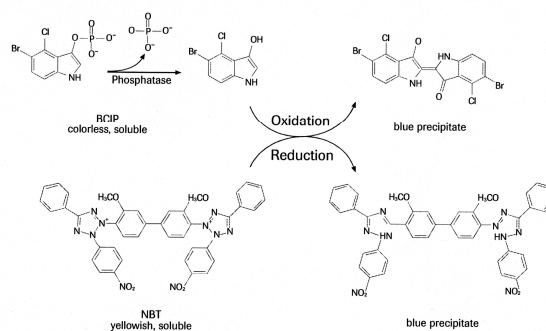
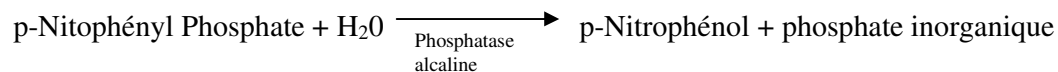


Figure IV. 8 : Réaction NBT/BCIP avec la phosphatase alcaline.

3. 10. 2 Test enzymatique pour la phosphatase alcaline

Un second substrat, le pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate), (Sigma, kit alcaline phosphatase yellow pNPP liquid substrate), est utilisé pour la détection de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline. La déphosphorylation du pNPP par la phosphatase alcaline se fait selon la réaction suivante :



Le produit obtenu par cette réaction est jaune. La cinétique de la réaction est suivie sur spectrophotomètre (Uvikon 930) en lisant l'absorbance à 405 nm.

4. BIOLOGIE CELLULAIRE

4. 1. TRANSFORMATION GENETIQUE DES PLANTES

Pour les travaux de transgénèse végétale, toutes les cultures *in vitro* sont réalisées sur du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) avec des vitamines (Gamborg *et al.*, 1968) contenant du saccharose (30 g/L) et du phytagar (7 g/L). Un milieu identique mais auquel on rajoute des hormones végétales, la BAP (benzamino purine) et l'ANA (acide α -naphtalène acétique), est utilisé comme milieu de régénération. Trois milieux dérivés sont utilisés :

- ✓ MS 0.05-2, pour la régénération de plantules, avec 0,05 μ g/mL d'ANA et 2 μ g/mL de BAP ;
- ✓ MS 00, milieu sans hormones, pour le développement des plantules ;
- ✓ MS 1/2, milieu sans hormone avec seulement 15 g/L de saccharose, favorisant l'enracinement des plantules.

4. 1. 1 Transformation nucléaire par *Agrobacterium tumefaciens*

Cette technique de transformation génétique à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* est la technique la plus utilisée pour la transformation nucléaire chez les plantes. *A. tumefaciens* est une bactérie gram-négative, responsable de la galle du collet, une maladie des plantes dicotylédones. Cette maladie se traduit par une division anarchique des cellules au point d'infection et par le développement d'une tumeur végétale. Lors de l'infection il y a intégration de façon stable d'un fragment d'ADN d'origine bactérienne dans la plante.

En effet, lorsqu'une cellule végétale est blessée, elle libère des composés phénoliques qui vont avoir un effet chimiotactique sur les bactéries et déclencher le processus d'infection. Ces composés agissent comme un signal d'induction des gènes de virulences (*vir*). Ce sont des gènes localisés sur les grands plasmides que possèdent les bactéries *A. tumefaciens*. Ces derniers sont appelés plasmides Ti (pour tumour inducing) et portent, en plus des gènes *vir*, une région d'ADN-T correspondant à la séquence d'ADN qui sera transférée dans le génome végétal (Stanton, 2003). La région d'ADN-T est délimitée par des bordures droite et gauche de 25 paires de bases. Elle contient des oncogènes induisant le développement de la tumeur ainsi que des gènes qui dirigent la synthèse des opines (acides aminés liés à un sucre utilisables par la bactérie et non par la plante). Suite à l'induction des gènes *vir*, les protéines

Vir produites vont couper l'ADN-T au niveau des bordures et le protéger des nucléases afin qu'il puisse traverser les nombreuses barrières physiques et être transporté jusqu'à l'ADN génomique de la plante où il pourra s'intégrer puis s'exprimer. L'exportation de l'ADN-T, et son adressage vers le noyau de la cellule végétale sont assurés par la bactérie tandis que son intégration dans le génome nucléaire végétal est assurée par les enzymes responsables de la réparation de l'ADN dans la cellule végétale hôte (Tzfira *et al.*, 2004).

Ce mécanisme naturel de transfert d'ADN a été « domestiqué » à des fins biotechnologiques et notamment pour devenir un outil de transformation génétique. En effet, seules les bordures de l'ADN-T sont nécessaires à son transfert dans le génome végétal. De ce fait, le plasmide Ti peut-être désarmé par délétion des oncogènes présents sur l'ADN-T de la souche sauvage : la nouvelle souche perd alors la capacité d'induire des tumeurs. Les gènes d'intérêt ainsi que les séquences nécessaires à la réalisation de la transformation génétique sont placés entre les bordures de l'ADN-T.

Préparation des Agrobactéries transformées: Les cellules *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 compétentes sont transformées par électroporation par le plasmide recombinant contenant le gène d'intérêt que l'on souhaite introduire dans le génome nucléaire de la plante. Les agrobactéries transformées sont sélectionnées sur milieu AB contenant:

- 25 mL de solution tampon AB 20X (15 g K_2HPO_4 , 6,6 g NaH_2PO_4 , qsp 250 mL H_2O),
- 25 mL de solution saline AB 20X (5 g NH_4Cl , 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl, 66,2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 12,5 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$),
- 12,5 mL de saccharose 20%
- 7,5 g de bacto-agar qsp 437,5 mL d' H_2O .

Ce milieu est additionné d'un antibiotique approprié (pour nous la kanamycine et la rifampicine) pendant 48h à 28°C. Une colonie isolée est alors cultivée en milieu liquide (5mL) additionné des antibiotiques de sélection pendant 24 h à 28°C, puis le tout est étalé sur des boîtes de milieu AB + antibiotique. Après 48 h d'incubation à 28°C, le tapis bactérien formé est prélevé à l'aide d'une öse et mélangé à 5 mL de $MgSO_4$ (10 mM), la suspension bactérienne est centrifugée, et lavée deux fois par du $MgSO_4$ puis resuspendue dans 10 mL de la même solution.

Préparation des tissus à transformer: De grandes feuilles de tabac Petit Havana et/ou PBD6, préalablement cultivé en serre, sont coupées à la base du pétiole. Elles sont

désinfectées dans une solution de Domestos 10% pendant 10 min, puis rincées par trois lavages consécutifs à l'eau stérile.

Transformation nucléaire via *Agrobacterium* : La transformation du tabac est réalisée suivant la méthode développée par Horsch *et al.* (1985): des disques foliaires (1 cm de diamètre) sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce sur les feuilles de tabac stérilisées. Ils sont immergés 10 min dans la suspension contenant les agrobactéries, puis, transférés sur milieu MS 0,05-2 pendant deux à trois jours en chambre de culture avant la régénération et la sélection des plantes transformées.

4. 1. 2 Transformation chloroplastique par biolistique

Cette technique a pour but de forcer la pénétration de l'ADN à travers la paroi pectocellulosique des cellules végétales. Le principe consiste à projeter sur le tissu à transformer de toutes petites billes d'or ou de tungstène enrobées d'ADN, à l'aide d'un canon à particules (Figure IV. 9).

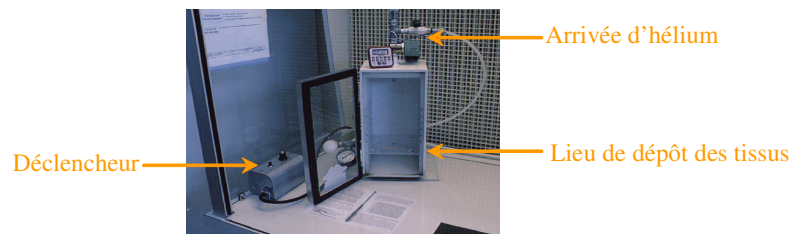


Figure IV. 9 : Canon à particules

Préparation des tissus à transformer : Des feuilles (5 à 10 cm) de tabac PBD6, préalablement cultivés en milieu stérile, sont coupées à la base du pétiole et déposées sur milieu MS 0,05-2 en attendant leur utilisation (30 min). Les transformations par biolistique sont réalisées par série de 10 tirs, soit pour 10 feuilles de tabac.

Préparation de l'ADN recombinant : Pour une série de 10 tirs, 500 μL de particules d'or (0,6 μm de diamètre) sont mélangées successivement à 100 μL d'ADN (de concentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 500 μL de CaCl_2 (2,5 M), et 200 μL de spermidine (0,1 M). L'ensemble est homogénéisé et laissé à sédimenter au minimum 10 min. Le mélange est ensuite centrifugé dans le but de ne garder que 30 μL , 3 μL par tir étant nécessaires.

Bombardement : Pour chaque tir, 3 μ L de la suspension préparée sont déposés dans un filtre de type « swinnex », lui même vissé sur le "gun" situé dans une enceinte sous vide (Figure IV. 9). Les tissus sont bombardés en utilisant un canon à particule de type PIG « Particule Influx Generator ». Le tir est réalisé par une décharge d'hélium délivré sous une forte pression (6 bars) dans l'enceinte sous vide du canon à particules. La feuille, bombardée sur sa face inférieure, est placée sur le milieu de régénération MS 0,05-2 pendant 2 à 3 jours en chambre de culture.

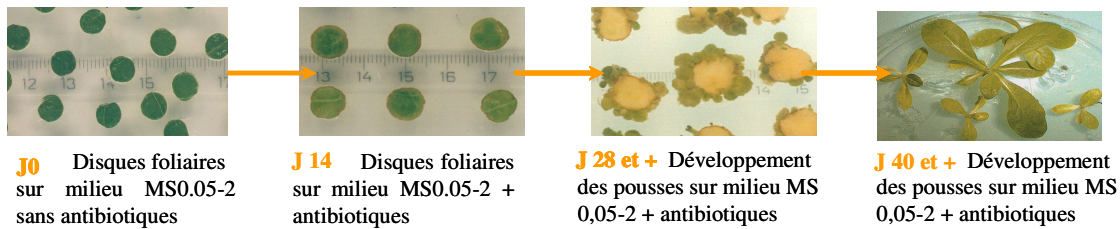
4. 1. 3 Régénération et sélection des plantes transformées

Le principe de régénération est identique qu'il s'agisse d'une transformation nucléaire ou plastidiale, seuls les antibiotiques permettant la sélection diffèrent (Figure IV. 10). La sélection débute après 2-3 jours en chambre de culture en transférant les disques foliaires ou les feuilles bombardées préalablement découpées en petits morceaux ($\sim 1 \text{ cm}^2$) sur le milieu de régénération MS 0,05-2 auquel sont ajoutées soit :

- la céfotaxime (450 mg/L) et la kanamycine (100 mg/L) pour les plantes transformées avec les agrobactéries. La céfotaxime est un bactériostatique qui bloque la prolifération des agrobactéries sur le milieu. La kanamycine, quant à elle, permet de sélectionner les cellules transformées contenant donc le gène de résistance *nptII* ;
- la spectinomycine (500 mg/L) dans le cadre des transformations chloroplastiques, car le marqueur de sélection introduit dans les plastes est le gène de résistance à la spectinomycine (*aadA*).

Tous les 10 à 15 jours, les explants sont repiqués sur un milieu de régénération identique jusqu'à l'apparition de cals puis de pousses. Les pousses sont alors repiquées sur du milieu MS 0-0 contenant les agents de sélection pour leur développement, puis milieu MS $\frac{1}{2}$ adéquat, pour favoriser le développement de racines. A ce stade, les plantules pourront être mises en chambre d'acclimatation avant d'être cultivées en serre.

Etapes de régénération des plantes transformées par *Agrobacterium tumefaciens*



Etapes de régénération des plantes transformées par biolistique

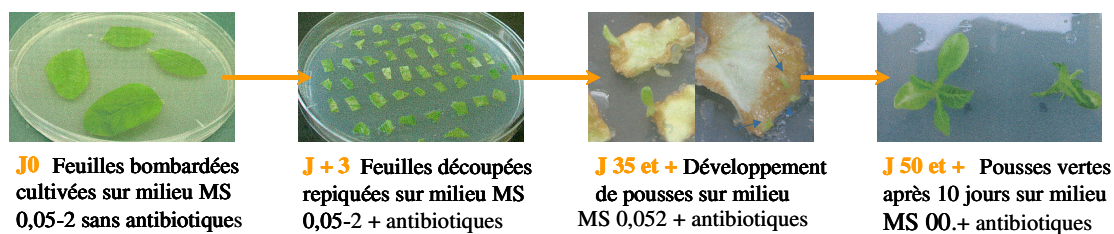


Figure IV. 10 : Régénération et sélection des plantes transformées

4. 2 CROISEMENTS DE PLANTES TRANSFORMEES, HYBRIDATION

Dans le but de combiner des caractères obtenus par transformation nucléaire fixés par autofécondation avec des caractères obtenus par transformation chloroplastique des techniques d'hybridation ont été utilisées directement sur les plantes intéressantes. L'hybridation est une fécondation croisée de l'ovule d'une plante par le pollen d'une autre plante. La technique permettant l'obtention d'hybrides a consisté dans un premier temps, à castrer manuellement les fleurs de tabac, c'est-à-dire retirer toutes les étamines contenant le pollen (Figure IV. 11). Cette plante de tabac constitue alors

la plante femelle. Le pollen a été récupéré de la plante avec laquelle on souhaite effectuer l'hybridation et déposé sur le stigmate du tabac femelle castré.

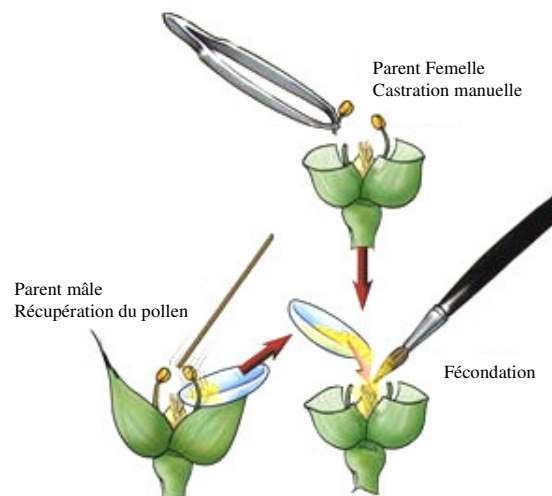


Figure IV. 11 : Technique d'hybridation

4. 3 PREPARATION DE CHLOROPLASTES PURIFIES DE FEUILLES DE TABAC

4. 3. 1 Préparation de chloroplastes

La technique utilisée pour isoler les chloroplastes de feuilles de tabac est dérivée de celle décrite par Mourioux et Douce (1981).

Toutes les étapes sont menées à 4°C. Une dizaine de feuilles de tabac sont prélevées et broyées délicatement dans un Waring Blender contenant 200 mL de solution de broyage (sorbitol 330 mM, Hepes 50 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, BSA (0,5%), ascorbate de sodium 4 mM, cystéine 7 mM, pH 7,8). Le broyat obtenu est passé sur trois épaisseurs de gaze et une toile à bluter de 50 µm de vide de maille et le filtrat récupéré est centrifugé à 1500 g pendant 20 min. A l'issue de la centrifugation, le culot est repris délicatement dans 25 mL de tampon de lavage (sorbitol 330 mM, Hepes 50 mM, KCl 10 mM, pH 7,8) et la solution est centrifugée à 1500 g pendant 20 min. Cette étape de lavage est répétée trois fois. A l'issue du dernier lavage, le culot est repris dans 5 mL de solution de lavage. Cette suspension, enrichie en chloroplastes, est filtrée sur une toile à bluter et directement déposée dans un tube Corex sur un gradient discontinu de Percoll (40 mL de milieu de lavage contenant 40% (v/v) de Percoll et 20 mL de milieu de lavage contenant 80% (v/v) de Percoll) puis le tout centrifugé à 2 000 g pendant 10 min. Ce gradient de Percoll permet d'éliminer les contaminants extra-plastidiaux et les chloroplastes cassés. Les chloroplastes intacts forment alors une bande à l'interface des couches de Percoll 40% et 80%, tandis que les chloroplastes cassés et le matériel non chloroplastique restent au-dessus du gradient de Percoll.

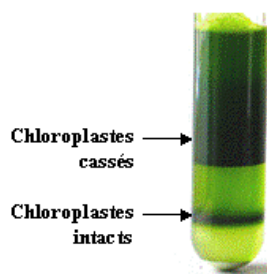


Figure IV. 12 : Chloroplastes intacts séparés sur gradient de Percoll

La bande contenant les chloroplastes intacts est reprise et lavée dans du tampon de lavage pour éliminer le Percoll, puis les chloroplastes récupérés dans un petit volume de la même solution et stockés à - 80 °C.

4. 3. 2 Préparation de fraction stromale

Après une centrifugation à 1 500 g pendant 10 min les chloroplastes intacts et purifiés sont directement repris dans un petit volume de tampon de lyse hypotonique (pyrophosphate de sodium 10 mM, pH 7,8) adapté au volume de chloroplastes intacts récupérés. La suspension de chloroplastes lysés est déposée sur un coussin de saccharose (15 mL de saccharose 0,6 M), puis centrifugée pendant 10 min à 13 000 g. Les protéines solubles contenues dans le surnageant et correspondant aux protéines du stroma sont ainsi séparées des systèmes membranaires (enveloppe et thylacoïdes) qui traversent la couche de 0,6 M de saccharose. La fraction stromale est stockée à -80°C jusqu'à utilisation.

4. 3. 3 Préparation de thylacoïdes

Il est possible de préparer des fractions enrichies en thylacoïdes à partir du culot récupéré sous le coussin de saccharose et contenant les systèmes membranaires. Dans un premier temps ce culot est lavé avec 25 mL de tampon de lyse, et la solution est centrifugée à 7 500 g pendant 5 min. Le culot est à nouveau repris dans 25 mL d'une solution contenant 2 mM de tricine, 300 mM de saccharose à pH 7,8. Après une centrifugation dans les mêmes conditions que la précédente, le culot est resuspendu dans 25 mL d'une solution contenant du phosphate de sodium 30 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM et saccharose 100 mM. Une dernière centrifugation de la solution, à 7 500 g pendant 5 min, permet de récupérer la fraction de thylacoïdes dans une solution de SDS 0,1% ou dans la solution de lyse selon l'utilisation que l'on voudra en faire par la suite. La fraction des thylacoïdes obtenue est stockée à - 80°C jusqu'à son utilisation.

4. 3. 4 Traitement par la thermolysine de la fraction de thylacoïdes purifiés

Ce traitement a pour but d'éliminer les protéines, externes ou internes, de la paroi des thylacoïdes permettant l'obtention d'une fraction luménale purifiée. La digestion protéolytique est réalisée selon la méthode de Dorne *et al.* (1982). Les thylacoïdes purifiés sont incubés à 4°C pendant une heure dans le milieu réactionnel suivant : saccharose 300 mM, tricine-NaOH 10 mM, CaCl₂ 2 mM, et thermolysine de *Bacillus thermoproteolyticus* 0,4 g/L. La thermolysine n'est active qu'en présence d'ions Ca²⁺ et son activité est facilement inhibée en présence d'EDTA 50 mM. Après une heure d'incubation en présence de thermolysine, les thylacoïdes lysés sont lavés dans une solution tampon (Hepes 50 mM) et centrifugés pendant 5 min à 7 500 g. Cette dernière étape permet d'éliminer les protéines membranaires ou les

protéines résiduelles du stroma, de façon à ne récupérer que les protéines du lumen des thylacoïdes.

4. 4 PREPARATION DE PROTOPLASTES PURIFIES DE FEUILLES DE TABACS

Des protoplastes sont préparés à partir de jeunes feuilles de tabac récoltées en serre. Ces feuilles sont découpées en bandelettes (1 mm) à l'aide d'un scalpel et mises en suspension dans 25 mL d'un milieu de plasmolyse (KCl 25g/L, CaCl₂ 2 g/L, MES 100mg/mL, pH 5,8), filtré à 0,2 µm et additionné de cellulase R10 1% (p/v) et de macérozyme R10 0,1% (p/v). Cette étape de plasmolyse permet de créer un espace entre la paroi et la membrane cellulaire. Dans ces conditions, les enzymes de digestion utilisées ont accès aux deux faces de la paroi des cellules. Après 5 h de digestion à 25 °C, les protoplastes sont libérés du tissu et récupérés par agitation circulaire pendant 1 à 2 min. Cette préparation est immédiatement utilisée pour garder le maximum de protoplastes intacts.

4. 5 EXPERIENCES DE GERMINATION

Les expériences de germination sont effectuées selon un protocole mis au point par Job *et al.* (1997) et à l'aide du protocole utilisé par Capron *et al.* (2000). Les graines sont lavées dans de l'eau osmosée afin d'éliminer les saletés et les inhibiteurs de germination contenus dans le tégument externe. Après séchage des graines, une expérience de germination est effectuée sur 100 graines dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre contenant trois feuilles de papier filtre imbibées de 1,3 mL d'eau puis recouvertes d'une quatrième feuille de papier filtre cadrié permettant un décompte facile. Pour éviter l'évaporation, les boîtes de Pétri sont disposées dans des boîtes en plastique fermées (largeur 13 cm, longueur 19 cm, hauteur 4 cm) sur une feuille de gaze imbibée d'eau. Les graines sont alors mises à germer à l'obscurité à température ambiante ou dans une armoire climatique régulée à différentes températures. Tous les tests de germination sont répétés trois fois. Pour les comptages de germination, deux stades sont analysés, la rupture de l'enveloppe et l'apparition d'une vraie radicule (visible sous la loupe). Les résultats de germination sont analysés avec le logiciel « SeedClaculator 2.1 » (Plant Research International, Pays-Bas). Ce logiciel détermine les paramètres de

germination, notamment les temps nécessaires pour obtenir 1% de germination (T_1), 50% de germination (T_{50}) et le pourcentage final de germination ($G_{\max}$).

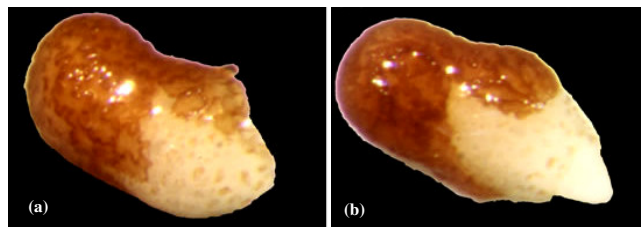


Figure IV. 13 : Stades de germination des graines de tabac *Nicotiana tabacum* d'après Manz *et al.*, 2005.
(a) Rupture de l'enveloppe, (b) apparition de la radicule ou rupture de l'albumen.

4. 6 TEST DE CARENCE EN AZOTE

Les analyses de carence en azote sont effectuées selon une méthode dérivée du protocole de Stitt *et al.* (2002). Les graines semées en terre sont placées en serre à une température de 25°C avec un éclairage journalier de 16 h. Les plantules obtenues sont alors déterrées, lavées avec de l'eau MilliQ puis repiquées dans des pots de vermiculite, un minéral naturel complètement inerte et neutre. Les pots contenant les plantules sont alors soumis à une irrigation régulière tous les trois jours avec des solutions nutritives composées des milieux suivants :

- ✓ Micro éléments (CoCl_2 0,11 μM , CuSO_4 0,1 μM , H_3BO_3 0,1 mM, KI 5 μM , MnSO_4 0,10 mM, Na_2MoO_4 1,03 μM et ZnSO_4 29,91 μM) ;
- ✓ Macro éléments (CaCl_2 , 0,51 mM, KCl 10,06 mM, MgSO_4 1,01 mM et NaH_2PO_4 0,91 mM) ;
- ✓ Vitamines (nicotinic acid 4,06 μM , pyridoxine HCl 2,43 μM et thiamine HCl 0,3 μM) ;
- ✓ FeEDTA 0,10 mM.

Différentes concentrations de nitrate d'ammonium (0 mM, 0,2 mM, 2 mM ou encore 20 mM) sont rajoutées à ce milieu nutritif selon le niveau de carence en azote que l'on veut induire lors de la croissance des plantes. Les solutions, préparées sous forme liquide, ont été conservées à 4°C pendant toute la durée du traitement.

5. MICROSCOPIE

5.1 MICROSCOPIE CONFOCALE

La microscopie confocale a été utilisée pour étudier la localisation de la GFP grâce à sa fluorescence intrinsèque. L'observation a pu être réalisée sur des tissus entiers ou sur des protoplastes ou chloroplastes purifiés. Ces échantillons de tissus végétaux sont visualisés au microscope confocal Zeiss LSM 510 Meta, avec les filtres d'excitation adaptés à l'excitation et l'émission fluorescente de la GFP (filtre d'excitation 470-440 nm, fenêtre d'émission 525-550 nm) et des chloroplastes (filtre d'excitation 470-440 nm, fenêtre d'émission 660-640 nm). Les captures d'image sont ensuite superposées grâce au logiciel Zeiss fourni avec le microscope.

5.2 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes de Strasbourg. Pour être observés au microscope électronique, les échantillons doivent subir une préparation permettant d'obtenir des coupes ultrafines ($< 0,1 \mu\text{m}$) qui présentent le minimum d'altération de l'intégrité cellulaire et tissulaire. La technologie utilisée comporte les étapes suivantes : une fixation chimique, une étape de déshydratation, une infiltration de résine, une section avec un ultramicrotome et un marquage des coupes avec des anticorps.

5.2.1 Fixation chimique

Des feuilles sont prélevées dans une même zone pour chaque plante, puis découpées, à l'aide d'une lame de rasoir, en lanières fines de 1 mm sur 1 cm au maximum. La taille des échantillons détermine la qualité de la fixation. Les bandelettes sont mises en suspension dans un mélange fixateur contenant du glutaraldéhyde 0,5%, et du paraformaldéhyde 4% dans du tampon phosphate 0,15 M (1,66 g de $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 0,56 g de KH_2PO_4 dans 200 mL d'eau). Le mélange des aldéhydes réagit préférentiellement avec les protéines, *via* leurs groupements aminés, assurant une stabilisation rapide de celles-ci et préservant l'intégrité structurale du matériel végétal. La préparation est dégazée sous vide à température ambiante

pour favoriser la diffusion du mélange fixateur dans les échantillons. Cette étape de fixation est prolongée deux heures. Les coupes fixées sont rincées par plusieurs bains successifs dans le tampon phosphate 0,15 M pendant deux heures.

5.2.2 Déshydratation

Les résines destinées aux inclusions sont solubles dans l'eau. Cette étape consiste donc à déshydrater progressivement les échantillons pour permettre l'infiltration par une résine polymérisable. La déshydratation a été conduite en incubant les échantillons dans des solutions de plus en plus concentrées d'éthanol (50, 70 et 90 %) pendant 15 min pour chacune. La durée de ces incubations est un compromis entre la nécessité d'éliminer le maximum d'eau et l'inconvénient d'extraire les constituants cellulaires.

5.2.3 L'inclusion

Les milieux d'inclusion sont des mélanges de résines préalablement fluides (monomères) qui durcissent après polymérisation. L'imprégnation des échantillons déshydratés est réalisée dans une résine méthacrylate « LRWhite » en solutions de plus en plus concentrées (25, 50 et 75 %) dans de l'éthanol, par bains de 1 heure, et 100% sur la nuit. L'inclusion est ensuite réalisée dans des capsules de gélatine, suivie de la polymérisation de la résine à 60°C pendant deux jours. A la suite de cela, des coupes ultra-fines ont été obtenues avec un ultra-microtome.

5.2.4 Marquage immuno-cytochimique

Toutes les étapes sont réalisées en faisant flotter les coupes préparées dans différentes solutions. Les étapes d'incubation sont les mêmes que celle d'un western blot. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à des particules d'or colloïdal de 10 ou 15 nm. Toute cette partie finale de l'inclusion à l'immunomarquage a été réalisée par l'équipe de l'IBMP de Strasbourg, selon les protocoles de leur laboratoire permettant la meilleure observation au microscope électronique.

Références bibliographiques

A

- Akiyama Y, Ito K (1993)** Folding and assembly of bacterial alkaline phosphatase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **268(11)**: 8146-8150.
- Alergand T, Peled-Zehavi H, Katz Y, Danon A (2006)** The chloroplast protein disulfide isomerase RB60 reacts with a regulatory disulfide of the RNA-binding protein RB47. *Plant Cell Physiol* **47**: 540-548.
- Allison LA, Simon LD, Maliga P (1996)** Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J* **15(11)**: 2802-2809.
- Allison LA (2000)** The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* **82(6-7)**: 537-548.
- Andrews JT, Whitney SM (2003)** Manipulating ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. *Arch Biochem Biophys* **414(2)**: 159-169.
- Avesani L, Marconi G, Morandini F, Albertini E, Bruschetta M, Bortesi L, Pezzotti M, Porceddu A (2007)** Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res* **16(5)**: 587-597.
- Azzoni AR, Kusnadi AR, Miranda EA, Nikolov ZL (2002)** Recombinant aprotinin produced in transgenic corn seed: extraction and purification studies. *Biotechnol Bioeng*. **80(3)**: 268-276.

B

- Bahassi EM, O'Dea MH, Allali N, Messens J, Gellert M, Couturier M (1999)** Interactions of CcdB with DNA gyrase. Inactivation of Gyra, poisoning of the gyrase-DNA complex, and the antidote action of CcdA. *J Biol Chem* **274(16)**:10936-10944.
- Ballestros M, Fredriksson A, Henriksson J, Nyström T (2001)** Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO J* **20**: 5280-5289.
- Bally J, Paget E, Droux M, Job C, Job D, Dubald M (2008)** Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins. *Plant Biotechnol J* **6(1)**: 46-61.
- Balmer Y, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB (2006)** Thioredoxin target proteins in chloroplast thylakoid membranes. *Antioxid Redox Signal* **8(9-10)**: 1829-1834.
- Barrett CM, Ray N, Thomas JD, Robinson C, Bolhuis A (2003)** Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. **304(2)**: 279-284.
- Bendich AJ (1987)** Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *Bioessays* **6(6)**: 279-282.
- Berks BC (1996)** A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22(3)**: 393-404.

- Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G (1999)** Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96(24)**: 13703-13708.
- Bewley JD, Black M (1994)** Physiology of development and germination. *Seeds, Plenum press*, New york.
- Biou V, Dumas R, Cohen-Addad C, Douce R, Job D, Pebay-Peyroula E (1997)** The crystal structure of plant acetohydroxy acid isomeroeductase complexed with NADPH, two magnesium ions and a herbicidal transition state analog determined at 1.65 Å resolution. *EMBO J* **16(12)**: 3405-15.
- Birnboim HC, Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. **7(6)**: 1513-1523.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W (1982)** Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**: 317-339
- Bjornberg O, Ostergaard H, Winther JR (2006)** Measuring intracellular redox conditions using GFP-based sensors. *Antioxid Redox Signal* **8(3-4)**:354-61.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 33-39.
- Bock R (2000)** Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie* **82(6-7)**: 549-557.
- Bock R (2001)** Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol* **312(3)**: 425-438.
- Bock R (2007)** Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr Opin Biotechnol* **18**: 100-106.
- Bogsch EG, Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Robinson C, Palmer T (1998)** An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem* **273**: 18003–18006.
- Borth N, Mattanovich D, Kunert R, Katinger H (2005)** Effect of increased expression of protein disulfide isomerase and heavy chain binding protein on antibody secretion in a recombinant CHO cell line. *Biotechnol Prog* **21(1)**: 106-111.
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB (1988)** Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240(4858)**: 1534-1538.
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brixley PJ, Guda C, and Daniell H (1997)** The chloroplast *psbA* promoter is more efficient in *Escherichia coli* than the T7 promoter for hyperexpression of a foreign protein. *Biotechnol. Lett.* **19**: 395-399.
- Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, Little S (1997)** The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res* **25(16)**: 3235-3241.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000)** Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists.
- Buchanan BB and Luan S (2005)** Redox regulation in chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research. *J Exp Bot* **56**: 1439-1447.
- Buswell S, Medina-Bolivar F, Chen Q, Van Cott K, Zhang C (2005)** Expression of porcine prorelaxin in transgenic tobacco. *Ann N Y Acad Sci.* **1041**: 77-81.

Butow RA, Henke RM, Moran JV, Belcher SM, Perlman PS (1996) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria using the biolistic gun. *Methods Enzymol* **264**: 265-278.

C

- Cannon MB, Remington J (2005)** Re-engineering redox-sensitive green fluorescent protein for improved response rate. *Protein Science* **15**: 45-57.
- Capell T, Claparols I, Del Duca S, Bassie L, Miro B, Rodriguez-Montesinos J, Christou P et Serafini-Fracassini D (2004)** Producing transglutaminases by molecular farming in plants : Minireview article. *Amino Acids* **26**: 419-423.
- Caplan A, Herrera-Estrella L, Inzé D, Van Haute E, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P (1983)** Introduction of Genetic Material into Plant Cells. *Science* **222(4625)**: 815-821.
- Capron I, Corbineau F, Dacher F, Job C, Come D, Job D (2000)** Sugarbeet seed priming: effects of priming conditions on germination, solubilization of 11-S globulin and accumulation of LEA proteins. *Seed Science Research* **10**: 243-254.
- Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P (1993)** Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet* **241(1-2)**: 49-56.
- Casse-Delbart F (1996)** La transgénèse végétale. *Les plantes transgéniques en agriculture*. Ed John Libbey. 59-88.
- Chevallet M, Luche S, Rabilloud T (2006)** Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* **1**: 1852-1858.
- Chong DK, Langridge WH (2000)** Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Res* **9(1)**: 71-78.
- Cipriani G, Testolin R, Morgante M (1995)** Paternal inheritance of plastids in interspecific hybrids of the genus *Actinidia* revealed by PCR-amplification of chloroplast DNA fragments. *Mol Gen Genet* **247(6)**: 693-697.
- Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB (1973)** Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70(11)**: 3240-3244.
- Collakova E, DellaPenna D (2003)** Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131(2)**: 632-642.
- Creighton AM, Hulford A, Mant A, Robinson D, Robinson C (1995)** A monomeric, tightly folded stromal intermediate on the delta pH-dependent thylakoidal protein transport pathway. *J Biol Chem* **270(4)**: 1663-1669.

D

- Dalbey RE, Chen M (2004)** Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1694(1-3)**: 37-53.
- Dai Z, Hooker BS, Anderson DB, Thomas SR (2000)** Improved plant-based production of E1 endoglucanase using potato: expression optimization and tissue targeting. *Mol. Breed.* **6**: 277-285.
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001a)** Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants, *Trends Plant Sci* **6(5)**: 219-226.

- Daniell H, Lee SB, Panchal T, Wiebe PO (2001b)** Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol* **311**: 1001-1009.
- Daniell H, Khan MS, Allison L (2002)** Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci* **7(2)**: 84-91.
- Daniell H, Cohill PR, Kumar S, Dufourmantel N (2004)** Chloroplast genetic engineering. *Molecular Biology of Plant Organelles: Chloroplasts and Mitochondria* (Daniell, H. and Chase, C., eds) 443-490. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Daniell H (2006)** Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol. J* **1**: 1071-1079.
- De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001)** Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* **19**: 71-74.
- De Jaeger G, Buys E, Eeckhout D, De Wilde C, Jacobs A, Kapila J, Angenon G, Van Montagu M, Gerats T, Depicker A (1999)** High level accumulation of single-chain variable fragments in the cytosol of transgenic *Petunia hybrida*. *Eur J Biochem* **259(1-2)**: 426-434.
- DeLisa MP, Samuelson P, Palmer T, Georgiou G (2002)** Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J Biol Chem.* **277(33)**: 29825-29831.
- DeLisa MP, Tullman D, Georgiou G (2003)** Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100(10)**: 6115-6120.
- Demarsy E, Courtois F, Azevedo J, Buhot L, Lerbs-Mache S (2006)** Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiol* **142(3)**: 993-1003.
- Denbow DM, Grabau EA, Lacy GH, Kornegay ET, Russell DR, Umbeck PF (1998)** Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poult Sci.* **77(6)**: 878-881.
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM (1982)** Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* **1(6)**: 561-573.
- Derman AI, Beckwith J (1991)** *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol* **173**: 7719-7722.
- Derman AI, Prinz WA, Belin D, Beckwith J (1993)** Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* **262(5140)**: 1744-1747.
- Di Cola A, Robinson C (2005)** Large-scale translocation reversal within the thylakoid Tat system *in vivo*. *J Cell Biol* **171**: 281-289.
- Di Cola A, Klostermann E, Robinson C (2005)** The complexity of pathways for protein import into thylakoids: it's not easy being green. *Biochem Soc Trans* **33(5)**: 1024-1027.
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H (2007)** Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318(5849)**: 453-456.
- Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY (2004)** Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* **279(21)**: 22284-22293.
- Dorne AJ, Carde JP, Joyard J, Börner T, Douce R (1982)** Polar Lipid Composition of a Plastid Ribosome-Deficient Barley Mutant. *Plant Physiol* **69(6)**: 1467-1470.
- Dorokhov YL, Sheveleva AA, Frolova OY, Komarova TV, Zvereva AS, Ivanov PA, Atabekov JG (2007)** Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves. *Tuberculosis (Edinb)* **87(3)**: 218-224.

- Drescher A, Ruf S, Calsa T Jr, Carrer H, Bock R (2000)** The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* **22**(2): 97-104.
- Dubald, M., Tissot, G., Dufourmantel, N. and Goutorbe, F (2008)** The engineering of recombinant plastids in higher plants. In: Recent Advances in Plant Biotechnology (Kumar, A., ed.), in press. New Delhi: IK International Publishers.
- Dufourmantel N, Dubald M, Matringe M, Canard H, Garçon F, Job C, Kay E, Wisniewski JP, Ferullo JM, Pelissier B, Sailland A, Tissot G (2007)** Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants overexpressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance. *J Plant Biotechnol* **5**: 118-133.
- Dumas R, Biou V, Halgand F, Douce R, Duggleby RG (2001)** Enzymology, structure, and dynamics of acetohydroxy acid isomeroreductase. *Acc Chem Res* **34**: 399-408.

E

- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991)** A simple and rapid method for the reparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**(6): 1349.
- Eibl C, Zhurong Z, Beck A, Minkyun K, Mullet J, Koop HU (1999)** *In vivo* analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J* **19**: 333-345.
- Einsiedel EF, Medlock J (2005)** A public consultation on plant molecular farming. *AgBioForum* **8**: 26-32.
- Ellis RJ (1979)** The most abundant protein in the world. *Trends Biochem Sci.* **4**(11): 241-244.

F

- Faye L, Landry N, Lerouge P, Gomord V, Vézina LP (2001)** La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes. *Medicine/sciences* **17**: 867-877.
- Faye L, Boulaflois A, Benchabane M, Gomord V, Michaud D (2005)** Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* **23**(15): 1770-1778.
- Faye L, Daniell H (2006)** Novel pathways for glycoprotein import into chloroplasts. *Plant Biotechnol J.* **4**(3):275-279.
- Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, Webber H, Phillips GJ (2000)** Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **182**(14): 4068-4076.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989)** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**: 64-71.
- Fernandez-San Millan A, Mingo-Castel A, Miller M, Daniell H (2003)** A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol J* **1**(2):71-79.
- Finazzi G, Chasen C, Wollman FA, de Vitry C (2003)** Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence in vivo. *EMBO J* **22**(4): 807-815.
- Fischer N, Stampacchia O, Redding K, Rochaix JD (1996)** Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol Gen Genet* **251**(3): 373-380.

- Fischer R, Emans N (2000)** Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.* **9(4-5)**: 279-299.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983)** Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **80(15)**: 4803-4807.
- Frand AR, Cuozzo JW, Kaiser CA (2000)** Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.* **10(5)**: 203-210.
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V (1985)** Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82(17)**: 5824-5828.

G

- Gallardo K, Job C, Groot SP, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D (2002)** Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol* **129(2)**: 823-837.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968)** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50(1)**: 151-158.
- Gasdaska J, Spencer D, Dickey L (2003)** Advantages of therapeutic protein production in the aquatic plant *Lemna*. *Bioprocessing J* **3**: 50-56.
- Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005)** The plant thioredoxin system. *Cell Mol Life Sci.* **62(1)**:24-35.
- Gianazza E (1995)** Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modifications of proteins. *J Chromato A* **705**: 67-87.
- Gils M, Kandzia R, Marillonnet S, Klimyuk V, Gleba Y (2005)** High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnol J.* **3(6)**: 613-620.
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y (2006)** Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103(40)**: 14701-14706.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2007)** Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **18**: 134-141.
- Glenz K, Bouchon B, Stehle T, Wallich R, Simon MM, Warzecha H (2006)** Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts. *Nat Biotechnol* **24**: 76-77.
- Golds T, Maliga P, Koop HU (1993)** Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Bio/Technol* **11**: 95-97.
- Goldstein DA, Thomas JA (2004)** Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM* **97(11)**: 705-716.
- Goldschmidt-Clermont M (1991)** Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res* **19(15)**: 4083-4089.
- Gomord V, Sourrouille C, Fitchette AC, Bardor M, Pagny S, Lerouge P, Faye L (2004)** Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol J.* **2(2)**: 83-100.
- Gomord V, Faye L (2004)** Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 171-181.
- Gopalan G, He Z, Balmer Y, Romano P, Gupta R, Heroux A, Buchanan BB, Swaminathan K, Luan S (2004)** Structural analysis uncovers a role for redox in

- regulating FKBP13, an immunophilin of the chloroplast thylakoid lumen. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 13945-13950.
- Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L (1987)** Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* **8**: 122-124.
- Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, Klosgen RB (2006)** Toc, Tic, Tac et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* **163**: 333-347.

H

- Han MJ, Yoon SS, Lee SY (2001)** Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing Poly(3-hydroxybutyrate). *J Bacteriol* **183**(1): 301-308.
- Hanahan D (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. **166**(4): 557-580.
- Hanson GT, McAnaney TB, Park ES, Rendell ME, Yarbrough DK, Chu S, Xi L, Boxer SG, Montrose MH, Remington SJ (2002)** Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application. *Biochemistry* **41**(52):15477-15488.
- Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ (2004)** Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* **279**(13):13044-13053.
- Hayes R, Kudla J, Gruissem W (1999)** Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends Biochem Sci* **24**(5): 199-202.
- Hedtko B, Börner T, Weihe A (2000)** One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep* **1**(5): 435-440.
- Heinlein M (2002)** The spread of tobacco mosaic virus infection: insights into the cellular mechanism of RNA transport. *Cell Mol Life Sci* **59**(1): 58-82.
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R (2004)** Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol* **22**(11): 1415-1422.
- Henry R, Carrigan M, McCaffrey M, Ma X, Cline K (1997)** Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the Delta pH protein transport systems in chloroplast thylakoids membranes. *J Cell Biol* **136**: 823-832.
- Herrmann RG, Maier RM, Schmitz-Linneweber C (2003)** Eukaryotic genome evolution: rearrangement and coevolution of compartmentalized genetic information. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1429): 87-97
- Hess WR, Börner T (1999)** Organellar RNA polymerases of higher plants. *In: Rev Cytol* **190**: 1-59.
- Hirel B, Gallais A (2006)** Rubisco synthesis, turnover and degradation: some new thoughts on an old problem. *New phytologist* **169**: 445-448.
- Hochuli E, Döbeli H, Schacher A (1987)** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr.* **411**: 177-184.
- Hofius D, Hajirezaei M, Geiger M, Tschiersch H, Melzer M, Sonnewald U (2004)** RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiol* **137**: 713-723.
- Hood EE, Helmer GL, Fraley RT, Chilton MD (1986)** The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bacteriol* **168**: 1291-1301.

- Horsch RB, Rogers SG, Fraley RT (1985)** Transgenic plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**: 433-437.
- Huang FC, Klaus SM, Herz S, Zou Z, Koop HU, Golds TJ (2002)** Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection. *Mol Genet Genomics* **268**(1): 19-27.
- Huang CY, Ayliffe MA, Timmis JN (2003)** Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* **422**(6927): 72-76.
- Hyunjong B, Lee DS, Hwang I (2006)** Dual targeting of xylanase to chloroplasts and peroxisomes as a means to increase protein accumulation in plant cells. *J Exp Bot* **57**(1): 161-9.

I

- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**(1): 23-28.

J

- Jack RL, Buchanan G, Dubini A, Hatzixanthis K, Palmer T, Sargent F (2004)** Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J* **23**: 3962-3972.
- Jacquot JP, Rouhier N, Gelhaye E (2002)** Redox control by dithiol-disulfide exchange in plants. I. The Chloroplastic systems. *Ann NY Acad Sci* **973**: 508-519.
- Jarvis P, Robinson C (2004)** Mechanisms of Protein Import and Routing in Chloroplasts. *Curr. Biol* **14**(24): 1064-R1077
- Jayaraman S, Haggie P, Wachter RM, Remington SJ, Verkman AS (2000)** Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J Biol Chem* **275**(9):6047-6050.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987)** *GUS* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**, 3901-3907.
- Jiang K, Schwarzer C, Lally E, Zhang S, Ruzin S, Machen T, Remington JS, Feldman L (2006)** Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**(2): 397-403.
- Job C, Kersulec A, Ravasio L, Chareyre S, Pépin R, Job D (1997)** The solubilisation of the basic subunit of sugarbeet seed 11-S globulin during priming and early germination. *Seed Science Research* **7**: 225-243.
- Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D (2005)** Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol* **138**(2): 790-802.
- Joh LD, Wroblewski T, Ewing NN, VanderGheynst JS (2005)** High-level transient expression of recombinant protein in lettuce. *Biotechnol Bioeng.* **91**(7):861-871.
- Jurado P, Ritz D, Beckwith J, de Lorenzo V, Fernández LA (2002)** Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **320**(1): 1-10.

K

- Kadokura H, Beckwith J. (2002)** Four cysteines of the membrane protein DsbB act in concert to oxidize its substrate DsbA. *EMBO J.* **21(10)**: 2354-2363.
- Kadokura H, Katzen F, Beckwith J. (2003)** Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem.* **72**:111-135.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1997)** An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci* **122**: 101-108.
- Kay E, Vogel TM, Bertolla F, Nalin R, Simonet P (2002)** *In situ* transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68(7)**: 3345-3351.
- Khan MS, Maliga P (1999)** Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol* **17(9)**: 910-915.
- Keegstra K, Cline K (1999)** Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**: 557-570.
- Kieselbach T, Bystedt M, Hynds P, Robinson C, Schroder WP (2000)** A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the *Arabidopsis* chloroplast thylakoid lumen. *FEBS Let.*, **480**: 271-276.
- Kieselbach T, Schröder WP (2003)** The proteome of the chloroplast lumen of higher plants. *Photosynth Res.* **78(3)**: 249-264.
- Kim J, Mayfield SP (2002)** The active site of the thioredoxin-like domain of chloroplast protein disulfide isomerase, RB60, catalyzes the redox-regulated binding of chloroplast poly(A)-binding protein, RB47, to the 5' untranslated region of psbA mRNA. *Plant Cell Physiol.* **43(10)**: 1238-1243.
- Knoblauch M, Hibberd JM, Gray JC, van Bel AJ (1999)** A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nat Biotechnol* **17(9)**: 906-909.
- Kode V, Mudd EA, Iamtham S, Day A (2005)** The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *Plant J* **44(2)**: 237-44.
- Kumar S, Daniell H (2004)** Engineering the chloroplast genome for hyperexpression of human therapeutic proteins and vaccine antigens. *Methods Mol Biol.* **267**: 365-383.
- Kunnimalaiyaan, M. and Nielsen, B.L (1997)** Chloroplast DNA replication: mechanism, enzymes and replication origins. *J Plant Biochem Biotechnol* **6**: 1-7.
- Kuroda H, Maliga P (2003)** The plastid clpP1 protease gene is essential for plant development. *Nature* **425(6953)**: 86-89.
- Kurokawa Y, Yanagi H, Yura T (2000)** Overexpression of protein disulfide isomerase DsbC stabilizes multiple-disulfide-bonded recombinant protein produced and transported to the periplasm in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66(9)**: 3960-3965.
- Kusnadi AR, Hood EE, Witcher DR, Howard JA, Nikolov ZL (1998)** Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnol Prog.* **14(1)**: 149-155.

L

- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lamberty M, Caille A, Landon C, Tassin-Moindrot S, Hetru C, Bulet P, Vovelle F (2001)** Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochemistry* **40(40)**: 11995-2003.
- Land A, Braakman I (2001)** Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* **83(8)**: 783-790.
- Lawrence DM, Halmer P, Bowles DJ (1990)** Mobilisation of storage reserve during germination and early seedling growth of sugar beet. *Physiol Plant* **78**: 421-429.
- Lebrun M, Leroux B, Sailland A (1992)**. Gène chimère pour la transformation des plantes. *European patent application Patent Application No. EP 508909*.
- Leelavathi S, Gupta N, Maiti S, Ghosh A, Reddy VS (2003)** Overproduction of an alkali- and thermo-stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme. *Mol Breed* **11**: 59-67.
- Legen J, Kemp S, Krause K, Profanter B, Herrmann RG, Maier RM (2002)** Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J* **31(2)**: 171-188.
- Lerbs-Mache S (2000)** Regulation of rDNA transcription in plastids of higher plants. *Biochimie* **82(6-7)**: 525-535.
- Levine AD, Rangwala SH, Horn NA, Peel MA, Matthews BK, Leimgruber RM, Manning JA, Bishop BF, Olins PO (1995)** High level expression and refolding of mouse interleukin 4 synthesized in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. **270(13)**: 7445-7452.
- Levitan A, Trebish T, Kiss V, Pereg Y, Dangoor I, Danon A (2005)** Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 6225-6230.
- Levy R, Weiss R, Chen G, Iverson BL, Georgiou G. (2001)** Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* *trxB* *gor* mutants *via* the coexpression of molecular chaperones. *Protein Expr Purif* **23(2)**: 338-347.
- Liénard D, Sourrouille C, Gomord V, Faye L (2007)** Pharming and transgenic plants. *Biotechnol Annu Rev* **13**: 115-147.
- Lister DL, Bateman JM, Purton S, Howe CJ (2003)** DNA transfer from chloroplast to nucleus is much rarer in *Chlamydomonas* than in tobacco. *Gene* **316**: 33-38.
- Livingstone D, Beilinson V, Kalyaeva M, Schmidt MA, Herman EM, Nielsen NC (2007)** Reduction of protease inhibitor activity by expression of a mutant Bowman-Birk gene in soybean seed. *Plant Mol Biol* **64(4)**: 397-408.
- Locker JK, Griffiths G (1999)** An unconventional role for cytoplasmic disulfide bonds in vaccinia virus proteins. *J Cell Biol* **144(2)**: 267-279.
- Lössl A, Eibl C, Harloff HJ, Jung C, Koop HU (2003)** Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep* **21(9)**: 891-899.

M

- Ma JK, Barros E, Bock R, Christou P, Dale PJ, Dix PJ, Fischer R, Irwin J, Mahoney R, Pezzotti M, Schillberg S, Sparrow P, Stoger E, Twyman RM; European Union Framework 6 Pharma-Planta Consortium. (2005)** Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO Rep* **6(7)**: 593-599.

- Magee AM, Coyne S, Murphy D, Horvath EM, Medgyesi P, Kavanagh TA (2004).** T7 RNA polymerase-directed expression of an antibody fragment transgene in plastids causes a semi-lethal pale-green seedling phenotype. *Transg Res* **13**: 325-337.
- Maier RM, Schmitz-Linneweber C (2004)** Plastid genomes. In H. Daniell and C. Chase (Eds.), *Molecular and Biotechnology of Plant Organelles*, Springer Verlag, 115-150.
- Maliga P (2004)** Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 289-313.
- Mant A, Woolhead CA, Moore M, Henry R, Robinson C (2001)** Insertion of Psak into the thylakoid membrane in a "Horseshoe" conformation occurs in the absence of signal recognition particle, nucleoside triphosphates, or functional albino3. *J. Biol. Chem* **276**: 36200-36206.
- Manz B, Müller K, Kucera B, Volke F, Leubner-Metzger G (2005)** Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated *in vivo* by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiol* **138(3)**: 1538-1551.
- Maréchal E, Cesbron-Delauw MF (2001)** The apicoplast: a new member of the plastid family *Trends Plant Sci* **6(5)**: 200-205.
- Margulis L (1975)** Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol* **(29)**: 21-38.
- Marillonnet S, Thoeninger C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2005)** Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* **23(6)**: 718-723.
- Martin W, Herrmann RG (1998)** Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol* **118(1)**: 9-17.
- Maskos K, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R (2003)** DsbA and DsbC-catalyzed oxidative folding of proteins with complex disulfide bridge patterns *in vitro* and *in vivo*. *J Mol Biol* **325(3)**:495-513.
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998)** Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* **16(13)**:1336-1343.
- Mason HS, Warzecha H, Mor T, Arntzen CJ (2002)** Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol Med*. **8(7)**: 324-329.
- Matile P (1992)** Chloroplast senescence. In NR Baker, H Thomas, eds, *Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinant*. Elsevier, Amsterdam, 413-440.
- Matringe M, Sailland A, Pelissier B, Rolland A, Zink O (2005)** p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor-resistant plants. *Pest Manag. Sci.* **61(3)**: 269-273.
- Matt P, Krapp A, Haake V, Mock HP, Stütt M (2002)** Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. *Plant J.* **30(6)**: 663-77.
- McFadden GI, Waller RF (1997)** Plastids in parasites of humans. *Bioessays* **19(11)**: 1033-1040.
- Mc Fadden GI (2001)** Chloroplast origin and integration. *Plant Physiol.* **125**: 50-53.
- Mc Gadey J (1970)** A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie* **23**:180-184.
- Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA (2003)** Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 438-442.
- Mechin V, Damerval C, Zivy M (2007)** Total protein extraction with TCA-acetone. *Methods Mol Biol* **355**: 1-8.
- Menkhaus TJ, Bai Y, Zhang C, Nikolov ZL, Glatz CE (2004)** Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnol Prog.* 1001-1014.

- Miflin BJ, Lea PJ (1980)** Ammonia assimilation. In: *The Biochemistry of Plants* (Miflin BJ ed). Academic Press, New York. **5**: 169-192.
- Miras S, Salvi D, Ferro M, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N (2002)** Non-canonical transit peptide for import into the chloroplast. *J. Biol. Chem* **277**: 47770–47778.
- Misaki R, Fujiyama K, Seki T (2006)** Expression of human CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase and CMP-sialic acid transporter in tobacco suspension-cultured cell. *Biochem Biophys Res Commun* **339**(4):1184-1189.
- Morden CW, Wolfe KH, dePamphilis CW, Palmer JD (1991)** Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudo genes. *EMBO J* **10**(11): 3281-3288.
- Morita MT, Tasaka M (2004)** Gravity sensing and signaling. *Curr Opin Plant Biol* **7**(6): 712-718.
- Mourioux G, Douce R. (1981)** Slow Passive Diffusion of Orthophosphate between Intact Isolated Chloroplasts and Suspending Medium. *Plant Physiol* **67**(3): 470-473.
- Munné-Bosch S (2005)** The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* **162**: 743-748.
- Müntz K (1998)** Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol* **38**: 77-99.
- Murashige T and Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol Plant* **15**: 493-497.
- Murai N, Kemp JD, Sutton DW, Murray MG, Slightom JL, Merlo DJ, Reichert NA, Sengupta-Gopalan C, Stock CA, Barker RF, Hall TC (1983)** Phaseolin Gene from Bean Is Expressed After Transfer to Sunflower Via Tumor-Inducing Plasmid Vectors. *Science* **222**(4623): 476-482.

N

- Nada A, Soll J (2004)** Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J. Cell Sci* **117**: 3975–3982.
- Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001)** Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(6): 3197-3202.
- Neuhaus HE, Emes MJ (2000)** Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**:111-140.

O

- O'Farrell PF (1975)** High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007-4021.
- Olins PO, Devine CS, Rangwala SH, Kavka KS. (1988)** The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Gene*. **73**(1): 227-235.
- Olins PO, Rangwala SH (1990)** Vector for enhanced translation of foreign genes in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*. **185**:115-9.
- O'Neill C, Horváth GV, Horváth E, Dix PJ, Medgyesy P (1993)** Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J* **3**(5): 729-738.
- Osborne TB (1924)** The vegetable proteins. Longmans, Green and Co, London.

Ostergaard H, Henriksen A, Hansen FG, Winther JR (2001) Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *EMBO J.* **20(21)**: 5853-5862.

P

Palmer JD, Nugent JM, Herbon LA (1987) Unusual structure of geranium chloroplast DNA: A triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions, and two repeat families. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84(3)**:769-773.

Paszkowski J, Shillito RD, Saul M, Mandák V, Hohn T, Hohn B, Potrykus I (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J* **3(12)**: 2717-2722.

Peltier JB, Friso G, Kalume DE, Roepstorff P, Nilsson F, Adamska I, van Wijk KJ (2000) Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* **12(3)**: 319-341.

Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem.* **272(25)**: 15661-15667.

Q

Qiu J, Swartz JR, Georgiou G (1998) Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64(12)**: 4891-4896

Quick WP, Schurr U, Schulze ED, Rodermerl SR, Bogorad L, Stitt M (1991a) Decreased Rubisco in transgenic tobacco transformed with antisens rbcS. I. Impact on photosynthesis in the ambient growth conditions. *Planta* **183**: 555-566.

Quick WP, Schurr U, Fichtner K, Schulze ED, Rodermerl SR, Bogorad L, Stitt M (1991b) The impact of decreased Rubisco on photosynthesis, growth and storage in tobacco plants which have been transformed with antisens rbcS. *Plant J.* **1**: 51-59.

R

Rabilloud T (1999a) Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol Biol* **112**: 9-19.

Rabilloud T (1999b) Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* **112**: 297-305.

Raina S, Missiakas D (1997) Making and breaking disulfide bonds. *Annu Rev Microbiol.* **51**:179-202.

Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, Job D (2004) The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol* **134(4)**:1598-1613.

Randolph-Anderson BL, Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Johnson AM, Dorthu MP, Matagne RF (1993) Further characterization of the respiratory deficient dum-1

- mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet* **236(2-3)**: 235-244.
- Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B (2002)** Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* **20(12)**: 522-531.
- Reddy VS, Leelavathi S, Selvapandian A, Raman R, Ferraiolo G, Shukla V, Bhatnagar RK (2002)** Analysis of chloroplast transformed tobacco plants with cry *Ila5* under rice *psbA* transcriptional elements reveal high level expression of Bt toxin without imposing yield penalty and stable inheritance of transplastome. *Mol Breeding* **9**: 259-269.
- Richter U, Kiessling J, Hedtke B, Decker E, Reski R, Börner T, Weihe A (2002)** Two RpoT genes of *Physcomitrella patens* encode phage-type RNA polymerases with dual targeting to mitochondria and plastids. *Gene* **290(1-2)**: 95-105.
- Richter S, Brüser T (2005)** Targeting of unfolded PhoA to the TAT translocon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280(52)**: 42723-42730.
- Rietsch A, Beckwith J (1998)** The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu Rev Genet.* **32**:163-84.
- Robinson C, Thompson SJ, Woolhead C (2001)** Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Traffic*, **2**: 245-251.
- Ruf S, Karcher D, Bock R (2007)** Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104(17)**:6998-7002.
- Rumeau D, Bécuwe-Linka N, Beyly A, Louwagie M, Garin J, Peltier G (2005)** New subunits NDH-M, -N, and -O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell* **17(1)**:219-232.
- Rumpho ME, Summer EJ, Green BJ, Fox TC, Manhart JR (2001)** Mollusc/algal chloroplast symbiosis: how can isolated chloroplasts continue to function for months in the cytosol of a sea slug in the absence of an algal nucleus? *Zoology* **104(3-4)**: 303-312.

S

- Santini CL, Bernadac A, Zhang M, Chanal A, Ize B, Blanco C, Wu LF. (2001)** Translocation of jellyfish green fluorescent protein *via* the tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock. *J Biol Chem* **276(11)**: 8159-8164.
- Sargent F, Bogsch EG, Stanley NR, Wexler M, Robinson C, Berks BC, Palmer T (1998)** Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J* **17(13)**: 3640-3650.
- Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996)** Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**: 850-858.
- Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, Fischer R (1999)** Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Res.* **8(4)**: 255-263.
- Schillberg S, Fischer R, Emans N (2003)** Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol Life Sci* **60(3)**: 433-445.
- Scholthof HB, Scholthof KB, Jackson AO (1996)** Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu Rev Phytopathol* **34**: 299-323.
- Schubert M (2006)** The chloroplast lumen proteome of *A. thaliana*. Doctoral Thesis.
- Schünemann D (2004)** Structure and function of the chloroplast signal recognition particle. *Curr Genet.* **44(6)**: 295-304.

- Schweder T, Lin HY, Jürgen B, Breitenstein A, Riemschneider S, Khalameyzer V, Gupta A, Büttner K, Neubauer P (2002)** Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**(3): 330-337.
- Serino G, Maliga P (1998)** RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiol* **117**(4): 1165-1170.
- Settles AM, Martienssen R (1998)** Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria. *Trends Cell Biol* **8**: 494-501.
- Shapiguzov A, Edvardsson A, Vener AV (2006)** Profound redox sensitivity of peptidyl-prolyl isomerase activity in *Arabidopsis* thylakoid lumen. *FEBS Lett* **580**: 3671-3676.
- Shen P, Huang HV (1986)** Homologous recombination in *Escherichia coli*: Dependence on substrate length and homology. *Genetics* **112**: 441-457.
- Shewry PR (1995)** Plant storage proteins. *Biol Rev Camb Philos Soc*. **70**(3): 375-426.
- Shikanai T, Shimizu K, Ueda K, Nishimura Y, Kuroiwa T, Hashimoto T (2001)** The chloroplast *clpP* gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol* **42**(3): 264-273.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962)** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. **59**: 223-239.
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986)** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* **5**(9): 2043-2049.
- Smith SE (1989)** Influence of parental genotype on plastid inheritance in *Medicago sativa*. *J Hered* **80**(3): 214-217.
- Sone M, Kishigami S, Yoshihisa T, Ito K (1997)** Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *The journal of biological chemistry* **272**(10): 6174-6178.
- Stanton BG (2003)** *Agrobacterium* mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and molecular biology reviews* **67** (1): 16-37.
- Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PTJ, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carrol JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russel DA (2000)** High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* **18**: 333-338.
- Stegemann S, Hartmann S, Ruf S, Bock R (2003)** High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 8828-8833.
- Stewart EJ, Aslund F, Beckwith J (1998)** Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *EMBO J* **17**(19): 5543-5550.
- Stitt M, Müller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A (2002)** Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot* **53**(370): 959-970.
- Stöger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P, Fischer R (2000)** Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol* **42**(4): 583-590.
- Stöger E, Ma JK, Fischer R, Christou P (2005)** Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr Opin Biotechnol* **16**(2): 167-173.

- Suzuki JY, Ytterberg AJ, Beardslee TA, Allison LA, Wijk KJ, Maliga P (2004)** Affinity purification of the tobacco plastid RNA polymerase and *in vitro* reconstitution of the holoenzyme. *Plant J* **40**(1): 164-172.
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990)** Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(21): 8526-8530.
- Svab Z, Maliga P (1991)**. Mutation proximal to the tRNA binding region of the *Nicotiana* plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin. *Mol Gen Genet* **228**: 316-319.
- Svab Z, Maliga P (1993)** High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 913-917.
- Svab Z, Maliga P (2007)** Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**(17):7003-7008.

T

- Tabet JC, Rebuffat S (2003)** Nobel Prize 2002 for chemistry: mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Med Sci* **19**: 865-872.
- Theg SM, Cline K, Finazzi G, Wollman FA (2005)** The energetics of the chloroplast Tat protein transport pathway revisited. *Trends Plant Sci* **10**(4): 153-154.
- Thomas JD, Daniel RA, Errington J, Robinson C. (2001)** Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **39**(1): 47-53.
- Tissot G, Canard H, Nadai M, Martone A, Botterman J, Dubald M (2008)** Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts. *Plant Biotech J* (in press).
- Tsien RY (1998)** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-544.
- Trebitsh T, Meiri E, Ostersetter O, Adam Z, Danon A. (2001)** The protein disulfide isomerase-like RB60 is partitioned between stroma and thylakoids in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *J Biol Chem* **276**(7): 4564-4569.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. (2003)** Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* **21**(12): 570-578.
- Tzfira T, Li J, Lacroix B, Citovsky V (2004)** Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet* **20**(8): 375-383.

V

- Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, Van den Elsacker S, Zaenen I, Schilperoort RA, Schell J (1974)** Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**(5479):169-170.
- Verma D, Daniell H (2007)** Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol* **145**(4): 1129-1143.
- Villarejo A, Burén S, Larsson S, Déjardin A, Monné M, Rudhe C, Karlsson J, Jansson S, Lerouge P, Rolland N, von Heijne G, Grebe M, Bako L, Samuelsson G (2005)** Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol* **7**(12): 1224-1231.

W

- Waters M, Pykes K (2005)** Plastid development and differentiation. In S.G. Moller (Ed), *Plastids Annual Plant Rev.* Blackwell, CRC Press. **13**: 30-59.
- Wedemeyer WJ, Welker E, Narayan M, Scheraga HA (2000)** Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry* **39(15)**: 4207-4216
- Wilkinson B, Gilbert HF (2004)** Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*. **1699(1-2)**: 35-44.
- Wilm M (2000)** Mass spectrometric analysis of proteins. *Adv Protein Chem* **54**: 1-30.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997)** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22(1)**: 130-131, 134-138.
- Wolf LP (1973)**. A test for bacterial alkaline phosphatase: use in rapid identification of *Serratia* organisms. *Clin Chem* **19(11)**: 1248-1249.

Y

- Ye GN, Hajdukiewicz PT, Broyles D, Rodriguez D, Xu CW, Nehra N, Staub JM (2001)** Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J*. **25(3)**: 261-270.

Z

- Zerges W (2000)** Translation in chloroplasts. *Biochimie* **82(6-7)**: 583-601.
- Zhang Q, Liu Y, Sodmergen (2003)** Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 angiosperm species. *Plant Cell Physiol.* **44(9)**:941-951.
- Zoubenko OV, Allison LA, Svab Z, Maliga P (1994)** Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucleic Acids Res* **22(19)**: 3819-3824.

Annexes

Annexe 1 : Séquence peptidique correspondant à la phosphatase alcaline recombinante dans les chloroplastes de tabac

SPOT N°	accession	protein name	identified peptides by mass spectrometry	N-terminal sequences
pCLT515 spot 1	gi 147229	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.3.1)	R.NYAEGAGGFFK.G	MRTPEMPV
-				
pCLT515 spot 2	gi 818851	alkaline phosphatase [synthetic construct]	R.NYAEGAGGFFK.G	MRTPEM
			K.GSITEQLLNAR.A	
-			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
-			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
-			K.GIDALPLTGQYTHYALNKK.T	
-			K.TGKPDYVTD SAASATAWSTGVK.T	
-			K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSR.K	
-				
pCLT515 spot 3	gi 818851			
-		alkaline phosphatase [synthetic construct]	K.APGLTQALNTK.D	
			K.GSITEQLLNAR.A	
			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N	
-			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N + Oxidation (M)	
			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K	
			R.LTGDQTAALRDSLSDKPAK.N	
			K.ATYHGNIDKPAVTCTPNPQR.N + Carbamidomethyl (C)	
			R.IAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMK.A + Oxidation (M)	
			K.DGAVMVMSYGNSEEDS QEHTGSQLR.I	
			K.DGAVMVMSYGNSEEDS QEHTGSQLR.I + Oxidation (M)	
			K.DGAVMVMSYGNSEEDS QEHTGSQLR.I + 2 Oxidation (M)	
			K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSR.K	
-			K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSRK.C	

pCLT515 spot 4	gi 147229	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.3.1) [Escherichia coli]	R.NYAEGAGGFFK.G	
-			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
-				
pCLT515 spot 5	gi 818851	alkaline phosphatase [synthetic construct]	K.APGLTQALNTK.D	
			R.NYAEGAGGFFK.G	
-			K.GSITEQLLNAR.A	
			K.GGKG SITEQLLNAR.A	
			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
			K.DGAVMVM SYGNSEEDS QEHTGSQLR.I + 2 Oxidation (M)	
	gi 12096	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit [Pinus edulis]	K.DTDILAAFR.V	
-			R.LTYYPTEYQTK.D	
-				
-	gi 4381459	EST244409 tomato ovary, TAMU Lycopersicon esculentum cDNA clone cLED5M17, mRNA sequence	K.DTDILAAFR.V	
-			K.LTYYPTEYQTK.D	
pCLT515 spot 6	gi 147229	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.3.1)	R.NYAEGAGGFFK.G	
-			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
-	gi 39655242	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Adenochilus nortonii]	K.DTDILAAFR.V	
			R.FLFC AESLCK.A	
pCLT516 spot 7	gi 15829687	alkaline phosphatase [<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai]	R.NYAEGAGGFFK.G	FTPVTKARTP
-			R.TPEMPVLENR.A	
-			K.GSITEQLLNAR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GGKG SITEQLLNAR.A	

pCLT516 spot 8	gi 26106783	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	K.APGLTQALNTK.D	FTPVTGAR
			R.NYAEGAGGFFK.G	
-			R.TPEMPVLENR.A	
			R.TPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.ARTPEMPVLENR.A	
-			K.ARTPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
			K.TFAETATAGEWQGK.T	
			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N + Oxidation (M)	
-			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K	
			R.LTGDQTAALRDSLSDKPAK.N	
			K.GIDALPLTGQYTHYALNKK.T	
			K.TGKPDYVTDASAATAWSTGVK.T	
			K.ATYHGNIKPAVTCTPNPQR.N + Carbamidomethyl (C)	
-			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQRL.I + 2 Oxidation (M)	
			K.AAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSR.K	
pCLT516 spot 9	gi 147235	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.3.1)	K.APGLTQALNTK.D	FTPVTGAR
-			R.NYAEGAGGFFK.G	
-			R.TPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
-			K.GSITEQLLNAR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			R.NDSVPTLAQMTDK.A + Oxidation (M)	
-			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
			K.TFAETATAGEWQGK.T	
			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K	
			R.LTGDQTAALRDSLSDKPAK.N	
			K.GIDALPLTGQYTHYALNKK.T	
			R.RLTGDQTAALRDSLSDKPAK.N	
			K.ATYHGNIKPAVTCTPNPQR.N + Carbamidomethyl (C)	
			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQRL.I + 2 Oxidation (M)	
			K.AAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSR.K	

			K.AAGLATGNVSTAEIQDATPAALVAHVTSRK.C	
pCLT516 spot10	gi 15829687	alkaline phosphatase [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	R.NYAEGAGGFFK.G	FTPVTGAR
			R.TPEMPVLENR.A	
-			R.TPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GSITEQLLNAR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
			K.TFAETATAGEWQGK.T	
			K.GIDALPLTGQYTHYALNKK.T	
			R.TPEMPVLENRAAQGDITAPGGAR.R + Oxidation (M)	
-			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I + 2 Oxidation (M)	
-				
pCLT516 spot 11	gi 26106783	Alkaline phosphatase precursor [Escherichia coli CFT073]	K.APGLTQALNTK.D	
			R.NYAEGAGGFFK.G	
-			R.TPEMPVLENR.A	
			R.TPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GSITEQLLNAR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
			K.TFAETATAGEWQGK.T	
-			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K	
			R.LTGDQTAALRDSLSDKPAK.N	
			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I + Oxidation (M)	
			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I + 2 Oxidation (M)	
-				
pCLT516 spot12	gi 15829687	alkaline phosphatase [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	R.NYAEGAGGFFK.G	

-			R.TPEMPVLENR.A	
-			R.TPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GSITEQLLNAR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A	
			K.ARTPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
			K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSR.K	
pCLT516 spot 13	gi 15829687	alkaline phosphatase [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	K.APGLTQALNTK.D	
-			R.NYAEGAGGFFK.G	
-			R.TPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.ARTPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
-			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K	
			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQ LR.I	
-			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQ LR.I + 2 Oxidation (M)	
pCLT516 spot 14	gi 147229	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.3.1)	R.NYAEGAGGFFK.G	
-			K.ARTPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
-			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
-				
pCLT516 spot 15	gi 15829687	alkaline phosphatase [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	K.APGLTQALNTK.D	
-			R.NYAEGAGGFFK.G	
-			R.TPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
-			K.GSITEQLLNAR.A	
			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
-			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
-			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K	
-			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQ LR.I + 2 Oxidation (M)	
-			K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSR.K	
-				

pCLT516 spot 16	gi 15829687	alkaline phosphatase [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	K.APGLTQALNTK.D	
-			R.NYAEGAGGFFK.G	
-			R.TPEMPVLENR.A	
			R.TPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
-			K.ARTPEMPVLENR.A + Oxidation (M)	
			K.GGKGSITEQLLNAR.A	
			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
			R.NDSVPTLAQM TDKAIELLSKNEK.G + Oxidation (M)	
-			K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSR.K	
pCLT516 spot 17	gi 818851	alkaline phosphatase [synthetic construct]	R.NYAEGAGGFFK.G	
-			K.GSITEQLLNAR.A	
-			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
			K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSR.K	
pCLT516 spot 18	gi 818851	alkaline phosphatase [synthetic construct]	R.NYAEGAGGFFK.G	
			K.GSITEQLLNAR.A	
-			K.TFAETATAGEWQ GK.T	
			K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSR.K	

*Annexe 2: séquence peptidique correspondant à la phosphatase alcaline
dans les souches bactériennes BL21 ou BL21 trX/gor.*

SPOT	accession	protein	identified peptides by mass spectrometry
BL21 trxB/gor pCLT516	gij1633108	Chain B, Alkaline Phosphatase (N51mg) [Escherichia coli]	K.APGLTQALNTK.D
spot e			R.NYAEGAGGFFK.G
-			R.NYAEGAGGFFK.G
			K.GSITEQLLNAR.A
			R.NDSVPTLAQMTDK.A
			K.GGKGSITEQLLNAR.A
			K.TFAETATAGEWQ GK.T
			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K
			K.GIDALPLTGQYTHYALNKK.T
			K.TGKPDYVTD SAASATAWSTGVK.T
BL21 pCLT516	gij493812	Chain B, Alkaline Phosphatase (E.C.3.1.3.1)	K.APGLTQALNTK.D
spot c			R.NYAEGAGGFFK.G
-			K.GSITEQLLNAR.A
			R.NDSVPTLAQMTDK.A
			K.GGKGSITEQLLNAR.A
			K.TFAETATAGEWQ GK.T
			K.ATYHGNIDKPAVTCTPNPQR.N + Carbamidomethyl
BL21 trxB/gor pCLT516	gij48994877	bacterial alkaline phosphatase [Escherichia coli K12]	K.APGLTQALNTK.D
spot f			R.NYAEGAGGFFK.G
-			R.TPEMPVLENR.A
			K.GSITEQLLNAR.A
			K.GFFLQVEGASIDK.Q
			R.NDSVPTLAQMTDK.A
			K.GGKGSITEQLLNAR.A

			K.TFAETATAGEWQ GK.T
			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N
			K.CYGPSATSEKCPGNALEK.G + 2 Carbamidomethyl (C)
			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K
			R.LTGDQTAALRDSLSDKPAK.N
			R.KCYGPSATSEKCPGNALEK.G + 2 Carbamidomethyl (C)
			K.GIDALPLTGQYTHYALNKK.T
			R.RLTGDQTAALRDSLSDKPAK.N
			K.TGKPDYVTDASAATAWSTGVK.T
			K.ATYHGNIDKPAVTCTPNPQR.N + Carbamidomethyl (C)
			R.ADVTLGGGAKTFAETATAGEWQ GK.T
			K.EGNTLVIVTADHAHASQIVAPDTK.A
			K.KEGNTLVIVTADHAHASQIVAPDTK.A
			R.IAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMK.A
			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I
			K.AAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSR.K
	gi 41817	beta lactamase TEM6 [Escherichia coli]	K.LLTGELLTLASR.Q
BL21 trxB/gor pCLT515	gi 48994877	bacterial alkaline phosphatase [Escherichia coli K12]	K.APGLTQALNTK.D
spot h			R.NYAEGAGGFFK.G
			K.GSITEQLLNAR.A
			R.NDSVPTLAQMMDK.A
			R.NDSVPTLAQMMDK.A + Oxidation (M)
			K.GGKGSITEQLLNAR.A
			K.TFAETATAGEWQ GK.T
			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N
			K.CYGPSATSEKCPGNALEK.G + 2 Carbamidomethyl (C)
			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N + Oxidation (M)
			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K

			R.LTGDQTAALRDSLSDKPAK.N
			R.RLTGDQTAALRDSLSDKPAK.N
			R.NDSVPTLAQMMDKAIELLSK.N
			R.NDSVPTLAQMMDKAIELLSK.N + Oxidation (M)
			K.TGKPDYVTDASAATAWSTGVK.T
			K.ATYHGNIDKPAVTCTPNPQR.N + Carbamidomethyl (C)
			R.ADVTLGGGAKTFAETATAGEWQGK.T
			K.EGNTLVIVTADHAHASQIVAPDTK.A
			R.NDSVPTLAQMMDKAIELLSKNEK.G
			K.TYNGALGVDIHEKDHPTILEMAK.A + Oxidation (M)
			K.KEGNTLVIVTADHAHASQIVAPDTK.A
			R.IAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMK.A
			R.IAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMK.A + Oxidation (M)
			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I
			K.AAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSR.K
			R.DSLSDKPAKNIILLIGDGMGDSEITAAR.N
			K.AAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSR.K
			R.GYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGNMPVR.W
			R.GYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGNMPVR.W + Oxidation (M)
BL21 pCLT516	gil15800109	alkaline phosphatase [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	K.APGLTQALNTK.D
spot a			R.NYAEGAGGFFK.G
			R.TPEMPVLENR.A
-			R.TPEMPVLENR.A
			K.GSITEQLLNAR.A
			R.NDSVPTLAQMMDK.A
			K.GGKGSITEQLLNAR.A
			K.TFAETATAGEWQGK.T
			K.CYGPSATSEKCPGNALEK.G + 2 Carbamidomethyl (C)
			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K
			K.TGKPDYVTDASAATAWSTGVK.T

			K.ATYHGNIDKPAVTCTPNPQR.N + Carbamidomethyl (C)
			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I
			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I + Oxidation (M)
			K.AAGLATGNVSTAELQDATPAALVAHVTSR.K
	gij601950	gatZ [Escherichia coli]	R.TGFNDSLLDIR.Y
BL21 trxB/gor pCLT516	gij818851	alkaline phosphatase [synthetic construct]	K.APGLTQALNTK.D
spot g			R.NYAEGAGGFFK.G
-			R.AAQGDITAPGGAR.R
			K.GSITEQLLNAR.A
			R.NDSVPTLAQMTDK.A
			K.GGKGSITEQLLNAR.A
			K.TFAETATAGEWQ GK.T
			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N
			K.CYGPSATSEKCPGNALEK.G + 2 Carbamidomethyl (C)
			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N + Oxidation (M)
			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K
			R.LTGDQTAALRDSLSDKPAK.N
			R.KCYGPSATSEKCPGNALEK.G + 2 Carbamidomethyl (C)
			K.GIDALPLTGQYTHYALNKK.T
			R.RLTGDQTAALRDSLSDKPAK.N
			R.NDSVPTLAQMTDKAIELLSK.N
			K.TGKPDYVTD SAASATAWSTGVK.T
			K.ATYHGNIDKPAVTCTPNPQR.N + Carbamidomethyl (C)
			R.ADVTLGGGAKTFAETATAGEWQ GK.T
			R.NDSVPTLAQMTDKAIELLSKNEK.G
			R.IAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMK.A
			R.IAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMK.A + Oxidation (M)
			K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I

			K.DGAVMVMMSGYGNSEEDSQEHTGSQLR.I + Oxidation (M)
			K.AAGLATGNVSTAEIQDATPAALVAHVTSR.K
			R.DSLSDKPAKNIILLIGDGMGDSEITAAR.N
			K.AAGLATGNVSTAEIQDATPAALVAHVTSR.K
			R.GYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGNMPVR.W
			R.GYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGNMPVR.W + Oxidation (M)
BL21 pCLT515	gij818851	alkaline phosphatase [synthetic construct]	K.APGLTQALNTK.D
spot d			R.NYAEGAGGFFK.G
-			K.GSITEQLLNAR.A
			R.NDSVPTLAQMTDK.A
			K.GGKGSITEQLLNAR.A
			K.TFAETATAGEWQGK.T
			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N
			K.CYGPSATSEKCPGNALEK.G + 2 Carbamidomethyl (C)
			K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N + Oxidation (M)
			K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K
			K.TGKPDYVTDASAATAWSTGVK.T
			R.IAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMK.A
			K.AAGLATGNVSTAEIQDATPAALVAHVTSR.K
	gij601950	gatZ [Escherichia coli]	R.TGFNDSLLDIR.Y
			R.AAVLCFAAESVATDCQR.E + 2 Carbamidomethyl (C)
BL21 pCLT516	gij818851	alkaline phosphatase [synthetic construct]	K.APGLTQALNTK.D
spot b			R.NYAEGAGGFFK.G
-			R.AAQGDITAPGGAR.R
			K.GSITEQLLNAR.A
			R.NDSVPTLAQMTDK.A
			K.GGKGSITEQLLNAR.A

		K.TFAETATAGEWQ GK.T
		K.NIILLIGDGMGDSEITAAR.N
		K.CYGPSATSEKCPGNALEK.G + 2 Carbamidomethyl (C)
		K.GIDALPLTGQYTHYALNK.K
		R.LTGDQTAALRDSLSDKPAK.N
		R.KCYGPSATSEKCPGNALEK.G + 2 Carbamidomethyl (C)
		K.GIDALPLTGQYTHYALNKK.T
		R.RLTGDQTAALRDSLSDKPAK.N
		R.NDSVPTLAQMTDKAIELLSK.N
		K.TGKPDYVTD SAASATAWSTGVK.T
		K.ATYHGNIDKPAVTCTPNPQR.N + Carbamidomethyl (C)
		R.ADVTLGGGAKTFAETATAGEWQ GK.T
		K.EGNTLVIVTADHAHASQIVAPDTK.A
		R.NDSVPTLAQMTDKAIELLSKNEK.G
		R.IAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMK.A
		R.IAAYGPHAANVVGLTDQTDLFYTMK.A + Oxidation (M)
		K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I
		K.DGAVMVMSYGNSEEDSQEHTGSQLR.I + Oxidation (M)
		K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSR.K
		R.DSLSDKPAKNIILLIGDGMGDSEITAAR.N
		K.AAGLATGNVSTAE LQDATPAALVAHVTSRK.C
		R.GYQLVSDAASLNSVTEANQQKPLLGLFADGNMPVR.W

Annexe 3: Résultat du séquençage, réalisé par spectrométrie de masse, des spots prélevés sur gel 2D correspondant à certaines protéines des tabacs recombinants et sauvage						
spots	accession (NCBI nr)	Description	% cov	score >50 (pep> 20)	MW	pI
spot 01	gil85013827	elongation factor-1 alpha [<i>Ypthima fasciata</i>]	7	181	44927	8,35
	gil7275	elongation factor 1 alpha [<i>Dictyostelium discoideum</i>]	8	170	49651	8,52
spot 02	gil131167	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor (20 kDa subunit) [<i>Nicotiana sylvestris</i>]	28	347	22410	9,78
	gil544747	PSI-D2=18.5 kda photosystem I psaD product {N-terminal} [Peptide Chloroplast Partial, 34 aa] [<i>Nicotiana tabacum</i>]	29	67	3365	3,9
	gil15237769	NLI interacting factor (NIF) family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	2	52	35548	6,36
spot 03	gil131167	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor (20 kDa subunit) (PSI-D) [<i>Nicotiana sylvestris</i>]	28	371	22410	9,78
	gil544747	PSI-D2=18.5 kda photosystem I psaD product {N-terminal} [<i>Nicotiana tabacum</i> , leaves, Peptide Chloroplast Partial, 34 aa] [<i>Nicotiana tabacum</i>]	29	51	3365	3,9
spot 04	gil131167	Photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor (20 kDa subunit) (PSI-D) [<i>Nicotiana sylvestris</i>]	12	100	22410	9,78
	gil3986695	ribosomal protein L12 [<i>Cichorium intybus</i>]	16	84	15166	9,88
	gil544739	PSI-E2=14.3 photosystem I psaE product {N-terminal} [<i>Nicotiana sylvestris</i> , leaves, Peptide Chloroplast Partial, 22 aa] [<i>Nicotiana sylvestris</i>]	95	68	2032	4,09
	gil1217601	PSI-E subunit of photosystem I [<i>Nicotiana sylvestris</i>]	14	56	15599	9,74
spot 05	gil124266803	thiamin biosynthesis protein ThiC [<i>Methylobium petroleiphilum</i> PM1]	1	59	69768	5,8
	gil1076411	seed storage protein beta-chain 6 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (fragment)	100	56	1086	4,53
	gil47507010	SAL_US002xk07r1.ab1 SAL_US N.Bentheme <i>Nicotiana benthamiana</i> cDNA 3', mRNA sequence [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	14	186	22302	9,59
spot 06	gil47507010	SAL_US002xk07r1.ab1 SAL_US N.Bentheme <i>Nicotiana benthamiana</i> cDNA 3', mRNA sequence	14	174	22302	9,59
	gil47508894	SAL_US006xh17f1.ab1 SAL_US N.Bentheme <i>Nicotiana benthamiana</i> cDNA 5', mRNA sequence	10	102	25817	9,78

spot 09	gil6899972	chloroplast ferredoxin-NADP+ oxidoreductase precursor [<i>Capsicum annuum</i>]	12	223	40382	8,54
	gil46399269	putative pyridoxine biosynthesis protein isoform A [<i>Nicotiana tabacum</i>]	15	161	33068	5,93
spot 11	gil76866940	KG9B.002E03F.050720T7 KG9B <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA clone KG9B.002E03, mRNA sequence	14	180	33542	8,89
spot 20	gil230922	Chain S, Crystal Structure Of The Unactivated Form Of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase(Slash)oxygenase From Tobacco [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6	53	14550	5,19
spot 21	gil899610	acidic ribosomal protein P2 [<i>Zea mays</i>]	8	48 (score limite)		4,31
spot 24	gil21912927	thioredoxin peroxidase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	14	116	29818	8,2
spot 25	gil21912927	thioredoxin peroxydase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7	64	29818	8,2
	gil157347019	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	5	53	23828	5,1
	gil92011878	KF8C.103G12F.051214T7 KF8 <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA clone KF8C.103G12, mRNA sequence	11	140	31932	6,49
spot 27	gil19898	photosystem II 23 kDa polypeptide [<i>Nicotiana tabacum</i>]	14	120	27866	7,03
	gil1076373	photosystem II oxygen-evolving complex protein 2 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (fragment)	92	96	1434	9,71
spot 28	gil49259454	Chain A, Crystal Structure Of Psbp Protein In The Oxygen-Evolving Complex Of Photosystem Ii From Higher Plants [<i>Nicotiana tabacum</i>]	27	247	19377	5,25
	gil131393	Oxygen-evolving enhancer protein 2-2, chloroplast precursor (23 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II) (23 kDa thylakoid membrane protein) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	14	190	28543	7,67
	gil1076373	photosystem II oxygen-evolving complex protein 2 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (fragment)	92	130	1434	9,71
	gil1345550	23-kDa polypeptide of photosystem II oxygen-evolving complex [<i>Nicotiana tabacum</i>]	8	104	28360	7,63
	gil14139	unnamed protein product [<i>Nicotiana tabacum</i>]	3	59	38903	4,97
spot 29	gil19898	photosystem II 23 kDa polypeptide [<i>Nicotiana tabacum</i>]	14	106	27866	7,03
	gil1076373	photosystem II oxygen-evolving complex protein 2 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (fragment)	92	72	1434	9,71
	gil49259454	Chain A, Crystal Structure Of Psbp Protein In The Oxygen-Evolving Complex Of Photosystem Ii From Higher Plants [<i>Nicotiana tabacum</i>]	12	68	19377	5,25

spot 30	gil19898	photosystem II 23 kDa polypeptide [<i>Nicotiana tabacum</i>]	8	125	27866	7,03
	gil49259454	Chain A, Crystal Structure Of Psbp Protein In The Oxygen-Evolving Complex Of Photosystem Ii From Higher Plants [<i>Nicotiana tabacum</i>]	12	64	19377	5,25
	gil1076373	photosystem II oxygen-evolving complex protein 2 - <i>Arabidopsis thaliana</i> (fragment)	92	50	1434	9,71
spot 31	gil12230349	Peptide methionine sulfoxide reductase (Protein-methionine-S-oxide reductase) [<i>Lactuca sativa</i>]	3	65	28822	8,69
	gil83417162	KL4B.101D10F.051103T7 KL4B <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA clone KL4B.101D10, mRNA sequence	9	126	28764	6,75
	gil76870069	KP1B.104P21F.050725T7 KP1B <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA clone KP1B.104P21, mRNA sequence	8	96	26925	5,44
spot 32	gil100284	superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) (Fe) - curled-leaved tobacco [<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>]	22	213	25434	5,39
	gil92020531	KL5B.117A02F.060217T7 KL5B <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA clone KL5B.117A02, mRNA sequence	6	73	31934	7,04
spot 34	gil2499728	Ribulose-phosphate 3-epimerase, chloroplast precursor (Pentose-5- phosphate 3-epimerase) (PPE) (RPE) (R5P3E) [<i>Solanum tuberosum</i>]	12	127	29863	7,71
spot 35	gil22550386	beta-carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	195	34431	6,19
	gil136063	Triosephosphate isomerase, cytosolic (TIM) (Triose-phosphate isomerase) [<i>Zea mays</i>]	20	173	27008	5,52
	gil136057	Triosephosphate isomerase, cytosolic (TIM) (Triose-phosphate isomerase) [<i>Coptis japonica</i>]	8	141	27073	5,54
	gil553107	triosephosphate isomerase [<i>Oryza sativa</i>]	15	137	27588	6,6
spot 36	gil22550386	beta-carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	196	34431	6,19
	gil115473	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	189	34489	6,41
spot 37	gil22550386	beta-carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	16	374	34431	6,19
	gil115473	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	16	364	34489	6,41

spot 38	gil22550386	beta-carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	269	34431	6,19
	gil115473	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	265	34489	6,41
	gil157142955	chloroplast-localized protein [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	12	109	33731	8,79
spot 42	gil5381255	peroxidase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5	76	35709	7,59
spot 45	gil52139820	glyoxisomal malate dehydrogenase [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	5	92	37608	8,09
	gil92015094	KF8B.100J13F.051010T7 KF8 <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA clone KF8B.100J13, mRNA sequence	6	92	32631	8,52
spot 46	gil52139820	glyoxisomal malate dehydrogenase [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	3	86	37608	8,09
	gil83416844	KL4B.100E13F.050922T7 KL4B <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA clone KL4B.100E13, mRNA sequence	7	116	32473	6,99
spot 50	gil11465970	cytochrome f [<i>Nicotiana tabacum</i>]	18	247	35224	9,12
	gil14602143	anthranilate synthase component II [<i>Aeropyrum pernix</i> K1]	4	65	21787	6,44
	gil1346110	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6	64	35923	6,38
spot 52	gil30013663	putative ribulose biphosphate carboxylase small subunit protein precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	34	425	20268	7,57
spot 53	gil30013663	putative ribulose biphosphate carboxylase small subunit protein precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	153	20268	7,57
spot 55	gil6899972	chloroplast ferredoxin-NADP+ oxidoreductase precursor [<i>Capsicum annuum</i>]	18	361	40382	8,54
	gil11465970	cytochrome f [<i>Nicotiana tabacum</i>]	18	283	35224	9,12
spot 58	gil22550386	beta-carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	241	34431	6,19
	gil115473	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	224	34489	6,41
spot 60	gil115473	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase)	29	413	34489	6,41
	gil22550386	beta-carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	25	336	34431	6,19
spot 61	gil22550386	beta-carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	19	403	34431	6,19
	gil115473	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase)	19	390	34489	6,41

spot 66	gil6899972	chloroplast ferredoxin-NADP+ oxidoreductase precursor [<i>Capsicum annuum</i>]	12	256	40382	8,54
	gil6561889	Ferredoxin [<i>Zea mays</i>]	10	165	39298	8,53
	gil4930119	Chain A, Pea Fnr Y308s Mutant In Complex With Nadp+	14	165	34699	6,54
	gil141448056	chloroplast ferredoxin-NADP+ reductase [<i>Pisum sativum</i>]	11	131	40107	8,57
spot 68	gil15225249	glycine dehydrogenase (decarboxylating), putative / glycine decarboxylase, putative / glycine cleavage system P-protein, putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	4	294	113703	6,18
	gil14596025	P-Protein - like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3	172	112883	6,51
spot 70	gil559005	ascorbate peroxidase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	19	272	27371	5,43
	gil22550386	beta-carbonic anhydrase [<i>N. tabacum</i>]	6	70	34431	6,19
spot 72	gil559005	ascorbate peroxidase [<i>N. tabacum</i>]	4	52	27371	5,43
	gil92037383	KT7C.101N20F.051216T7 KT7 <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA clone KT7C.101N20, mRNA sequence	11	157	32673	7,74
spot 73	gil7331143	chaperonin 21 precursor [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	12	192	26546	6,85
	gil110377793	chloroplast pigment-binding protein CP26 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	11	137	30428	5,73
	gil50660327	chloroplast chaperonin 21 [<i>Vitis vinifera</i>]	6	96	26380	8,96
spot 74	gil15225249	glycine dehydrogenase (decarboxylating), putative / glycine decarboxylase, putative / glycine cleavage system P-protein, putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	5	274	113703	6,18
	gil14596025	P-Protein - like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	4	163	112883	6,51
spot 75	gil11465949	photosystem II protein D2 [<i>N. tabacum</i>]	6	62	39510	5,33
spot 76	gil8347420	cysteine protease [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6	68	39175	6,95
spot 78	gil11134054	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (OEE1) (33 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II) (OEC 33 kDa subunit) (33 kDa thylakoid membrane protein) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	14	340	35206	5,89
	gil22571	33 kDa oxygen-evolving protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	13	269	35114	5,68
	gil14139	unnamed protein product [<i>N. tabacum</i>]	3	86	38903	4,97

spot 79	gil147791852	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	17	352	33213	5,87
	gil11134054	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (OEE1) (33 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II) (OEC 33 kDa subunit) (33 kDa thylakoid membrane protein) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	16	330	35367	5,84
	gil30013657	oxygen evolving complex 33 kDa photosystem II protein [<i>Nicotiana tabacum</i>]	16	330	35177	5,63
	gil739292	oxygen-evolving complex protein 1	13	317	26489	5,13
spot 80	gil11134054	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (OEE1) (33 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II) (OEC 33 kDa subunit) (33 kDa thylakoid membrane protein) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	21	477	35367	5,84
	gil147791852	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	17	369	33213	5,87
	gil14139	unnamed protein product [<i>Nicotiana tabacum</i>]	3	92	38903	4,97
spot 82	gil2632088	Plastid-lipid-Associated Protein [<i>Nicotiana tabacum</i>]	10	140	29385	4,83
	gil92025026	BL12.102D22F.060309T7 BL12 <i>Nicotiana tabacum</i> cDNA clone BL12.102D22, mRNA sequence	11	77	14747	5,17
spot 83	gil47508620	SAL_US029xe21r1.ab1 SAL_US N.Bentheme <i>Nicotiana benthamiana</i> cDNA 3', mRNA sequence	12	91	22212	9,58
spot 84	gil13310811	ankyrin-repeat protein HBP1 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	16	232	37294	4,45
spot 86	gil157333396	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	12	230	42499	5,95
	gil145566788	[Segment 2 of 4] Phosphoribulokinase, chloroplast (Phosphopentokinase) (PRKase) (PRK) [<i>Vitis sp</i>]	100	104	2281	4,22
	gil1173347	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast precursor (Sedoheptulose- bisphosphatase) (SBPase) (SED(1,7)P2ase) [<i>Triticum aestivum</i>]	6	88	42034	6,04
	gil99903817	chloroplast sedoheptulose-1,7- bisphosphatase [<i>Marchantia polymorpha</i>]	3	58	42057	6,62

spot 87	gil115448091	Os02g0698000 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	13	323	44837	5,68
	gil125579	Phosphoribulokinase, chloroplast precursor (Phosphopentokinase) (PRKase) (PRK) [<i>Spinacia oleracea</i>]	13	295	44979	5,82
	gil147859917	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	13	265	45194	5,83
	gil157333396	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	8	164	42499	5,95
	gil51949796	adenosine kinase isoform 1T [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7	37	37400	5,13
	gil99903817	chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase [<i>Marchantia polymorpha</i>]	3	63	42057	6,62
spot 88	gil125578	Phosphoribulokinase, chloroplast precursor (Phosphopentokinase) (PRKase) (PRK) [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	18	434	44086	6,03
	gil147859917	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	16	427	45194	5,83
	gil100380	ribulose-bisphosphate carboxylase activase (EC 6.3.4.-) (clone TA1.1) - common tobacco (fragment)	8	55	25913	5,01
spot 89	gil12643758	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplast precursor (RuBisCO activase 2) (RA 2) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	41	1010	48313	8,14
	gil10720247	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor (RuBisCO activase) (RA) [<i>Solanum pennellii</i>]	30	956	50669	8,61
spot 92	gil4827253	plastidic aldolase [<i>Nicotiana paniculata</i>]	14	219	42789	6,38
	gil111162651	chloroplast aldolase [<i>Nicotiana attenuata</i>]	20	172	23038	6,14
	gil4827251	plastidic aldolase NPALDP1 [<i>Nicotiana paniculata</i>]	12	162	42547	6,92
	gil12643758	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplast precursor (RuBisCO activase 2) (RA 2) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	10	147	48313	8,14
	gil15237225	HCF136 (High chlorophyll fluorescence 136) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	9	111	44076	6,79
	gil75252730	Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplast precursor [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	11	127	45441	9,02
	gil445628	RuBisCO activase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6	71	42720	5,5
spot 93	gil4827253	plastidic aldolase [<i>Nicotiana paniculata</i>]	31	815	42789	6,38
spot 95	gil147835267	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	23	678	42921	8,13
	gil21311559	latex plastidic aldolase-like protein [<i>Hevea brasiliensis</i>]	27	646	42671	8,43

spot 96	gil147835267	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	20	693	42921	8,13
	gil21311559	latex plastidic aldolase-like protein [<i>Hevea brasiliensis</i>]	21	665	42671	8,43
	gil4827251	plastidic aldolase NPALDP1 [<i>Nicotiana paniculata</i>]	33	652	42547	6,92
	gil2493810	Coproporphyrinogen III oxidase, chloroplast precursor (Coproporphyrinogenase) (Coprogen oxidase) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	4	71	44907	7,64
	gil126896	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor [<i>Citrullus lanatus</i>]	3	64	36178	8,88
spot 99	gil32746733	mRNA-binding protein precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	10	206	44217	6,51
	gil147773479	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	8	105	42304	8,74
spot 100	gil147773479	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	13	230	42304	8,74
	gil2765081	g5bf [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	22	162	42653	8,19
	gil7525029	photosystem II 44 kDa protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3	75	51835	6,71
	gil48375044	putative mitochondrial malate dehydrogenase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5	56	22024	7,64
	gil32746733	mRNA-binding protein precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2	54	44217	6,51
	gil32746733	mRNA-binding protein precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	265	44217	6,51
spot 101	gil1169586	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic (D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase) (FBPase) (CY-F1) [<i>Solanum tuberosum</i>]	7	149	37287	5,8
	gil147773479	hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>]	5	128	42304	8,74
	gil2493810	Coproporphyrinogen III oxidase, chloroplast precursor (Coproporphyrinogenase) (Coprogen oxidase) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6	90	44907	7,64
	gil22240	GADPH (383 AA) [<i>Zea mays</i>]	6	75	40923	7,21
	gil231610	ATP synthase gamma chain, chloroplast precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2	63	41421	8,16
	gil231610	ATP synthase gamma chain, chloroplast precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	9	129	41421	8,16
spot 103	gil48375044	putative mitochondrial malate dehydrogenase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5	81	22024	7,64
	gil21388544	putative mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase [<i>Solanum tuberosum</i>]	7	81	36172	8,87
	gil22240	GADPH (383 AA) [<i>Zea mays</i>]	6	63	40923	7,21
	gil7525029	photosystem II 44 kDa protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3	58	51835	6,71
	gil32746733	mRNA-binding protein precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2	49	44217	6,51
	gil32746733	mRNA-binding protein precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2	49	44217	6,51

spot 104	gil120661	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor (NADP-dependent glyceraldehydephosphate dehydrogenase subunit A) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	20	364	41837	6,6
spot 105	gil18072795	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Capsicum annuum</i>]	29	514	33492	6
	gil120661	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor (NADP-dependent glyceraldehydephosphate dehydrogenase subunit A) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	23	492	41837	6,6
	gil115459078	Os04g0486600 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	20	357	36750	6,34
	gil40716077	fructose-bisphosphate aldolase [<i>Pandanus amaryllifolius</i>]	11	259	38300	6,48
spot 106	gil120673	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic [<i>Petunia x hybrida</i>]	27	559	36504	6,68
	gil231610	ATP synthase gamma chain, chloroplast precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6	121	41421	8,16
	gil83283995	fructose-bisphosphate aldolase-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	5	91	38594	7,51
spot 108	gil4539543	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	16	159	36702	7,7
	gil120661	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor (NADP-dependent glyceraldehydephosphate dehydrogenase subunit A) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7	103	41837	6,6
	gil119905	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplast precursor (FNR) [<i>Pisum sativum</i>]	4	67	40169	8,56
	gil231610	ATP synthase gamma chain, chloroplast precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2	66	41421	8,16
spot 109	gil1707878	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (Glycine cleavage system T protein) (GCVT) [<i>Solanum tuberosum</i>]	20	356	44249	8,77
	gil168324	aspartate aminotransferase P1 [<i>Lupinus angustifolius</i>]	11	170	45827	8,36
	gil121530	Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase (Glycolate oxidase) (GOX) (Short chain alpha-hydroxy acid oxidase) [<i>Spinacia oleracea</i>]	5	57	40260	9,16
spot 110	gil1707878	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (Glycine cleavage system T protein) (GCVT) [<i>Solanum tuberosum</i>]	22	497	44249	8,77

spot 111	gil1707878	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (Glycine cleavage system T protein) (GCVT) [<i>Solanum tuberosum</i>]	35	459	44249	8,77
	gil157328511	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	23	262	44278	8,73
		(Blast: Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor)				
	gil3334202	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (Glycine cleavage system T protein) (GCVT) [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	14	229	44378	8,73
	gil121530	Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase (Glycolate oxidase) (GOX) (Short chain alpha-hydroxy acid oxidase) [<i>Spinacia oleracea</i>]	7	167	40260	9,16
spot 112	gil4103324	GDP-mannose pyrophosphorylase [<i>Solanum tuberosum</i>]	16	122	39553	6,77
	gil120663	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplast precursor (NADP-dependent glyceraldehydephosphate dehydrogenase subunit B) [<i>Pisum sativum</i>]	5	99	48067	7,57
	gil3334196	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (Glycine cleavage system T protein) (GCVT) [<i>Flaveria trinervia</i>]	5	70	44257	8,87
spot 113	gil120665	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplast precursor (NADP-dependent glyceraldehydephosphate dehydrogenase subunit B) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	20	542	47440	8,83
spot 115	gil120665	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplast precursor (NADP-dependent glyceraldehydephosphate dehydrogenase subunit B) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	28	755	47440	8,83
	gil531555	aspartate aminotransferase [<i>A. thaliana</i>]	3	58	49771	7,67
spot 123	gil2499497	Phosphoglycerate kinase, chloroplast precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	30	808	50146	8,48
	gil1346121	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor (Glycine cleavage system T protein) (GCVT) [<i>Flaveria pringlei</i>]	5	60	44325	8,91
	gil40457328	glutamine synthetase GS58 [<i>Nicotiana attenuata</i>]	3	53	47497	6,73
spot 124	gil218312	chloroplast elongation factor TuB (EF-TuB) [<i>Nicotiana sylvestris</i>]	18	366	46672	5,7
	gil40457328	glutamine synthetase GS58 [<i>Nicotiana attenuata</i>]	16	364	47497	6,73
	gil2499497	Phosphoglycerate kinase, chloroplast precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	12	256	50146	8,48

spot 125	gil68566313	Elongation factor TuA, chloroplast precursor (EF-TuA) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	20	689	51924	6,34
	gil2499497	Phosphoglycerate kinase, chloroplast precursor [<i>Nicotiana tabacum</i>]	3	78	50146	8,48
spot 127	gil218312	chloroplast elongation factor TuB (EF-TuB) [<i>Nicotiana sylvestris</i>]	20	552	46672	5,7
spot 132	gil6683504	actin isoform B [<i>Mimosa pudica</i>]	41	722	41703	5,31
	gil126888	Malate dehydrogenase [NADP], chloroplast precursor (NADP-MDH) [<i>Zea mays</i>]	3	89	46830	5,79
	gil303844	eukaryotic initiation factor 4A [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	3	54	46902	5,29
spot 134	gil10720247	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor (RuBisCO activase) (RA) [<i>Solanum pennellii</i>]	18	500	50669	8,61
	gil12643758	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplast precursor (RuBisCO activase 2) (RA 2) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	22	492	48313	8,14
	gil445628	RuBisCO activase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	19	492	42720	5,5
	gil3334149	Magnesium-chelatase subunit chlI, chloroplast precursor (Mg-protoporphyrin IX chelatase) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	4	61	46599	6,64
spot 136	gil399942	Stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplast precursor [<i>Pisum sativum</i>]	17	639	75469	5,22
	gil10720247	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor (RuBisCO activase) (RA) [<i>Solanum pennellii</i>]	6	129	50669	8,61
spot 139	gil30025966	heat shock protein 70 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	23	692	70832	5,17
	gil10720247	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor (RuBisCO activase) (RA) [<i>Solanum pennellii</i>]	3	95	50669	8,61
spot 142	gil55977763	ATP synthase subunit alpha (ATPase subunit alpha) (ATP synthase F1 sector subunit alpha) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	33	978	55420	5,14
	gil134104	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplast precursor (60 kDa chaperonin subunit beta) (CPN-60 beta) [<i>Brassica napus</i>]	4	99	62434	6,56
spot 143	gil55977763	ATP synthase subunit alpha (ATPase subunit alpha) (ATP synthase F1 sector subunit alpha) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	30	978	55420	5,14
spot 144	gil78102542	ATP synthase CF1 beta subunit [<i>Nicotiana sylvestris</i>]	30	693	53506	5,1
spot 148	gil78102542	ATP synthase CF1 beta subunit [<i>Nicotiana sylvestris</i>]		1073	53506	5,1

spot 150	gil14717999	ATP synthase beta subunit [<i>Celtis yunnanensis</i>]	28	547	41128	5,3
	gil2501356	Transketolase, chloroplast precursor (TK) [<i>Solanum tuberosum</i>]	12	405	79942	5,94
	gil1293020	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [<i>Polyscias guilfoylei</i>]	8	182	52534	6,1
spot 151	gil2501356	Transketolase, chloroplast precursor (TK) [<i>Solanum tuberosum</i>]	12	411	79942	5,94
	gil3559814	transketolase 1 [<i>Capsicum annuum</i>]	10	362	80056	6,16
	gil111162653	transketolase [<i>Nicotiana attenuata</i>]	21	243	32539	6,34
	gil114572	ATP synthase subunit beta (ATPase subunit beta) (ATP synthase F1 sector subunit beta)	16	237	53521	5
spot 152	gil2501356	Transketolase, chloroplast precursor (TK) [<i>Solanum tuberosum</i>]	15	461	79942	5,94
	gil3559814	transketolase 1 [<i>Capsicum annuum</i>]	13	387	80056	6,16
	gil111162653	transketolase [<i>Nicotiana attenuata</i>]	25	292	32539	6,34
	gil77563673	transketolase 1 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	37	146	7129	9,06
	gil3219762	Actin-54 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6	62	37464	6,56
spot 155	gil44662784	lipoamide dehydrogenase [<i>Capsicum annuum</i>]	19	470	53312	6,72
	gil132000	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Nicotiana acuminata</i>]	5	129	52908	6,41
spot 156	gil4262869	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [<i>Nicotiana tabacum</i>]	32	840	52895	6,29
spot 158	gil132000	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Nicotiana acuminata</i>]	28	668	52908	6,41
spot 159	gil1705613	Catalase isozyme 1 (Salicylic acid-binding protein) (SABP) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	23	585	56788	6,6
	gil21634143	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [<i>Cardiochlamys madagascariensis</i>]	21	513	53427	6,74
spot 160	gil21634143	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [<i>Cardiochlamys madagascariensis</i>]	22	482	53427	6,74
spot 161	gil462187	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial precursor (Serine methylase) (Glycine hydroxymethyltransferase) (SHMT) [<i>Pisum sativum</i>]	7	144	57256	8,71
	gil405145	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase [<i>Codonopsis ovata</i>]	6	117	52507	6,24

spot 162	gil1346155	Serine hydroxymethyltransferase 1, mitochondrial precursor (Serine methylase) (Glycine hydroxymethyltransferase) (SHMT) [<i>Flaveria pringlei</i>]	18	440	57013	8,72
	gil4262869	ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [<i>Nicotiana tabacum</i>]	17	272	52895	6,29
	gil2459684	catalase 1 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	4	70	56826	6,86
spot 163	gil1705613	Catalase isozyme 1 (Salicylic acid-binding protein) (SABP) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	25	597	56788	6,6
	gil71842522	AlaT1 [<i>Vitis labrusca</i>]	14	275	52683	6,13
	gil15223186	AOAT2 (ALANINE-2-OXOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE 2); alanine transaminase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	11	237	53410	6,21
	gil13430566	putative alanine aminotransferase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	11	229	53320	6,91
	gil132000	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Nicotiana acuminata</i>]	10	222	52908	6,41
	gil29569153	alanine aminotransferase [<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)]	9	215	53548	8,01
	gil114557	ATP synthase subunit beta (ATPase subunit beta) (ATP synthase F1 sector subunit beta)	7	103	53437	5,15
spot 164	gil26246385	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	34	888	52103	5,97
	gil114572	ATP synthase subunit beta (ATPase subunit beta) (ATP synthase F1 sector subunit beta) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	21	274	53521	5
	gil132000	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Nicotiana acuminata</i>]	9	205	52908	6,41
	gil231687	Catalase isozyme 1 [<i>Solanum lycopersicum</i>]	3	90	56470	6,56
spot 165	gil26246385	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	36	953	52103	5,97
	gil132000	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Nicotiana acuminata</i>]	7	116	52908	6,41
	gil231687	Catalase isozyme 1 [<i>Solanum lycopersicum</i>]	3	81	56470	6,56
	gil21401	ADP-glucose pyrophosphorylase [<i>Solanum tuberosum</i>]	3	64	48787	5,73
spot 166	gil147229	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.3.1) [<i>Escherichia coli</i>]	34	1014	49430	5,81
	gil132000	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Nicotiana acuminata</i>]	6	127	52908	6,41

spot 167	gil147235	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.3.1) [<i>Escherichia coli</i>]	48	1040	49405	5,74
	gil131915	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Barnadesia caryophylla</i>]	3	73	52673	6,29
spot 168	gil147235	alkaline phosphatase precursor (EC 3.1.3.1) [<i>Escherichia coli</i>]	46	1041	49405	5,74
	gil131983	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit) [<i>Jasminum simplicifolium</i> subsp. <i>Suavissimum</i>]	5	121	51781	6,6
spot 169	gil7766898	Chain A, Crystal Structure Of Pseudomonas Fluorescens Hppd [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	40	834	40026	5,01
spot 170	gil7766898	Chain A, Crystal Structure Of Pseudomonas Fluorescens Hppd [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	38	676	40026	5,01
spot 171	gil1633107	Chain A, Alkaline Phosphatase (N51mg) [<i>Escherichia coli</i>]	34	620	46686	5,63
spot 172	gil26246385	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	29	835	52103	5,97
spot 173	gil26246385	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	26	559	52103	5,97
spot 174	gil26246385	Alkaline phosphatase precursor [<i>Escherichia coli</i> CFT073]	16	439	52103	5,97
	gil114557	ATP synthase subunit beta (ATPase subunit beta) (ATP synthase F1 sector subunit beta) [<i>Nicotiana rustica</i>]	5	112	53437	5,15
	gil132000	Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Nicotiana acuminata</i>]	4	84	52908	6,41
spot 175	gil1943561	Chain , Green Fluorescent Protein From Aequorea Victoria [<i>Aequorea victoria</i>]	21	316	26581	5,68
	gil22550386	beta-carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	13	182	34431	6,19
	gil157142955	chloroplast-localized protein [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	11	120	33731	8,79
spot 176	gil150261557	Chain A, The Chemical Control Of Protein Folding: Engineering A Superfolder Green Fluorescent Protein [<i>Aequorea victoria</i>]	31	618	26807	5,08
	gil7766898	Chain A, Crystal Structure Of Pseudomonas Fluorescens Hppd [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	14	119	40026	5,01
	gil12229948	Proteasome subunit alpha type 6 (20S proteasome alpha subunit A) (20S proteasome subunit alpha-1) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	4	59	27286	5,92

spot 177	gil1943561	Chain , Green Fluorescent Protein From Aequorea Victoria [<i>Aequorea victoria</i>]	21	418	26581	5,68
	gil132000	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Nicotiana acuminata</i>]	6	85	52908	6,41
	gil14594925	putative alpha7 proteasome subunit [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6	65	27181	6,11
	gil115473	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6	51	34489	6,41
spot 178	gil1943561	Chain , Green Fluorescent Protein From Aequorea Victoria [<i>Aequorea victoria</i>]	22	451	26581	5,68
	gil310921	carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	9	68	28596	5,7
	gil132000	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [<i>Nicotiana acuminata</i>]	2	55	52908	6,41
spot 179	gil1490529	GFPuv [Cloning vector pGFPuv]	25	294	26779	5,8
	gil559005	ascorbate peroxidase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	10	108	27371	5,43

Publication

Bally J, Paget E., Droux M., Job C., Job D., Dubald M (2008) Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for formation of disulfide bonds in recombinant proteins. *Plant Biotechnology Journal* **6** : 46-61.

Brevet

Bally J., Paget E., Dubald M (2007) Transplastomic plants expressing lumen-targeted protein. Brevet No. EP06356090.8

Communications orales

- 8th International Congress of Plant Molecular Biology. ISPMB. 2006
(Centre de convention, Adelaide, Australie).
- 15th Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. FESPB. 2006
(Palais des congrès, Lyon)
- Réunion GDR Rédoxines, (Paris). 2006

Poster

- 6^{ème} Journée Andrée Verbert, 2006
Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille I

Abstract:

Plastid genome engineering is an emerging technology which is being considered for the improvement of plant agronomic traits as well as for the molecular farming of biomaterials and therapeutic proteins. In the first part of this work, the potential of these organelles of prokaryotic origin to correctly fold and accumulate a disulfide bond containing enzyme has been investigated. Unlike a normal bacterial cytosol, the stroma of tobacco chloroplasts was found to support the formation of a recombinant alkaline phosphatase from *Escherichia coli*, whose activity and stability depend on the presence of two intra-molecular disulfide bonds. Targeting this enzyme to the thylakoid lumen *via* the Sec pathway resulted in stronger accumulation levels and higher specific activity. Complementary approaches have been initiated in tobacco using bacterial chaperones involved in the catalysis of disulfide bond formation, and a redox sensitive green fluorescent protein. These findings shed some light on the folding properties within chloroplasts, and have important biotechnological implications for the production in plants of many therapeutic proteins.

Recombinant chloroplasts have the capacity to accumulate massive amounts of recombinant protein. The second part of this work focused on the consequences on the plant fitness and physiology of such extreme expression levels. We have analyzed tobacco plastid transformants accumulating alkaline phosphatase, a green fluorescent protein, and a bacterial hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase. These lines exhibited a normal wild-type growth rate, and no significant perturbation of the chloroplast transcriptome was observed. In contrast, a proteomic approach on leaves revealed some differences, in particular a massive drop in the amount of Rubisco. The impact of recombinant protein expression on plant metabolism is discussed.

Keywords: chloroplast, transformation, disulfide bonds, thylacoïdes, recombinant, proteomic.

Résumé:

L'ingénierie génétique des plastes est une technologie émergente considérée tant pour l'amélioration de certains caractères d'intérêt agronomiques, que pour la production de biomatériaux et de protéines thérapeutiques. Dans la première partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés au potentiel de ces organites, d'origine procaryotique, à replier correctement et accumuler une enzyme contenant des ponts disulfures. Nous avons montré qu'à l'inverse du cytoplasme bactérien, le stroma des chloroplastes de tabac permet la formation d'une phosphatase alcaline recombinante dont l'activité et la stabilité dépendent de la présence de ses deux ponts disulfures intramoléculeaires. L'adressage de cette enzyme au lumen des thylacoïdes *via* le système Sec résulte en un niveau d'expression plus élevé et une plus grande activité spécifique de la protéine. Des approches complémentaires ont été initiées dans le tabac, avec des protéines chaperonnes impliquées dans la formation des ponts disulfures, et d'une protéine fluorescente verte (GFP) sensible aux variations redox. Ces résultats nous informent sur les propriétés de repliement au sein des chloroplastes et ont des implications biotechnologiques importantes pour la production de nombreuses protéines thérapeutiques dans les plantes.

Les chloroplastes recombinants ont la capacité d'accumuler une quantité massive de protéines recombinantes. Pour la seconde partie de nos travaux, nous nous sommes attardés sur les conséquences d'un niveau d'expression extrême. Nous avons analysé les plastes transformés de tabac accumulant la phosphatase alcaline, une GFP, ainsi qu'une hydroxyphényl pyruvate dioxygénase bactérienne. Ces lignées ont une croissance normale et aucune perturbation significative du transcriptome n'a été observée. En revanche, l'analyse du protéome des feuilles a révélé des différences et en particulier une diminution drastique de l'accumulation de la Rubisco. L'impact de l'accumulation massive de la protéine recombinante sur le métabolisme de la plante est discuté.

Mots clefs: chloroplaste, transformation, ponts disulfures, thylacoïdes, recombinant, protéomique.