

2m11.2616.5

Université de Montréal

Études fonctionnelles de la section -135 à -27 du promoteur du gène

*PR-10a* de la pomme de terre.

Par

Louise Paquet

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Décembre 1997

©Louise Paquet, 1997



2.11.12

W  
4  
U58  
1998  
V.058

Université de Montréal

Études fonctionnelles de la section -135 à -137 du promoteur du gène

PR-108 de la pomme de terre

PR

Louise Paduel

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître en sciences (M.Sc.)

Décembre 1997

Louise Paduel, 1997



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Études fonctionnelles de la section -135 à -27 du promoteur du gène  
*PR-10a* de la pomme de terre.

présenté par :

Louise Paquet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

*Le Jean Morais  
Normand Bussière  
Daniel Mallet*

Mémoire accepté le *15.05.1998*

## SOMMAIRE

Le gène de la protéine PR-10a de *Solanum tuberosum* (la pomme de terre) est activé lors des infections par *Phytophthora infestans* et après traitement avec un éliciteur extrait du même organisme. Des régions *cis*-actives ont été délimitées dans le promoteur de PR-10a [Matton *et al.*, 1993 ; Després *et al.*, 1995]. La section comprise entre les positions -135 à -105 est liée par un facteur nucléaire des tubercules (PBF-1). La capacité de la région -135 à -105 d'activer la transcription lorsqu'elle est placée devant le promoteur minimal de PR-10a a été testée par expression transitoire d'un gène rapporteur, celui de la  $\beta$ -glucuronidase, dans des protoplastes de tissu foliaire de pomme de terre. La région -135 à -105 a de plus été placée devant un promoteur minimal hétérologue, celui du gène du CaMV 35S, et testée de même.

Une autre région *cis*-active avait été délimitée entre les positions -47 à -27. Cette région avait été mutée et testée dans le contexte du promoteur tronqué à la position -135 : cette mutation stimulait la transcription à des niveaux 5 fois supérieurs à ceux entraînés par la même section de promoteur intacte. Cependant, une délétion de 4 pb avait été introduite dans la région mutée pendant la procédure de mutation. Afin de vérifier si la transcription augmentée était bien le résultat de la mutation et non celui de cette délétion fortuite de 4 pb, une construction a été préparée afin de restaurer la distance normale entre les positions -47 à -27, tout en maintenant toute cette région mutée. Cette construction fut placée devant le gène rapporteur et testée dans les protoplastes. Le protocole expérimental incluait la co-transfection d'un plasmide porteur du

gène de la luciférase pour corriger les résultats en fonction de l'efficacité de l'électroporation. Les résultats montrent que le plasmide porteur de la région -135 à -105 possède à lui seul la capacité d'activer la transcription lorsqu'il est placé devant le promoteur minimal homologue. La mutation de la région -47 à -27 continue de causer une augmentation de la transcription lorsque la distance normale est restaurée entre le début et la fin de la mutation.

## TABLE DES MATIÈRES

	page
<b>Sommaire</b> .....	iii
<b>Liste des tableaux</b> .....	vi
<b>Liste des figures</b> .....	vii
<b>Abréviations</b> .....	x
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>1.1 Contexte de la réponse de défense</b> .....	1
<b>1.2 Les protéines PR</b> .....	5
<b>1.3 La famille PR-10</b> .....	6
<b>1.4 La protéine PR-10a</b> .....	7
<b>1.5 Le gène de PR-10a</b> .....	8
<b>1.6 Objectif de la recherche</b> .....	11
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	
<b>2.1 Préparation des plasmides</b>	
<b>2.1.1 Le plasmide pLP17.</b> .....	13
<b>2.1.2 Le plasmide pLP3.</b> .....	15
<b>2.1.3 Le plasmide pLP4.</b> .....	16
<b>2.1.4 Le plasmide pLP9.</b> .....	17
<b>2.1.5 Le plasmide porteur du gène de la luciférase.</b> .....	18
<b>2.2 Préparation des protoplastes</b> .....	18

**TABLE DES MATIÈRES (suite)**

<b>2.3 Transformation des protoplastes par électroporation.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Essai d'activité luciférase.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Essai d'activité <math>\beta</math> - glucuronidase.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Méthodes de calcul.....</b>	<b>23</b>
<b>3. RÉSULTATS</b>	
<b>3.1 Expérience no.1.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Expérience no. 2.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Expérience no. 3.....</b>	<b>36</b>
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>41</b>
<b>5. CONCLUSION.....</b>	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>49</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xi</b>

## LISTE DES TABLEAUX

page

<b>TABLEAU I. Composition des solutions de préparation des protoplastes.</b>	
.....	19
<b>TABLEAU II. Combinaisons de concentrations de protoplastes et de plasmides utilisées pour les divers lots de protoplastes.</b>	
.....	21
<b>TABLEAU III. Activité luciférase, activité GUS et activité GUS relative pour l'expérience no.1.</b>	
.....	28
<b>TABLEAU IV. Activité luciférase, activité GUS et activité GUS relative pour l'expérience no.2.</b>	
.....	34
<b>TABLEAU V. Activité luciférase, activité GUS et activité GUS relative pour l'expérience no.3.</b>	
.....	39



## LISTE DES FIGURES

	page
<b>Figure 1. Comparaison des destins d'une plante porteuse du gène <math>R_1</math>, après l'attaque d'un pathogène possédant le gène <math>avr_1</math> ou après celle d'un pathogène ne le possédant pas.....</b>	<b>3</b>
<b>Figure 2. Représentation schématique de la région -155 à +145 du promoteur de <i>PR-10a</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 3. Séquence des manipulations pour insérer la section -135 à -105 devant le promoteur minimal de PR-10a fusionné au gène de la <math>\beta</math>-glucuronidase (plasmide pLP17).....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 4. Insertion du promoteur minimal du gène du CaMV 35S devant le gène de la <math>\beta</math>-glucuronidase (plasmide pLP3).....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 5. Insertion de la section -135 à -105 de PR-10a devant le promoteur minimal de CaMV 35S placé devant GUS (plasmide pLP4).....</b>	<b>16</b>
<b>Figure 6. Construction du plasmide pLP9 comportant exactement 19 paires de bases mutées entre les positions -47 et -27 dans le contexte du promoteur tronqué à la position -135.....</b>	<b>17</b>
<b>Figure 7. Les plasmides ayant servi à tester l'activité intrinsèque de l'élément -135 à -105 placé devant le promoteur homologue.....</b>	<b>26</b>

<b>Figure 8. L'élément -135 à -105 suffit pour activer le promoteur homologue.</b>	
.....	31
<b>Figure 9. Les plasmides ayant servi à tester l'activité intrinsèque de l'élément -135 à -105 placé devant un promoteur hétérologue....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 10. L'effet de l'élément -135 à -105 sur l'activation du promoteur minimal hétérologue.....</b>	<b>35</b>
<b>Figure 11. Les plasmides ayant servi à tester l'activité de l'élément -135 à -47 placé, en respectant la distance originale, devant le promoteur homologue.....</b>	<b>37</b>
<b>Figure 12. L'effet de la restauration de la distance normale dans la partie mutée (-47 à -27) du promoteur.....</b>	<b>40</b>

## ABRÉVIATIONS

avr	avirulent
CaMV 35S	le transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
GUS	le gène <i>uidA</i> d' <i>Escherichia coli</i> qui code pour la $\beta$ -glucuronidase
HR	réponse hypersensible (hypersensitive response)
kb	1000 (kilo) paires de bases
4-MU	4-methylumbelliférol
MUG	4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide
n.d.	non détecté
pb	paires de bases
PBF-1, PBF-2	<i>PR-10a</i> binding factor 1 et 2 : facteurs se liant au promoteur de <i>PR-10a</i> .
PR	associé à la pathogénie (pathogenesis-related)
SAR	résistance systémique acquise (systemic acquired resistance)
SEBF-1	facteur se liant à l'élément atténuateur (silencing element binding factor)

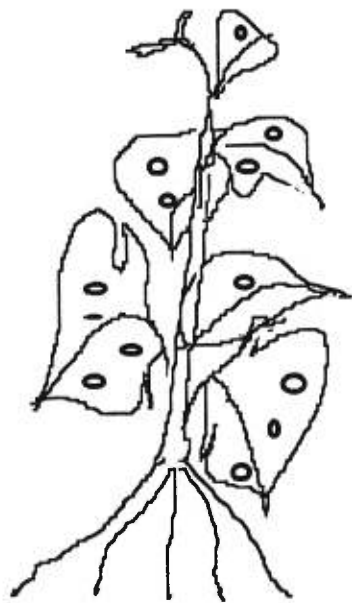
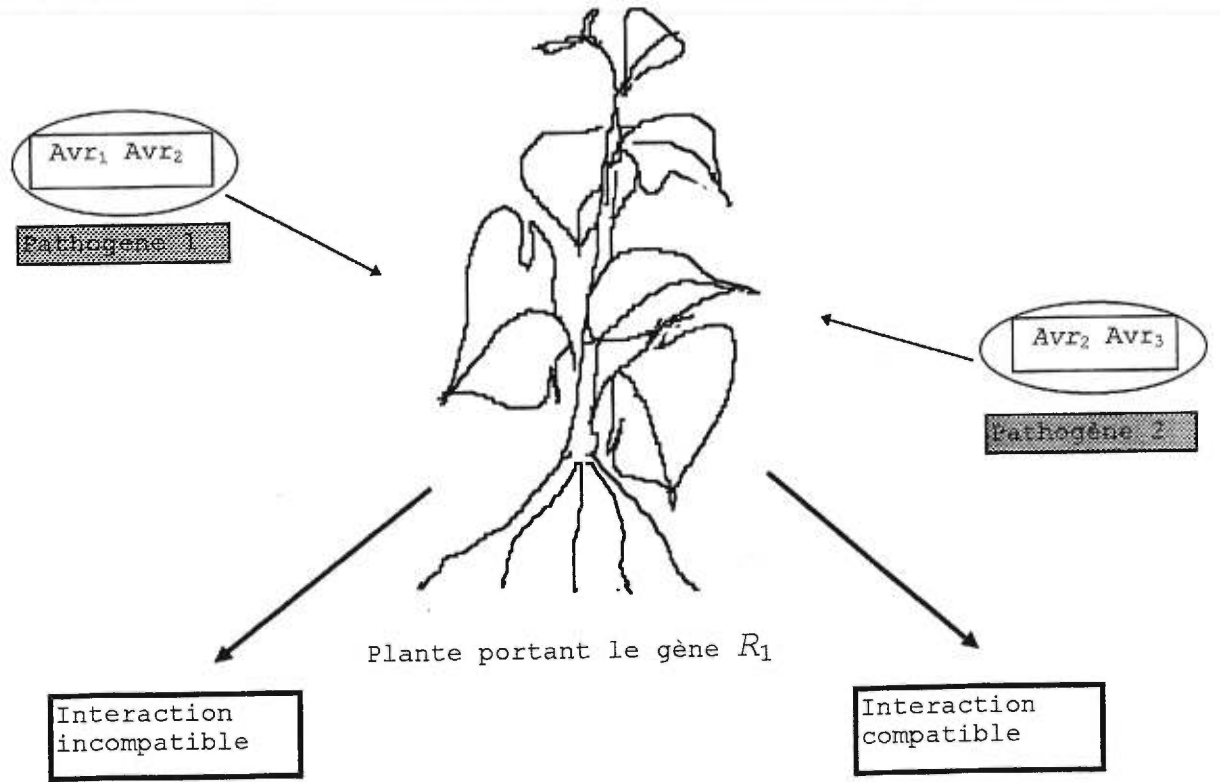
## 1. INTRODUCTION

L'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse de défense des plantes contre les infections microbiennes comporte non seulement un intérêt pratique certain mais lève aussi le voile sur les fondements d'un phénomène vital commun à tous les organismes : la réception et la transmission intracellulaire de signaux, le tout culminant avec l'activation de gènes spécifiques.

**1.1 Contexte de la réponse de défense** L'interaction entre un pathogène et la plante peut mener à deux sortes de conséquences. Lors d'une interaction dite incompatible, la progression du pathogène est rapidement restreinte. Le plus souvent alors, la plante met en branle une série de réponses physiologiques comme la mort rapide des cellules (programmed cell death), la synthèse concomitante de composés antimicrobiens comme les phytoalexines et l'épaississement des parois cellulaires [Greenberg, J. T. *et al.*, 1994]. Au niveau cellulaire près du site d'infection, les réactions observées incluent une apparition brutale de réactifs oxygénés, des flux ioniques impliquant des échanges de  $K^+$  et de  $H^+$ , une décompartmentation et l'induction de protéines associées à la pathogénie (pathogenesis-related :PR). Ces réactions rapides accompagnées de la restriction de la progression du pathogène au voisinage du site d'infection ont été désignées : « réponse hypersensible » (hypersensitive response en anglais : HR). Cette HR précède et pourrait même être nécessaire à l'apparition d'une réponse systémique de la plante qui devient

plus résistante aux attaques subséquentes. [Staskawicz *et al.*, 1995]. Quand cette résistance est acquise (en anglais : systemic acquired resistance ou SAR) l'acide salicylique s'accumule et l'expression de certains gènes PR est augmentée [Dong, 1995]. Par contre, une infection dite compatible conduit à la prolifération du pathogène *in planta* avec les symptômes afférents. On peut alors détecter certains marqueurs de la réponse de défense, mais ceux-ci apparaissent moins rapidement et en moindre quantité que dans l'interaction incompatible [Constabel et Brisson, 1992 ; Lamb *et al.*, 1992].

L'issue d'une rencontre entre une plante et un pathogène dépend des interactions de produits de gènes spécifiques de la plante et du pathogène (Figure 1, page 3). Pour que l'interaction soit incompatible, le produit d'un allèle *avr* du pathogène doit rencontrer son vis-à-vis chez la plante, le produit d'un allèle *R* correspondant. Les autres occurrences, soit la rencontre d'une plante dépourvue de *R* avec un pathogène porteur de l'*avr* correspondant ou la rencontre d'une plante porteuse de *R* avec un pathogène dépourvu de l'allèle *avr* correspondant, mènent à une interaction compatible dont l'issue est souvent fatale pour la plante [Lamb *et al.*, 1989]. Cette base génétique des relations des plantes avec leurs pathogènes a été établie par Flor (Flor, 1971). Bien qu'un gène *avr* ait été cloné en 1984 [Staskawicz *et al.*, cité par Lamb, 1994], il a fallu attendre jusqu'en 1992 pour qu'un gène *R* soit formellement identifié. Au moins six gènes de résistance sont clonés et en voie de caractérisation. Ces gènes se



Réponse hypersensible  
Résistance systémique acquise  
Survie



Progression du pathogène  
Létalité

**Figure 1. Comparaison des destins d'une plante porteuse du gène  $R_1$ , après l'attaque d'un pathogène possédant le gène  $avr_1$  ou après celle d'un pathogène ne le possédant pas.**

trouvent dans des espèces différentes réagissant à des attaques de pathogènes variés. Le cas du gène *pto* de la tomate est intéressant. Ce gène confère une résistance aux attaques de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) et il encode une protéine kinase de type sérine-thréonine. La protéine Pto possède de l'homologie avec une protéine kinase de type récepteur de *Brassica napus* qui joue un rôle essentiel dans le système de reconnaissance de l'auto-incompatibilité entre le pollen et les styles possédant le même haplotype pour le locus S. Dans un essai de deux hybrides chez la levure, Pto est capable de se lier physiquement au produit du gène *avrPto* [Scofield *et al.*, 1996] et les mutations de *Pto* et d'*avrPto* qui abolissent la résistance causent aussi la perte du contact protéine-protéine. Dans ce système, la perception du signal infectieux semble donc s'établir par un contact direct entre le produit du gène d'avirulence et le produit du gène de résistance. Quant à la transmission de ce signal en aval de Pto vers les composants de la machinerie cellulaire qui établissent effectivement la ligne de défense, il a été démontré qu'il existe une protéine capable d'interagir avec Pto et qui est phosphorylée par elle. Cette protéine est encodée par le gène *Pti* et possède un domaine kinase de type sérine-thréonine comme Pto. Cependant, Pti ne phosphoryle pas Pto et de plus, Pti n'est pas phosphorylée non plus par Fen, le produit d'un membre de la même famille que *Pto* et se situant au même locus. Quand le gène *Pti* est introduit dans le tabac, les plantes subissent une HR plus rapide quand elles sont attaquées par un pathogène porteur de *avrPto* [Zhou *et al.*, 1995]. Ces faits suggèrent que dans ce système, les événements de signalisation passent

par une cascade de phosphorylations. Le fait qu'il existe des homologues de *Pto* chez une vaste diversité d'espèces suggère que cette organisation de la voie de signalisation pourrait elle aussi être répandue. La suite des événements menant à la HR pourrait impliquer la phosphorylation de facteurs de transcription par *Pto* ou par *Pti*. La phosphorylation de facteurs de transcription précède l'activation de plusieurs gènes impliqués dans la réponse de défense, notamment celle de *PR-10a* [Després *et al.*, 1995].

**1.2 Les protéines PR** Le point culminant de ces événements intracellulaires consiste en l'activation de gènes. Certains, comme ceux des protéines PR, sont induits rapidement par les attaques de pathogènes avirulents durant la HR. Plusieurs protéines PR ont été identifiées par l'apparition ou l'augmentation importante de leur synthèse lors des attaques incompatibles. La définition de ce groupe de protéines inclut aujourd'hui celles qui sont induites lors des infections ou situations apparentées [van Loon *et al.*, 1994]. D'autres gènes sont induits rapidement lors des infection : les gènes associés aux enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes qui conduisent à la formation de la lignine, des phytoalexines et à la production d'acide salicylique. Comme l'activité biochimique du produit de ces gènes est bien caractérisée, ils ne sont pas classés dans le groupe des protéines PR. D'autres gènes, dont plusieurs *PR*, sont induits plus tard et de façon systémique, en corrélation avec l'établissement de la SAR. On en a pour exemples les gènes des familles *PR-2* et *PR-3*, qui encodent des  $\beta$ -1,3-glucanases et chitinases respectivement. Il n'est pas rare que des gènes *PR*



répondent à d'autres stimuli que l'infection. Ainsi, le gène d'un membre de la famille PR-10 du haricot est activé par la privation de lumière et pendant la sénescence des feuilles [Walter *et al.*, 1996]. Les protéines PR sont groupées en onze familles selon des critères considérant soit l'activité biologique ou enzymatique, soit l'immunoréactivité croisée, soit l'homologie de séquence. Pour certaines de ces familles, une activité biochimique est connue, mais pour d'autres la fonction de la protéine dans la plante demeure mystérieuse.

**1.3 La famille PR-10** Cette famille de protéines PR est composée de protéines intracellulaires de faible poids moléculaire. Elles sont largement répandues dans le règne végétal [Osmark, 1996]; on les trouve chez les monocotylédones [Warner *et al.*, 1992] comme chez les dicotylédones. Certaines sont connues comme étant des déterminants d'allergies alimentaires, comme celles du céleri et de la pomme et d'autres sont des allergènes trouvés dans le pollen des arbres, comme Bet v 1 du bouleau dont la structure tridimensionnelle a été récemment déterminée [Gajhede *et al.*, 1996]. Des isoformes de Bet v 1 sont induites lors d'inoculation d'un pathogène dans des suspensions de cultures cellulaires de bouleau [Swoboda *et al.*, 1995]. Les protéines de la famille PR-10 montrent de l'homologie avec deux ribonucléases du ginseng [Moiseyev *et al.*, 1997]. Une activité ribonucléase a été récemment rapportée pour Bet v 1 [Swoboda *et al.*, 1996] et le groupe de Hess [Walter *et al.*, 1996] spécule, en se fondant sur des faits circonstanciels, que cette activité pourrait être l'apanage de plusieurs membres de la famille PR-10.

**1.4 La protéine PR-10a** D'abord nommé *STH-2*, le gène codant pour la protéine PR-10a de la pomme de terre a été isolé par hybridation différentielle à partir de tubercules induits en état de réponse hypersensible [Marineau *et al.*, 1987]. Ses niveaux d'ARNm augmentent quand le tubercule blessé est traité à l'acide arachidonique, un éliciteur extrait du mycélium de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Ils sont aussi plus élevés dans les tiges après blessure et dans le tissu foliaire, après l'application d'un homogénat de mycélium [Matton et Brisson, 1989]. Quant au produit de ce gène, il a été étudié par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps polyclonal généré à partir d'une protéine de fusion PR-10a -  $\beta$ -galactosidase. Quand les tubercules et les feuilles sont traités avec une faible concentration d'une race avirulente de *P. infestans*, l'accumulation de la protéine est plus forte et apparaît plus tôt qu'avec les races virulentes [Constabel et Brisson, 1992]. La protéine détectée apparaît dans les tubercules et les feuilles 72 h après l'élicitation et s'y maintient au moins jusqu'à 120 h. On la détecte aussi, après élicitation, dans les stolons, les tiges et les pétioles. Fait intéressant, dans les plantes intactes et non inoculées on retrouve cette protéine dans les stigmates où elle s'accumule davantage à maturité de la fleur [Constabel et Brisson, 1995]. La fonction de la protéine exprimée par *PR-10a* n'est pas connue. Des efforts pour détecter une activité ribonucléase chez PR-10a ont été vains [Brisson, données non publiées].

**1.5 Le gène de PR-10a** Le gène de PR-10a et les régions d'ADN qui le flanquent ont été séquencés. [Matton *et al.*, 1993]. L'activation du promoteur de

*PR-10a* (1 kpb avant + 145 pb après le site d'initiation de la transcription) a été étudiée dans des plants transgéniques de pomme de terre à l'aide du gène rapporteur *uidA* de *E. coli* qui code pour la  $\beta$ -glucuronidase (GUS). L'apparition de GUS telle que détectée par histochimie est principalement associée à la zone immédiatement adjacente au point de pénétration du pathogène et on la détecte aussi dans les tissus vasculaires des organes infectés ou traités avec un homogénat de *P. infestans*. La blessure provoque à elle seule une activation du gène, mais à des degrés moindres que l'infection ou l'élicitation.

L'expression du gène dans les stigmates de plantes intactes est plus forte dans les couches cellulaires superficielles. [Constabel et Brisson, 1995].

Une portion d'ADN de 1 kb en 5' jusqu'à la position +145 par rapport au site d'initiation de la transcription a été analysée en détail pour ses propriétés promotrices. L'expression transitoire de GUS fusionné à des délétions progressives de 5' en 3', a été analysée dans des protoplastes de tissu foliaire de pomme de terre. [Matton et al, 1993]. La région qui commence à la position -135 est suffisante pour activer le gène au même niveau que la section entière de 1 kb. Des délétions internes, des multimérisations et des déplacements ont montré que la région située entre les positions -135 et -47 possède les attributs d'une séquence activatrice autonome. De plus, les résultats de ces expériences indiquent la présence probable d'un élément répresseur de la transcription entre les positions -47 et -27. Afin d'analyser les propriétés du promoteur en contexte de réponse de défense et en réaction à la blessure, des régions progressivement réduites en 5' du promoteur ont été fusionnées à GUS et

introduites dans des pommes de terre transgéniques. [Després et al, 1995]. La région -135 à +145 retient tous les éléments nécessaires pour activer le gène dans les tubercules en réponse à la blessure et/ou à l'élicitation [Tableau 1 *in* Després et al, 1995]. Par contre, il semble que, *in vivo*, la section -155 à -135 ait un important effet quantitatif sur cette activation. De plus, ces expériences ont démontré que l'élément -47 à -27, dans le contexte du promoteur tronqué à la position -135, conserve en tubercules transgéniques ses propriétés atténuatrices.

En présence d'extraits nucléaires de tubercules, un oligonucléotide reproduisant la section -135 à -105 de la région activatrice est capable de déplacer, par compétition, un facteur qui se lie à la région -135 à -47. [Matton *et al*, 1993]. Des essais subséquents [Després et al, 1995] ont montré qu'un autre facteur nucléaire se lie à la région -47 à -27 (Silencing Element Binding Factor-1 : SEBF-1). Une représentation schématique des caractéristiques des régions importantes pour l'activation du gène est présentée à la figure 2, page 10.



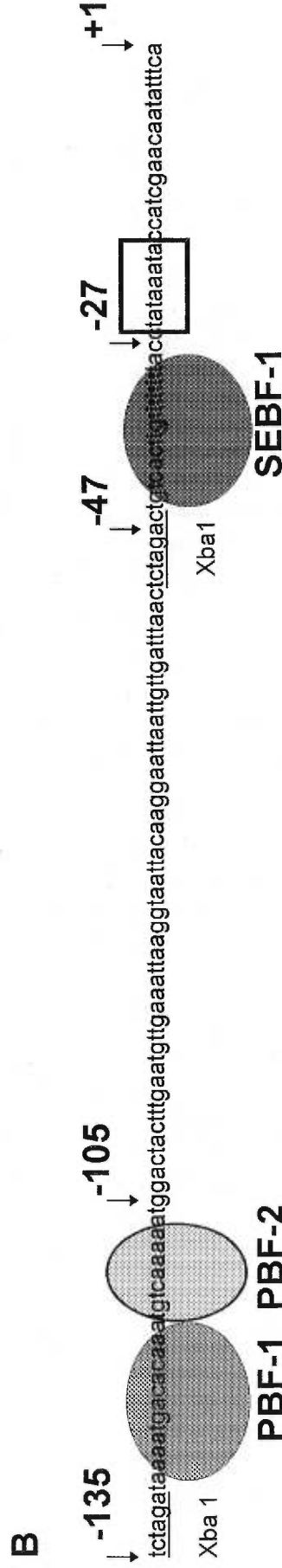
**-155 à -135 :** région de régulation quantitative de la réponse à la blessure et à l'élícitation

**-135 à -105 :** élément de réponse à la blessure et à l'élícitation (elicitor responsive element : ERE)

**-105 à -80 :** région de régulation négative de la réponse à la blessure

**-47 à -27 :** élément atténuateur de la réponse à la blessure et à l'élícitation (silencing element : SE)

**-27 à +145 :** minimum requis pour la réponse à la blessure



**Figure 2. Représentation schématique de la région -155 à +145 du promoteur de PR-10a.** Les sites nucléotidiques de fixation des facteurs à l'ADN ne sont pas connus. **A.** Les portions fonctionnellement significatives de la région du promoteur de PR-10a qui débute à la position -155. **B.** Séquence de la région -135 à +1 et les facteurs qui s'y lient. PBF-1,2 : PR-10a Binding Factor 1,2; SEBF-1 : Silencing Element Binding Factor 1. Les sites de restriction sont soulignés, la boîte TATA présumée est encadrée.

La liaison du facteur *PR-10a* Binding Factor-1 (PBF-1) et celle d'un autre facteur, PBF-2, à l'élément -135 à -105 (Elicitor responsive element : ERE) a été analysée en détail et les résultats ont démontré que cette liaison est contrôlée par un événement de phosphorylation pendant la réponse à la blessure et à l'élicitation [Després *et al.*, 1995]. De plus, la synthèse de la protéine *PR-10a* est elle aussi affectée par le traitement des tubercules avec des inhibiteurs de kinases et/ou de phosphatases. Une autre série d'expériences a montré qu'il existe, dans la pomme de terre, une protéine kinase qui possède des caractéristiques biochimiques et sérologiques semblables à celles de la protéine kinase C des mammifères. Cette kinase est activée en corrélation avec la liaison de PBF-2 ainsi qu'avec l'apparition de *PR-10a* et une résistance accrue des tubercules à l'infection [Subramaniam *et al.*, 1997].

**1.6 Objectif de la recherche** L'objectif de la présente recherche comportait deux volets. Il s'agissait tout d'abord de vérifier si l'ERE situé entre les positions -135 à -105 de *PR-10a* possède à lui seul la capacité d'activer la transcription. L'élément a donc été placé immédiatement devant le promoteur minimal de *PR-10a* (promoteur homologue) fusionné à GUS et l'expression transitoire en protoplastes a été mesurée. Afin de vérifier si l'élément conserve ses propriétés activatrices devant un promoteur minimal hétérologue, il fut aussi placé devant le promoteur du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35S). L'autre volet de la recherche visait à investiguer le comportement de la section mutée entre -47 et -27 dans le contexte du promoteur tronqué à la position -135. Cette région avait déjà été étudiée (Matton *et al.*, 1993) et le fait de la muter provoquait une transcription accrue du

gène rapporteur par rapport à la même section intacte. Cependant, pour obtenir cette mutation, les expérimentateurs avaient eu recours à une procédure de sous-clonage qui entraînait la perte de quatre paires de base dans la section mutée. Il devenait donc nécessaire de déterminer si les effets observés alors étaient vraiment dus à la mutation de l'élément ou s'ils n'étaient pas plutôt occasionnés par la perte des quatre paires de bases. Cette délétion créée par inadvertance aurait pu causer le déplacement d'un éventuel facteur activateur (peut-être PBF-1 ou 2) par rapport à l'appareil de transcription et l'augmentation de la transcription observée n'aurait été alors qu'un artefact du sous-clonage. La distance normale a donc été restaurée entre les positions -47 et -27 et cette construction a été testée en expression transitoire. Tous les tests ont été faits en co-électroporant un plasmide porteur du gène de la luciférase pour corriger les résultats en fonction de l'efficacité de la transformation. Les résultats suggèrent que la séquence -135 à -105 possède à elle seule des propriétés activatrices suffisantes pour augmenter l'activité du promoteur minimal homologue. En ce qui concerne l'activation du promoteur hétérologue, les résultats ne sont pas concluants. D'autre part, l'augmentation de la transcription observée à la suite de la mutation de la région -47 à -27 n'est pas modifiée, même après restauration de la distance normale entre les positions -47 à -27.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

### 2.1 Préparation des plasmides

#### 2.1.1 *Le plasmide pLP17.* Ce plasmide

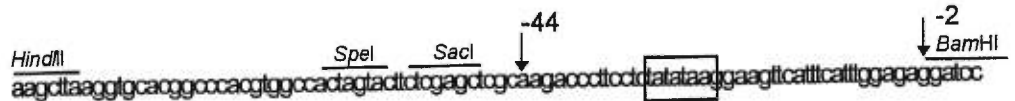
comporte la section -135 à -105 de PR-10a placée devant le promoteur minimal de PR-10a, lui-même fusionné au gène rapporteur GUS. Le promoteur minimal de PR-10a a été défini comme étant la région de -27 à +145 parce que celle-ci contient la présumée boîte TATA à la position -25 et qu'une délétion en 5' du promoteur allant jusqu'à la position -5 montre à peine plus d'activité que le plasmide portant le gène GUS nu [Matton et al, 1993]. La stratégie employée pour obtenir le plasmide pLP17 est décrite à la figure 3, page 14.



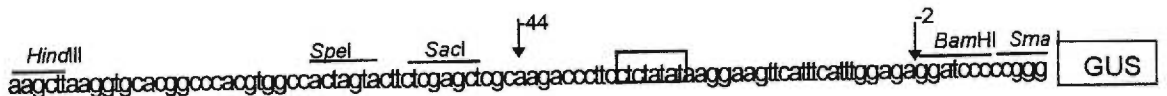


**2.1.2 Le plasmide pLP3.** Ce plasmide est constitué du promoteur minimal du gène CaMV 35S placé devant le gène de GUS. Le plasmide porteur du promoteur minimal du gène CaMV 35S nous a été obligeamment fourni par le Dr Carl Douglas de l'Université de Colombie Britannique. Il s'agit du phagemide commercial pSL1180 dans lequel le promoteur minimal (de la position -44 à la position -2 du gène CaMV 35S) est inséré entre les sites *Sac* I et *Bam* HI. La description de ce plasmide et la méthode employée pour insérer le promoteur minimal du gène CaMV 35S devant GUS sont décrites à la figure 4, sur cette page.

Le phagemide pSL1180 porte le promoteur minimal du gène CaMV 35S entre ses sites *Sac*I et *Bam*HI :



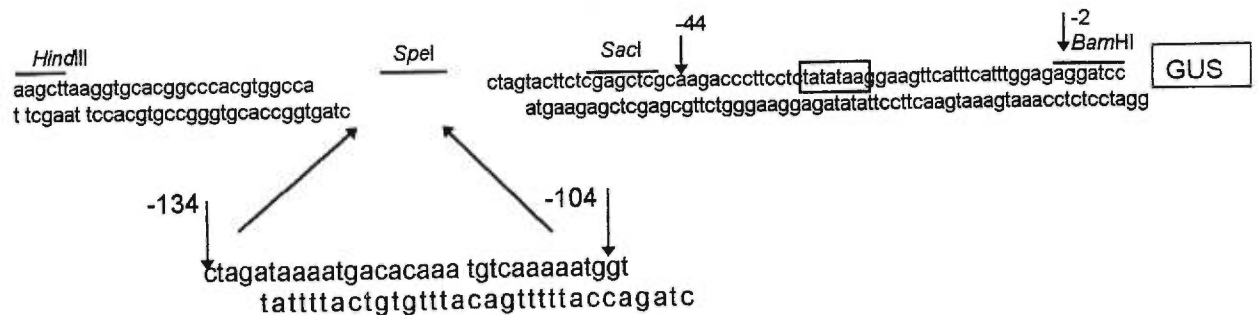
Exciser via *Hind*III et *Bam*HI et insérer dans les mêmes sites de pBI201, ce qui génère pLP3 :



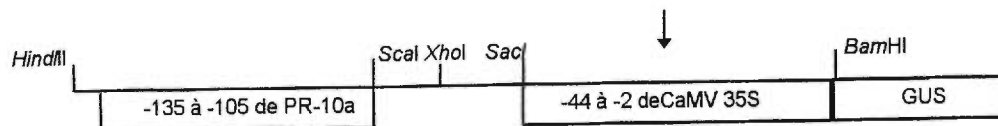
**Figure 4. Insertion du promoteur minimal du gène CaMV 35S devant le gène de la β-glucuronidase (plasmide pLP3).**

**2.1.3 Le plasmide pLP4** Celui-ci comporte les mêmes éléments que le plasmide pLP3 avec, en plus, la section -135 à -105 de PR-10a placée devant le promoteur minimal de CaMV 35S. Les détails de sa construction sont indiqués à la figure 5, sur cette page.

Le plasmide pLP3 est coupé par *SpeI*, ce qui génère des extrémités compatibles avec les extrémités synthétisées de l'oligonucléotide reproduisant la section -135 à -105 :



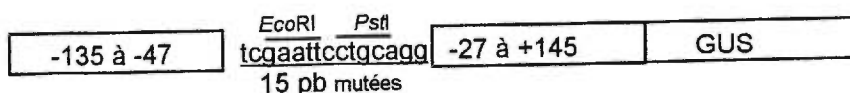
On obtient le plasmide pLP4 :



**Figure 5. Insertion de la section -135 à -105 de PR-10a devant le promoteur minimal de CaMV 35S placé devant GUS (plasmide pLP4).**

**2.1.4 Le plasmide pLP9** a été construit à partir du plasmide pDPM686. Ce dernier est porteur de la région -135 à -47 de PR-10a placée devant la section -27 à +145, elle-même placée devant GUS. Afin de produire cette construction, on avait eu recours à une procédure de sous-clonage de la région -135 à -47 qui laissait quinze (15) paires de bases mutées entre les positions -47 et -27. Dans le plasmide pLP9, quatre (4) paires de bases ont été ajoutées à la partie mutée afin de restaurer la distance normale entre les positions -47 et -27. La construction de pLP9 est décrite à la figure 6, sur cette page.

Le plasmide pDPM686 est constitué de la région -135 à -47 placée devant la région -27 à +145, elle-même placée devant le gène GUS :



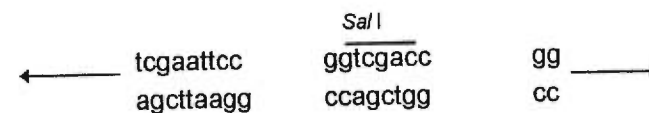
pDPM686 coupé *PstI* :



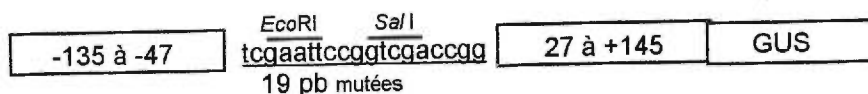
Traitement à l'ADN polymérase de T4+ dCTP : (activité 3'5' exonucléase : perte de 4 nucléotides sur chaque brin)



Ligation avec un linker 8-mer portant le site *SalI*



On obtient pLP9 :



**Figure 6. Construction du plasmide pLP9 comportant exactement 19 paires de bases mutées entre les positions -47 et -27 dans le contexte du promoteur tronqué à la position -135.** pDPM686 avait été construit pour le travail décrit dans Matton *et al.*, 1993.

### **2.1.5 Le plasmide porteur du gène de la luciférase**

Le plasmide

porteur du gène de la luciférase servant de standard interne en co-transformation nous a été obligeamment fourni par W. Barnes. Il s'agit du plasmide pWB216, une variante de pWB196 [Barnes, 1990]. Le gène de la luciférase y est entraîné par le promoteur du gène CaMV 35S (987 pb).

Toutes les constructions ont été vérifiées par digestion à des sites de restriction appropriés, puis par séquençage par la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

## **2.2 Préparation des protoplastes**

La procédure de préparation des protoplastes est celle décrite par Magnien *et al.*, 1980 avec quelques modifications. Le matériel biologique consistait en feuilles jeunes (les 4 à 5 dernières ouvertes) et saines de plants de *Solanum tuberosum* cv Désirée croissant *in vitro* et âgés de 8 semaines. Toutes les manipulations furent faites de façon stérile. Les feuilles excisées étaient d'abord scarifiées à l'aide de carborundum étalé au pinceau. Elles étaient ensuite lavées dans de l'eau stérile et incubées dans une solution de plasmolyse (Tableau I, page 19) pendant 1 à 3 h. La solution était ensuite remplacée par une solution enzymatique (Tableau I, page 19) afin de digérer les parois cellulaires. Les feuilles y incubaient 16 h. La solution enzymatique était retirée et les feuilles fragilisées étaient placées dans une solution dense (Tableau I, page 19) dans laquelle les protoplastes étaient libérés par une délicate agitation. Le tout était filtré sur de la mousseline de coton et le mélange de protoplastes et de solution dense était recueilli dans des bouteilles Babcock jusqu'à mi-col. Le reste du col était rempli de solution de culture (Tableau I, page 19).

## SOLUTIONS MÈRES DE SELS

## Macro-éléments 10X

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	823 mg L <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	950 mg L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85 mg L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2220 mg L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185 mg L <sup>-1</sup>

## Micro-éléments 1000X

MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	100 mg L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1000 mg L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1000 mg L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	30 mg L <sup>-1</sup>
KI	10 mg L <sup>-1</sup>
NiCl <sub>2</sub>	30 mg L <sup>-1</sup>
AlCl <sub>3</sub>	30 mg L <sup>-1</sup>

## Solution de fer 100X

Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	745 mg L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	556 mg L <sup>-1</sup>

## SOLUTION DE PLASMOLYSE

Mannitol	425 mM
BAP 0.01% w/v	0.001% w/v
Macroéléments 10X	1X
Microéléments 1000X	1X
Solution de Fer 100X	1X
pH final : 5.5	

## SOLUTION ENZYMATIQUE

Mannitol	425 mM
BAP 0.01% w/v	0.001% w/v
Macroéléments 10X	1X
Microéléments 1000X	1X
Solution de Fer 100X	1X
Cellulysin	1670 mg L <sup>-1</sup>
Macérase	330 mg L <sup>-1</sup>

## SOLUTION DENSE

Saccharose	500 mM
Macroéléments 10X	1X
Microéléments 1000X	1X
Solution de Fer 100X	1X
pH : 5.5	

## SOLUTION DE CULTURE

Acide nicotinique	1	mg L <sup>-1</sup>
Pyridoxine-HCl	1	mg L <sup>-1</sup>
Thiamine-HCl	1	mg L <sup>-1</sup>
Pantothénate de Ca	1	mg L <sup>-1</sup>
L-cystéine-HCl	1	mg L <sup>-1</sup>
Inositol	100	mg L <sup>-1</sup>
Biotine	0.01	mg L <sup>-1</sup>
2,4-D	0.1	mg L <sup>-1</sup>
NAA	1	mg L <sup>-1</sup>
BAP	0.2	mg L <sup>-1</sup>
Mannitol	440	mM
Saccharose	60	mM
Macroéléments 10X	1X	
Microéléments 1000X	1X	
Solution de Fer 100X	1X	

Tableau I. Composition des solutions de préparation des protoplastes.

La récupération des protoplastes s'est effectuée par centrifugation à basse vitesse. Les protoplastes ayant passé plusieurs heures dans la solution enzymatique équilibrée à 425 mM de mannitol, leur densité est moindre que celle de la solution dense à 500 mM de saccharose (Tableau I, page 19). Une première centrifugation à basse vitesse (70 au rhéostat de la centrifugeuse de laiterie, pendant 10 min) permettait de séparer les protoplastes les plus volumineux et les recueillir. Après avoir remplacé la solution de culture au haut du col de la bouteille, la centrifugation était répétée à vitesse plus rapide (100, 10 min) pour recueillir le reste. Cette procédure a permis d'obtenir, de façon fiable et reproductible, à partir de 12 boîtes de plants *in vitro*, de 6 à 10 X 10<sup>6</sup> protoplastes et plus.

### **2.3 Transformation des protoplastes par électroporation**

La procédure est la même que celle décrite [Matton *et al.*, 1993]. Les protoplastes recueillis étaient gardés sur glace et utilisés le même jour, pas plus de 5 h après leur isolement. La concentration des protoplastes et la quantité de plasmide utilisée sont décrits au Tableau II, page 21.

Purification sur CsCl	Concentration de protoplastes	Quantité de plasmide		Lots de protoplastes
		Testé	Standard luciférase	
1 X	$1 \times 10^6$	50 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{g}$	2 <sup>e</sup> , 3 <sup>e</sup> , 5 <sup>e</sup> , 6 <sup>e</sup> , 14 <sup>e</sup> .
2 X	$1 \times 10^6$	50 $\mu\text{g}$ ou 25 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{g}$ 1 $\mu\text{g}$	18 <sup>e</sup> , 20 <sup>e</sup> 21 <sup>e</sup> b), c)
2 X	$2 \times 10^6$	10 $\mu\text{g}$	0,2 $\mu\text{g}$	21 <sup>e</sup> a)

**Tableau II. Combinaisons de concentrations de protoplastes et de plasmides utilisées pour les divers lots de protoplastes.**

Ces paramètres variaient selon que les plasmides avaient été purifiés une ou deux fois sur CsCl et selon la quantité de protoplastes disponibles. Ainsi, on peut constater que le fait d'augmenter la concentration des cellules permet de réduire la quantité de plasmide. L'efficacité de la transformation par électroporation était améliorée avec la double purification des plasmides et en fonction directe de la concentration des protoplastes (voir Résultats). 320  $\mu\text{L}$  de solution de culture contenant les protoplastes étaient déposés dans la cuvette à électroporation avec 50  $\mu\text{L}$  du plasmide à tester dilué dans du TE (TRIS-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM). Le standard interne (plasmide contenant le gène de la luciférase sous contrôle de 987 pb du promoteur du gène du CaMV 35S [Barnes, 1990]) était ajouté à raison de 5  $\mu\text{L}$  et dans les quantités décrites au Tableau II, page 21. 160  $\mu\text{L}$  de tampon d'électroporation (HEPES 10mM, NaCl 150 mM, CaCl 5 mM, mannitol 335 mM) étaient ajoutés au mélange. La décharge électrique était produite à l'aide d'un générateur ajusté à 185 V, couplé à un condensateur qui délivre 1000  $\mu\text{F}$ . Après la



protoplastes étaient gardés sur glace pendant 10 min avant d'être transférés dans 3,5 mL de solution de culture où ils incubaient à l'obscurité pendant 18 h. Ils étaient ensuite recueillis par centrifugation à basse vitesse (vitesse 3 sur la centrifugeuse clinique, pendant 3 min) dans 100  $\mu$ L de tampon de lyse (Luciferase Assay System de Promega). Les membranes étaient brisées par agitation mécanique (vortex) brève (1 s) et le tout était immédiatement congelé dans de la glace sèche et gardé à - 80° C. Des précautions furent prises pour que tous les échantillons subissent les manipulations dans un même laps de temps.

#### **2.4 Essai d'activité luciférase**

L'activité luciférase se dégrade rapidement dans l'extrait végétal [Millar *et al.*, 1992]. Même à - 80° C, l'activité diminue après deux semaines (notre observation). Aussi convient-il de prendre des précautions dans la manipulation des échantillons : ils doivent être gardés sur glace sèche et décongelés sur glace juste avant l'essai. Millar et collaborateurs suggèrent d'éliminer les débris membranaires par centrifugation avant l'essai. Toutefois, entre nos mains, cette procédure était nuisible à l'activité et elle fut abandonnée sans que la reproductibilité des résultats n'en souffre (données non présentées). L'émission de lumière fut captée par un compteur à scintillation LKB Wallac 1217 Rackbeta réglé pour détecter la chimiluminescence [Fulton et van Ness, 1993]. Le décompte des photons fut fait pendant 3 min et le résultat était une intégration de tous les comptes. 50  $\mu$ L de réactif contenant la luciférine (Luciferase Assay Reagent (LAR) de Promega) et 5  $\mu$ L de l'extrait étaient placés dans un tube d'Eppendorf de 1,8 mL suspendu aux rebords d'une fiole à scintillation. Le fait de déposer le tube d'Eppendorf au fond de la fiole diminuait la captation de la lumière. Le tout était placé dans le compteur exactement 55 s avant le début réel du compte. La détection de la lumière émise est rendue sous forme de « comptes » dont la valeur progresse de façon linéaire jusqu'à 30 X 10<sup>6</sup> comptes. La vérification de la linéarité a été effectuée avec un extrait dont l'activité était plus forte que la zone de linéarité. Des dilutions progressives avec le tampon de lyse ont permis d'établir la limite de linéarité de détection.

## 2.5 Essai d'activité $\beta$ - glucuronidase

La mesure de l'activité GUS a été effectuée selon la méthode de Jefferson [Jefferson, 1987]. Brièvement, le substrat de la  $\beta$ -glucuronidase, le 4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) était ajouté, en concentration finale de 1 mM aux échantillons. Les échantillons étaient ensuite placés à 37°C pour que la réaction suive son cours. Le produit de la réaction, le 4-methylumbelliferone (4-MU) émet de la fluorescence en solution basique. La mesure s'effectue donc dans 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M. Les mesures furent prises à intervalles réguliers (0, 1, 2, 4 h) dans un fluoromètre Hoefer TKO 100 préalablement calibré avec le 4-MU authentique. Les résultats, exprimés en picomoles de 4-MU par min, sont normalisés par mg de protéines. La teneur en protéines fut établie par la méthode de Bradford avec le réactif de Biorad.

## 2.6 Méthodes de calcul

1<sup>ère</sup> étape : déterminer l'activité luciférase.

De chaque compte, on a d'abord soustrait la chimiluminescence intrinsèque du réactif LAR. Du résultat, exprimé par mg de protéines, fut soustraite la chimiluminescence endogène d'un extrait de cellules non transformées, exprimée par mg de protéines.

2<sup>ième</sup> étape : déterminer l'activité  $\beta$ -glucuronidase

Toujours inclus dans l'expérience, un témoin négatif consistait en un échantillon cellules transformées avec un plasmide porteur du gène GUS sans promoteur ainsi qu'avec le standard de luciférase. La présence d'une activité luciférase sans activité GUS détectable assurait que l'absence de cette dernière n'était pas due à une faille dans la procédure d'électroporation. Ce témoin ne devait pas donner plus d'activité GUS qu'un extrait de cellules non transformées.

Pour calculer l'activité GUS, on a soustrait deux mesures prises dans la zone de linéarité de production de 4-MU (avant 1h après l'addition de MUG, la production

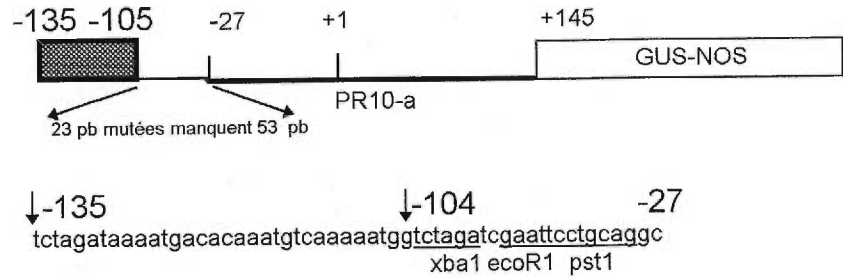
de 4-MU n'est pas linéaire). Le résultat était exprimé en unités par min par mg de protéines. De ce résultat, on a soustrait la même mesure accomplie sur un extrait de cellules non transformées ou sur un extrait de cellules ayant reçu le plasmide GUS sans promoteur. Cette soustraction servait à éliminer du résultat la production de 4-MU résultant d'une dégradation spontanée ou chimique mais non enzymatique en présence de l'extrait. Les données furent ensuite converties en picomoles de 4-MU par mg par min. Par la suite, la correction fut faite pour l'efficacité de l'électroporation en divisant l'activité GUS par l'activité luciférase.

### 3. RÉSULTATS

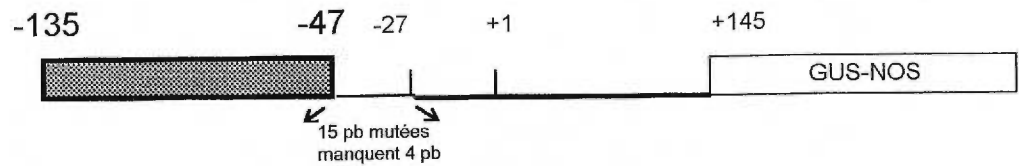
#### 3.1 Expérience no.1. L'ÉLÉMENT -135 À -105 POSSÈDE-T-IL EN LUI-MÊME DES PROPRIÉTÉS ACTIVATRICES DE LA TRANSCRIPTION QUAND IL EST PLACÉ, SEUL, DEVANT LE PROMOTEUR MINIMAL HOMOLOGUE ?

La figure 7, page 26 décrit les différentes constructions ayant servi à cette expérience. pLP17 comporte l'élément -135 à -105 placé devant le promoteur minimal qui commence à la position -27. En réalité, la séquence originale du promoteur est ici conservée jusqu'à la position -106 inclusivement. Nous conservons la nomenclature -135 à -105 pour des raisons de commodité de comparaison avec les autres auteurs. Il existe 23 pb mutées, résidus de construction, entre les positions 104 et -27. L'élément est donc déplacé par rapport sa position normale en regard de l'appareil transcriptionnel. Le témoin positif était fourni par la construction comportant le promoteur tronqué jusqu'à la position -135, dont la partie qui va de la position -47 à la position -27 a été mutée avec 4 pb manquantes. Cette construction avait activé le gène a des niveaux 5 fois plus élevés que le promoteur entier [Matton *et al.*, 1993]. Le témoin négatif était la construction -27 à +145 qui ne garde du promoteur que la boîte TATA présumée, essentielle pour la liaison des facteurs de transcription généraux. On a inclus dans l'expérience le promoteur tronqué à la position -135 afin de servir de point de comparaison en tant qu'activation provoquée par la région -135 à -105 quand elle se trouve en position normale par rapport au site d'initiation. Il paraissait intéressant d'inclure aussi dans l'expérience la construction qui contient le promoteur tronqué jusqu'à la position -105. Il s'agit d'un autre point de comparaison

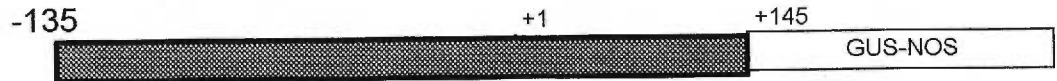
## pLP17



## pDPM686



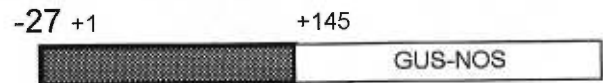
## pDPM635



## pDPM680



## pDPM683



**Figure 7. Les plasmides ayant servi à tester l'activité intrinsèque de l'élément -135 à -105 placé devant le promoteur homologue.** Ceux qui portent la dénomination DPM ont été préparés dans le cadre de l'article de Matton *et al*, 1993. GUS-NOS signifie le gène de la  $\beta$ -glucuronidase suivi de la séquence de terminaison du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Le tableau III, page 28, montre les résultats bruts des activités luciférase et GUS pour chaque construction testée dans différents lots de protoplastes. Font partie du même lot de protoplastes, les cellules préparées et électroporées le même jour et ayant subi les tests d'activité luciférase et GUS en une seule séance de mesures. Pour certains lots, un même plasmide a été testé plus d'une fois. Ces transformations supplémentaires sont indiquées par des lettres (ex. : 3<sup>e</sup> lot, a) et b)).

	Activité luciférase (LUC) coups x 10 <sup>9</sup> mg <sup>-1</sup>	Activité β-glucuro- nidase (GUS) pmoles mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	GUS/LUC
<b>pLP17 (-135 Δ -104,-27)</b>			
3e lot a)	411	71,97	0,175
b)	444	117,60	0,265
5e lot a)	383	24,93	0,065
b)	276	20,37	0,074
6e lot	346	23,28	0,067
14e lot a)	499	26,38	0,053
b)	1129	52,48	0,046
<b>pDPM635 (-135 à +145)</b>			
2e lot	4530	109,72	0,024
3e lot a)	3251	361,41	0,111
b)	1616	194,36	0,120
5e lot	513	37,04	0,072
6e lot	6246	399,28	0,064
14e lot	187	3,15	0,017
<b>pDPM680 (-105 à +145)</b>			
6e lot	410	5,08	0,0124
14e lot a)	3631	43,83	0,0121
b)	13	n. d.	
<b>pDPM683 (-27 à +145)</b>			
2e lot	6990	124,23	0,018
5e lot	789	16,73	0,021
6e lot	735	49,73	0,068
14e lot a)	11	n. d.	
b)	1061	6,72	0,006
<b>pDPM686 (-135Δ -47,-27)</b>			
2e lot	21180	4616,20	0,22
6e lot	1166	842,34	0,72
14e lot a)	19	3,93	0,21
b)	16	5,15	0,32

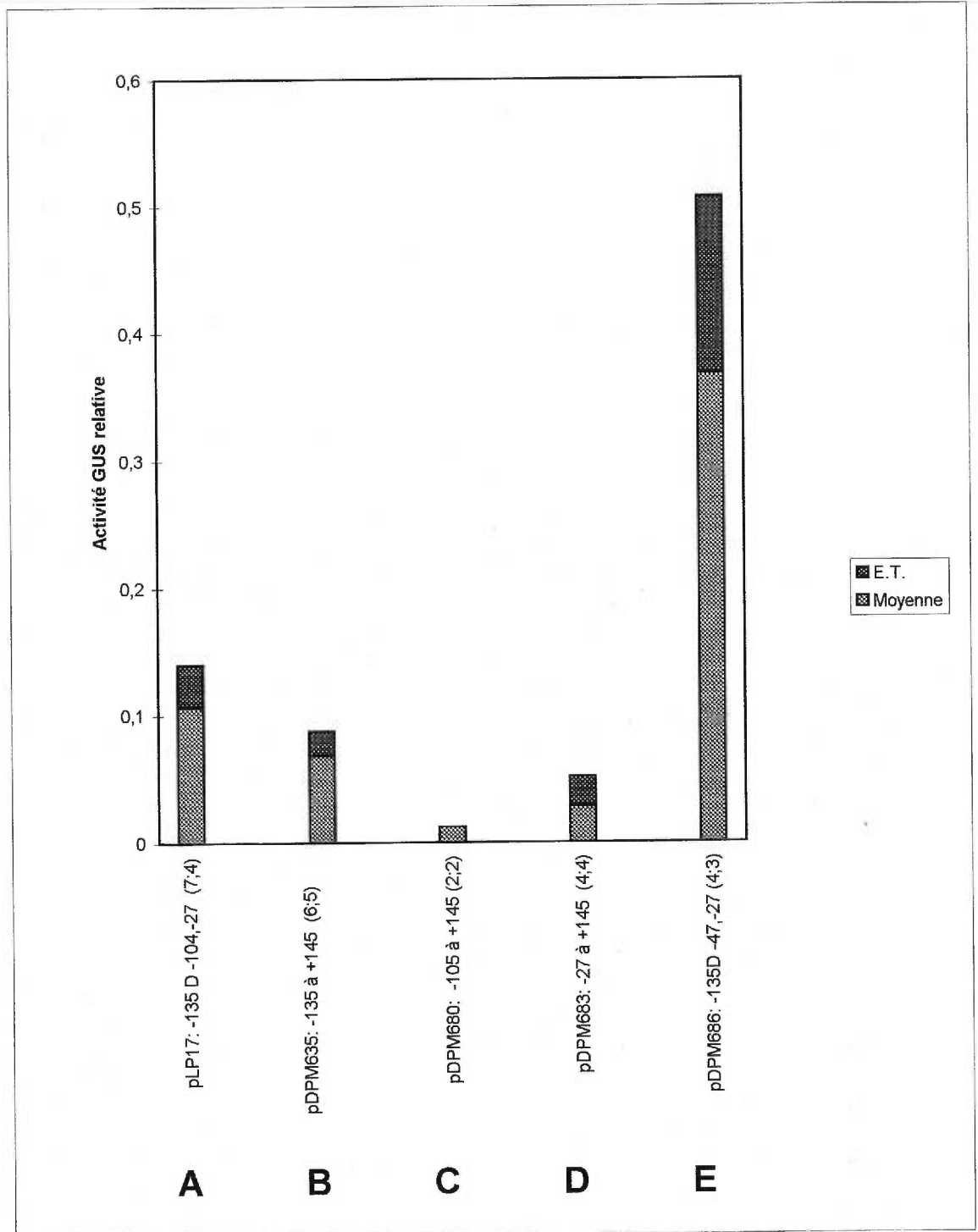
**Tableau III. Activité luciférase, activité GUS et activité GUS relative pour l'expérience no. 1. n.d.: non détecté**

Validité de la méthode de correction pour l'efficacité de transformation. Quand un même plasmide a été transformé deux fois dans un lot de protoplastes, les variations de l'activité GUS sont compensées par la correction. On peut en constater des exemples, toujours au tableau III, page 28, pour pDPM635 au 3<sup>e</sup> lot, pour pLP17 au 5<sup>e</sup> lot, et pour pDPM686, au 14<sup>e</sup> lot. D'autre part, quand l'activité luciférase est très faible, l'activité GUS n'est pas détectable, comme le montre le résultat pour le plasmide pDPM680 au 14<sup>e</sup> lot b) et pour le plasmide pDPM683 au 14<sup>e</sup> lot a). En contraste, l'activité GUS entraînée par le plasmide pDPM686 dans le 14<sup>e</sup> lot demeure détectable même si l'activité luciférase est très basse pour ces transformations. C'est que l'activité GUS est alors comparativement très forte car elle résulte de l'action du promoteur amputé de son élément atténuateur. Ceci est d'ailleurs en accord avec les données de Matton *et al.* (1993).

Reproductibilité des résultats Prenant le plasmide pDPM635 comme exemple, on constate qu'il existe d'assez fortes variations entre les lots de protoplastes, même une fois prise en compte la correction pour l'efficacité de transformation (0,017 à 0,120). Cette variation demeure toutefois acceptable en ce qu'elle ne nuit pas à la signification des différences entre les résultats obtenus pour les différents plasmides et ce, tenant compte de l'erreur-type de la moyenne (figure 8, page 31). D'autre part, les fortes variations de l'activité luciférase, reflet de l'efficacité de la transformation, s'expliquent par le fait que la conductivité électrique des cuvettes variait avec l'usure. L'usage ultérieur de cuvettes neuves a pu pallier à ce problème (comparer la variation des activités luciférase du tableau III, page 28, avec celles du tableau IV, page 34).



Analyse des résultats La figure 8, page 31, montre, sous forme d'histogramme, les moyennes des résultats pour chaque plasmide. L'activité GUS relative est représentée en unités arbitraires. L'expression de GUS entraînée par la section du promoteur qui va de la position -135 à la position +145 ( B dans la figure 8) peut servir de point de référence pour les autres sections de promoteur. Dans des expériences d'expression transitoire antérieures, cette section du promoteur conservait les mêmes propriétés activatrices que le promoteur complet (1 kb) [Matton *et al.*, 1993]. La section -135 à -105 placée devant la position -27 (pLP17 : A, figure 8) conserve dans cette situation ses propriétés activatrices, et même davantage. Le promoteur tronqué à la position -105 (C, figure 8), construction conservant l'élément atténuateur, active moins la transcription que le promoteur minimal qui est tronqué à la position -27 (D, figure 8). C'est le résultat attendu en raison de la présence de l'élément atténuateur. Quant à la construction qui comporte la section -135 à -47 placée devant la position -27 avec 15 pb mutées entre -47 et -27 (E, figure 8), elle active la transcription à son plus haut niveau : 4 fois plus que le promoteur tronqué à -135. Pour ces trois dernières constructions, les résultats, en ce qui concerne leur rapport (ratio) sont en accord avec ceux obtenus précédemment [Matton *et al.*, 1993].

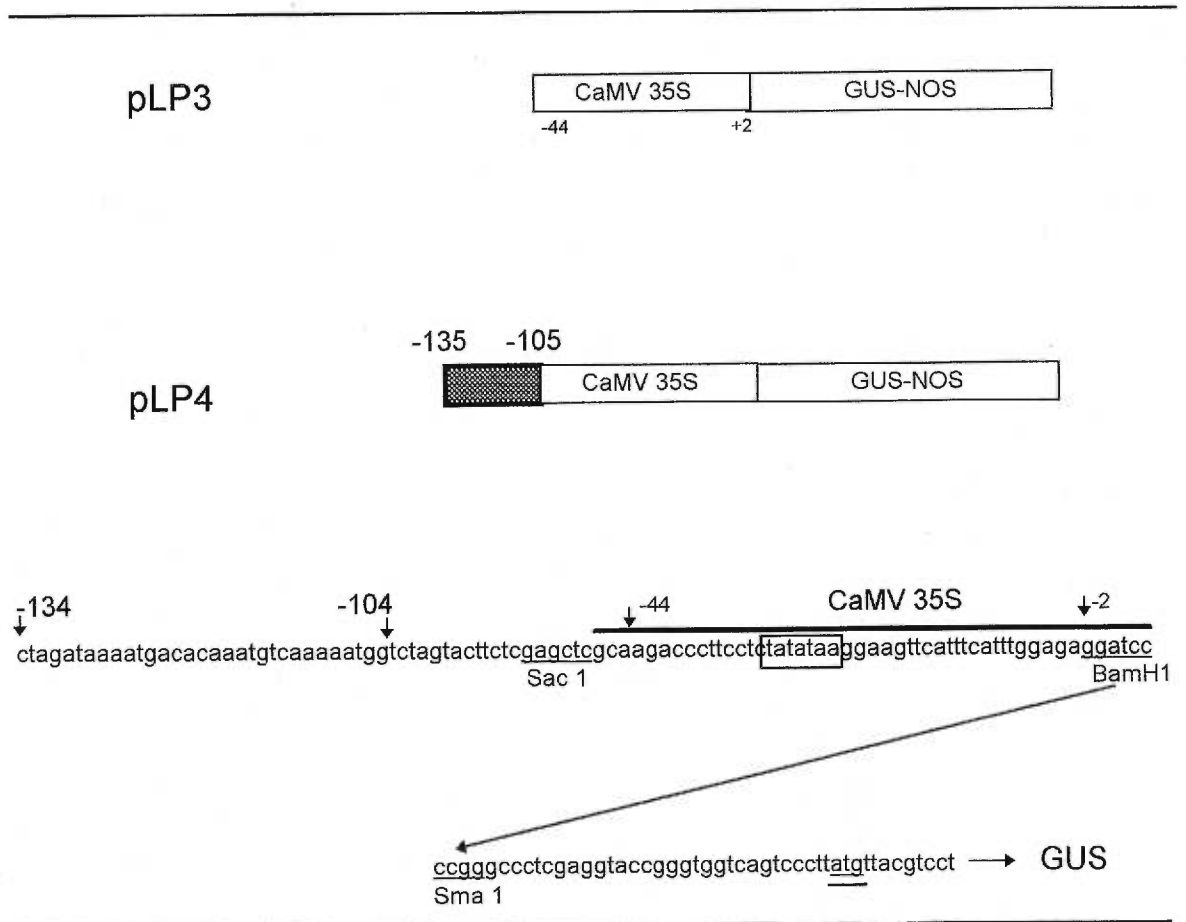


**Figure 8. L'élément -135 à -105 suffit pour activer le promoteur homologue.**

Les chiffres entre parenthèses signifient: (le nombre de transformations; le nombre de lots de protoplastes analysés). E. T.= erreur-type de la moyenne.

**3.2 Expérience no. 2** L'ÉLÉMENT -135 À -105 POSSÈDE-T-IL EN LUI-MÊME DES PROPRIÉTÉS ACTIVATRICES DE LA TRANSCRIPTION QUAND IL EST PLACÉ DEVANT UN PROMOTEUR MINIMAL HÉTÉROLOGUE ?

La figure 9, sur cette page, décrit les plasmides utilisés pour cette expérience. pLP3 est un témoin nécessaire puisqu'il s'agit du promoteur minimal du gène de CaMV 35S seul, placé devant le gène rapporteur. pLP4 est formé de la section -135 à -105 placée devant le promoteur minimal hétérologue, lui-même placé devant GUS.



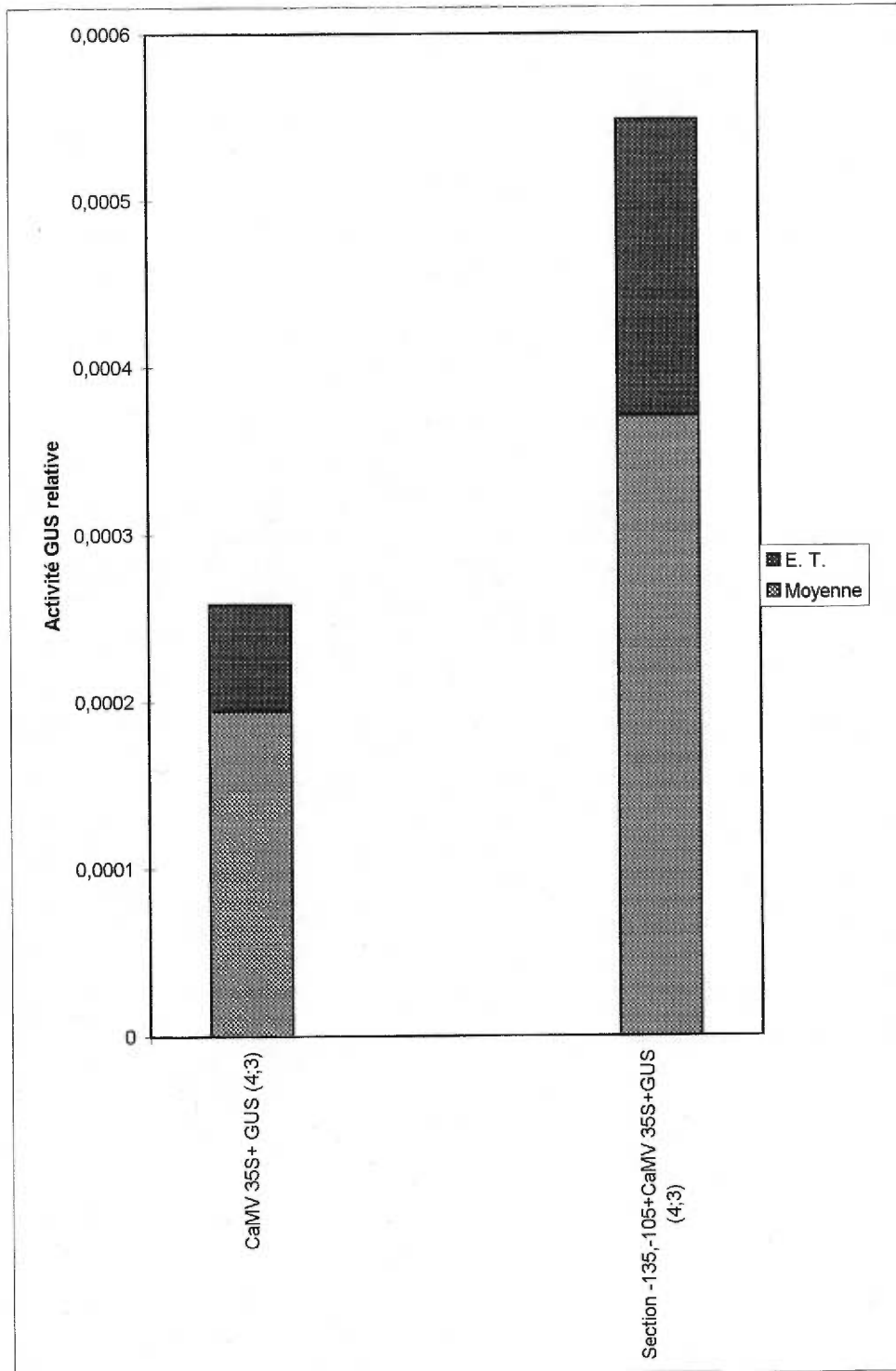
**Figure 9. Les plasmides ayant servi à tester l'activité intrinsèque de l'élément -135 à -105 placé devant un promoteur hétérologue.** La boîte TATA du gène de CaMV 35S est entourée. Le site présumé d'initiation de la traduction de GUS est souligné deux fois.

Le tableau IV, page 34, donne le détail des résultats obtenus avec les transformations de ces deux plasmides. Les remarques précédentes sur la validité de la méthode de correction ainsi que sur la reproductibilité des résultats demeurent valables ici. Cependant, l'activité GUS n'est pas toujours détectable, même quand l'efficacité de la transformation est bonne (v.g. pLP3, 21<sup>e</sup> lot, a) et c), et pLP4, 21<sup>e</sup> lot, c)).

La figure 10, page 35, montre les moyennes des résultats pour chaque plasmide. Bien que la valeur moyenne pour l'activité du promoteur seul (pLP3) soit plus faible que celle du promoteur entraîné par la section -135 à -105, cette différence n'est pas significative (Test de Student).

	Activité luciférase (LUC) coups x 10 <sup>6</sup> mg <sup>-1</sup>	Activité β-glucuronidase (GUS) pmoles mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	GUS/LUC
<b>pLP3 (CaMV 35S - GUS)</b>			
18e lot	8988	2,3	0,00026
20e lot a)	47682	12,2	0,00026
b)	27938	6,6	0,00024
21e lot a)	3644	n.d.	0,00000
b)	8626	0,25	0,00003
c)	48572	n.d.	0,00000
<b>pLP4 ( -135Δ[-104,-27]+145 - CaMV 35S - GUS)</b>			
18e lot	12117	11,3	0,00093
20e lot a)	65343	12,4	0,00019
b)	21588	10,6	0,00049
21e lot	6160	1,3	0,00021
b)	40417	1,1	0,00003
c)	43022	n.d.	0,00000

**Tableau IV. Activité luciférase, activité GUS et activité GUS relative pour l'expérience no. 2. n.d.: non détecté**

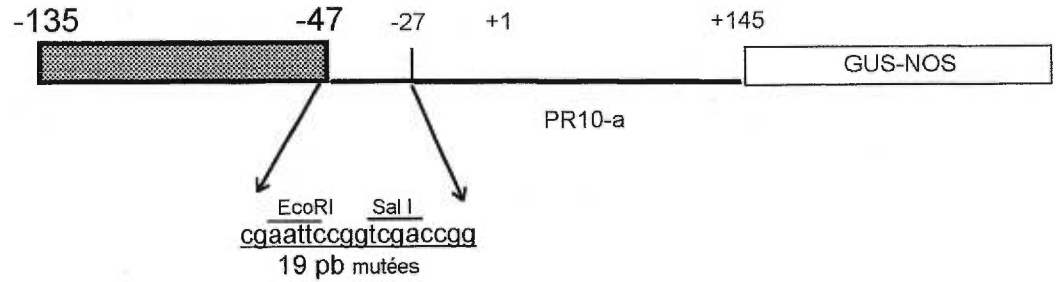


**Figure 10. L'effet de l'élément -135 à -105 sur l'activation du promoteur minimal hétérologue.**  
 Les chiffres entre parenthèses signifient:  
 (le nombre de transformations; le nombre de lots de protoplastes). E.T.: Erreur-type de la moyenne.

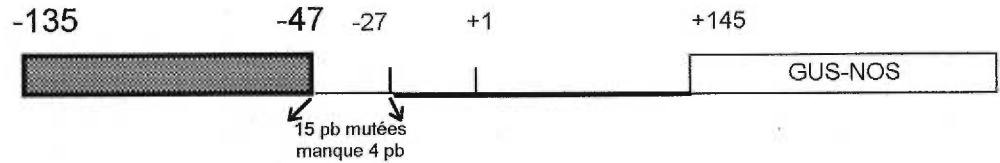
**3.3 Expérience no. 3.** La CONSTRUCTION -135 COMPORTANT LA RÉGION -47 À -27 MUTÉE AVEC 4 PB MANQUANTES CONSERVE-T-ELLE SES PROPRIÉTÉS ACTIVATRICES QUAND ON RESTAURE LA DISTANCE NORMALE ENTRE -47 ET -27 ?

La figure 11, page 37, décrit les plasmides qui ont servi à ces expériences. pLP9 consiste en la section -135 à -47 placée, à distance normale, devant le promoteur minimal de PR-10a. À l'origine de pLP9, le pDPM686 dont la partie mutée entre les positions -47 et -27 a perdu 4 pb, et qui avait précédemment entraîné une activation 5 fois plus forte que celle qui résultait de l'action du promoteur entier [Matton *et al.*, 1993]. Comme point de comparaison, on a inclus le plasmide qui porte la région de PR-10a de -135 à +145. Cette construction active la transcription au même niveau que le promoteur entier [Matton *et al.*, 1993 et le présent travail, données non présentées]. Finalement, le témoin négatif, qui consiste en un promoteur minimal nu.

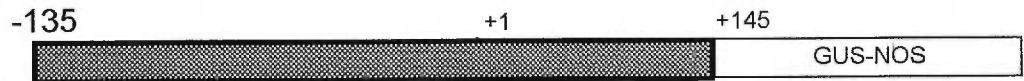
## pLP9



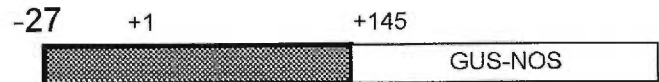
## pDPM686



## pDPM635



## pDPM683



**Figure 11. Les plasmides ayant servi à tester l'activité de l'élément -135 à -47 placé, en respectant la distance originale, devant le promoteur homologue.** Ceux qui portent la dénomination DPM ont été préparés dans le cadre de l'article de Matton *et al*, 1993. GUS-NOS signifie le gène de la  $\beta$ -glucuronidase suivi de la séquence de terminaison du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*.

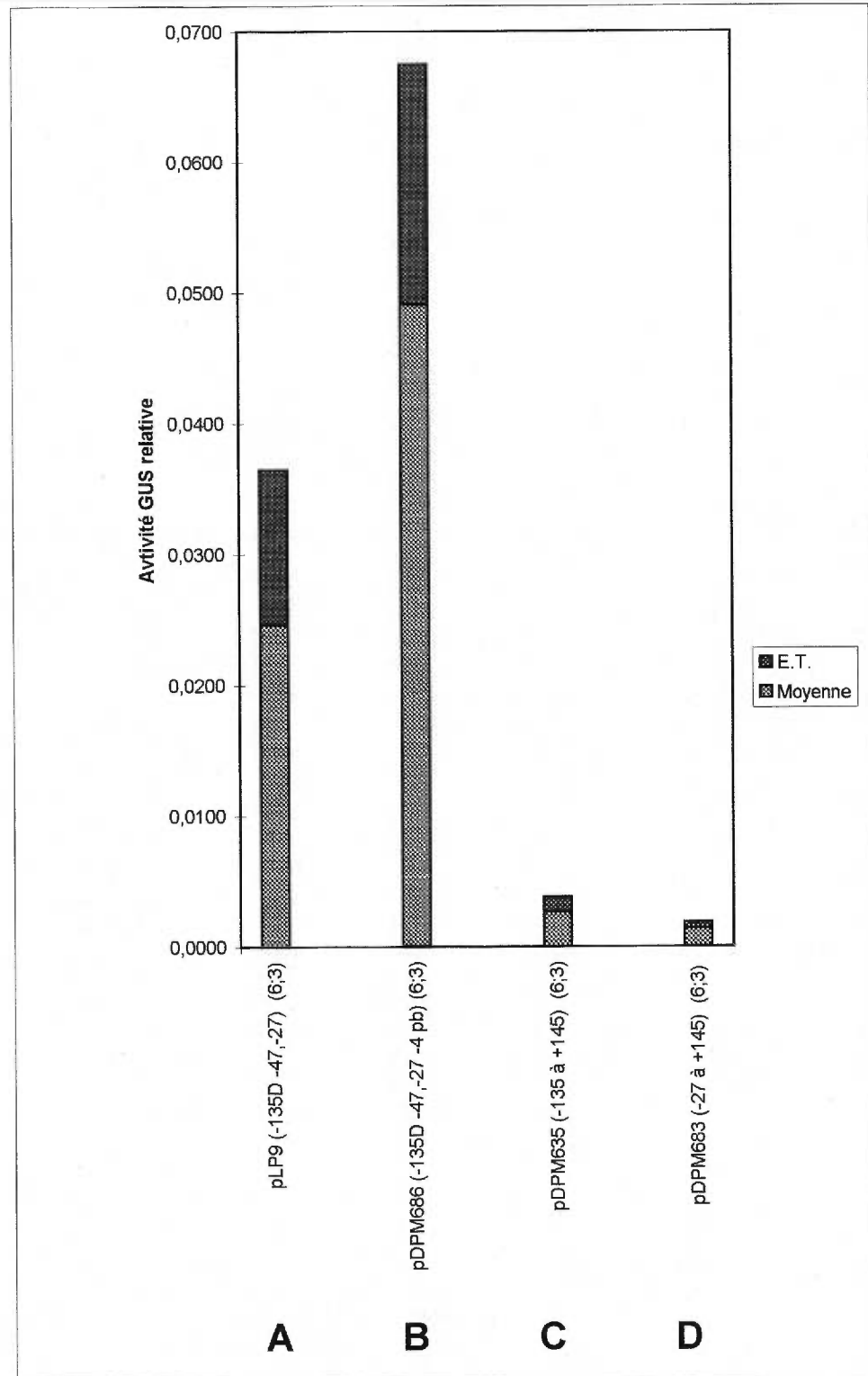


Le tableau V, page 39, présente les résultats de cette expérience. En ce qui concerne la reproductibilité des résultats de ce tableau, une remarque s'impose. Pour les 18<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> lots de protoplastes, la concentration des cellules était de  $1 \times 10^6$  cellules par mL et les quantités de plasmides utilisées furent 50  $\mu$ g de plasmide à tester et 5  $\mu$ g de plasmide de luciférase (Tableau 2, page 21). On constate une assez grande variabilité dans l'efficacité des transformations, telle que montrée par les résultats d'activité luciférase. Cependant, pour le 21<sup>e</sup> lot de protoplastes, en a), la concentration de protoplastes utilisée fut de  $2 \times 10^6$  protoplastes par mL et les quantités de plasmides furent réduites à 10  $\mu$ g et 0,2  $\mu$ g de plasmide de luciférase. La variabilité dans l'efficacité s'en trouve réduite de beaucoup. Cette combinaison n'a pu être employée davantage en raison de la rareté relative des protoplastes et de la nécessité, pour des raisons de statistiques, de multiplier les transformations pour un même lot de protoplastes. Une autre combinaison de conditions, utilisée pour le 21<sup>e</sup> lot de protoplastes en b) et c), consiste à prendre  $1 \times 10^6$  cellules par mL avec 25  $\mu$ g et 1  $\mu$ g de plasmide à tester et de plasmide luciférase, respectivement. Cette méthode donne des résultats intermédiaires quant à la variabilité dans l'efficacité.

La figure 12, page 40, présente les moyennes des résultats pour chaque plasmide. La différence entre la moyenne des données de pLP9 (A, figure 12) et celle des données de pDPM686 (B, figure 12) n'est pas significative (Test de Student). Les deux activent la transcription au moins 5 fois plus que pDPM635 (C, figure 12). Les résultats obtenus avec le pDPM635 (délétion -135) et le pDPM683 (délétion -27 ; D, figure 12) sont conformes à ceux obtenus précédemment [Matton *et al.*, 1993 et le présent travail].

	Activité luciférase (LUC) coups x 10 <sup>6</sup> mg <sup>-1</sup>	Activité β-glucuronidase (GUS) pmoles mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	GUS/LUC
<b>pLP9 (-135Δ[-47,-27]+145)</b>			
18e lot	634	47,3	0,075
20e lot a)	167481	2739,3	0,016
b)	11104	82,8	0,007
21e lot a)	1887	62,3	0,033
b)	3868	49,7	0,013
c)	69747	235,7	0,003
<b>pDPM686 (-135Δ[-47,-27 moins 4 pb]+145)</b>			
18e lot	4047	402,30	0,099
20e lot a)	88998	468,30	0,005
b)	21829	277,90	0,013
21e lot a)	12299	1097,00	0,089
b)	19388	447,30	0,023
c)	15482	1009,40	0,065
<b>pDPM635 (-135 à +145)</b>			
18e lot	785	5,80	0,007
20e lot a)	7933	4,90	0,001
b)	7579	16,60	0,002
21e lot a)	7527	27,40	0,004
b)	28665	23,90	0,001
c)	59362	78,00	0,001
<b>pDPM683 (-27 à +145)</b>			
18e lot	21370	18,4	0,001
20e lot a)	36707	82,9	0,002
b)	25122	32,6	0,001
21e lot a)	7795	22,2	0,003
b)	9232	5,9	0,001
c)	10142	6,4	0,001

**Tableau V. Activité luciférase, activité GUS et activité GUS relative pour l'expérience no. 3**



**Figure 12. L'effet de la restauration de la distance normale dans la partie mutée (-47 à -27) du promoteur.**

Les chiffres entre parenthèses signifient: (le nombre de transformations; le nombre de lots de protoplastes)  
E.T.: Erreur-type de la moyenne.

#### 4. DISCUSSION

Au cours de ces expériences, la méthode de correction pour l'efficacité de la transformation par co-transformation du plasmide porteur du gène luciférase s'est avérée efficace mais elle ne permettrait pas de déceler des différences faibles. En effet, il existe une telle erreur-type de la moyenne, conséquence de la variance, pour un même plasmide que la comparaison des moyennes ne pourrait détecter que des différences de 50%. Autrement dit, une moyenne devrait être au moins 1½ fois plus grande qu'une autre pour que la différence entre les deux soit significative dans ces conditions. Pour améliorer la sensibilité de la mesure, il faudrait probablement songer à augmenter le nombre de transformations pour chaque plasmide dans un même lot de protoplastes et réduire d'autant le nombre de lots testés car la variation provient surtout des différences entre les lots pour un même plasmide (forte variance). Cette exigence est toutefois contrée par la disponibilité des protoplastes. Néanmoins, ce constat n'invalide pas les résultats ici présentés. On ne saurait trop insister sur la nécessité de manipuler les échantillons contenant l'activité luciférase avec le plus de célérité possible. En effet, il a été démontré que l'activité luciférase se dégrade rapidement dans les extraits végétaux : en dedans de 3h à température ambiante [Millar *et al.*, 1992]. C'est pourquoi les mesures doivent être prises dans des conditions rigoureusement identiques quant au temps compris entre le moment de la rupture des membranes et celui de la congélation.

Nous avons utilisé cette procédure de correction de l'activité du gène rapporteur pour étudier l'activation de la transcription par deux éléments *cis*-actifs de la région -135 à -27 de PR-10a. Le gène PR-10a est activé spécifiquement lors de la

transmission de signaux intracellulaires d'alerte. Des facteurs de transcription spécifiques sont généralement tenus pour responsables de ce genre d'activation. Ils exercent leur effet en se liant à des séquences précises, la plupart du temps en amont des gènes activés. Les données recueillies jusqu'ici à propos de l'activation de *PR-10a* suggèrent que PBF-2 est impliqué dans cette activation : sa liaison avec l'ERE est corrélée avec l'activation de *PR-10a*, même quand les conditions de cette liaison sont altérées par des manipulations de l'état de phosphorylation du milieu. Cependant, la caractérisation de PBF-2 n'est encore pas assez avancée pour établir hors de tout doute que ce facteur nucléaire est aussi un facteur de transcription. Toutefois, pour le présent travail, il est utile de prendre pour acquise l'hypothèse selon laquelle PBF-1 est bien un facteur de transcription et que son activité suivant sa liaison avec l'ERE est responsable de la transcription de *PR-10a* dans le contexte de la réponse de défense. Vu la rapidité de la liaison de PBF-2 à l'ERE après élicitation, et surtout en tenant compte du fait que la phosphorylation des extraits nucléaires où il est présent influe de façon draconienne sur cette liaison, on peut imaginer que PBF-2 est déjà présent dans la cellule i.e. qu'aucune nouvelle synthèse de protéines n'est requise. Des travaux récents de Després (communication personnelle) ont montré que PBF-2 est effectivement présent sous une forme inactive dans des extraits de tubercules non élicités et est constitué de 2 sous-unités dont la plus petite serait acceptrice de la phosphorylation. On aurait donc la série d'événements suivante : le domaine de liaison à l'ADN de PBF-2 est activé à la suite d'un événement de phosphorylation de la petite sous-unité, cette phosphorylation étant elle-même provoquée par une cascade de signalisation intracellulaire ; le

domaine d'activation de la transcription de PBF-2 peut alors exercer son effet. Plusieurs travaux récents ont montré que la spécificité de l'activation de la transcription par les facteurs de transcription est souvent le résultat d'interactions protéines-protéines et/ou ADN- protéines (Kodadek, 1995 ; Thanos et Maniatis, 1995). Autrement dit, dans plusieurs cas minutieusement étudiés d'induction de gènes en réponse à des stimuli extra-cellulaires, comme celui de NF- $\kappa$ B activant le gène de l'interféron  $\beta$ , un facteur de transcription n'est pas seul responsable de la spécificité de l'induction : il doit interagir avec d'autres facteurs qui ne possèdent pas nécessairement d'activité transcriptionnelle. De plus, la topologie de l'ADN dans la région de liaison semble jouer un rôle important [Falvo *et al.*, 1995]. Dans le cas de NF- $\kappa$ B, la liaison d'une protéine HMG induit une courbure dans l'ADN et cette conformation nouvelle est nécessaire pour une interaction entre NF- $\kappa$ B et d'autres facteurs de transcription. A son tour, cette interaction protéine-protéine doit avoir lieu pour que l'activation se produise. Les résultats du présent travail ne réfuteraient pas l'hypothèse selon laquelle l'activité transcriptionnelle de PBF-2 est modulée par la présence de SEBF-1 lié au SE. SEBF-1 est présent dans les extraits de tubercules frais où il est déjà lié au SE (Després *et al.*, 1995 et Boyle, communication personnelle). Par contre, sa liaison diminue avec le temps, en corrélation avec la disparition de PR-10a (Boyle, communication personnelle). Ces faits, et les résultats présentés ici pointent vers un rôle de modulateur pour SEBF-1 en regard de l'activation de PR-10a pendant la réponse de défense. Le mécanisme exact de cette modulation demeure bien entendu inconnu, mais elle pourrait s'exercer par la seule

présence encombrante de SEBF-1 entre PBF-2 et les facteurs généraux de la transcription.

En ce qui concerne le présent travail, on constate deux situations :

1- l'effet de pLP17 ne se distingue pas de celui de pDPM635 (figure 8, page 31).

Pourtant, la section atténuatrice de -47 à -27 en est absente, alors qu'elle est toujours présente dans pDPM635 (figure 7, page 26). Si l'effet atténuateur du SE était le résultat d'un effet d'encombrement par SEBF-1, on s'attendrait plutôt à ce que pLP17 donne une activation plus forte que pDPM635. Cette contradiction pourrait s'expliquer si l'action atténuatrice de SE était modulée par une interaction avec un autre facteur présent entre -105 et -47. Il existe un motif TAATNN à la position -68 ; ce motif est connu pour lier des facteurs homéotiques chez les eucaryotes. Cependant aucun facteur nucléaire n'a été détecté à cet endroit [Matton *et al.*, 1993] et des tentatives pour détecter la présence de protéines liées à la section -135 à -47 par des expériences d'empreintes (footprinting) n'ont pas été concluantes (Deragon, données non publiées). Par contre, la section -155 à -135 est absente de tous ces essais. On a vu qu'en transgéniques, cette section confère un effet quantitatif important. L'effet répresseur du SE sur la réponse à la blessure et à l'élicitation est peut-être atténué par la section -155 à -105, mais aucun test n'a été fait pour le découvrir. Une autre façon d'interpréter cette contradiction est de supposer que la distance est effectivement importante pour l'activité du ERE et qu'elle s'exerce au maximum à sa position naturelle tout en étant réduite par la présence du SE. Cette interprétation est d'ailleurs compatible avec les résultats obtenus avec pLP9 qui garde l'ERE à sa position naturelle tout

en étant dépourvu du SE : on observe une activation 4 fois plus forte qu'avec pDPM635 (figure 12, page 40). L'effet d'encombrement n'est donc ni infirmé ni confirmé par ces résultats. Une façon de tester si cet effet existe serait de déplacer le SE par rapport au ERE mais sans le muter.

2- Un autre fait intéressant, c'est que l'activité de l'ERE en l'absence du SE n'est pas modifiée par un déplacement sur l'axe hélicoïdal (4 pb) par rapport à l'appareil de transcription. Ce résultat pointe vers une activité de l'ERE indépendante de sa position par rapport à l'appareil de transcription. Cette capacité d'activer la transcription indépendamment de la position de l'activateur avait d'ailleurs déjà été observée dans l'étude de Matton et collègues (Matton *et al.*, 1993).

Le fait qu'aucune activité transcriptionnelle n'ait été détectée avec l'ERE placé devant le promoteur hétérologue pourrait s'expliquer par la distance relativement courte entre CaMV 35S et l'ATG de GUS qui pourrait n'être pas suffisante pour assurer une traduction efficace (figure 9, page 32). On peut exclure la possibilité d'une défaillance dans le système expérimental parce que les tests ont été faits en même temps que ceux d'autres plasmides qu'on peut alors considérer comme témoins positifs. Des tentatives ont été faites pour multimériser la section -135 à -105 devant les promoteurs, mais sans succès. Un dimère de l'élément a été effectivement construit, mais le séquençage a montré qu'il portait des mutations dans la section -135 à -105. Ces efforts ont donc été abandonnés. On pourrait répéter les expériences d'induction du promoteur hétérologue en allongeant la distance entre la boîte TATA du promoteur et l'ATG de GUS. Il suffirait d'utiliser les sites de restriction



disponibles sur pSL1180 ou d'insérer une séquence leader hétérologue comme la séquence  $\Omega$  du virus de la mosaïque du tabac [Gallie, cité par Millar *et al.*, 1992].

Un modèle d'activation pourrait se dégager de ces résultats. Ce modèle n'est toutefois envisageable que pour ce qui concerne l'activation et non la réponse à l'élicitation qui elle, ne peut être étudiée qu'en transgéniques. L'activation serait donc le résultat de la liaison de PBF-2 phosphorylé à l'ERE. Cette liaison permettrait l'activation de la transcription modulée par SEBF-1 lié au SE. Cette modulation pourrait s'exercer par simple encombrement ou par interaction avec d'autres facteurs quantitatifs inconnus.

L'étude des motifs d'ADN possédant la capacité de stimuler la transcription en réponse à l'infection ne permet pas de découvrir des similitudes entre les régions *cis*-actives des différents gènes de différentes espèces. Même à l'intérieur d'une même famille de gènes dans la même espèce de plantes, les éléments *cis*-actifs diffèrent en séquence et en position. Par exemple, dans le persil, il existe trois gènes appartenant à la famille PR-10. Les promoteurs de ces trois gènes, quoique montrant de la similitude dans certaines portions de leur séquence, ne possèdent pas d'éléments *cis*-actifs semblables [Rushton *et al.*, 1996]. Par contre, le promoteur de l'un de ces gènes (PR1-2) contient un élément dont la séquence est très similaire à celle de la section de PR-10 comprise entre les positions -124 et -111 :

**TGACACAAATGTCA**  
**ACTGTGTTTACAGT**

Les sections soulignées sont conservées entre PR1-2 et PR-10a tant en ce qui a trait à la position qu'à la séquence. De plus, la restauration de cette configuration partagée par les deux promoteurs dans un autre promoteur qui en est normalement dépourvu confère à ce dernier la capacité d'activer la transcription en réponse à l'élicitation. Cette ressemblance entre deux éléments *cis*-actifs de deux gènes *PR* dans deux plantes d'espèces différentes renforce l'intérêt de poursuivre l'étude de la section -135 à -105 de PR-10a. L'introduction de la construction pLP17 en pommes de terre transgéniques afin de tester la capacité de cet élément de conférer au promoteur la réponse à l'élicitation reste à venir.

## 5. CONCLUSION

La connaissance de l'architecture fonctionnelle des régions proximales des promoteurs des gènes impliqués dans la réponse de défense des plantes est requise pour la compréhension des interactions moléculaires qui sous-tendent les fonctions de facteurs de transcription spécifiques dans la régulation de ces mêmes promoteurs par des signaux environnementaux et/ou développementaux. Parce que certains gènes impliqués dans la réponse de défense jouent aussi un rôle dans le développement, la connaissance précise des éléments minimaux des promoteurs impliqués dans la réponse de défense est requise. Dans ce travail, nous avons déterminé que l'élément -135 à -105 du promoteur de PR-10a est suffisant pour entraîner l'activation de la transcription dans un contexte d'expression transitoire en protoplastes. Nous avons aussi établi que l'activation relativement forte obtenue avec l'amputation de la section -47 à -27 en contexte du promoteur tronqué à -135 n'est pas influencée par la position de l'élément -135 à -105 par rapport à l'appareil de transcription.

Le clonage imminent du gène de PBF-2 et de celui de SEBF-1 permettront de poursuivre la caractérisation des éléments *cis-* et *trans-*actifs et de leurs interactions dans la régulation du promoteur de PR-10a.

---

**BIBLIOGRAPHIE**

- Barnes, W. M. (1990) Variable patterns of expression of luciferase in transgenic tobacco leaves. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87** :9183-9187.
- Constabel, C. P. et Brisson, N. (1992) The defense-related *STH-2* gene product of potato shows race-specific accumulation after inoculation with low concentrations of *Phytophthora infestans* zoospores. *Planta* **188** : 289-295.
- Constabel, C. P. et Brisson, N. (1995). Stigma-and vascular-specific expression of the *PR10-a* gene of potato : a novel pattern of expression of a pathogenesis-related gene. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **8**, 104-113.
- Després, C., Subramaniam, R., Matton, D. P., et Brisson, N. (1995). The activation of the potato *PR-10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell* **7**, 589-598.
- Dixon, R. A. et Harrison, M. J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32** : 479-501.
- Dong, X. (1995) Finding the missing pieces in the puzzle of plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** :7137-7139.
- Falvo, J. V., Thanos, D., et Maniatis, T. (1995) Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN $\beta$  gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell* **83** :1101-1111.
- Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9** : 275-296.

- Fulton, R., et van Ness, B. (1993) Luminescent reporter gene assays for luciferase and  $\beta$ -galactosidase using a liquid scintillation counter. *BioTechniques*, **15(5)** :762-763.
- Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F.M., Ipsen, H., Larsen, J. N., Joost van Neerven, R. J., Schou, C., Lowenstein, H. et Spangfort, M. D. (1996) X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Structural Biology*, **3** : 1040-1045.
- Greenberg, J. T., Guo, A., Klessig, D. F. et Ausubel, F. M. (1994). Programmed cell death in plants : a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77** :551-563.
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants : the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Reporter*, **5** : 387-405.
- Kodadek, T. (1995) From carpet bombing to cruise missiles : the « second-order » mechanism used by transcription factors to ensure specific DNA binding *in vivo*. *Current Biology* **2** : 267-279.
- Lamb, C. J., Lawton, M.A., Dron, M. et Dixon, R.A. (1989) Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, **56** : 215-224.
- Lamb, C. J., Ryals, J. A., Ward, E. R., et Dixon, R. A. (1992) Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. *Biotechnology* **10** :1436-1445.
- Lamb, C. (1994) Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell*, **76** : 419-422.

- Magnien, E., Dalschaert, X. et M. Devreux. 1980. Different radiosensitivities of *Nicotiana plumbaginifolia* leaves and regenerating protoplasts. *Plant Science Letters*, **19** :231-241.
- Marineau, C., Matton, D.P., et Brisson, N. (1987). Differential accumulation of potato tuber mRNAs during the hypersensitive response induced by arachidonic acid elicitor. *Plant Mol. Biol.* **9**, 335-342.
- Matton, D.P. et Brisson, N. (1989). Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **2**, 325-331.
- Matton, D. P., Prescott, G., Bertrand, C., Camirand, A., et Brisson, N. (1993). Identification of *cis*-acting elements involved in the regulation of the pathogenesis-related gene STH-2 in potato. *Plant Mol. Biol.* **22**, 279-291.
- Millar, A. J., Short, S. R., Hiratsuka, K., Chua, N-H, et Kay, S. A (1992). Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. *Plant Mol. Biol. Reporter*. **10(4)** :324-337
- Moiseyev, G. P., Fedoreyeva, L. I., Zhuravlev, Y. N., Yasnetskaya, E., Jekel, P. A., et Beintema, J. J. (1997) Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Letters* **407** : 207-210
- Osmark, P. (1996) Structure and function of Bet v 1, the major allergen from birch pollen, and its homologues. Ph.D thesis, University of Copenhagen.
- Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., et Somssich, I. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* **15** : 5690-5700.

- Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 5463-5467.
- Scofield, S. R., Tobias, C. M., Rathjen, J. P., Chang, J. H., Lavelle, D. T., Michelmore, R. W. et Staskawicz, B. J. (1996) Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274** : 2063-2065.
- Somssich, I. E. (1994) Pathogenesis-related (PR) gene expression. In *Results and problems in cell differentiation 20*, L. Nover (Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 163-179.
- Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G. et Jones, J. D. G. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268** : 661-667.
- Subramaniam, R., Després, C., et Brisson, N. (1997) A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *Plant Cell* **9** : 653-664.
- Swoboda, I., Scheiner, O., Heberleborg, E., et Vicente, O. (1995) cDNA cloning and characterization of three genes in the Bet V 1 gene family that encode pathogenesis-related proteins. *Plant Cell & Environment* **18** : 865-874.
- Swoboda, I., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Scheiner, O., Heberleborg, E. et Vicente, O. (1996) Bet v 1 proteins, the major birch pollen allergens and members of a family of conserved pathogenesis-related proteins, show ribonuclease activity in vitro. *Physiologia Plantarum* **96** :433-438.

- Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y. et Martin, G. B. (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* **274** : 2060-2063.
- Thanos, D., et Maniatis, T. (1995) Virus induction of human IFN $\beta$  gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* **83** : 1091-1100.
- van Loon , L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T. et Conejero, V. (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter* **12** : 245-264.
- Walter, M. H., Liu, J.-W., Wünn, J., et Hess, D. (1996) Bean ribonuclease -like pathogenesis-related protein genes (*Ypr 10*) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *Eur. J. Biochem.* **239** :281-293.
- Warner, S. A. J., Scott, R., et Draper, J. (1992) Characterisation of a wound-induced transcript from the monocotyledon asparagus that shares homology with a new class of pathogenesis-related (PR) proteins. *Plant Mol. Biol.* **19**, 555-561.
- Zhou, J., Loh, Y-T., Bressan, R. A., et Martin, G. B. (1995). The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell* **83** : 925-935.



## Remerciements

La réalisation de ce travail a été facilitée par l'octroi d'une bourse du CRSNG pour laquelle je suis infiniment reconnaissante.

Je tiens également à remercier le professeur Normand Brisson pour sa patience et son affabilité constantes.

Finalement, je remercie mes collègues de laboratoire B. Boyle, R. Subramaniam et C. Després pour leur gentillesse et leur coopération spontanée.