Nancy-Université
INPL

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.
D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite entraîne une poursuite pénale.

Contact SCD INPL: mailto:scdinpl@inpl-nancy.fr

LIENS

Code de la propriété intellectuelle. Articles L 122.4
Code de la propriété intellectuelle. Articles L 335.2 – L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale RP2E
UMR INPL(ENSAIA)-INRA 1121 Agronomie et Environnement
Plant Advanced Technologies SAS

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'INPL
En Sciences Agronomiques

Par

Flore BITEAU

Production de protéines recombinantes par des plantes carnivores génétiquement transformées : Application à *Drosera rotundifolia* et transfert de la technologie à *Nepenthes alata*

THESE CONFIDENTIELLE

Soutenue à huis clos le 14 Mai 2009, devant le jury composé de :

M. Jean-Louis Goergen	Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy	Président du Jury
M. Hubert Schaller	Chargé de Recherche, HDR, CNRS-IBMP, Strasbourg	Rapporteur
Mme Véronique Gomord	Chargée de Recherche, HDR, CNRS, Rouen	Rapportrice
M. Frédéric Bourgaud	Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy	Examinateur
M. Eric Gontier	Professeur, UPJV, Amiens	Examinateur
Mme Laurence Gaume	Chargée de Recherche, CNRS, Montpellier	Examinatrice
M. Alain Hehn	Maître de conférences, HDR, ENSAIA-INPL Nancy	Invité

à mon grand-père Albert,

à mon parrain Claude

REMERCIEMENTS

L'ENSAIA, c'est un peu la maison depuis 6 ans … J'y étais (en tant qu'élève) … et j'y suis restée pendant que mes camarades de classe s'en allaient aux quatre coins du monde. Je pensais en avoir fait le tour… Et pourtant…c'était sans connaître l'univers des laboratoires… Elève ingénieur, on passe dans les couloirs, on vole des regards furtifs dans la salle café, regards empreints de curiosité, de respect et d'inquiétude…Et puis, j'ai franchi la barrière. J'ai rejoint ce monde merveilleux de la blouse blanche® comme le dit Julie ou de la Belouse blanche comme le dirait Eric…(et croyez moi, j'en ai frimé un moment auprès de mes anciens collègues de 3A : « ça y est , j'ai des entrées pour la salle café !! »…). Et j'y ai passé 3 années formidables, riches, et palpitantes. Aussi, je tiens à exprimer ici de façon simple et très sincère, ma reconnaissance chaleureuse à toutes les personnes qui ont joué un rôle important durant ma thèse ou qui m'ont apporté de près ou de loin leur soutien :

Je souhaite remercier **Madame Véronique Gomord,** Chargé de recherche au CNRS de Rouen et **Mr Hubert Schaller**, Chargé de recherche au CNRS à l'IBMP de Strasbourg, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci à **Mr Jean-Louis Goergen**, Professeur à l'ENSAIA et à **Madame Laurence Gaume**, Chargée de Recherche au CNRS de Montpellier, d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie, **Sylvain Plantureux**, directeur du Laboratoire Agronomie et Environnement pendant ces 3 ans.

Je remercie bien sûr, **Fréderic Bourgaud**, mon directeur de thèse, (mais aussi nouveau directeur du Laboratoire Agronomie et Environnement et directeur scientifique de PAT SAS). Merci Fred de m'avoir confié ce projet à mes tout débuts, de m'avoir fait tout simplement confiance. Merci pour ton soutien, tes encouragements au moment où j'en avais le plus besoin, et pour tes conseils éclairés durant ces 3 années.

Mes remerciements vont ensuite à mes 2 co-directeurs de thèse :

A **Alain Hehn** … Merci Alain, pour ton aide précieuse, ton suivi, tes conseils plus qu'avisés, ta super disponibilité (je cherche des superlatifs), ton soutien moral (service assuré quasiment 24h/24…mails à l'appui. Tu assures aussi le Service Après Thèse ?), tes corrections éclairs et ton implication dans mon travail… Comme diraient certains, « il est fort

ce Alain ! », avec un fan club à l'ENSAIA pour preuve (« Hehn Addict », c'est bien ça ?). Que dire d'autre, ou comment le dire ?... Un grand Merci tout simplement.

A **Eric Gontier**, directeur de thèse durant ma première année, et désormais co-directeur. Tu as décidé de t'expatrier à Amiens, à mon grand regret !! Merci Eric pour ton énergie communicative, ton optimisme et ton soutien quotidien durant cette première année. Merci pour tes réunions improbables entre 2 parkings, sur le rebord d'une fenêtre, ou même à Germiny ! Merci aussi de m'avoir donné le goût de la recherche dès ma sortie de l'école.

Merci à **Jean Paul Fèvre**, PDG de Plant Advanced Technologies SAS, de m'avoir confié cette mission, de m'avoir fait confiance, et de m'avoir permis de vivre cette grande aventure qu'est la thèse CIFRE. Merci d'avoir eu cette idée lumineuse de PAT Vendredi®, et d'avoir fait de ma thèse un projet passionnant…Et merci pour cette convivialité et cet esprit d'équipe que tu as instaurés au sein de l'entreprise.

Mes remerciements vont ensuite à **Sissi Miguel**, mon ex stagiaire de Master II, ma collègue, mon amie et désormais ma sœur siamoise !! (hein Bernard ?) ... Sissi, merci d'avoir été mon alliée depuis ton arrivée … et d'être venue partager avec moi la lourde tâche qui nous incombe…. D'abord stagiaire exceptionnelle (la plus extraordinaire que je n'ai jamais eue ; tu pleures un peu là ou je continue ?), puis ingénieur R&D chez PAT SAS sur le projet, tu as largement participé et contribué à ce travail de thèse… Merci tout simplement pour ça. Merci pour ton efficacité, et ton aide précieuse… Merci aussi pour ton soutien moral dans mes moments de doutes, tes séances de coaching et de psychothérapie (merci aussi au bureau d'Etienne…), et aussi d'avoir gardé Moumoute durant les périodes sombres… (Tu ne t'y attendais pas à celle la ?). Et puis, il y a tout le reste, bien sûr, que je ne peux dévoiler ici entièrement…Jude, le drover, John John… cette complicité qui nous unit, et ces regards qui ne nécessitent aucune parole…

Mes remerciements vont ensuite à la Team PAT SAS Plantes à traire, mes collègues de bureau : A **Benoît** : merci pour ton soutien, ta disponibilité, et ta forme olympique matinale quotidienne… et à **Jean-Marc** : merci pour tes conseils notamment en Culture *In Vitro*, pour ton investissement dans le projet, et pour nos petites séances de papotage…

Merci bien sûr, à tous les doctorants de la thésard vallée et aux stagiaires pour cette ambiance chaleureuse de travail et pour tous ces bons moments partagés … Merci à **Dao, Minh, Romain, Petit Seb, µSeb, Vincent, Christelle, Camille, Boris, Emma, Robert,**

Mickaël, Natalia, Lama, Guilhem, Hélène. J'en profite aussi pour remercier la **Cath**, pour tes éclats de rire mythiques et la joie de te croiser dans les couloirs…

Je voudrais remercier en particulier **Etienne** : le don de code, de logiciel, le prêt de bureau, les poires-chocolat …, merci pour ton soutien. J'ai encore une dette envers toi, qui sera bientôt honorée à condition que mon secret ne soit pas dévoilé… (Kyle ? non ...stp…)

Un grand Merci aussi à toi **Grand Seb**…. Pour ton soutien, ta bonne humeur, tes délires (n'arrête surtout pas, je t'en prie !), et ta complicité durant ces 3 ans… tu as apporté beaucoup de rires et de gaité durant ma thèse… et ce n'est bien sûr pas terminé…

Merci à **Julie,** ma « coloc » de première année…que de bons souvenirs avec toi, Miss M : Shepperd, les belles plantes, Harry, Bob, Christina, ton chili con carne… j'en passe et des meilleurs...

Merci à **Martine**, tu m'as bien souvent facilité la tâche dans mes manips… !! Merci aussi pour ta disponibilité… Merci également à **Dominique** et à **Claude**, pour leur aide et leur gestion des phytotrons.

Merci à **Thamara**, pour ta patience d'ange …

Merci à **Bernard Cunin** et à **Marc Rémy**, pour leur aide et leur disponibilité au Jardin Botanique du Montet.

Merci à **Jacques Boulay**, pour ses conseils de culture des plantes carnivores, et pour m'avoir prêté ses « bibles ».

Merci à **Emmanuel Guédon**, et **Céline Chéry** pour leur aide et leur disponibilité concernant les expérimentations sur l'interféron gamma et sur le facteur intrinsèque.

Merci à **Jean-Louis Guéant**, pour son implication dans le projet.

Enfin, un grand grand grand MERCI à ma famille :

Tout d'abord à **mes parents**, à qui je dois beaucoup. Merci de m'avoir soutenue quotidiennement durant ces 8 années d'études, d'avoir cru en moi, et de m'avoir encouragée pour en arriver là ! ... Merci aussi à ma sœur **Sophie**, mon « frérot » pour son soutien (Sanka, j'ai suivi ta devise !!).

Je remercie également ma grand-mère **Yvonne**, pour son soutien moral, mon Oncle **Jean** (et **Mimi**) pour l'intérêt porté à mon OGM (Ouvrage de Grand Mérite selon ses dires). Je n'oublie pas **Odile** et **Eric**, pour leur gentillesse…

Enfin le dernier mot est pour toi, **Louis**. Tout au long de ma thèse et même bien avant, tu as partagé mes moments d'enthousiasme mais aussi de doutes et d'incertitudes. Tu as toujours été là pour m'écouter patiemment (Les plantes carnivores n'ont plus de secrets pour toi !!), me rassurer, et me donner confiance… Merci infiniment…

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 3

SOMMAIRE 7

LISTE DES ABREVIATIONS 13

REPERTOIRE DES ESPECES CITEES (et noms vernaculaires lorqu'ils existent) 17

INTRODUCTION GENERALE 19

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 23

1. Les protéines recombinantes 25
- **1.1. Définition** 25
- **1.2. Les différents systèmes d'expression** 26
  - **1.2.1. les procaryotes** 26
  - **1.2.2. Les levures** 28
  - **1.2.3. Système d'expression Baculovirus-cellules d'insectes** 30
  - **1.2.4. Les cellules animales** 32
  - **1.2.5. les animaux transgéniques** 36
  - **1.2.6. Les plantes transgéniques** 39
    - **1.2.6.1. Les avantages du système plante** 39
    - **1.2.6.2. Les limitations du système plante et les stratégies de contournement développées** 44
      - **1.2.6.2.1. La glycosylation chez les plantes** 44
      - **1.2.6.2.2. L'adressage des protéines et leur extraction-purification** 46
      - **1.2.6.2.3. Adressage des protéines vers la voie sécrétoire** 49
      - **1.2.6.2.4. L'activité protéolytique et la stabilité des protéines recombinantes** 50
      - **1.2.6.2.5. L'optimisation des codons** 50
      - **1.2.6.2.6. Le « gene silencing » et les suppresseurs** 51
    - **1.2.6.3. Systèmes d'expression végétaux émergeants** 52
    - **1.2.6.4. Etat du marché des protéines recombinantes végétales** 55
  - **1.2.7. Comparaison des différents systèmes de production** 55
- **1.3. Contexte concurrentiel et économique** 57
- **1.4. Deux exemples de protéines recombinantes modèles** 58
  - **1.4.1. L'interféron gamma** 58
  - **1.4.2. Le facteur intrinsèque** 61

2. Les plantes carnivores 66
- **2.1. Ecologie** 66
- **2.2. Les *Drosera*** 67
  - **2.2.1. Distribution et biotope** 68
  - **2.2.2. Description botanique** 69
  - **2.2.3. Le fonctionnement du piège** 70
    - **2.2.3.1. Description du piège et des glandes** 70
    - **2.2.3.2. Mécanismes de capture des insectes : stimulation mécanique et chimique** 71
    - **2.2.3.3. Les enzymes digestives** 72
- **2.3. Les *Nepenthes*** 73
  - **2.3.1. Distribution géographique et biotope** 75
  - **2.3.2. Description botanique** 76
  - **2.3.3. Ecologie** 80
  - **2.3.4. Le fonctionnement des pièges** 80
    - **2.3.4.1. Description des urnes et formation** 80
    - **2.3.4.2. Mécanismes de capture des insectes** 82
    - **2.3.4.3. Les enzymes digestives contenues dans les sécrétions des urnes** 85
    - **2.3.4.4. Evolution du pH de l'urne au cours du temps** 89
    - **2.3.4.5. Nutrition de la plante : flux de nutriments** 90
  - **2.3.5. Utilisation traditionnelle** 90

3. La transformation génétique chez les végétaux supérieurs 92
3.1. Les différentes techniques de transformation génétique des végétaux 92
3.1.1. Les méthodes de transferts directs 92
3.1.2. Les méthodes de transferts indirects 93
3.2. Mécanismes de l'infection des plantes dicotylédones par *d'Agrobacterium tumefaciens* 94
3.2.1. Le plasmide Ti et l'ADN-T 95
3.2.2. Induction du système de virulence de la bactérie 97
3.2.3. Le transfert de gènes *d'Agrobacterium tumefaciens* à la plante 98
3.2.4. L'intégration de l'ADN-T dans les cellules végétales 100
3.3. Utilisation de la souche *Agrobacterium tumefaciens* pour la transformation génétique des plantes 101
3.3.1. Le système de co-intégration 101
3.3.2. Le système binaire 103
3.3.3. Les gènes de sélection 104
3.3.4. Les gènes rapporteurs 106
3.3.5. Les promoteurs 110
3.4. L'étape de régénération de la plante en vue de sa transformation génétique. 110
3.4.1. Utilisation de cellules différenciées : l'organogénèse directe 111
3.4.2. Utilisation de cellules indifférenciées : la régénération indirecte 111
3.4.2.1. L'embryogénèse somatique 111
3.4.2.2. L'organogénèse indirecte à partir de cals 115
3.5. La transformation génétique *in planta* 115
3.5.1. Par inoculation de graines 115
3.5.2. Par inoculation de parties florales 116
3.5.3. Par inoculation de méristèmes 116

PRESENTATION DES OBJECTIFS* *119

I. 1er axe de recherche : Production de protéines recombinantes par la plante *Drosera rotundifolia* (Chapitre 1 – résultats) 123
1. Réaliser la preuve de concept de la technologie : Transformer génétiquement la plante *Drosera rotundifolia* avec deux gènes marqueurs et étudier l'expression des protéines recombinantes : 123
2. Confirmer la première preuve de concept : Transformer génétiquement la plante *Drosera rotundifolia* avec deux gènes humains et étudier l'expression des protéines recombinantes : 123

II. 2ème axe de recherche : Production de protéines recombinantes par la plante *Nepenthes alata* 124
1. Evaluation du potentiel de *Nepenthes* pour la production de protéines recombinantes dans les urnes : Etude quantitative et qualitative des enzymes naturellement présentes dans les sécrétions des pièges. (chapitre 2 – résultats) 124
2. Elaboration d'un protocole de régénération de *Nepenthes alata* à partir d'une cellule en vue de la transformation génétique de la plante (chapitre 3- résultats) 124

MATERIELS ET METHODES* *125

1. Matériel végétal et conditions de culture des plantes 127
1.1. Matériel végétal 127
1.1.1. *Drosera rotundifolia* 127
1.1.2. *Nepenthes alata* 127
1.2. Conditions de culture des plantes 127
1.2.1. Culture des plantes en conditions *in vitro* 127
1.2.2. Milieux de culture de micropropagation *in vitro* 128
1.2.3. Culture des plantes en sol 128

2. Culture bactérienne 130
2.1. Milieux de culture 130
2.2. Antibiotiques de sélection 130

3. Matériel plasmidique (de départ) 131
3.1. Le plasmide pCR8®/GW/TOPO® 131
3.2. Le plasmide pBin-Gw 132
3.3. Le plasmide pTDE4 133
3.4. le plasmide pBin-*m-gfp5-ER* 134

4. Techniques de biologie moléculaire 134
4.1. Construction de plasmides recombinants 134
4.1.1. Amplification du gène à cloner par PCR 135
4.1.2. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose 138
4.1.3. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose 139
4.1.4. Clonage dans le plasmide pCR®8/GW/TOPO® 139
4.1.5. Transformation génétique de bactéries 140
4.1.5.1. Par électroporation 140
4.1.5.2. Par choc thermique 140
4.1.6. Extraction d'ADN plasmidique de bactéries 141
4.1.7. Analyse plasmidique par digestion de restriction 141
4.1.8. Vérification du sens d'insertion du gène dans le vecteur pCR®8/GW/TOPO® 142
4.1.9. Séquençage 142
4.1.10. Recombinaison dans un vecteur de destination par la technologie Gateway 143
4.1.11. Obtention des plasmides recombinants pBin-*IFNγ* et pBin-*FI* 143
4.2. Conjugaison triparentale 145
4.2.1. Les souches bactériennes 145
4.2.2. Le principe de la conjugaison triparentale 145
4.2.3. Protocole de conjugaison triparentale 146
4.2.4. Préparation de l'inoculum bactérien pour la transformation génétique de plantes 147
4.3. Caractérisation moléculaire des *Drosera rotundifolia* transformées 148
4.3.1. Extraction d'ADN génomique de feuilles de *Drosera rotundifolia* 148
4.3.2. Amplification d'un fragment d'ADN par PCR 150

5. Etude des protéines produites par les plantes carnivores (naturelles et recombinantes) 151
5.1. Révélation histochimique de l'activité GUS (*Drosera rotundifolia*) 151
5.2. Observation de la protéine GFP sous microscopie à fluorescence (*Drosera rotundifolia*) 151
5.3. Dosage des protéines totales 151
5.4. Concentration des protéines des fluides digestifs 152
5.5. Extraction de protéines de feuilles de *Drosera rotundifolia* par le Trizol Reagent® 152
5.6. Détection immunologique des protéines 154
5.6.1. par Dot Blot 154
5.6.2. Par Western Blot 156
5.6.3. Révélation des blots : détection des complexes antigènes/anticorps 159
5.6.3.1. Révélation par réaction colorimétrique (NBT/BCIP) 159
5.6.3.2. Révélation par chimioluminescence 159
5.7. Etude de l'activité pH-dépendante des protéases par zymogramme 160

RESULTATS ET INTERPRETATIONS* *163

CHAPITRE 1 : Preuve de concept de la technologie PAT Friday®* *165

Production de protéines recombinantes par des Drosera rotundifolia génétiquement transformées* *165

1. Transformation génétique de *Drosera rotundifolia* 165
1.1. Détermination des conditions de transformation génétique de *Drosera rotundifolia* 165
1.1.1. Conditions de régénération des plantules 165
1.1.2. Conditions de sélection des plantules transformées 166
1.1.3. Utilisation du céfotaxime pour l'élimination des agrobactéries suite à la co-colture 168
1.1.3.1. Résistance intrinsèque des explants au céfotaxime 168
1.1.4. Conditions d'élimination des agrobactéries 169
1.2. Protocole de transformation génétique 170
1.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien 171
1.2.2. Préparation des explants et inoculation avec les agrobactéries 172
1.2.3. Co-culture 172
1.2.4. Elimination des agrobactéries 173
1.2.5. Régénération et sélection des transformants 173
1.2.6. Repiquage des bourgeons transformés et enracinement 173

2. Etude des plantes génétiquement transformées avec les gènes marqueurs codant pour les protéines GFP et GUS 174
2.1. Obtention des transformants GFP et GUS 174
2.1.1. Obtention des régénérants 174
2.1.2. Vérification de l'absence de contamination des plantes par les agrobactéries 175
2.2. Caractérisation biochimique des plantes 176
2.2.1. Observations de plantes Drosera rotundifolia transformées avec le gène codant pour la GFP 176
2.2.1.1. Observations de feuilles au microscope à fluorescence 176
2.2.1.2. Observations de poils glanduleux et de mucilage au microscope à fluorescence 177
2.2.2. Observations de plantes *Drosera rotundifolia* transformées avec le gène codant pour la protéine GUS 179
2.2.2.1. Observations de feuilles après incubation avec le substrat X-Gluc 179
2.2.2.2. Observations, à la loupe binoculaire, de feuilles et de poils de feuilles de *Drosera rotundifolia* après incubation avec le substrat X-Gluc 180
2.2.2.3. Observations de gouttelettes de glu sur papier Whatman après réaction avec le substrat X-Gluc 180
2.3. Caractérisation moléculaire des plantes 181

3. Etude des plantes transformées avec les gènes humains IFNγ et FI 184
3.1. Construction des plasmides pBin-GW-IFNγ et pBin-GW-FI 185
3.2. Obtention des plantes génétiquement transformées IFNγ et FI 190
3.3. Caractérisation moléculaire des plantes 190
3.3.1. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN à partir de feuilles 190
3.3.2. Mise en évidence de l'intégration du transgène dans le génome de la plante par PCR 191
3.4. Mise en évidence de l'expression des protéines humaines par immuno-révélation 193
3.4.1. Mise au point d'un protocole d'extraction de protéines à partir de feuilles de *Drosera rotundifolia* par le Trizol Reagent® 193
3.4.2. Mise en évidence des protéines recombinantes dans les feuilles par Dot Blot 194

4. Discussion relative à la transformation génétique des *Drosera rotundifolia* et à la production des protéines recombinantes dans les feuilles et dans la glu 196

CHAPITRE 2 : Etude du potentiel de la technologie PAT Friday® appliquée au genre Nepenthes 203

Etude quantitative et qualitative des protéines contenues dans les urnes de Nepenthes, Mise en évidence et contrôle de l'activité protéasique. 203

1. Etude quantitative des protéines des fluides digestifs de Nepenthes 204
1.1. Quantification des protéines totales dans les fluides digestifs 205
1.2. Evaluation du rendement en protéines totales de la technologie PAT Friday® appliquée au genre *Nepenthes* 208
1.2.1. Volume de fluides digestifs par urne 208
1.2.2. Nombre d'urnes et volume total de sécrétions par plante 209
1.2.3. Suivi du remplissage des urnes de *Nepenthes* et du taux de protéines des nouvelles sécrétions après vidange. 211
1.2.3.1. Suivi sur des urnes vidangées 2 à 3 semaines après ouverture 211
1.2.3.2. Suivi sur des urnes vidangées à l'ouverture 213

2. Etude des enzymes natives des sécrétions des urnes de *Nepenthes* 216
2.1. Etude des protéines sécrétées dans les urnes de *Nepenthes* 217
2.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique du jus de *Nepenthes* 218

3. Contrôle de l'activité des protéases 220
3.1. Contrôle de l'activité des protéases par le pH 220
3.1.1. pH des urnes 220
3.1.2. Mise en évidence d'un contrôle pH-dépendant 222
3.1.2.1. Mise en évidence d'un contrôle pH-dépendant par zymogramme 222
3.1.2.2. Mise en évidence d'un contrôle pH-dépendant par incubation de protéines spécifiques dans du fluide digestif 225
3.1.2.2.1. incubation de BSA 225
3.1.2.2.2. Incubation d'Interféron gamma 226

3.1.2.2.3. Incubation de Facteur Intrinsèque 228
3.2. Par l'ajout d'inhibiteurs de protéases 230

4. Discussion relative à l'étude du potentiel de la technologie appliquée la plante *Nepenthes* 231

CHAPITRE 3 : Développement de la technologie PAT Friday® sur le genre Nepenthes 237

Elaboration d'un protocole de régénération de Nepenthes alata en vue de sa transformation génétique 237

1. Essai de régénération de *Nepenthes alata* par organogénèse directe 238
1.1. Essai de régénération de *Nepenthes alata* sous l'influence d'une combinaison hormonale NAA/BAP 239
1.2. Essai de régénération de *Nepenthes alata* sous l'influence de Thidiazuron 239
1.3. Utilisation d'antioxydants en vue de limiter le brunissement des explants 242

2. Régénération de *Nepenthes alata* par la voie indirecte 243
2.1. Induction de la callogénèse 245
2.2. Régénération de *Nepenthes alata* par organogénèse indirecte 246
2.2.1. Induction de cals globuleux 246
2.2.1.1. Observations macroscopiques 246
2.2.1.2. Observations microscopiques 248
2.2.2. Prolifération des cals 248
2.2.2.1. En milieu liquide 249
2.2.2.2. En milieu solide 250
2.2.3. Régénération de tiges feuillées 251
2.2.3.1. Exposition des cals globuleux à des cytokinines à l'obscurité 252
2.2.3.2. Exposition des cals globuleux à des cytokinines à la lumière 252
2.3. Régénération de *Nepenthes alata* par embryogénèse somatique 254
2.3.1. Induction de cals friables 254
2.3.2. Observations microscopiques des cals friables 257
2.3.2.1. Observations microscopiques de cals friables issus de racines 258
2.3.2.2. Observations microscopiques de cals friables issus de parties aériennes de plantes étiolées 259
2.3.3. Etude de l'embryogénèse zygotique de *Nepenthes* en vue de l'identification des différents stades de l'embryogenèse somatique 261
2.3.3.1. Etude de l'embryogénèse zygotique de *Nepenthes mirabilis* 261
2.3.3.2. Obtention d'embryons somatiques de *Nepenthes alata* 263

3. Discussion relative à l'élaboration d'un protocole de régénération de *Nepenthes alata* en vue de sa transformation génétique 264

CONCLUSION GENERALE 271

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 277

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX 321

ANNEXES 329

LISTE DES ABREVIATIONS

$US : dollar americain
µF : micro Farad
2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
2-DOG-6-P : 2-déoxyglucose-6-phosphate phosphatase
3'nos : terminateur nopaline synthétase
3'oc : terminateur de l'octopine synthétase
ABA : Acide Abscissique
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADN-T : ADN de transfert
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMP : Adénosine MonoPhosphate
ARN : Acide RiboNucléique
ARNdb : Acide RiboNucléique double brin
ARNi : ARN interférence
ARNm : Acide RiboNucléique messagers
ATP : Adénosine Tri Phosphate
BAP : BenzylAminoPurine
BAP : Benzylaminopurine
BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BET : Bromure d'Ethidium
BEVS : Baculovirus Expression Vector System
BHK : Baby Hamster Kidney
BLA : Biologics Licence Application
BSA : bovin serum albumin
BY2 : Bright Yellow 2
CaMV : Cauliflower mosaic virus : Virus de la mosaïque du chou-fleur
Cbl : Cobalamine
CDP-*star :* (Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricycle (3.3.1.13,7) decan} -4-yl) phenyl phosphate
cellules HEK-293 : cellules Human Embryonic Kidney
cellules NSO : cellules du Noyau Supra Optique
CHO : Chinese Hamster Ovary
CMH : Complexe majeur d'Histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
CTAB : hexadecyltrimethylammonium bromide
CTLA-4 : cytotoxic lymphocyte associated antigen
DAN : Diazoacetyl-DL-norceuline methyl ester
DDE : N-dodecyldiethanolamine
DEPC : DiethylenePyrocarbonate
DIR : Directe
EAO : Espèces activées de l'oxygène
ECL : ElectroChimioLuminescent
EDTA : l'acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EMEA : European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
EPO : érythropoïétine

ESP : Extreme Shooty Phenotype
FDA : Food and Drug Administration
FI : Facteur Intrinsèque
GAF : gamma interferon activation factor
GAS : Gamma Interferon Activated Sequence
GFP : Green Fluorescent Protein
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GRAS : Generally Regarded as Safe
GUS ou *uid A* : β-glucuronidase
Gw : Gateway®
HbsAg : Antigène de l'hépatite B
HC-Pro : Helper Component Proteinase
HER : Herceptine
hGH : Hormone de croissance
HPHIC : Chromatographie d'Interactions Hydrophobes à Haute Performance
hpt : hygromycine B phosphotransférase
HSV : Herpes Simplex Virus
IFN-γ : Interféron gamma
IGF : Insulin-like growth factor
Ipt : isopenténYl transférase
JAK : Janus Kinase
kb : Kilobase
kDa : KiloDalton
kV : kiloVolt
LB : Left Border
mAb : Anticorps monoclonal
mas : mannopine synthétase
MAT : Multi-Auto-Transformation
MES : 2-(N-morpholino) ethane acide sulfonique
Milieu LB : milieu Luria-Bertani
mob : mobilization
MPEs : masses pro-embryogéniques
MS(dro) : milieu de culture Murashige et Skoog utilisé pour *Drosera rotundifolia*
MS(nep) : milieu de culture Murashige et Skoog utilisé pour *Nepenthes alata*
MUG : 4-Méthylumbelliféryl β-D-Glucuronide
NAA : Naphthalene Acetic Acid
N-acétylglucosaminyltransférase 1 : GNT1
NANA : acide N-acetylneuraminique
NBT : Nitroblue tetrazolium chloride
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NGNA : acide N-glycosylneuraminique
NK : Natural killers
NLS : signaux de localisation nucléaires
nptII : néomycine phosphotransférase II
onc : oncogènes
ONPG : O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
P35S : promoteur du virus de la mosaïque du chou fleur
PA : protéase aspartique
PAL : Phenylalanine Amonia Lyase
PAT SAS : Plant Advanced Technologies SAS

PBS : phosphate buffered saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pdb : paire de bases
PEG : PolyEthylène Glycol
PFLC : Protein Folding Liquid Chromatography
pmi : phosphomannose isomérase
Pnos : Promoteur nopaline synthétase
PPO : PolyPhénol Oxydase
PR : Pathogenesis-Related
PTGS : Post Transcriptional Gene Silencing
PVDF : Polyfluorure de vinylidène
PVP : polyvinylpyrrolidone
RB : Right Border
RE : Réticulum Endoplasmique
REV : Reverse
rgs-CaM : regulator of gene silencing–calmodulin-like protein
rhG-CSF : recombinant human granulocyte colony-stimulating factor
rhIFN-g : IFN gamma humain recombinant
Rpm : rotation par minute
RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNARE : soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein receptors
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TAE : Tris Acetate EDTA
TBSV : Tomato Bushy Stunt Virus
TCL : Thin Cell layer
TDZ : Thidiazuron
TE : Tris EDTA
TGS : Transcriptional Gene Silencing
Thyb : Température d'hybridation
Tm : Température de fusion
TNF : Tumor Necrosis Factor
tPA : tissue Plasminogen Activator
tra : transfer
UI : Unité Internationale
UV : Ultra violet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIGS : Virus Induced Gene silencing
VP : Viral Protein
VSD : vacuolar sorting determinant
WAP : promoteur Whey Acidic Protein
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
X-Gluc : acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide
xylA : xylose isomérase
YEB : Yeast Extract Bacto
YFP : Yellow Fluorescent Protein

REPERTOIRE DES ESPECES CITEES
(et noms vernaculaires lorsqu'ils existent)

Aequora Victoria : Méduse fluorescente
Agrobacterium rhizogenes : Agrobactérie (relation symbiotique avec légumineuse)
Agrobacterium tumefaciens : Agrobactérie (responsable de la galle du collet)
Arabidopsis thaliana : Arabette des dames
Bacillus subtilis
Campylobacter jejuni
Cephalotus : Plante carnivore de la famille des céphalotacées
Chlamydomonas reinhardtii : Algue verte unicellulaire
Chorella vulgaris : Algue microscopique d'eau douce
Drosera cuneifolia
Drosera adelae
Drosera anglica
Drosera binata
Drosera intermedia : Drosera intermédiaire
Drosera ordensis
Drosera regia : Rossolis royal
Drosera rotundifolia : Drosera à feuilles rondes
Dunaliella salina : Algue verte halophile
Escherichia coli
Lemna minor : Lentille d'eau
Mangifera indica : Manguier
Medicago truncatula : Luzerne tronquée
Nepenthes alata
Nepenthes albomarginata
Nepenthes ampullaria
Nepenthes bicalcaratala
Nepenthes burbidgeae
Nepenthes campanulata
Nepenthes distillatoria
Nepenthes edwardsiana
Nepenthes gracilis
Nepenthes hybrida
Nepenthes khasiana
Nepenthes lowii
Nepenthes madagascariensis
Nepenthes masoalensis
Nepenthes maxima
Nepenthes merilliana
Nepenthes mirabilis
Nepenthes northiana
Nepenthes pervillei
Nepenthes rafflesiana
Nepenthes rajah
Nepenthes reinwardtiana
Nepenthes sanguinae

Nepenthes sibuyanensis
Nepenthes spathulata
Nepenthes thorelii
Nepenthes tobaica
Nepenthes veitchii
Nepenthes ventricosa
Nepenthes vieillardii
Nepenthes villosa
Nepenthes x coccinae
Nepenthes x hybrida
Nepenthes x kinabaluensis
Nepenthes x mixta
Nepenthes x ventrata
Nepenthes x wrigleyiana
Phaeodactylum tricornutum : Microalgue
Physcomitrella patens : Mousse bryophyte
Pichia pastoris : Levure méthylotrophe
Plasmodium falciparum : Sporozoaire responsable du paludisme
Pyrococcus species : Genre *d'archaea* appartenent à l'ordre des *thermococcales*
Rhizobium trifolii
Saccharomyces cerevisiae : Levure de boulanger
Sarracenia : Plante carnivore appartenant à l'ordre des *Nepenthales*
Spirodela : Lentille d'eau
Spodoptera frugiperda : Larve de papillons ravageurs de culture
Staphylococcus aureus : Staphylocoque doré
Streptococcus mutans : Streptocoque responsable des caries
Streptococcus sobrinus : Streptocoque responsable des caries
Streptomyces : Genre de bactéries filamenteuses du sol
Tetraselmis suecica : Microalgue
Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes : Bacterie anaérobie thermophile
Vibrio cholerae : Bactérie responsable du choléra

INTRODUCTION GENERALE

Grâce aux progrès accomplis dans les techniques du génie génétique, l'introduction dans une cellule procaryote ou eucaryote d'un gène provenant d'un autre organisme a permis d'utiliser la cellule hôte en tant qu'usine de production de protéines recombinantes. Ainsi, l'expansion des biotechnologies a pu offrir de nouvelles potentialités dans la conception, et la fabrication même, de médicaments innovants. Dans le domaine de la santé, le développement des biotechnologies a contribué à la mise au point de nombreuses molécules thérapeutiques : l'insuline recombinante dans le traitement du diabète se substitue depuis plus de vingt ans aux produits d'extraction, l'érythropoïétine recombinante stimule la production de globules rouges chez des patients dialysés ou atteints d'un cancer, ou encore le facteur VIII recombinant permet de traiter l'hémophilie.

Des millions de patients ont déjà bénéficié de médicaments et de vaccins issus des biotechnologies, et certains rapports nous prédisent que dans le futur, beaucoup plus de personnes y auront accès (PhRMA, 2008). Actuellement, 633 médicaments issus des biotechnologies sont en développement pour le traitement de plus de 100 maladies. Ceci inclut 254 médicaments contre le cancer, 162 médicaments contre des maladies infectieuses, 59 contre des maladies auto-immunes, et 34 contre le virus de sida. Ces médicaments sont actuellement en essais cliniques ou en cours d'examination par la FDA (Food and Drug Administration) (PhRMA, 2008).

Cet essor récent des biotechnologies appelle à l'émergence de nouveaux procédés de production de médicaments, et notamment de protéines recombinantes, toujours plus productifs et rentables. Certains systèmes d'expression sont désormais largement exploités comme les systèmes bactériens, les levures ou les CHO. D'autres systèmes d'expression, comme les systèmes végétaux ou les cellules d'insectes, moins développés, sont cependant très prometteurs.

L'idée de créer une plateforme de production de protéines recombinantes à partir de plantes est née fin 2005 au sein de l'entreprise Plant Advanced Technologies SAS, déjà positionnée dans la production de métabolites secondaires par la technologie « Plantes à traire ». Souhaitant contourner les inconvénients des systèmes d'expression végétaux traditionnels, elle s'est orientée vers un modèle de plantes très particulier que sont les plantes carnivores : l'idée étant d'utiliser leur système excrétoire naturel de protéines pour la production de molécules thérapeutiques à haute valeur ajoutée. Cette technologie a été baptisée PAT Friday®.

C'est dans ce contexte de recherche appliquée que s'inscrivent les travaux présentés dans ce manuscrit. Ce mémoire est structuré en 4 parties distinctes. La première est consacrée

à la synthèse bibliographique, et décrit notamment les différents systèmes d'expression utilisés pour la production de glycoprotéines à visée thérapeutique. Les plantes carnivores impliquées dans le développement de la technologie et les techniques de transformation génétique de plantes et de culture *in vitro* sont ensuite présentées. La deuxème partie présente les objectifs de recherche. La troisième partie détaille les différentes méthodologies expérimentales et les techniques analytiques utilisées au cours de notre étude. Les résultats obtenus sont développés dans la dernière partie, divisée en 3 chapitres : le premier présente les résultats relatifs à la preuve de concept de la technologie réalisée sur la plante *Drosera rotundifolia*. Le deuxième étudie le potentiel de la technologie appliqué au genre *Nepenthes*. Enfin, le dernier chapitre présente les résultats relatifs à la régénération de *Nepenthes* en vue de sa transformation génétique.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les protéines recombinantes

1.1. Définition

Les protéines recombinantes sont ainsi qualifiées dans la mesure où elles sont produites par des cellules dont l'ADN a été modifié par recombinaison génétique. La protéine, synthétisée par une cellule différente de sa cellule d'origine, est ainsi dite hétérologue ou recombinante. Au sens large, un système de production adapté à la fabrication d'une protéine recombinante donnée, est un procédé biotechnologique qui s'appuie principalement sur :

- l'emploi d'un vecteur d'expression (un plasmide ou un virus), jouant le rôle de transporteur génétique du gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée ;
- l'utilisation d'une cellule hôte, chargée d'exécuter les instructions fournies par le gène d'intérêt qui lui est inséré, dans l'objectif de synthétiser la protéine recherchée ;
- une phase de production proprement dite permettant de fabriquer les volumes de protéines souhaités ;
- enfin, une séparation et extraction de la protéine du milieu de culture, suivie par une purification de celle-ci.

Au sens restreint, un système de production de protéines recombinantes est caractérisé par un couple constitué d'un vecteur d'expression et d'un hôte (cellule ou organisme).

Actuellement, il existe divers systèmes d'expression voués à la production et la purification de protéines recombinantes : la bactérie *E. coli*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules *Chinese Hamster Ovary* (CHO) sont les plus avancées. Les autres systèmes d'expression font l'objet de nombreux travaux et sont de plus en plus présents dans le domaine des biotechnologies. Parmi ceux-ci, on trouve la levure *Pichia pastoris*, les cellules d'insectes, les animaux et les plantes transgéniques. Chacun de ces systèmes présentent des avantages et des inconvénients. Le choix de l'hôte d'expression sera en partie dicté par les impératifs économiques, mais la qualité des protéines recombinantes produites constituera également un paramètre déterminant, en particulier dans le cas de la production de protéines destinées à être injectées chez l'homme.

Pour être stables et actives *in vivo*, ces protéines doivent subir de multiples modifications post-traductionnelles. Les principales modifications sont le repliement, le clivage, l'association des sous-unités, la γ-carboxylation et la glycosylation. Elles se produisent après ou pendant la traduction de l'ARN messager en une chaîne d'acides aminés

et sont spécifiques du type de cellule considérée. Parmi les modifications souvent requises pour assurer la fonction et la stabilité de la protéine, ainsi que son adressage vers le lieu où elle est active, la glycosylation est l'une des plus importantes. Les glycannes associés aux protéines sont en effet extrêmement variables en fonction de l'hôte dans lequel la protéine d'intérêt est exprimée.

1.2. Les différents systèmes d'expression

1.2.1. les procaryotes

La bactérie *E. coli* fut et reste le premier hôte utilisé pour la production de protéines recombinantes (Dodet, 1990) simples : en 1982, l'insuline, issue de cet hôte, a été la première protéine recombinante humaine à être commercialisée. D'autres protéines sont depuis lors produites, comme par exemple, l'hormone de croissance, les interférons alpha et bêta, l'interleukine et le TNF (tumor necrosis factor)(Cadoret *et al.*, 2008).

- Avantages

Ses avantages incontestables sont une excellente caractérisation génétique et physiologique, un temps de génération court et une bonne adaptation à la culture en masse. De nombreux vecteurs plasmidiques ont été construits et sont disponibles afin d'insérer et d'exprimer un gène étranger, et permettent également de sélectionner les clones recombinants. *E. coli* possède une grande capacité à accumuler des protéines étrangères, puisqu'elles peuvent représenter plus de 20% des protéines cellulaires totales. Le taux d'expression de la protéine hétérologue peut atteindre plusieurs grammes par litre.

- Inconvénients

Néanmoins, cette bactérie est incapable de synthétiser des protéines recombinantes possédant une conformation tridimensionnelle identique à celle d'une protéine humaine, en raison de l'absence de protéines impliquées dans le repliement (Baneyx and Mujacic, 2004). *E. coli* est pourvu de faibles capacités sécrétoires (Sandkvist and Bagdasarian, 1996 ; Choi and Lee, 2004) : les protéines recombinantes sont en effet souvent accumulées, dans le cytoplasme ou le périplasme, sous formes d'agrégats insolubles, appelés corps d'inclusions (Panda, 2003 ; Mergulhao *et al.*, 2005). Il est souvent difficile de récupérer ces protéines mal repliées. De plus, les étapes successives de purification et de renaturation sont susceptibles

d'amoindrir l'activité biologique des protéines, et aussi d'abaisser le rendement (Fischer *et al.*, 1993). Enfin, *E. coli* étant une entérobactérie, il est important de s'assurer de l'absence d'endotoxines dans les protéines recombinantes purifiées. A noter que d'autres bactéries comme *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* possèdent des capacités de sécrétion supérieures à *E. coli*. Cependant leur génétique est moins connue, et le niveau de production de protéines est inférieur à celui obtenu avec *E. coli*.

- Utilisation de techniques chromatographiques pour améliorer la renaturation des protéines issues de *E.coli*

De nombreuses études ont été menées afin d'améliorer l'expression et le repliement des protéines hétérologues produites par *E. coli* (Swartz, 2001 ; Vallejo and Rinas, 2004). Ces dernières années, la chromatographie liquide a été utilisée pour replier les protéines avec un fort taux de réussite (Li *et al.*, 2004 ; Geng and Wang, 2007). Cette méthode présente 2 avantages : elle empêche non seulement les protéines non repliées de s'agréger entre elles, mais elle permet aussi de purifier (du moins partiellement) simultanément les protéines pendant le procédé. Cette technique est appelée le repliement des protéines par chromatographie liquide (PFLC : Protein Folding Liquid Chromatography) (Geng and Wang, 2007). Une PFLC idéale comprend 4 étapes : l'élimination et la récupération facilitée des agents dénaturants, le repliement de la protéine cible, la séparation de protéines contaminantes incluant les intermédiaires non-conformes de la protéine cible. Les méthodes utilisées peuvent être la chromatographie d'exclusion de taille, d'interactions hydrophobes, d'échanges d'ions, ou encore la chromatographie d'affinité.

Par exemple, le rhG-CSF recombinant (recombinant human granulocyte colony-stimulating factor) exprimé dans *E.coli* a été récemment renaturé et purifié par chromatographie liquide par échanges d'ions sur colonne de sépharose. Dans les conditions optimales de repliement de la protéine (concentration en urée, pH, ratio de glutathion réduit et oxydé dans la phase mobile optimale), la molécule purifiée à 96% a été obtenue avec une activité biologique élevée (Wang *et al.*, 2007a).

- Autres approches d'amélioration

Une méthode récente (avantageuse de part sa simplicité) de renaturation et de purification par chromatographie d'interactions hydrophobes à haute performance (HPHIC) donne également des résultats prometteurs (Guo, 2001 ; Bai *et al.*, 2003 ; Lili *et al.*, 2006).

Une autre stratégie alternative a consisté à co-exprimer la protéine d'intérêt avec des molécules chaperonnes (Levy *et al.*, 2001). Par exemple, la co-expression de la protéine Deg-P, protéase périplasmique nécessaire à la protéolyse dans l'enveloppe cellulaire, minimise la formation des corps d'inclusion (Lin *et al.*, 2001).

Enfin, des essais récents de « synthèse de protéines sans cellules » (« cell free protein synthesis » correspondant à l'utilisation d'extraits cellulaires d'*E.coli*) donnent également des résultats prometteurs. La suppression de la membrane externe et de la membrane plasmique rend possible l'utilisation directe de fragments d'ADN linéaires amplifiés par PCR ou de fragments d'ARN messagers comme matrice pour la synthèse de protéines (pas d'étape de clonage ni de fermentation) (Chen *et al.*, 2007 ; Seki *et al.*, 2008). Relativement fastidieuse et n'autorisant pas de procédés à grande échelle pour le moment (Mergulhao *et al.*, 2005), cette technologie offre l'avantage de pouvoir produire des protéines normalement toxiques pour la cellule hôte. Le procédé demeure néanmoins onéreux, de par la nécessité d'apporter en continu des réactifs en grand volume, et en particulier des nucléotides et des sources d'énergie (Zawada *et al.*, 2003).

- La glycosylation des protéines issues de *E.coli*

Il est généralement considéré que le système E. coli ne glycosyle pas les protéines. Bien que les travaux récents aient mis en évidence l'existence d'un processus de N-glycosylation dans les archées et de O-Glycosylation dans les eubactéries (Abu-Qarn *et al.*, 2008), les structures N-glycanniques identifiées diffèrent considérablement de celles retrouvées sur les glycoprotéines humaines (Figure 5) (Young *et al.*, 2002). Ces structures sont susceptibles d'engendrer des réactions immunitaires chez l'homme, c'est pourquoi des systèmes d'expression eucaryotiques seront davantage privilégiés pour la production de protéines dont les modifications post-traductionnelles sont essentielles à l'activité biologique.

1.2.2. Les levures

Les levures sont utilisées depuis l'Antiquité dans l'alimentation humaine, pour la fabrication du pain et des boissons alcoolisées. La plus connue est *Saccharomyces cerevisiae*, la levure de boulanger.

- Avantages

Les levures sont capables de proliférer rapidement et dans un milieu de culture simple, peu coûteux, en absence de facteurs de croissance d'origine animale (Stagoj and Podobnik, 2006). S'adaptant bien à la culture en masse, les fermentations produisent en général une haute densité cellulaire et le taux d'expression de la protéine hétérologue est généralement voisin de la centaine de milligrammes par litre (Cereghino and Cregg, 2000). Les levures offrent également l'avantage d'avoir un matériel génétique simple et de n'être ni pyrogènes, ni pathogènes (organismes GRAS, *Generally Regarded as Safe*) et constituent ainsi un organisme de choix pour la production de protéines à visée thérapeutique.

- Inconvénients

La sécrétion des protéines hétérologues fonctionne très bien pour de petits polypeptides comme l'insuline, mais les résultats sont moins probants pour les protéines de masse moléculaire élevée, bien que la sécrétion et la maturation puissent être améliorées par adjonction de signaux spécifiques (Eckart and Bussineau, 1996). Les protéines synthétisées sont souvent obtenues à l'intérieur du cytoplasme et nécessitent de lyser la cellule afin de les récupérer.

- La glycosylation des protéines issues des levures

Les levures sont capables de réaliser certaines modifications post-traductionnelles mais la glycosylation n'est cependant pas identique à celle retrouvée chez l'homme. En effet, ces micro-organismes produisent des N-glycannes de type oligomannosidique (*high-mannose*) (figure 5, p 56), c'est-à-dire constitués d'une cinquantaine à une centaine de résidus mannoses (Gemmill and Trimble, 1999). Ces glycannes ne ressemblent pas à ceux des cellules animales, si bien que les glycoprotéines produites dans ces systèmes d'expression sont souvent immunogènes pour l'Homme.

- Utilisation de *Pichia pastoris* pour la production de protéines recombinantes

Certaines levures sont de meilleurs candidats que *Saccharomyces cerevisiae* pour la production de protéines recombinantes, car ils sont de meilleurs sécréteurs. C'est le cas de la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* (Cereghino *et al.*, 2002). Plus de 400 protéines recombinantes ont été exprimées dans cet hôte, la plupart étant d'origine humaine ou mammalienne (Cereghino and Cregg, 2000). Le rendement est généralement meilleur que dans *S. cerevisiae*. Le gène d'intérêt peut être placé sous le contrôle du promoteur de l'alcool

oxydase (AOX1), réprimé en présence de glucose et inductible en présence de méthanol (Zhang *et al.*, 2000). Dernièrement, le β-amyloïde 1–42 recombinant humain a été synthétisé dans la levure sous contrôle de ce promoteur. Après deux étapes de purification (chromatographie par échanges d'ions sur colonne de sépharose et chromatographie en phase inversée), la protéine fonctionnelle a été obtenue à un rendement de 355 mg/L de milieu de culture (Shen *et al.*, 2008). De plus, physiologiquement, *P. pastoris* a recours à la respiration plutôt qu'à la fermentation. Or la fermentation produit de l'éthanol et de l'acide acétique, qui atteignent rapidement des niveaux toxiques dans une culture en cellules à haute densité (Cereghino *et al.*, 2002). Quant à la glycosylation des protéines produites, *Pichia pastoris* peut produire des N-glycannes et des O-glycannes. La différence dans le nombre et le type de résidus ajoutés par rapport aux cellules humaines pose de gros problèmes d'antigénicité. En plus de la présence de N-glycannes hypermannosylés, des structures de type O-mannose, absentes sur les protéines natives humaines, ont été mises en évidence sur l'anti-thrombine III produite chez *P. pastoris* (Mochizuki *et al.*, 2001). Dans ce cas, la présence des O-glycannes réduit de 50% l'activité de la glycoprotéine produite. Ainsi, toutes ces différences rendent les protéines produites par *P. pastoris* difficilement utilisables en thérapeutique humaine, même si des études d'humanisation de la glycosylation des protéines sont en cours (Chiba and Jigami, 2007 ; Hamilton and Gerngross, 2007 ; Wei *et al.*, 2008).

1.2.3. Système d'expression Baculovirus-cellules d'insectes

Le système baculovirus-cellules d'insectes s'appuie sur l'insertion du ou des gènes à exprimer dans le génome d'un baculovirus vecteur, et sur l'infection de cellules de lépidoptères (par exemple *Spodoptera frugiperda* Sf9) par le virus recombinant (Haines *et al.*, 2008). Le système est basé sur le remplacement du gène viral de la polyhédrine (produite tardivement durant le cycle viral et rentrant dans la composition des polyèdres viraux) par un gène d'intérêt et sur l'expression de la protéine recombinante dans les cellules d'insectes infectées.

- Avantages

Ce système offre l'avantage de pouvoir obtenir, dans des temps relativement courts, des vecteurs recombinants faciles à sélectionner et de très hauts niveaux d'expression, allant de quelques dizaines à quelques centaines de milligrammes par litre de culture (Fraser, 1992).

Une autre considération importante est liée à la sécurité : aucun virus de vertébrés ne semble se multiplier dans les cellules de lépidoptères employées et aucun prion n'a à ce jour été identifié. Quant au baculovirus, il ne peut accomplir sa multiplication que dans les cellules d'insectes. L'absence de sérum dans le milieu de culture constitue un avantage non négligeable en terme de coût (Altmann *et al.*, 1999). Les cellules présentent également une meilleure tolérance à l'osmolarité et aux coproduits du métabolisme cellulaire.

- Inconvénients

Un inconvénient majeur réside dans la nécessité de procéder à la réinfection virale à chaque nouvelle culture, compte tenu du cycle lytique du virus. D'autre part, les cellules d'insectes possèdent les équipements enzymatiques leur permettant d'effectuer la maturation et les modifications post-traductionnelles, mais ces dernières sont cependant très différentes de celles retrouvées chez les eucaryotes supérieurs (Marchal *et al.*, 2001).

- Glycosylation des protéines issues de cellules d'insectes

Contrairement aux structures glycanniques complexes et multi-antennées observées sur les protéines produites par les cellules de mammifères, les N-glycannes synthétisés par les cellules d'insectes sont de type oligomannose ou pauci-mannose. Ceci compromet l'activité biologique des glycoprotéines, et peut induire des réactions immunologiques chez l'homme (Harrison *et al.*, 2006). De nombreux travaux ont été menés afin d'humaniser les glycoprotéines produites par le système baculovirus-cellules d'insectes (Jarvis, 2003 ; Shi and Jarvis, 2007). L'objectif est de produire par génie métabolique des protéines portant des structures N-glycanniques de type complexe. Les cellules d'insectes ont été transformées avec des gènes codant pour des enzymes mammaliennes de la glycosylation intervenant notamment dans la sialylation des N-glycannes (Seo *et al.*, 2001 ; Aumiller *et al.*, 2003 ; Jarvis, 2003 ; Jarvis *et al.*, 2004).

- Développement à l'échelle industrielle

Ce système d'expression est utilisé dans le cadre de la production industrielle. Dernièrement, Protein Sciences Corp a développé FluBlok®, un vaccin trivalent injectable contre la grippe humaine composé de protéines recombinantes d'hémagglutinine du virus produites par des cellules d'insectes. Ce vaccin, en essais cliniques de phase III s'est révélé sans danger et efficace pour l'Homme. La BLA a été delivrée par la FDA en avril 2008 et l'autorisation de mise sur le marché est attendue pour 2009 (McPherson, 2008).

Le système BEVS (Baculovirus Expression Vector System) a dernièrement été utilisé pour le développement d'un vaccin contre la malaria (Shi *et al.*, 2000).

Récemment, un vaccin contre l'infection au parvovirus du porc a été produit par des cellules d'insectes et a donné des résultats prometteurs (Antonis *et al.*, 2006).

1.2.4. Les cellules animales

Les bioprocédés basés sur les cellules de mammifères sont utilisés depuis près d'un quart de siècle pour la production de vaccins, et de protéines thérapeutiques et diagnostiques. L'émergence de la culture de cellules animales a commencé avec la production de tPA (tissue Plasminogen Activator, Activase®) par la société Genentech en 1987. Le marché des protéines recombinantes produites par ce système d'expression dépasse aujourd'hui 20 milliards de dollars annuels (Griffin *et al.*, 2007), représentant 60 à 70% des protéines thérapeutiques disponibles (Wurm, 2004 ; Jayapal *et al.*, 2007). La plupart sont exprimées dans les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO), mais aussi dans d'autres lignées telles que les cellules de rein de hamster nouveau-né BHK (Baby Hamster Kidney), les cellules de myélomes de souris comme les cellules NSO et Sp2/0, les cellules rénales d'embryons humains (HEK-293), les cellules humaines issues de carcinome cervical HeLa, les cellules de rétine humaine…(Chen *et al.*, 2001 ; Arden and Betenbaugh, 2004 ; Wurm, 2004).

- Avantages

Les cellules animales se prêtent bien à la culture en masse en bioréacteurs, même si les rendements en protéines recombinantes sont plus faibles qu'avec les bactéries ou les levures, soit de l'ordre de 5 à 10 milligrammes par litre de milieu (Butler, 2005). Leur physiologie est relativement bien connue et l'optimisation des rendements fait l'objet de nombreuses études (Seth *et al.*, 2007). Parallèlement au développement de vecteurs toujours plus puissants, il est notamment possible de travailler sur le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, afin d'augmenter la productivité et d'améliorer la qualité des protéines recombinantes synthétisées (Arden and Betenbaugh, 2004 ; Allen *et al.*, 2008 ; Majors *et al.*, 2008). Des travaux portant sur l'amélioration de la composition du milieu de culture (Allen *et al.*, 2008) ou sur le contrôle de l'expression des gènes endogènes (Warner, 1999) sont également menés. Les améliorations récentes portent aussi sur la sécurité sanitaire : la tendance est au remplacement de substances d'origine animale dans le milieu par des substances végétales

(fractions peptidiques de colza), afin de limiter les risques de contamination (Farges-Haddani *et al.*, 2006 ; Farges *et al.*, 2008). Par ailleurs, les cellules CHO sont capables de synthétiser des protéines complexes, de poids moléculaire élevé, correctement repliées, et possédant les modifications post-traductionnelles très proches de celles retrouvées sur les protéines humaines.

- Inconvénients

Les cellules animales sont relativement exigeantes en éléments nutritifs, et la culture est délicate, limitée et coûteuse. En effet, les investissements requis pour mettre en place une unité de fermentation de cellules mammifères sont importants (environ 200 millions $US pour une capacité de 200 kg d'anticorps annuelle)(Faye *et al.*, 2002).

- La glycosylation des protéines issues des cellules animales

Pour ce qui est de la glycosylation, les cellules CHO sont capables de reproduire des séquences oligosaccharidiques de structures quasi-similaires à celles retrouvées chez l'Homme (figure 5, p 56). L'équipement enzymatique des cellules de mammifères les plus couramment utilisées (CHO et BHK) apparaît suffisant pour garantir une glycosylation complexe des protéines recombinantes avec un haut degré de sialylation α2-3. Toutefois, ces systèmes manquent d'enzymes telles que les α1,3-fucosyltransférases ou les α2,6-sialyltransférases, qui transfèrent des motifs glycosidiques caractéristiques en position terminale des N-glycanes des tissus humains (Butler, 2005).

Cependant, l'absence de ces enzymes n'induit pas une production de glycoprotéines immunogènes. La glycosylation de l'EPO humain consiste en un mélange de formes sialylées : 60% en α-2,3 et 40% en α-2,6. L'EPO recombinant produit dans les cellules CHO est quant à lui sialylé uniquement en α-2,3, mais il est pour autant très efficace biologiquement et aucun effet physiologique néfaste n'a été observé chez les patients. Malgré tout, le génie génétique a permis de créer une érythropoïétine modifiée (Darbépoétine) avec deux sites supplémentaires de N-glycosylation, lui conférant un temps de demi-vie trois fois plus long (Egrie *et al.*, 2003). Cette stratégie a été utilisée pour d'autres protéines recombinantes comme des hormones ovariennes (Perlman *et al.*, 2003).

Pour la production de protéines thérapeutiques recombinantes, il est essentiel d'assurer un profil de glycosylation stable entre les batchs. Cependant, ceci n'est pas toujours facile à contrôler, car la diminution des nutriments pendant la culture, particulièrement le glucose et la

glutamine, limite le processus de glycosylation (Nyberg *et al.*, 1999). La culture en fedbatch est une stratégie pour assurer la concentration constante de ces nutriments clés (Xie and Wang, 1997). D'autres paramètres de culture, comme le pH, la température, l'oxygène, des produits d'accumulation (ammoniaque) peuvent également avoir un effet significatif sur la distribution des glycannes sur la protéine recombinante (microhétérogénéité) (Butler, 2005).

- Développement à l'échelle industrielle

Les protéines recombinantes thérapeutiques produites par des cellules CHO ayant obtenu une AMM de la FDA sont listées dans le tableau 1 (page suivante) (Jayapal *et al.*, 2007).

Parmi les cellules de mammifères utilisées pour la production industrielle de protéines recombinantes, on peut citer le cas des hybridomes, résultant de la fusion d'un lymphocyte B de souris (producteur d'un anticorps spécifique) et d'un myélome (cellule à propriétés tumorales) afin de combiner les caractéristiques distinctes des deux cellules en une seule. Ces dernières peuvent donner à une cellule normale la capacité de se développer indéfiniment et à un taux qui excède la croissance normale des cellules. Une cellule hybridome produira l'anticorps monoclonal (mAb) qui a été à l'origine produit par la cellule du lymphocyte B, et de façon indéfinie. L'anticorps que la cellule originale de lymphocyte B produit dépend du genre d'antigène qui a été injecté à la souris avant que les cellules aient été recueillies.

Il a été nécessaire de développer des voies de recherche sophistiquées afin de produire des anticorps monoclonaux thérapeutiques recombinants pouvant être utilisés en thérapie humaine (Bellet and Dangles-Marie, 2005). Les travaux ont abouti à la production d'anticorps chimériques, c'est-à-dire composés de régions constantes murines et de régions variables humaines, ou d'anticorps humanisées ou humains.

Le marché mondial des anticorps monoclonaux thérapeutiques a connu une croissance exponentielle ces dernières années, puisque ces molécules représentent 40% des molécules thérapeutiques en développement dans le domaine des biotechnologies (PhRMA, 2008). Le seul marché des dix anticorps monoclonaux commercialisés en 2001 représentait 8 milliards de dollars et devait atteindre 16 milliards en 2008 (Pavlou and Reichert, 2004). En 2006, 21 anticorps monoclonaux étaient commercialisés (PhRMA, 2006), et actuellement 238 sont en développement (en essais cliniques)(PhRMA, 2008) .

Médicament	Protéines	Applications thérapeutiques	Compagnies	FDA autorisation
Recothrom™	Trombine α	Cicatrisation plaies chirurgicales	Zymogenetics	2008
Xyntha™	facteur VIII	Hémophilie A	Wyeth	2008
Vectibix™	Anti-EGFR mAb	Cancer colorectal métastatique	Amgen	2006
Myozyme™	α-glucosidase	Maladie de Pompe	Genzyme	2006
Aldurazyme™	Laronidase	Mucopolysaccharidose I	Genzyme	2006
Hylenex™	Hyaluronidase	Augmente l'absorption des autres médicaments	Halozyme Therapeutics	2005
Orencia®	Ig-CTLA4 fusion	polyarthrite rhumatoïde	Bristol-Myers Squibb	2005
Naglazyme™	N-acétylgalactosamine-4-sulfatase	Mucopolysaccharidose VI	Biomarin Pharmaceutical	2005
Luveris®	Hormone lutéinisante	Infertilité	Serono	2004
Avastin™	Anti-VEGF mAb	Cancer colorectal métastatique et de la langue	Genentech	2004
Advate™	Facteur VIII	Hémophilie A	Baxter	2003
Xolair™	Anti-IgE mAb	Asthme	Genentech	2003
Raptiva™	Anti-CD11a mAb	Psoriasis chronique	Genentech	2003
Fabrazyme™	α-galactosidase	Maladie de Fabry	Genzyme	2003
Rebif®	Interféron-β	Sclérose en plaques de type récurrente	Serono	2002
Humira™	Anti-TNF α mAb	Polyarthrite rhumatoïde	Abbott	2002
Aranesp™	Erythropoietine	Anémie	Amgen	2001
Campath™	Anti-CD52 mAb	Leucémie lymphoïde chronique	Genzyme, Bayer	2001
ReFacto™	Facteur VIII	Hémophilie A	Wyeth	2000
Tenecteplase™	Activateur tissulaire du plasminogène t-PA	Pathologie myocarde, infarctus	Genentech	2000
Herceptin™	Anti-HER2 mAb	Cancer du sein métastatique	Genentech	1998
Enbrel™	Récepteur au TNFα	polyarthrite rhumatoïde	Amgen, Wyeth	1998
Benefix™	Facteur IX	Hémophilie B	Wyeth	1997
Follistim™/Gonal-F®	Hormone stimulation follicule	Infertilité	Serono/ NV Organon	1997
Rituxan™	Anti-CD20	Lymphome non hodgkinien	Genentech, Biogen Idec	1997
Avonex™	Interféron-β	Sclérose en plaques de type récurrente	Biogen Idec	1996
Cerezyme®	β-glucocérébrosidase	Maladie de Gaucher	Genzyme	1994
Pulmozyme™	Deoxyribonuclease I	Fibrose kystique, mucoviscidose	Genentech	1993
Epogen™/ Procrit™	Erythropoïétine	Anémie	Amgen/Ortho Biotech	1989
Activase™	t-PA	Infarctus du myocarde aigu	Genentech	1987

Tableau 1 : Protéines recombinantes produites dans des cellules CHO, dont la commercialisation a été approuvée par la FDA (Jayapal et al., 2007).

1.2.5. les animaux transgéniques

- Les différents systèmes d'expression et leurs avantages

Les recherches sur la transgénèse animale ont débuté en 1980, avec l'obtention des premières souris transgéniques (Gordon *et al.*, 1980). Aujourd'hui, les techniques du génie génétique ont rendu possible l'induction de l'expression tissu-spécifique de protéines recombinantes, et leur adressage, en particulier dans le lait de l'animal (Soler *et al.*, 2006). L'opération consiste à isoler le gène codant pour la protéine d'intérêt, à l'associer à des éléments régulateurs (sous le contrôle du promoteur des gènes codant pour de la caséine par exemple) capables de diriger sa synthèse et sa sécrétion. Ensuite le gène peut être introduit par exemple (plusieurs méthodes existent) par microinjection dans les pronoyaux des embryons au stade une cellule (Houdebine, 2005). Plusieurs espèces d'animaux transgéniques peuvent produire des protéines recombinantes mais actuellement deux systèmes sont exploités.

Le premier consiste à produite la protéine dans le lait des animaux transgéniques de ferme. Ce système est étudié depuis 20 ans (Houdebine, 2008). Il a permis à une protéine, l'antithrombine III humaine, de recevoir l'autorisation de mise sur le marché en Europe par l'EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) en 2006 (société GTC Biotherapeutics). L'entreprise française BioProtein Technologies (créée en 1998 à Jouy en Josas) s'est spécialisée dans la production à la demande de protéines recombinantes dans le lait de lapines transgéniques, pour des entreprises pharmaceutiques, de biotechnologies ou pour des laboratoires publics.

Dans le second système, la protéine est produite dans le blanc d'œuf de poules transgéniques (Zhu *et al.*, 2005 ; Lillico *et al.*, 2007). Ce système est devenu récemment plus attractif suite à l'amélioration des méthodes d'obtention d'oiseaux transgéniques (Houdebine, 2008). Deux anticorps monoclonaux et l'interféron-β1a humain ont été produits dans le blanc d'œuf de poule (Zhu *et al.*, 2005 ; Lillico *et al.*, 2007).

Une grande variété de protéines recombinantes a été préparée à titre expérimental avec ces deux systèmes : des anticorps monoclonaux, des vaccins, des facteurs sanguins, des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines, des enzymes, des protéines du lait, du collagène, du fibrinogène (Houdebine, 2008). La production de protéines recombinantes dans le sang, le plasma séminal, les urines (Houdebine, 2000), les glandes séricigènes des vers à

soie (Royer *et al.*, 2005), l'hémolymphe des larves d'insectes (Markaki *et al.*, 2007) sont d'autres systèmes théoriquement exploitables mais moins développés à l'heure actuelle.

Plusieurs espèces de mammifères sont couramment étudiées et utilisées pour la production de protéines recombinantes dans leur lait : lapines, truies, brebis, chèvres, et vaches. Les lapines offrent un grand nombre d'avantages : génération facile de fondateurs et de progénitures transgéniques, grande fertilité, production relativement importante de lait, insensibilité aux maladies à prions, pas de transmissions de maladies sévères à l'homme. Les ruminants sont potentiellement mieux appropriés pour une grande production de protéines, mais les étapes de clonage ou d'utilisation de vecteurs lentiviraux pour l'intégration d'ADN étranger sont fastidieuses, leur reproduction est relativement lente. De plus, ils ne glycosylent pas les protéines aussi bien que les lapines ou les truies, et sont sensibles aux maladies à prions (Houdebine, 2008).

- Inconvénients

L'utilisation de ces systèmes d'expression nécessite une réflexion au préalable. En effet, il est nécessaire de tenir compte des effets secondaires indésirables que peut avoir la protéine sur les animaux transgéniques. Par exemple, le gène de l'hormone de croissance humaine associé au promoteur WAP (Whey Acidic Protein) de lapin s'exprime en dehors de la glande mammaire et peut perturber la croissance et la reproduction des animaux (Devinoy *et al.*, 1994). De même, le gène de l'érythropoïétine (EPO) humain exprimé dans ces mêmes conditions altère gravement la santé des lapins qui la produisent (Massoud *et al.*, 1996).

Un autre inconvénient de taille réside dans la purification de la protéine recombinante en quantités commercialement viables, qui est une étape délicate, compte-tenu de la complexité de la composition du lait (Goldman, 2003). Ceci dépend aussi du lieu d'expression de la protéine : dans la phase aqueuse du lait ou dans la membrane des globules gras (Houdebine, 2008). Enfin, la production de protéines recombinantes dans le lait d'animaux transgéniques se heurte également à des niveaux d'investissements très lourds, puisque le coût de la production d'un animal transgénique peut être estimé entre 20 et 300 milliers de dollars (suivant l'animal) (Wall, 1996).

- Glycosylation des protéines issues des animaux transgéniques

Un autre exemple de problème lié à la production de protéine dans le lait réside dans certaines modifications post-traductionnelles. La glande mammaire peut exprimer 2g de

protéines recombinantes par litre de lait (Melo *et al.*, 2007). A des concentrations plus élevées, les protéines ne sont pas correctement glycosylées (machinerie cellulaire saturée) (Houdebine, 2008). Par exemple, l'inhibiteur humain C1 produit dans le lait de lapine n'est pas complètement sialylé (Koles *et al.*, 2004).

Les anticorps monoclonaux secrétés dans le blanc d'œuf ne contiennent pas d'acide sialique (Zhu *et al.*, 2005). Ces modifications au niveau de la glycosylation peuvent engendrer une diminution du temps de demi-vie de la molécule et peuvent compliquer l'utilisation clinique. Dans d'autres cas, il peut en résulter des problèmes d'ordre immunitaire. Par exemple, les structures N-glycannes du facteur IX recombinant produites dans le lait de truie ne présentent pas d'acide sialique, ni de motifs Gal alpha(1,3)Gal, généralement très antigéniques pour l'homme (Gil *et al.*, 2008).

Malgré ces quelques inconvénients, il existe des cas de production de protéines par ce biais qui ont très bien fonctionné. Par exemple, la métalloprotéine superoxyde dismutase humaine produite dans le lait de lapines transgéniques a été produite sous forme active et tétramérique, normalement glycosylée et associée à l'ion cuivre (Stromqvist *et al.*, 1997).

Dans d'autres cas comme la production de l'anti-thrombine III humaine dans le lait de chèvre, la protéine produite contient deux formes d'acide sialique : l'acide N-acetylneuraminique NANA et l'acide N-glycosylneuraminique NGNA (Qun Zhou *et al.*, 2005). Seule la forme NANA est présente chez l'homme, et la seconde forme NGNA pourrait potentiellement induire une réponse immunitaire chez les patients.

Malgré cela, l'Atryn®, produit par la société américaine GTC biotherapeutics pour soigner la thrombose et l'embolie pulmonaire a été récemment acceptée par l'EMEA étant donné son utilité et des études prédisant une faible probabilité d'induire des effets délétères. Après un premier refus en février 2006 (en cause : le peu d'études menées sur la recherche d'anticorps développés par les patients en réponse à la protéine recombinante), l'AMM a été délivrée sous conditions de surveillance étroite des patients afin de détecter tout risque de production d'anticorps anti-ATryn. Ceci suggère donc que l'EMEA peut accepter une protéine recombinante légèrement différente de la structure native, du moment qu'elle est active et sans danger (Houdebine, 2008). La demande de BLA (Biologic License Application) pour ce médicament auprès de la FDA (US Food and Drug Administration) a été placée en « priority review » (suggérant une amélioration significative dans l'efficacité et la sécurité du traitement d'une grave maladie) et devrait être étudiée d'ici février 2009.

➢ Développement à l'échelle industrielle

Actuellement, outre l'antitrombine III, d'autres molécules sont produites dans le lait des animaux transgéniques (Tableau 1).

Protéines	Espèces animales	Applications	Compagnies
Antithrombine III*#	Brebis	Thrombose, Embolie pulmonaire	GTC Biotherapeutics (USA)
tPA	Brebis	Thrombose	PPL Therapeutics (UK)
α-antitrypsine*	Chèvre	Emphysème, Cirrhose	PPL Therapeutics (UK)
Facteur IX*	Chèvre	Hémophilie b	PPL Therapeutics (UK)
Facteur VIII*	Chèvre Truie	Hémophilie a	PPL Therapeutics (UK)
Anticorps polyclonaux*	Vache	Vaccins	Hematech (USA)
Lactoferrine*	Vache	Bactéricide	Pharming Group (NED)
C1 inhibitor*Δ	Lapine	Angioedème héréditaire	Pharming Group (NED)
Calcitonine	Lapine	Ostéoporose, hypercalcémie	PPL Therapeutics (UK)

Tableau 2 : Protéines recombinantes en phase cliniques produites par des animaux transgéniques. * : BLA en demande aux Etats-Unis auprès la FDA, Δ : AMM en demande en Europe auprès de l'EMEA, # : AMM délivrée en Europe par l'EMEA (Melo *et al.*, 2007).

1.2.6. Les plantes transgéniques

Même si les hybridomes et les cellules CHO sont les plus utilisés pour de telles productions, un autre système d'expression fait actuellement l'objet de nombreuses études et pourraient constituer une alternative économiquement intéressante : il s'agit des plantes transgéniques (Faye *et al.*, 2002).

1.2.6.1. Les avantages du système plante

Aujourd'hui, les systèmes de production de protéines recombinantes font essentiellement appel à la culture de cellules animales. Ce procédé reste relativement coûteux et sa capacité de production est limitée ce qui ne permet pas de couvrir la demande actuelle

grandissante en protéines thérapeutiques. En effet, les industries pharmaceutiques ont actuellement besoin de méthodes permettant une montée en échelle rapide, utilisant des techniques de purification simple et à moindre coût, avec une qualité reproductible. De plus, le système de production doit être capable de réaliser les modifications co et post-traductionnelles, incluant le clivage du peptide signal, l'adressage de la protéine, la formation des ponts disulfures, et la glycosylation.

L'utilisation de plantes transgéniques pourrait permettre de palier à cette forte demande en protéines d'intérêt notamment en anticorps. En effet, même si les rendements sont souvent encore limités dans les systèmes d'expression végétaux (Ma *et al.*, 1995), la capacité de production dans les plantes transgéniques est quasiment illimitée puisqu'elle dépend exclusivement des surfaces mises en culture (Negrouk *et al.*, 2005). Ainsi un "bioréacteur" végétal permettra d'obtenir jusqu'à 20 kg de protéines recombinantes par hectare qu'il s'agisse de tabac, de maïs, de soja ou de luzerne (Austin *et al.*, 1994). Enfin, le principal avantage des plantes transgéniques par rapport aux systèmes traditionnels de culture de cellules de mammifères en fermenteur, est que la production d'anticorps recombinants serait jusqu'à 500 fois moins coûteuse.

Outre ces deux points, le système de production de protéines thérapeutiques par les plantes présente d'autres avantages (Giddings *et al.*, 2000 ; Yusibov and Rabindran, 2008) :

- Les cellules végétales étant des cellules eucaryotes (comme les cellules humaines), elles disposent d'un système permettant dans de nombreux cas de produire des protéines complexes ayant des propriétés thérapeutiques équivalentes aux protéines humaines. Elles sont en effet capables d'effectuer toutes les modifications post-traductionnelles requises pour obtenir une molécule bioactive. Ceci est illustré par leur capacité à produire des protéines de mammifères complexes comme des protéines sanguines et plasmatiques, des antigènes, des facteurs de croissance, des hormones, des cytokines, des enzymes et des anticorps (tableau 3). La production d'immunoglobulines dans les cellules végétales est un bon exemple : ces dernières sont capables de synthétiser correctement, et d'assembler les chaines polypeptidiques lourdes et légères constituant un anticorps (Hiatt *et al.*, 1989 ; Peeters *et al.*, 2001).

Produits	Protéines/antigènes ciblés	Plantes	Références
Protéines sanguines et plasmatiques	Albumine	Pomme de Terre, Tabac	(Sijmons *et al.*, 1990 ; Farran *et al.*, 2002)
	Aprotinine	Maïs	(Zhong *et al.*, 1999)
	Collagène I **(CropTech Corp.)**	**Tabac**	(Ruggiero *et al.*, 2000)
	Encéphaline	Tabac	(Goddijn and Pen, 1995)
	Hémoglobine	Tabac	(Dieryck *et al.*, 1997)
	α1-Antitrypsine **(Applied Phytologics Inc.)**	**Riz**	(Terashima *et al.*, 1999 ; McDonald *et al.*, 2005)
Vaccins	Bet v1 (Allergene pollen de bouleau)	Tabac	(Krebitz *et al.*, 2000)
	Toxine B Cholera	Pomme de terre	(Arakawa *et al.*, 1999)
	Glycoprotéine B du CMV humain	Tabac	(Tackaberry *et al.*, 1999)
	Sous unité Toxine B Cholera fusionnée à l'insuline/HIV1gp120/rotavirus VP7	Pomme de terre	(Arakawa *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2004 ; Choi *et al.*, 2005)
	Peptide D2 de fibronective lié à la protéine B de *Staphylococcus aureus*	Haricot noir	(Brennan *et al.*, 1999)
	VP1 (contre la poliomyélite)	Luzerne, Haricot noir	(Wigdorovitz *et al.*, 1999 ; Dus Santos *et al.*, 2002)
	VP2 (contre la maladie de Gumboro)	*Arabidopsis thaliana*	(Wu *et al.*, 2004)
	VP4 (Contre le rotavirus)	Luzerne	(Wigdorovitz *et al.*, 2004)
	Hémaglutinine	Tabac	(Beachy *et al.*, 1996)
	HbsAg Antigène hépatite B **(AltaGen Bioscience inc)**	Tabac, **Pomme de Terre**	(Kong *et al.*, 2001 ; Sojikul *et al.*, 2003)
	Glycoproteine gp41	Soja	(Buratti *et al.*, 1998)
	Entérotoxine B d'*E.coli* **(Arizona State Univ, essais cliniques phase I)**	**Pomme de Terre,** Tabac	(Mason *et al.*, 1998)
	Toxine B du choléra de *Vibrio cholerae*	Pomme de Terre	(Arakawa *et al.*, 1998)
	Epitope de *P. falciparum* (Malaria)	Tabac	(Turpen *et al.*, 1995)
	Capside virus Norwalk **(Arizona State Univ, essais cliniques phase I/II)**	**Tabac, Pomme de Terre**	(Tacket *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2005)
	Protéine G du virus de la rage	Tabac, épinard, tomate	(McGarvey *et al.*, 1995)
	Auto-antigène	Pomme de Terre	(Ma *et al.*, 1997)

Hormones, cytokines, et facteurs de croissance	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) GM-CSF	Tabac, Canne à sucre	(Lee *et al.*, 1997 ; James *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2005)
	Interféron β	Tabac	(Edelbaum *et al.*, 1992)
	Interféron α **(BLX 883 Biolex, essais cliniques phase I/II)**	Tabac, Riz, **Lentilles d'eau**	(De Zoeten *et al.*, 1989 ; Zhu *et al.*, 1994)
	Interféron γ	Riz (Cellules)	(Chen *et al.*, 2004)
	Somatropine hGH	Tabac (chloroplaste)	(Cramer *et al.*, 1999)
	Erythropoïétine	Tabac (Cellules)	(Matsumoto *et al.*, 1995)
	Facteur de croissance épidermique	Tabac	(Goddijn and Pen, 1995)
	Facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF)	Mousse (*Physcomitrella patens*)	(Baur *et al.*, 2005)
	Interleukine 2	Pomme de Terre	(Park and Cheong, 2002)
	Interleukines 2 et 4	Tabac	(Magnuson *et al.*, 1998)
	Interleukine 10	Tabac	(Menassa *et al.*, 2004)
	Interleukine 12	Tabac	(Gutierrez-Ortega *et al.*, 2004)
	Facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF)	Riz, Tabac	(Panahi *et al.*, 2004)
	Insuline **(Sembiosys Genetics Inc., essais cliniques phase I)**	*A.thaliana*, **Carthame**	(Nykiforuk *et al.*, 2006), http://www.sembiosys.com/Products/Diabetes.aspx
Enzymes	Angiotensine	Tabac, Tomate	(Hamamoto *et al.*, 1993)
	Protéine C	Tabac	(Cramer *et al.*, 1996)
	Glucocérébrosidase **(Protalix, essais cliniques phase III)**	Tabac, **Cellules de Tabac**	(Reggi *et al.*, 2005)
	Alpha-trichosantine	Tabac	(Kumagai *et al.*, 1993)
	Acetylcholinesterase humaine	Tomate	(Mor *et al.*, 2001)
	Phosphatase alcaline humaine **(Phytomedics Inc.)**	**Tabac**	(Borisjuk *et al.*, 1999 ; Komarnytsky *et al.*, 2000)
	Lipase gastrique de chien	Tabac	(Gruber *et al.*, 2001)
	Transglutaminase humaine	Tabac	(Sorrentino *et al.*, 2005)

Anticorps (mAb, Fragments, IgG, ScFv, sIgA, Dig A…)	Contre l'antigène carcinoembryonique humain	Tabac, Riz, Blé	(Vaquero *et al.*, 1999 ; Stoeger *et al.*, 2000 ; Vaquero *et al.*, 2002)
	Contre le virus de la rage mAb	Tabac	(Ko *et al.*, 2003)
	Contre IgG humaine mAb	Luzerne	(Khoudi *et al.*, 1999)
	Contre antigène de surface du Streptocoque **(*CaroRx*™, Planet Biotechnology/Large Scale Biology Corp., essais cliniques phase II)**	**Tabac**	(Ma *et al.*, 1994 ; Larrick *et al.*, 2001)
	Contre l'antigène de surface du cancer du colon	Tabac	(Verch *et al.*, 1998)
	Contre HSV2, protéine du virus de l'Herpès **(Epicyte Pharmaceutical)**	Riz, **Soja**	(Zeitlin *et al.*, 1998 ; Briggs *et al.*, 2000)
	Contre Zearaleone (mycotoxine)	*A. thaliana*	(Yuan *et al.*, 2000)
	Contre la créatinine kinase-MM	*A. thaliana*, Tabac	(Neve *et al.*, 1993 ; Bruyns *et al.*, 1996 ; De Wilde *et al.*, 1996)
	Contre Ig de surface de tumeur (Lymphome non Hodkinien) **(Large Scale Biology Corp., Essais Clinique phase I OK)**	**Tabac**	(McCormick *et al.*, 1999)
	Contre glycoprotéine D du virus de l'herpes	Microalgue	(Mayfield *et al.*, 2003)
	Contre virus de l'hépatite B **(PlantGenix Inc.)**	**Tabac**	(Ramirez *et al.*, 2002)
	Contre CD30 et CD20 humain (lymphome d'Hodgkin/non Hodkin) mAb, **(Biolex Inc.)**	**Lentilles d'eau**	(Cox *et al.*, 2006)
Autres	Hirudine **(Sembiosys Genetics Inc.)**	Tabac, **colza**	(Parmenter *et al.*, 1995a)
	Avidine **(Prodigene Inc.)**	**Maïs**	(Hood *et al.*, 1997)
	Endostatine	Tabac	(Hong *et al.*, 2005)
	Facteur intrinsèque **(Cobento Biotech AS, essais cliniques phase II)**	***A.thaliana***	(Fedosov *et al.*, 2003)
	Lactoferrine humaine	Tabac, Riz	(Salmon *et al.*, 1998 ; Gruber and Spik, 2000 ; Nandi *et al.*, 2005)
	Apolipoprotéine **(Sembiosys Genetics Inc., essais précliniques)**	**Carthame**	http://www.sembiosys.com/Products/Stroke.aspx

Tableau 3 : Principales Protéines recombinantes et anticorps monoclonaux produits dans les plantes transgéniques. En gras souligné : entreprises/institutions développant la production pour une utilisation pharmaceutique (premières protéines pharmaceutiques dérivant de plantes susceptibles d'obtenir l'AMM et de gagner prochainement le marché) (Raskin *et al.*, 2002 ; Ma *et al.*, 2003 ; Lienard *et al.*, 2007a ; PhRMA, 2008)

- Il n'existe pas, en l'état actuel des connaissances, de pathogènes végétaux capables d'infecter l'homme et l'animal, éliminant ainsi le risque par exemple d'infection ou de contamination virale par les protéines produites par les plantes, à la différence des protéines produites par les cellules de mammifères ou d'animaux transgéniques. La sécurité biologique est donc assurée.

- Le niveau actuel des biotechnologies végétales permet de cibler de façon spécifique les tissus dans lesquels s'exprimera la protéine d'intérêt. En particulier, dans le cas du maïs, la protéine peut être ciblée dans les grains, permettant un stockage efficace et une bonne stabilité de la protéine d'intérêt.
- Enfin, la capacité de régénération et la pérennité du végétal sont des qualités qui entrent en compte pour la production de protéines recombinantes. La luzerne, par exemple, est un végétal bien adapté à la production de protéines recombinantes, en raison de la facilité de son bouturage et de l'homogénéité et de la stabilité de la descendance, le point négatif étant une possibilité accrue de persistance dans l'environnement. Ce problème de dissémination peut être solutionné par la culture des plantes en serre S2 mais sur des superficies restreintes.

1.2.6.2. Les limitations du système plante et les stratégies de contournement développées

1.2.6.2.1. La glycosylation chez les plantes

Un des inconvénients majeurs de la production de protéines recombinantes par des plantes transgéniques reste la glycosylation végétale.

En effet, si la production de protéines par les plantes est relativement aisée, leur utilisation en thérapie humaine est limitée car elles différent des protéines natives humaines par leurs motifs de glycosylation. Ceux-ci les rendent fortement allergéniques pour l'Homme, et modifient leur devenir et leur biodistribution dans l'organisme (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). Les plantes n'ont pas le même équipement enzymatique que les cellules de mammifères pour assurer les modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations sur les protéines. C'est dans les compartiments tardifs de l'appareil de Golgi que la maturation des N-glycannes diffère chez les plantes, en particulier en raison de l'ajout de résidus β1,2-xylose et d'α1,3-fucose à de très nombreux glycannes végétaux à la place d'un β1,4-N-

acetylglucosamine et d'un α1,6-fucose respectivement chez les mammifères (Lerouge *et al.*, 1998). De plus, l'addition de résidus β1,3-galactose et α1,4-fucose au N-acétylglucosamine terminal du N-glycanne forme une structure oligosaccharidide de Lewis a au lieu d'un β1,4-galactose combiné à l'acide sialique chez les mammifères (Figure 1).

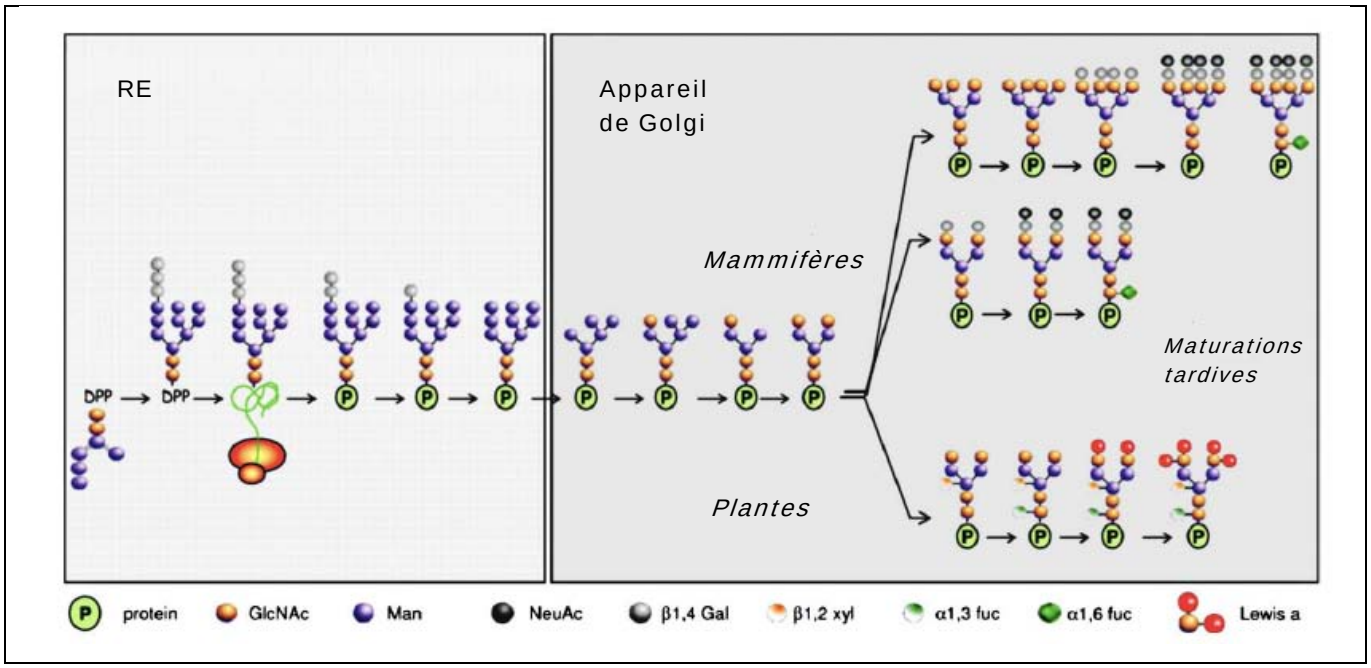


Figure 1 : Processus de N-glycosylation dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi chez les plantes et chez les mammifères (Lienard *et al.*, 2007a).

De nombreux travaux de type génie métabolique sont actuellement en cours afin de modifier la machinerie de glycosylation des végétaux. La plupart des stratégies étudiées afin d'humaniser les N-glycannes concernent l'inhibition de glycosyltransférases résidentes de l'appareil de Golgi ou l'expression de "nouvelles" glycosyltransférases dans ce compartiment.

L'analyse de mutants d'Arabidopsis a montré que l'inactivation d'une seule glycosyltransférase golgienne : la N-acétylglucosaminyltransférase 1 (GNT1), est suffisante pour complètement bloquer la biosynthèse de N-glycannes complexes chez les plantes (Von Schaewen *et al.*, 1993). Cette glycosyltransférase a été clonée chez plusieurs végétaux (Strasser *et al.*, 1999) et l'expression d'un antisens de GNT I dans des plants de tabac et de pomme de terre a montré une réduction de la biosynthèse de N-glycannes complexes chez les plantes transformées (Wenderoth and von Schaewen, 2000). De nombreuses glycosyltransférases végétales, et plus particulièrement la β1,2 xylosyltransférase et l'α1,3 fucosyltransférase, ont été récemment clonées et caractérisées par exemple chez le maïs (Bondili *et al.*, 2006). Le développement de nouvelles stratégies d'inhibition de ces enzymes,

comme la recombinaison homologue pourrait, dans un proche avenir, permettre la production de protéines d'intérêt thérapeutique non immunogènes chez les plantes.

A côté de ces approches par inactivation de glycosyltransférases, une autre stratégie prometteuse pour humaniser les N-glycannes végétaux est l'expression de "nouvelles" glycosyltransférases, comme par exemple la β1,4-galactosyltransférase (Bakker *et al.*, 2001). Elles vont compléter et/ou inactiver par compétition la machinerie endogène de maturation des N-glycannes de la cellule végétale, en ajoutant des résidus galactose aux résidus terminaux N-acetylglucosamine.

La présence de glycannes sialylés endogènes chez les plantes est sujette à controverse : les résultats de l'équipe de Shah (Shah *et al.*, 2003) ont montré l'existence de glycoconjugués sialylés dans les cellules végétales, alors que les mêmes expériences reproduites par Séveno et ses collaborateurs (Séveno *et al.*, 2004) ont révélé que si l'acide sialique est détecté, il n'était pas associé aux structures N-glycanniques. L'expression d'une α-2,6 sialyltransferase mammalienne biologiquement active dans l'appareil de Golgi chez *Arabidopsis thaliana* n'a pas suffi pour obtenir une sialysation correcte (Wee *et al.*, 1998). En effet, l'obtention de glycannes sialylés chez les plantes, en adaptant la machinerie de maturation des N-glycannes végétaux, nécessiterait le transfert d'au moins cinq gènes hétérologues différents codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide sialique dans le cytosol et son transport dans l'appareil de Golgi (Faye *et al.*, 2005 ; Lienard *et al.*, 2007a). Ainsi, la production de glycoprotéines recombinantes sialylées chez les plantes représente un nouveau défi dans le domaine des biotechnologies végétales.

1.2.6.2.2. L'adressage des protéines et leur extraction-purification

L'adressage des protéines recombinantes vers des organes spécifiques (feuilles, graines, racines) et des compartiments cellulaires (réticulum endoplasmique, chloroplaste, vacuole, corps lipidiques) est possible chez les plantes et permet d'augmenter le rendement et de simplifier les premières étapes de l'extraction-purification. Lorqu'on souhaite surexprimer une protéine, celles-ci est adressée préférentiellement vers des organes de la plante ayant une biomasse importante pour optimiser le rendement. On utilise pour cela des promoteurs adaptés. Par exemple, dans le cas de plantes ayant un feuillage important comme le tabac ou la luzerne, l'expression de la protéine recombinante est ciblée dans le feuillage. Par contre, dans le cas de la pomme de terre, le maïs, le blé, le soja, le riz, le colza ou le carthame, les

protéines sont adressées vers le tubercule ou la graine (Lienard *et al.*, 2007a). Chacun de ces systèmes offre des avantages et des inconvénients :

Le feuillage permet un niveau de synthèse élevé (Ullah, 2003), mais présente une activité protéasique élevée empêchant l'accumulation de certaines protéines. Par ailleurs, les feuilles contiennent parfois des substances gênantes, oxydantes, difficiles à éliminer (polyphénols présents dans les feuilles de tabac) (Schiermeyer *et al.*, 2005). Le tabac génétiquement transformé est utilisé par exemple pour la production d'hémoglobine humaine (Dieryck *et al.*, 1997). Les protéines recombinantes doivent être extraites de ces feuilles rapidement car elles peuvent être dégradées (Benchabane *et al.*, 2008).

Les limitations de la graine proviennent d'une capacité plus réduite de synthèse, et de l'obligation d'attendre la floraison avec un risque accru de dispersion du transgène. Par contre, le milieu d'accumulation des protéines, à faible teneur en eau, est plus stable. Les grains de maïs transgéniques sont utilisés par exemple pour la production de lipase gastrique (Zhong *et al.*, 2006). L'expression du gène codant pour la protéine recombinante a lieu dans la graine seulement. Ces dernières peuvent être stockées 2 à 3 ans sans que la protéine recombinante ne s'altère. En effet, les vacuoles de cellules de graines présentent une plus faible activité hydrolytique que les vacuoles des autres cellules. Par exemple, l'albumine humaine exprimée dans les vacuoles de cellules d'endosperme de grains de blé a montré une très bonne stabilité (Arcalis *et al.*, 2004).

D'autres compartiments cellulaires ont été ciblés pour la production de protéines chez les plantes. L'expression peut se faire également dans un fruit comme la banane ou la tomate, permettant la production par exemple de vaccins oraux (Sala *et al.*, 2003b).

L'expression des protéines recombinantes dans les chloroplastes offre quelques avantages, notamment des rendements très élevés. Le transgène est introduit dans les organites par bombardement de particules et est intégré directement dans le génome du chloroplaste par recombinaison homologue (Staub *et al.*, 2000). Un chloroplaste possède son propre génome, sous forme d'ADN circulaire (200Kb), et chaque chloroplaste contient environ 100 copies identiques du génome. Comme une cellule contient une centaine de chloroplastes, il en résulte qu'elle peut renfermer environ 10 000 copies du transgène. Cette transformation stable des chloroplastes permet donc l'accumulation de grandes quantités de protéines. Bénéficiant d'une faible activité protéolytique, une protéine exprimée dans cette organelle peut représenter plus de 20% des protéines totales de la feuille (Lienard *et al.*,

2007a). Dans certains cas, quand la concentration en protéines recombinantes exprimées dans le chloroplaste est trop élevée, des corps d'inclusion contenant les protéines peuvent se former, simplifiant ainsi la purification. Mais les chloroplastes n'ont pas la capacité de glycosyler les protéines, et semblent uniquement adaptés à la production de molécules simples. A noter qu'une voie alternative permettant l'adressage de glycoprotéines dans le chloroplaste (comme compartiment de stockage) par la voie sécrétoire (RE, Golgi) a été récemment décrite chez *Arabidopsis thaliana* (Villarejo *et al.*, 2005 ; Faye and Daniell, 2006).

Le principal inconvénient de ces systèmes de production de protéines recombinantes dans le feuillage, les graines ou les chloroplastes est lié à la nécessité d'étapes lourdes d'extraction-purification de la protéine recombinante à partir du tissu végétal. En effet, la protéine recombinante est insérée dans la matrice du tissu végétal, ce qui rend son extraction et sa purification difficile à mettre en œuvre, alors même que cette étape doit être réalisée le plus rapidement possible du fait de la protéolyse rapide *in planta* (Benchabane *et al.*, 2008). Ces étapes d'extraction- purification peuvent représenter plus de 80% des coûts de production d'une protéine recombinante (Hellwig *et al.*, 2004), la récupération est donc au centre même de la rentabilisation du procédé. Cette dernière étape limite donc les avantages des systèmes actuels de production de protéines recombinantes par des plantes transgéniques. Il existe par conséquent un besoin réel de systèmes de production qui conservent les avantages des systèmes de production actuels utilisant des plantes transgéniques tout en limitant fortement leurs inconvénients, notamment en simplifiant considérablement l'extraction-purification de la protéine recombinante.

Des procédés ont ainsi été mis au point pour simplifier les phases initiales de purification.

Par exemple, chez certaines plantes oléagineuses, la protéine recombinante peut être fusionnée à une protéine (oléosine) faisant partie intrinsèque des corps lipidiques qui s'accumulent dans la graine lors de sa maturation. En combinant cette fusion avec une expression ciblée dans la graine, un système d'expression/purification simple a été mis au point : la protéine recombinante est récupérée avec les lipides, par centrifugation de l'homogénat. Puis elle est séparée de la fusion par protéolyse dirigée et est extraite de la fraction lipidique lors d'une seconde séparation de phase. Cette stratégie a été utilisée pour la production de l'hirudine dans le colza, un anticoagulant sécrété par les glandes salivaires de sangsue (Parmenter *et al.*, 1995b ; Boothe *et al.*, 1998). Cette stratégie a été adaptée à la

purification d'anticorps recombinants produits dans les graines d'une autre plante oléagineuse, le carthame (par la société Sembyosis Genetics). La plante transgénique produit et accumule deux protéines recombinantes dans deux compartiments cellulaires distincts de la graine : un anticorps et une protéine présentant une forte affinité pour cet anticorps, la protéine A produite en fusion avec l'oléosine. La protéine A fusionnée à l'oléosine et l'anticorps forment des complexes lors du broyage de la graine. Ces complexes sont facilement isolés et purifiés avec la phase lipidique de l'extrait. Enfin, les anticorps sont libérés après dissociation des complexes dans des conditions de pH acide (WO/1998/027115. Sembyosis Genetics Inc. Moloney *et al.*, 1998). Une stratégie similaire visant à augmenter le niveau d'expression, à faciliter la purification et à réduire la protéolyse des protéines d'intérêt a été développé pour la production d'insuline dans les corps lipidiques de graines d'*Arabidopsis thaliana* (Nykiforuk *et al.*, 2006).

1.2.6.2.3. Adressage des protéines vers la voie sécrétoire

Chez les plantes et les animaux, le réticulum endoplasmique permet l'entrée des protéines dans la voie sécrétoire, ce qui assure l'assemblage correct des protéines. Beaucoup de protéines recombinantes produites dans les plantes sont secrétées dans l'espace intercellulaire ou l'apoplaste (Streatfield, 2007). Cet adressage dépend seulement de la présence d'un peptide signal en partie N-terminale de la protéine, clivé pendant l'insertion traductionnelle du peptide en formation dans le RE.

Il a été observé que les protéines recombinantes adressées vers la voie sécrétoire, peuvent être excrétées dans les rhizosecrétions des racines, dans des quantités plus importantes que dans les tissus racinaires (Borisjuk *et al.*, 1999). Cette technologie, développée par l'entreprise Phytomedics (Fischer *et al.*, 2004), permet de supprimer l'étape d'extraction de la protéine des tissus et de simplifier le processus de purification. Récemment, des immunoglobulines ont été produites dans leur forme active dans les rhizosécrétions de tabac transgénique (Drake *et al.*, 2003). Les protéines recombinantes GFP et la phosphatase alcaline placentaire humaine ont également été exprimées dans les fluides issus de la guttation de feuilles de tabac transgéniques (Komarnytsky *et al.*, 2000).

Alors que la sécrétion extracellulaire des protéines est une voie dépendant uniquement de la présence d'un peptide signal, l'adressage final des protéines vers un autre compartiment comme le RE ou la vacuole nécessite des signaux supplémentaires, comme la fusion de

signaux de rétention KDEL ou HDEL à l'extrémité C-terminale (Wandelt *et al.*, 1992 ; Gomord *et al.*, 1997) ou la présence d'un VSD (vacuolar sorting determinant) sur la séquence de la protéine (Benchabane *et al.*, 2008).

1.2.6.2.4. L'activité protéolytique et la stabilité des protéines recombinantes

Les protéases présentes dans les différents compartiments de la plante peuvent altérer la stabilité des protéines recombinantes pendant leur extraction des tissus (Michaud *et al.*, 1997). Les protéases vacuolaires, actives à pH acide, sont très dommageables pour l'intégrité des protéines secrétées dans ce compartiment. Comme décrit ci-dessus, des stratégies d'adressage vers les compartiments RE ou vers les chloroplastes, ayant une plus faible activité protéolytique sont développées. Récemment, il a été mis en évidence qu'il était possible de bloquer l'activité des protéases *in planta* grâce à des inhibiteurs de protéase recombinant, permettant d'augmenter la production de protéines dans les organes cibles, sans compromettre le développement de la plante hôte (Benchabane *et al.*, 2008). Par exemple, l'expression de l'oryzacystatine I, un inhibiteur de protéinase à cystéine de riz, dans le cytoplasme de cellules foliaires de tabac transgénique, a montré une augmentation de 40% de la quantité de protéines solubles dans les feuilles (Van der Vyver *et al.*, 2003). De la même façon, des lignées de pomme de terre transgéniques exprimant un inhibiteur de protéase à aspartate (cathepsine D de tomate) ont vu leur niveau de protéines totales dans les feuilles augmenter de 35% par rapport à une plante sauvage, ceci sans affecter la croissance de la plante (Rivard *et al.*, 2006).

1.2.6.2.5. L'optimisation des codons

L'optimisation des codons du gène d'intérêt peut aussi permettre d'augmenter le niveau d'expression de la protéine dans la plante de 5 à 100 fois (Perlak *et al.*, 1991 ; Hamada *et al.*, 2005). En effet, le code génétique étant redondant, certains codons sont utilisés préférentiellement par certains organismes, notamment par les plantes.

1.2.6.2.6. Le « gene silencing » et les suppresseurs

Un autre problème se pose dans le système plante. Au cours de l'évolution, les plantes ont développé un mécanisme de défense permettant de se protéger contre les infections virales. Lorsque les ARN viraux sont présents en quantité trop importante dans une cellule, un système de régulation spécifique appelé « gene silencing » post transcriptionnel (PTGS) se met en place. Or la surexpression de gènes chez les plantes transgéniques s'apparente à la présence surnuméraire de certains ARN. En effet, ce mécanisme se met en place en présence d'ARN viral dans la plante, mais aussi en présence d'ARN étranger (Vaucheret and Fagard, 2001), notamment sous contrôle d'un promoteur fort. Dans les plantes transformées, l'inactivation épigénétique post-transcriptionnelle correspond à la dégradation spécifique des ARN messagers (ARNm) codés par le transgène par la production massive d'ARNi double brin (ARN interférence) de 20-30 paires de bases complémentaires. L'ARNdb est dégradé par une nucléase de type Rnase III en petites molécules d'ARN de 21 à 23 nucléotides de long qui vont servir de guide à un complexe multi-enzymatique pour dégrader tous les ARN messagers homologues (Pfeffer *et al.*, 2003). Le transgène est alors éteint. Cette extinction post-transcriptionnelle peut être associée à un phénomène de « gene silencing » transcriptionnel (TGS) correspondant à la méthylation du gène en question, bloquant sa transcription (Sijen *et al.*, 2001).

Plusieurs stratégies peuvent être adoptées pour éviter ce phénomène, en exprimant par exemple simultanément au gène d'intérêt un suppresseur de silencing. Il existe en effet des suppresseurs viraux de gene silencing. Par exemple, le HC-Pro (Helper Component Proteinase) est capable de bloquer la production d'ARNi mais il n'intervient pas dans la méthylation (Mallory *et al.*, 2001 ; Ma *et al.*, 2008). Précédemment, un autre gène a été mis en évidence, le gène *rgs-CaM* chez le tabac. Il code pour une protéine liant le calcium capable d'inhiber le « gene silencing » et interagit avec HC-Pro dans le mécanisme de suppression du PTGS (Anandalakshmi *et al.*, 2000). Un des meilleurs suppresseurs caractérisé est la protéine p19 provenant du Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV) (Qiu *et al.*, 2002). Ce suppresseur, co-exprimé avec une protéine recombinante a permis d'augmenter de 50 fois le niveau d'expression de la protéine d'intérêt (Voinnet *et al.*, 2003).

1.2.6.3. Systèmes d'expression végétaux émergeants

Le tabac, le maïs, le riz, la luzerne sont des plantes très fréquemment utilisées pour la production de protéines thérapeutiques, Cependant, quelques nouveaux systèmes d'expression à partir de plantes émergent dernièrement.

- Les lentilles d'eau

La société américaine Biolex Therapeutics utilise comme plate-forme de production, les plantes aquatiques *Lemna* et *Spirodela* (developpée par l'entreprise française LemnaGene rachetée par Biolex en 2005) de la famille des Lemnacées, afin de produire des protéines pour l'industrie pharmaceutique et vétérinaire. Ce sont des plantes aquatiques (figure 2, A) ayant la capacité de se développer naturellement dans un environnement simple. Elles sont donc très adaptées à la culture intensive, puisque leur biomasse peut doubler en 24 à 48h. La présence d'un peptide signal permet la sécrétion des protéines recombinantes dans le milieu de culture extracellulaire, réduisant les coûts d'extraction et de purification (Gasdaska *et al.*, 2003). Des travaux récents ont permis de produire des anticorps monoclonaux ne comportant pas de N-glycannes végétaux dans des plantes où a été inhibée l'expression des gènes codant pour les enzymes β1,2 xylosyltransférase et l'α1,3 fucosyltransférase par ARNi (Cox *et al.*, 2006). L'entreprise Biolex développe actuellement à grande échelle (figure 2, B) des plantes produisant l'interféron α (essais cliniques de phase II), une plasmine et un anticorps contre le lymphome non hodgkinien (essais précliniques).



Figure 2 : La lentille d'eau *Lemna minor* et la culture en bioréacteurs. A : Feuilles de *Lemna minor* à la surface de l'eau. **B** : Culture à grande échelle de la plante aquatique *Lemna minor* (Biolex Therapeutics).

➢ Les mousses

Physcomitrella patens (figure 3) est une espèce de mousse bryophyte adventice des cultures et des milieux ouverts. La transformation génétique de *Physcomitrella patens* s'effectue par la méthode du transfert direct d'ADN dans des protoplastes (à partie de cellules de protonéma) par précipitation au polyéthylène glycol (Schaefer *et al.*, 1991). Il a été démontré que la voie principale d'intégration d'ADN exogène dans le génome de *Physcomitrella* est l'intégration ciblée par recombinaison homologue (Schaefer and Zryd, 1997). Ceci ouvre la voie à la génération directe de mutants knock-out et knock-in de gènes codant pour des enzymes de la glycosylation, et à la production de protéines non immunogéniques pour l'Homme (Koprivova *et al.*, 2004 ; Decker and Reski, 2007).

La génération de plantes transgéniques stable prend environ 8 semaines, et la culture en photo-bioréacteurs de verre est désormais maîtrisée. Une protéine thérapeutique a déjà été produite dans ce système : le facteur de croissance endothéliale vasculaire VEGF (Baur *et al.*, 2005). Cette technologie est développée par l'entreprise allemande Greenovation Inc (Fischer *et al.*, 2004)**.**



A



B

Figure 3 : La mousse *Physcomitrella patens* et la culture de protoplastes en photo-bioréacteurs. A : gamétophyte de *Physcomitrella patens***, B :** photobioreacteur.

➢ Les microalgues

Les algues sont un système de production de protéines thérapeutiques en pleine émergence. Les espèces phares sont *Chlamydomonas reinhardtii, Dunaliella salina, Phaeodactylum tricornutum, Chorella vulgaris,* et *Tetraselmis suecica.* L'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Figure 4) est actuellement la mieux étudiée pour la production de protéines recombinantes par transformation des chloroplastes (Leon-Banares *et al.*, 2004). La culture de ces algues en photo-bioréacteurs confinés de 500 000 L est maîtrisée, réduisant

les risques de dissémination et de pollution génique. Elles procurent d'excellents rendements en biomasse et restent compétitives en termes de coût de production. Elles exigent pour leur développement de l'eau (douce ou salée), des éléments nutritifs, du carbone et de la lumière (Cadoret *et al*., 2008). Le taux de division cellulaire rapide (de l'ordre de 8h) permet d'atteindre des densités cellulaires élevées rapidement. Elles ont également la capacité d'excréter la protéine dans le milieu extracellulaire, ce qui réduit fortement les coûts de purification (Franklin and Mayfield, 2004 ; Mayfield and Franklin, 2005). Un fragment d'anticorps monoclonal humain produit dans ces algues a été correctement assemblé, avec la capacité de se lier à l'antigène (Mayfield *et al*., 2003). Par contre, ces protéines produites à partir de chloroplastes ne sont pas glycosylées, et très peu d'études ont été menées à ce sujet (Cadoret *et al.*, 2008).

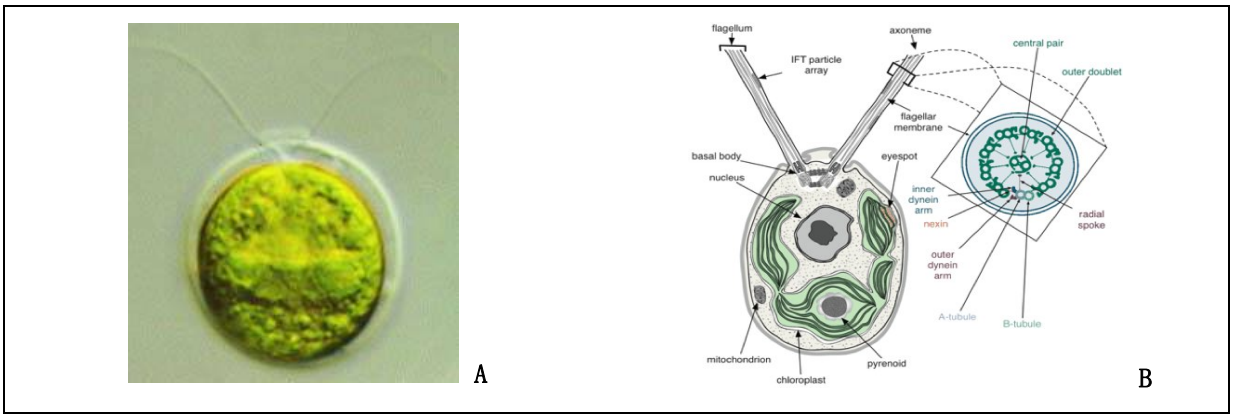


Figure 4 : Photographie (A) et schéma (B) de *Chlamydomonas reinhardtii*. (Source : http://i.treehugger.com/images/2007/10/24/chlamydomonas%20genome.jpg)

➢ Culture de cellules végétales

La culture de cellules végétales offre beaucoup d'avantages par rapport à des plantes entières pour la production de protéines recombinantes. En effet, les cellules végétales cultivées en conditions *in vitro* stériles peuvent se développer très rapidement, comme par exemple les cellules BY2 (Bright Yellow 2) de tabac (Hellwig *et al.*, 2004). En effet, dans des conditions optimales, elles doublent leur nombre en 12h de culture permettant d'obtenir rapidement une large biomasse. Le potentiel de ces cellules pour la production de protéines thérapeutiques a récemment été illustré. Elles ont été utilisées pour synthétiser deux allergènes recombinants d'acariens très immunoréactifs, pouvant être utilisés dans le diagnostic allergique et en immunothérapie (Lienard *et al.*, 2007b). Ce système offre de nombreux avantages : conditions contrôlées, faibles coûts de purification grâce à la sécrétion des

protéines dans le milieu de culture. Mais ces avantages économiques sont contrebalancés par le coût élevé des bioréacteurs nécessaires à la culture de ces cellules. Alors que les motifs de glycosylation sont différents suivant l'âge de la feuille d'un plant de tabac (Elbers *et al.*, 2001), les motifs de glycosylation sont reproductibles d'un batch à l'autre dans les cultures de cellules BY2, et des études en cours ont montré la possibilité de complémenter le milieu de culture en vue de diminuer l'hétérogénéité des N-glycannes (Lienard *et al.*, 2007a).

1.2.6.4. Etat du marché des protéines recombinantes végétales

A l'heure actuelle, le marché des protéines recombinantes végétales est toujours au stade émergeant. En effet, même si certaines molécules sont produites en tant que réactifs de diagnostic (Trypzean® (trysine bovine issue maïs transgénique) de Prodigène Inc, Apronexin® (aprotinine bovine issue de Tabac transgénique) de Large scale Biology Corp., la lactoferrine humaine et le lysosyme humain issus de riz transgéniques de Ventria Bioscience, l'avidine de poulet (issues de Maïs transgénique) de Prodigene Inc., tous vendus par Sigma-Aldrich (ref Sigma T3568, A6103, L4040, L1667, A8706)), aucune molécule pour la thérapie humaine issue de plantes n'a encore rejoint le marché. Certaines sont en essais cliniques à des stades avancés (tableau N°3, page 14) : CaroRX™ développé par Planet Biotechnology et Large Scale Biology Corp. a été notamment le premier anticorps issus de plantes à atteindre les essais cliniques. C'est un anticorps monoclonal sécrétoire SIgA-G produit dans les feuilles et la tige de tabac transgénique. Il se lie à une protéine située sur la surface des bactéries des espèces *S. mutans* et *S. sobrinus*. Ces bactéries utilisent cette protéine pour adhérer à la surface dentaire. L'accrochage de cet anticorps à ces bactéries à l'intérieur de la bouche permettra d'empêcher l'adhésion de ces mêmes bactéries aux dents et ainsi permettre de prévenir les caries, notamment chez l'enfant (Walsh, 2006).

1.2.7. Comparaison des différents systèmes de production

Les différents motifs de glycosylation produits par les différents systèmes de production de protéines recombinantes (décrits précédemment) sont résumés sur le schéma suivant :

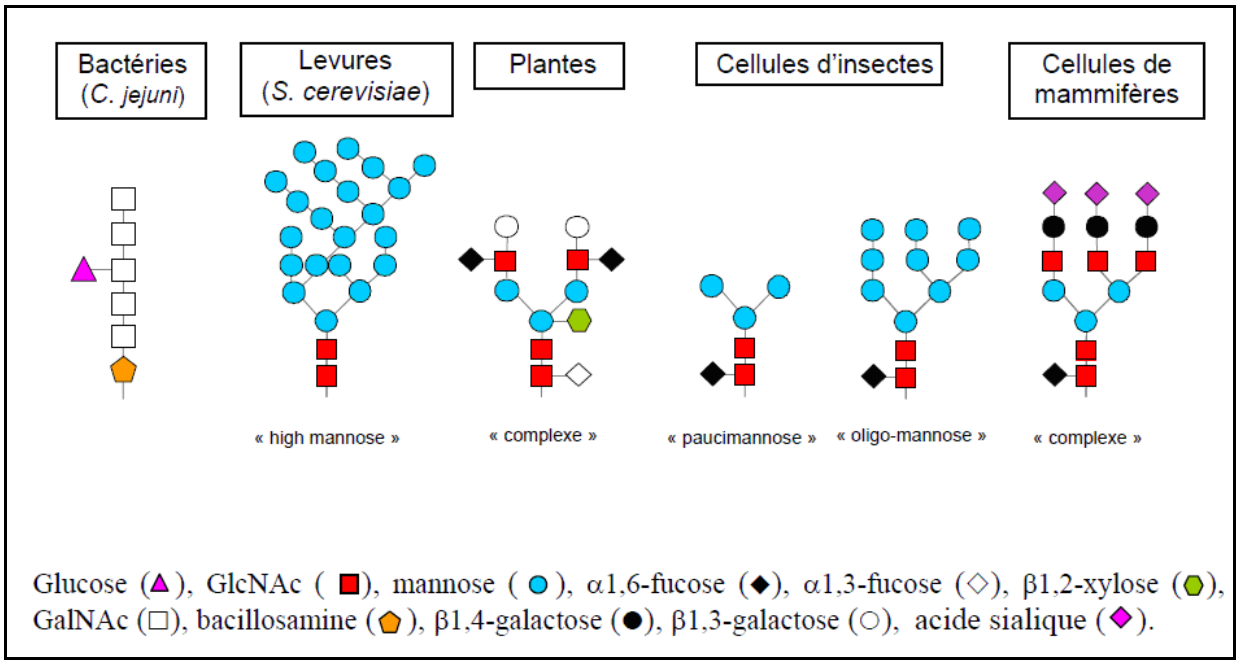


Figure 5 : Exemples de structures N-glycanniques caractéristiques des glycoprotéines en fonction du système d'expression considéré (Kochanowski, 2005).

Les avantages et les inconvénients des différents systèmes de production, en termes de coûts, de productivité, de sécurité et d'authenticité sont résumés dans le tableau ci dessous.

Systèmes de production	Cout de production	Cout d'extraction purification	Temps de production	Capacité de production	Qualité	Cout de stockage	Glycosylation	Risques de contaminations
Bactérie	Faible	Moyen	Court	Elevé, Centaines de mg/L	Médiocre	Modéré (-20°C)	Aucune	Endotoxines
Levures	Moyen	Faible	Moyen	Elevé, 200 mg/L	Moyenne	Modéré (-20°C)	Incorrecte	Risques faibles
Baculovirus/ Cellules d'insectes	Moyen	Faible	Court	Moyen, 10 à 100 mg/L	Bonne	Cher (N_2)	Différences majeures	Risques faibles
Cellules de mammifères	Elevé	Faible	Long	Moyen, Qq dizaines mg/L	Très Bonne	Cher (N_2)	Correct	Virus, prions et ADN oncogénique
Animaux transgéniques	Elevé	Elevé	Très long	Très élevé, Qq g/L	Très Bonne	Cher	Correcte	Virus, prions et ADN oncogénique
Cultures cellulaires végétales	Moyen	Faible	Moyen	Moyen	Bonne	Modéré	Différences mineures	Risques faibles
Plantes transgéniques	Très faible	Elevé	Long	Très élevé 600mg/kg Mat fraiche	Bonne	Peu cher (T°C ambiante)	Différences mineures	Risques faibles

Tableau 4 : Comparaison des différents systèmes d'expression de protéines recombinantes (Fischer and Emans, 2000 ; Ma *et al.*, 2003 ; Dingermann, 2008)

Les plantes présentent donc de nombreux avantages comparées aux systèmes d'expression traditionnels. Ceci inclut le faible coût de production, la possibilité de monter en échelle rapidement, l'absence de pathogènes pour l'homme, la capacité d'assembler des protéines complexes et de les adresser dans certains tissus. Cependant, pour que ce système devienne totalement viable, des progrès sont à faire du côté de l'humanisation des motifs de glycosylations, et de l'extraction/purification des protéines.

1.3. Contexte concurrentiel et économique

L'industrie pharmaceutique et les sociétés de biotechnologie sont confrontées à un défi majeur : celui de disposer de systèmes de production de protéines recombinantes qui puissent répondre à leurs contraintes à la fois en termes de qualité, de quantité produite et de rentabilité. Il existe au niveau mondial un déficit de capacité de production de ces protéines recombinantes, car les systèmes actuellement disponibles ne permettent pas de produire la quantité et la qualité pour un coût raisonnable, ce qui limite le développement de nouveaux traitements thérapeutiques. Ce besoin va s'accentuer dans les années à venir. Depuis la fin des années 1990, plus de 280 protéines recombinantes thérapeutiques, dont une vingtaine d'anticorps monoclonaux, sont commercialisées, représentant un chiffre d'affaire estimé à près de 49 milliards de dollars US en 2006. Ce segment connaît une croissance de 20% par an contre 7% pour l'industrie pharmaceutique globale et près de 2200 nouvelles protéines recombinantes sont actuellement en phase clinique (Cadoret *et al.*, 2008). Le système d'expression constitué par les plantes transgéniques est une voie prometteuse pour synthétiser des protéines d'intérêt avec des coûts réduits (Boehm, 2007). Comme les systèmes eucaryotes, elles sont capables de réaliser toutes les maturations post-traductionnelles nécessaires à l'obtention de protéines thérapeutiques humaines conformes (Gomord and Faye, 2004 ; Saint-Jore-Dupas *et al*., 2007).

1.4. Deux exemples de protéines recombinantes modèles

1.4.1. L'interféron gamma

Le gène de l'interféron gamma (IFNγ) se trouve sur le chromosome 12 humain. La protéine compte 166 acides aminés. Un peptide signal de 23 acides aminés est clivé dans le réticulum endoplasmique, générant ainsi une protéine comportant 143 résidus (Gray and Goeddel, 1982). Son extrémité N-terminale est bloquée par un résidu glutamine sous forme de pyroglutamate (Rinderknecht *et al.*, 1984). L'extrémité C-terminale peut être partiellement clivée de plusieurs acides aminés avant sécrétion. La masse moléculaire de la protéine découlant de la structure primaire est théoriquement voisine de 17,1 kDa (Gray *et al.*, 1982). La structure tridimensionnelle de l'IFNγ a été établie par Ealick et ses collaborateurs (Ealick *et al.*, 1991). Il est constitué de deux monomères identiques. Chaque monomère est constitué de six hélices α reliées par plusieurs boucles. Il n'apparaît pas de feuillet β. La forme monomérique est active (Sareneva *et al.*, 1994).

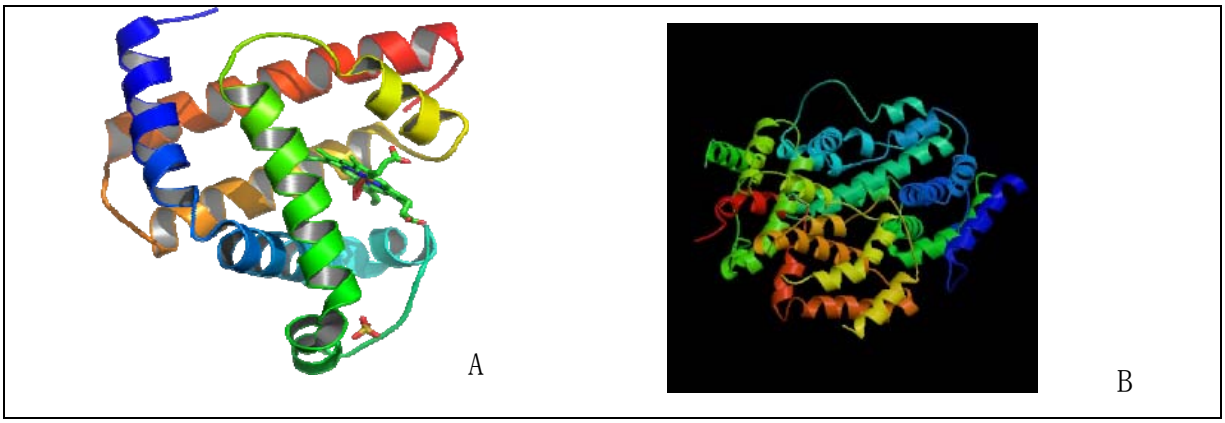


Figure 6 : Structure tri-dimensionnelle de l'interféron-gamma (forme monomère (**A**) et dimère (**B**) (Ealick *et al.*, 1991))

- La glycosylation de l'IFN-γ

L'IFNγ humain possède deux sites potentiels de N-glycosylation, les résidus asparagines 25 (Asn 25) et 97 (Asn 97). En revanche, cette protéine ne possède pas de site de O-glycosylation.(Sareneva *et al.*, 1996 ; Goldman *et al.*, 1998)

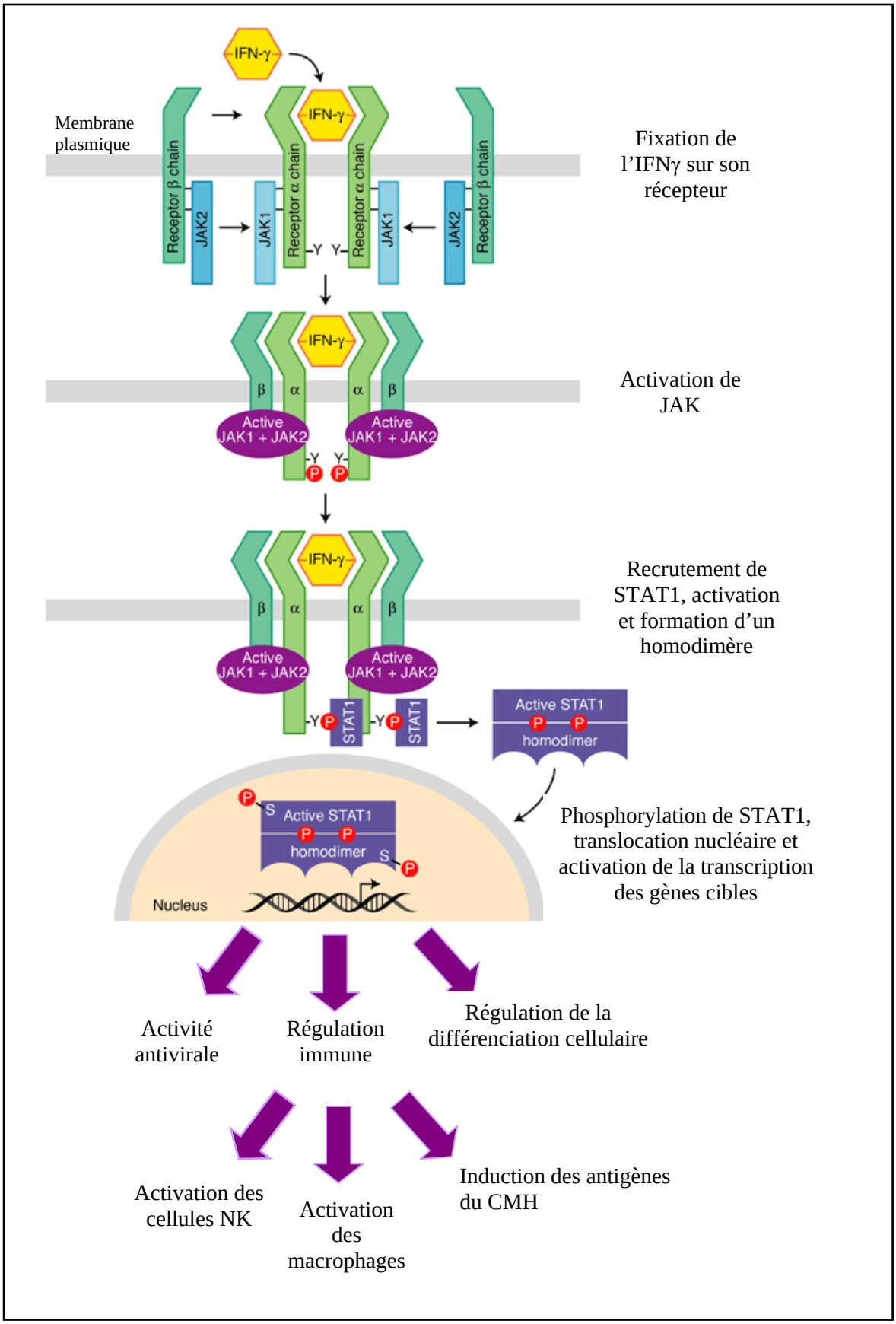
Il en résulte trois glycoformes possibles distinctes, suivant la variation d'occupation des sites de glycosylation. On distingue ainsi des molécules d'IFNγ glycosylées sur deux sites (glycoforme 2N), sur un site (glycoforme 1N) et sur aucun site (glycoforme 0N) (Goldman *et al.*, 1998 ; Kochanowski *et al.*, 2008).

L'IFNγ non glycosylé est biologiquement actif (Littman *et al.*, 1985). Mais la présence des glycannes sur la protéine peut améliorer certaines propriétés biologiques. En effet, l'occupation du site Asn 25 par une structure glycannique favorise sa dimérisation, sa sécrétion (Sareneva *et al.*, 1994) et sa résistance aux protéases (Sareneva *et al.*, 1995). De plus, la demi-vie circulatoire de l'IFNγ non glycosylé se trouve amoindrie en comparaison avec l'IFNγ doublement glycosylé (Sareneva *et al.*, 1993). L'antigénicité et l'activité anti-virale sont également modifiées par la présence des structures oligosaccharidiques (Meager and Leist, 1986).

- Fonction biologique :

L'IFNγ appartient à la famille des cytokines. Chez l'homme, l'IFNγ peut être produit par deux types de cellules : les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles (Vanhaverbeke *et al.*, 2004). La synthèse d'IFNγ peut être induite par divers effecteurs : des cytokines, des antigènes, les esters de phorbol, les lectines, et l'IFNγ lui-même. L'action de l'IFNγ sur une cellule nécessite la présence d'un récepteur membranaire spécifique. Les mécanismes moléculaires d'action de cette cytokine sont complexes, car ils font appel à de nombreuses cascades de signaux de transduction (Kalvakolanu, 2003). L'IFNγ, sous forme homodimérique, se fixe à son récepteur (figure 7). Ce dernier se compose d'une chaîne α, qui permet la fixation de l'IFNγ, et d'une chaîne β, qui permet la transduction du signal. Les deux chaînes du récepteur sont associées à deux kinases, JAK1 et JAK2 respectivement. Lors de la fixation de l'IFNγ, il y a rapprochement des deux chaînes du récepteur, entraînant la phosphorylation réciproque de JAK1 et JAK2, ainsi que la phosphorylation de STAT1 (signal transducer and activator of transcription). Cette dernière s'homodimérise, formant ainsi le complexe GAF (gamma-interferon activation factor), et traverse la paroi nucléaire pour aller se fixer sur les sites GAS (*Gamma IFN activation sequence*) au niveau des promoteurs des gènes inductibles par l'IFNγ (Kalvakolanu and Roy, 2005 ; Wang *et al.*, 2007b), permettant le déclenchement de plusieurs réponses (antivirale, immunorégulatrice et anti-tumorale) (Ikeda *et al.*, 2002 ; Schroder *et al.*, 2004 ; Vanhaverbeke *et al.*, 2004) :

- L'activation des systèmes enzymatiques interférant avec la synthèse des capsides virales,
- L'activation des macrophages et de la phagocytose,
- L'induction des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité,
- L'activation des cellules NK « Natural killers »,
- La modulation de la production d'anticorps par les lymphocytes B et T,
- La régulation de la différenciation cellulaire.



<u>Figure 7</u> : Voie de signalisation de l'IFNγ adaptée de (Newport, 2003).

La production d'IFNγ recombinant a déjà été réalisée dans les systèmes d'expression bactériens, et de cellules de mammifères. Elle a aussi récemment été produite à moindre coût dans des cellules végétales de riz, donnant lieu à la glycoforme 2N ayant une activité biologique anti-virale (Chen *et al.*, 2004).

L'IFNγ est actuellement commercialisé sous le nom d'Actimmune® par la société Genentech et d'Imukin® par la société Boehringer Ingelheim. La prise se fait sous forme d'injection intramusculaire ou sous cutanée. Dans les deux cas, il est produit chez *E. coli* et est, par conséquent, non glycosylé. Bien que faisant l'objet de nombreuses études pharmacologiques et cliniques, en particulier dans le cadre de la mise au point et du développement de thérapies anti-cancéreuses (Ikeda *et al.*, 2002 ; Fanga *et al.*, 2008), (notamment pour le traitement du cancer métastatique du rein (Geboers *et al.*, 2006)), les applications thérapeutiques de l'IFNγ recombinant sont à l'heure actuelle limitées à deux maladies : l'ostéoporose (Khovidhunkita and Epstein, 1997) et la maladie granulomateuse chronique (déficit immunitaire héréditaire) (Weening *et al.*, 1995).

1.4.2. Le facteur intrinsèque

Le facteur intrinsèque (Figure 8) est une glycoprotéine secrétée par les cellules pariétales du fundus de l'estomac. Le gène du facteur intrinsèque se trouve sur le chromosome 11 humain. C'est une protéine de 399 acides aminés, ayant une masse moléculaire de 43,4 KDa (Wuerges *et al.*, 2007).

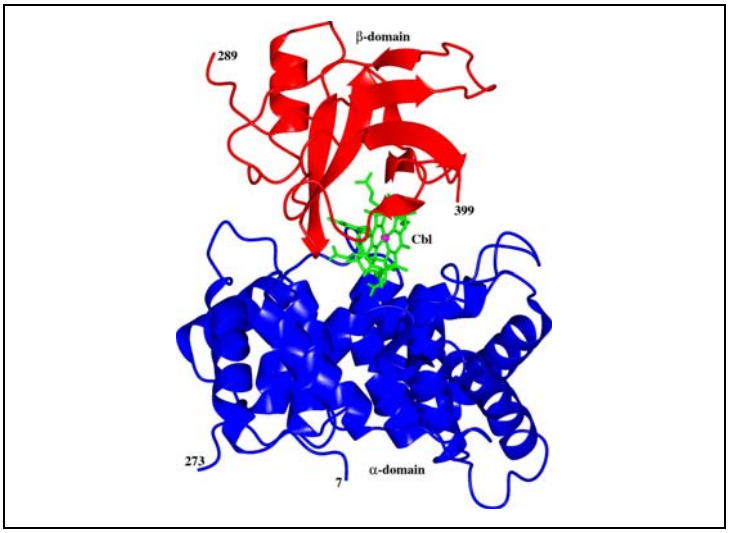


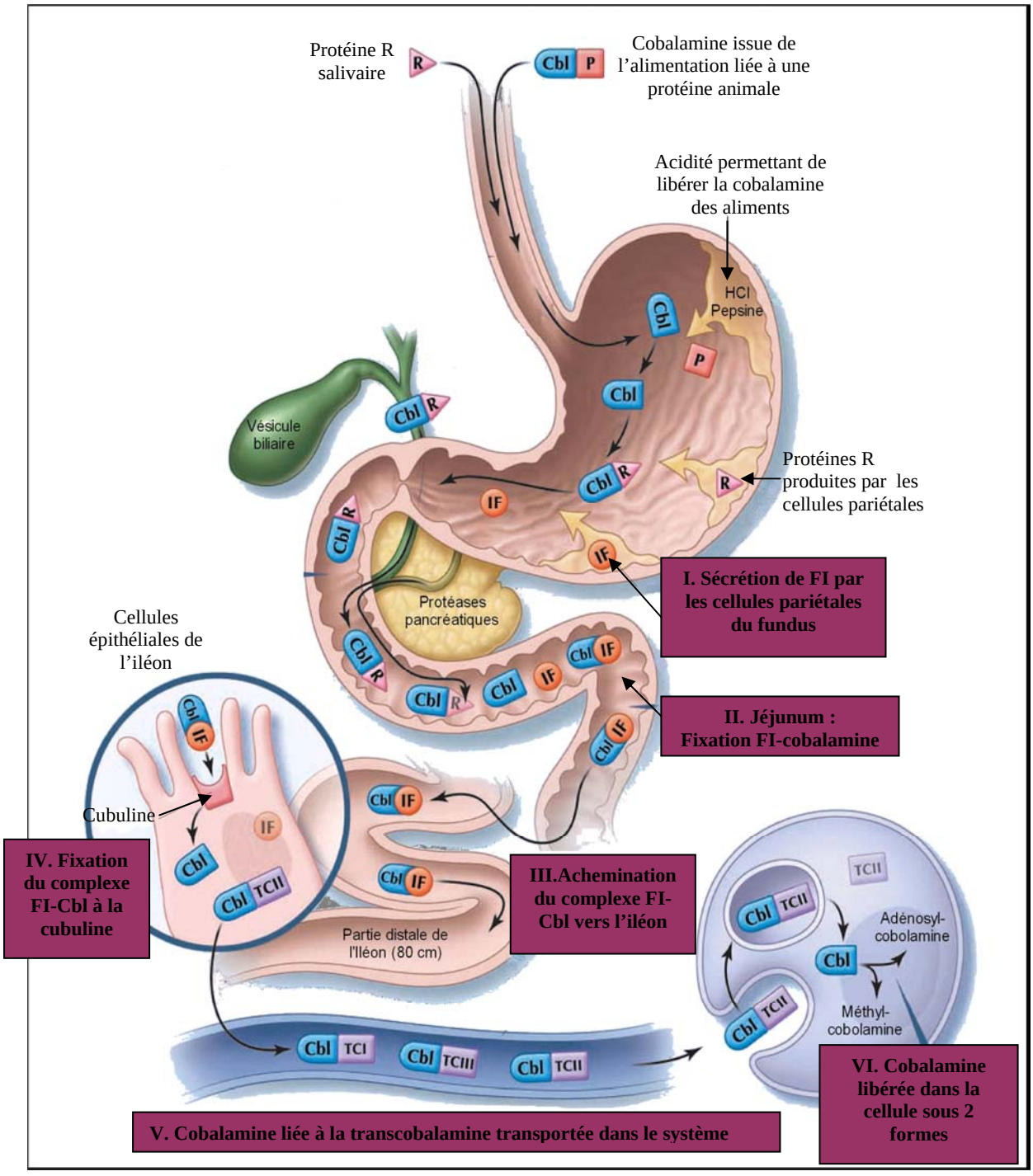
Figure 8 : Structure tridimensionnelle du complexe cobalamine - Facteur intrinsèque (Mathews *et al.*, 2007) (en vert)

Le FI est composé de 2 parties :

- un domaine α comprenant 270 résidus (7-123) en bleu, composé de 12 hélices α (6 parallèles orientées dans une direction, et 6 autres parallèles orientées dans la direction opposée) et de 3 ponts disulfures.
- un domaine β comprenant 110 résidus (289–399) en rouge, composé de 6 brins β formant un feuillet β antiparallèle (brins tête bêche), et d'une hélice α et de 3 brins β formant un feuillet β antiparallèle perpendiculaire au premier feuillet. Un site de glycosylation a été identifié sur le résidu Asn-395 de ce domaine.
- La Vitamine B12 (cobalamine) est liée à l'interface des deux domaines (Mathews *et al.*, 2007).

La vitamine B12 est présente dans l'alimentation complexée à des protéines. Elle est libérée dans l'estomac sous l'effet de l'acidité qui y règne et des pepsines. Elle se lie alors préférentiellement aux ligands R salivaire et gastrique (figure 9). Dans la lumière duodénale, ces protéines R sont hydrolysées par les protéases pancréatiques et la cobalamine (Vit B12) libérée se fixe instantanément au Facteur Intrinsèque (FI). Le complexe Cbl-FI, résistant à la protéolyse pancréatique, transite le long de l'intestin grêle sans modification. Il se fixe spécifiquement sur un récepteur iléal (Okuda, 1999), volumineuse glycoprotéine d'un poids moléculaire de l'ordre de 200 000 daltons. Elle est formée de deux sous-unités dont l'une ancre le récepteur dans la membrane microvillositaire par une séquence hydrophobe et l'autre lie le complexe (la cubiline). Dans les cellules épithéliales de l'iléon, la vitamine B12 se détache du FI et est ensuite prise en charge par la transcobalamine ; ce complexe est alors acheminé vers le sang.

Cette association Cbl-FI permet la maturation des érythrocytes en hématies permettant de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus (Russell-Jones and Alpers, 1999). La vitamine B12 participe aussi à la transformation de l'homocystéine en méthionine, et joue à cet égard un rôle régulateur important. (L'homocystéine est en effet un facteur de risque d'attaque cérébrale et d'altération vasculaire). Les besoins journaliers s'élèvent de 2 à 5 µg/j. L'organisme contient habituellement 5 mg de vitamine B12, qui est stockée surtout dans le foie. Cette quantité est normalement suffisante pour satisfaire les besoins pendant une durée assez longue de 3 à 5 ans.



<u>Figure 9</u> : Rôle du Facteur Intrinsèque dans le transport de la vitamine B12 vers les cellules de l'organisme.

Les causes gastriques de déficience en vitamine B12 regroupent la maladie de Biermer mais aussi la gastrite chronique avec défaut de libération de B12 alimentaire. Parmi les autres causes de malabsorption, les plus fréquentes sont la prolifération microbienne et les causes médicamenteuses, radiothérapies ou chirurgicales. Enfin, il existe un certain nombre de causes génétiques de carences cellulaires qui affectent soit l'endocytose du facteur intrinsèque,

soit le transport intracellulaire et la conversion en coenzyme actif de la vitamine B12 (Guéant *et al.*, 1993).

Une anémie peut apparaître quand cette réserve en vitamine B12 est réduite à son dixième. L'anémie pernicieuse (ou maladie de Biermer) est due à un défaut de résorption intestinale de la vitamine B12, par suite d'un manque de facteur intrinsèque. Elle touche une personne sur mille. (Okuda, 1999 ; Chanarin, 2000)

Cette maladie est auto-immune et le patient présente dans certains cas des auto-anticorps dirigés contre le facteur intrinsèque (50% des cas) et contre la muqueuse gastrique (90% des cas). Le manque de sécrétion de facteur intrinsèque est lui-même la conséquence d'une atrophie de la muqueuse gastrique. La maladie peut être associée à d'autres maladies immunologiques comme les thyroïdites, le diabète, ou le vitiligo. Elle touche surtout les personnes âgées (Masnou *et al.*, 2007).

Elle est généralement progressive (diminution des réserves sur 4 ans). Le syndrome anémique est souvent absent, mais peut être détecté par le teint pâle et subictérique du patient. D'un point de vue digestif, ce dernier peut souffrir de glossite (langue dépapillée, sèche, lisse, gêne douloureuse à l'alimentation), de diarrhées, et de douleurs ou d'inconfort abdominal dus à la gastrite atrophique. L'estomac est le siège d'une lésion importante, cause de la maladie : l'atrophie de la muqueuse. Le patient peut souffrir de lésions neurologiques lorsque la maladie est diagnostiquée tardivement. Les signes nerveux les plus importants sont ceux qui dérivent de l'atrophie des cordons postérieurs et latéraux de la moelle épinière **:** des troubles moteurs (rigidité spastique des membres inférieurs), des troubles sensoriels (paresthésies des doigts et des orteils dans les cas les plus graves uniquement, des troubles sphinctériens (incontinence urinaire) et psychiques (troubles du caractère, hallucinations). La fréquence pour le patient de développer un cancer gastrique est très élevée dans cette affection (Chanarin, 1987 ; Andres *et al.*, 2004).

Le principal traitement (à suivre à vie) contre ce type d'anémie consiste en l'injection intra-musculaire ou intra-veineuse de vitamine B12. Il s'avère parfois difficile de calculer la dose de vitamine B12 requise, car cette dose doit également restaurer les réserves de la vitamine dans le foie. Il va de soi que ce traitement coûte très cher (Van Walraven *et al.*, 2001). Alternativement, une dose journalière de 0,5 à 2 mg (correspondant à 100 fois la dose requise) peut être administrée oralement, mais de ce cas, la vitamine n'est pas entièrement internalisée (Kuzminski *et al.*, 1998 ; Norberg, 1999 ; Van Walraven *et al.*, 2001). Mais les quantités de vitamines non-absorbées peuvent représenter un danger de croissance anormale des micro-organismes intestinaux. C'est pourquoi, le traitement optimal reste l'administration

orale d'une dose journalière de vitamine B12 (2 à 4µg) complexée à du FI (ceci laissant entrevoir un marché potentiel important pour cette protéine). Il est important de mentionner qu'occasionnellement, le traitement par ce complexe n'est pas bénéfique. Ceci concerne les cas d'anémies pernicieuses où les anticorps anti-FI sont responsables de la malabsorption de la cobalamine (Okuda, 1999).

Certaines compagnies pharmaceutiques tentent d'imiter le processus naturel d'assimilation de la vitamine : du FI de porc est ajouté à la vitamine. Cependant, l'utilisation de protéines animales couplées à des médicaments devient de plus en plus problématique en terme de sécurité sanitaire (Fedosov *et al.*, 2003).

Récemment, l'expression de FI humain recombinant dans les systèmes d'expression de cellules eucaryotes, de levures *Pichia pastoris* et de cellules d'insectes a été décrite (Gordon *et al.*, 1992 ; Wen *et al.*, 2000). Le problème encouru avec ces stratégies est une modification des propriétés biologiques de la protéine, l'obtention de faibles rendements et surtout un coût élevé qui ne permet pas de répondre à la demande des patients.

A noter enfin que le FI recombinant peut aussi être utilisé pour le diagnostic biologique (mesure de la vitamine B12 dans le sang ou le plasma) (Bor *et al.*, 2003).

Des travaux récents ont montré que le FI recombinant produit à moindre coût dans les plantes (*Arabidopis thaliana*) était fonctionnel (se lie à la cobalamine, et le complexe formé se fixe à la cubiline). Un rendement de 40 mg pour 150 g de matière sèche a été obtenu (Fedosov *et al.*, 2003). Son administration orale suggère, par rapport aux motifs de glycosylations végétales, un risque immunogénique très faible pour les patients. Cette technologie à été brevetée par l'entreprise danoise Cobento (WO/2003/006661 COBENTO BIOTECH APS Berglund *et al.*, 2002).

Les plantes représentent donc un excellent système d'expression, pour une production en quantité importante (montée en échelle possible) de FI recombinant à des fins thérapeutiques et diagnostiques.

2. Les plantes carnivores

2.1. Ecologie

Les systèmes de capture et de digestion dont sont pourvues les plantes carnivores représentent une aptitude remarquable et singulière dans le monde végétal. Les raisons de ce mode de nutrition et son origine ont fait l'objet de nombreuses théories. La plus couramment admise est l'adaptation au milieu (Ellison *et al.*, 2003). L'ensemble des milieux où vivent les plantes carnivores sont nutritionnellement pauvres. Ces sols ont une ammonisation et une nitrification peu intenses. Pour faire face à cette pauvreté du milieu, les plantes carnivores ont développé des pièges qui sont le résultat de plusieurs milliers d'années d'évolution. Les proies capturées, digérées puis assimilées au niveau des pièges fournissent de l'azote et d'autres éléments, que les plantes vivant dans des milieux plus riches assimilent par leurs racines sous forme de minéraux. L'aptitude à obtenir des éléments nutritifs (organiques) à partir d'animaux capturés représente donc un avantage sélectif pour la colonisation des milieux pauvres en éléments nutritifs.

Les plantes carnivores ont certains points communs. D'abord, elles poussent dans des zones humides. Elles sont aussi héliophiles. Elles craignent souvent la concurrence d'autres espèces végétales. La capacité de vivre sur des sols très pauvres, défavorables à la croissance de nombreuses espèces végétales contrebalance cet handicap. Vivant naturellement sur des sols pauvres où l'humidité a dilué toutes les particules minérales solubles, elles ont donc comme source d'eau soit de l'eau de pluie soit de l'eau quasiment déminéralisée. Elles sont en effet calcifuges, c'est-à-dire qu'elles ne supportent pas le calcaire. Elles se développent dans des tourbières acides, où le pH favorisera la solubilisation des phosphates et des carbonates de calcium. Enfin, elles ont un système racinaire peu développé (Juniper *et al.*, 1989 ; Slack, 2000).

Les plantes carnivores ont réussi la performance d'inverser les règles fondamentales de l'écologie générale qui veulent que les animaux se nourrissent de plantes ; c'est ici l'inverse qui se produit et l'on voit dans leur cas "le monde vert fonctionner à l'envers". Le carnivorisme végétal est ainsi un exemple de bouleversement de l'ordre classique de la chaîne alimentaire. Détaillons les 2 genres de plantes carnivores qui nous servent de modèles : *Drosera* et *Nepenthes*.

2.2. Les *Drosera*

Les *Drosera* sont de petites plantes insectivores de l'ordre des Népenthales, de la famille des Droséracées, appartenant au genre *Drosera*.

Le genre *Drosera* comprend entre 80 et 110 espèces, localisées sur tous les continents. On trouve la moitié de ces espèces dans le sud-ouest de l'Australie (Figure 10, A). Elles présentent une très grande variété de formes : feuilles rondes ou filiformes, simples ou divisées, en rosette sur le sol ou le long d'une tige dressée, des fleurs simples ou composées, etc (Figure 10, D.E.F). Elles ont néanmoins toutes en commun la présence de poils glandulaires qui sont responsables de la capture et de la digestion des proies. Ces poils (quelquefois appelés « tentacules »), présents en grand nombre à la surface de la feuille, sont surmontés d'une glande ovale parfois rouge éclatant (Figure 10, B.C). Celle-ci est couronnée d'une goutte de liquide digestif visqueux qui brille au soleil comme une rosée matinale; de là vient le nom de Rossolis en français, celui de Sundew en anglais et de Drosera en latin.

Ces plantes sont très riches en métabolites secondaires : en flavonoïdes (Melzig *et al.*, 2001 ; Marczak *et al.*, 2005 ; Paper *et al.*, 2005), et en naphthoquinones (plumbagine chez *D. binata et D. peltata*, ramentacéone chez *D. alicea*, drosérone, hydroxydrosérone chez *D. gigantea*) (Didry *et al.*, 1998 ; Budzianowski, 2000 ; Krolicka *et al.*, 2008). *Drosera rotundifolia* est préconisée en homéopathie contre les toux incessantes et quinteuses, accompagnées de vomissements et d'inflammation des voies respiratoires entrainant des douleurs dans la poitrine. Des extraits rentrent également dans la composition de sirops antitussifs. Les flavonoïdes qu'elle contient (hyperoside, quercétine et isoquercitrine) auraient une activité anti-inflammatoire et antispasmodique (Krenn *et al.*, 2004).

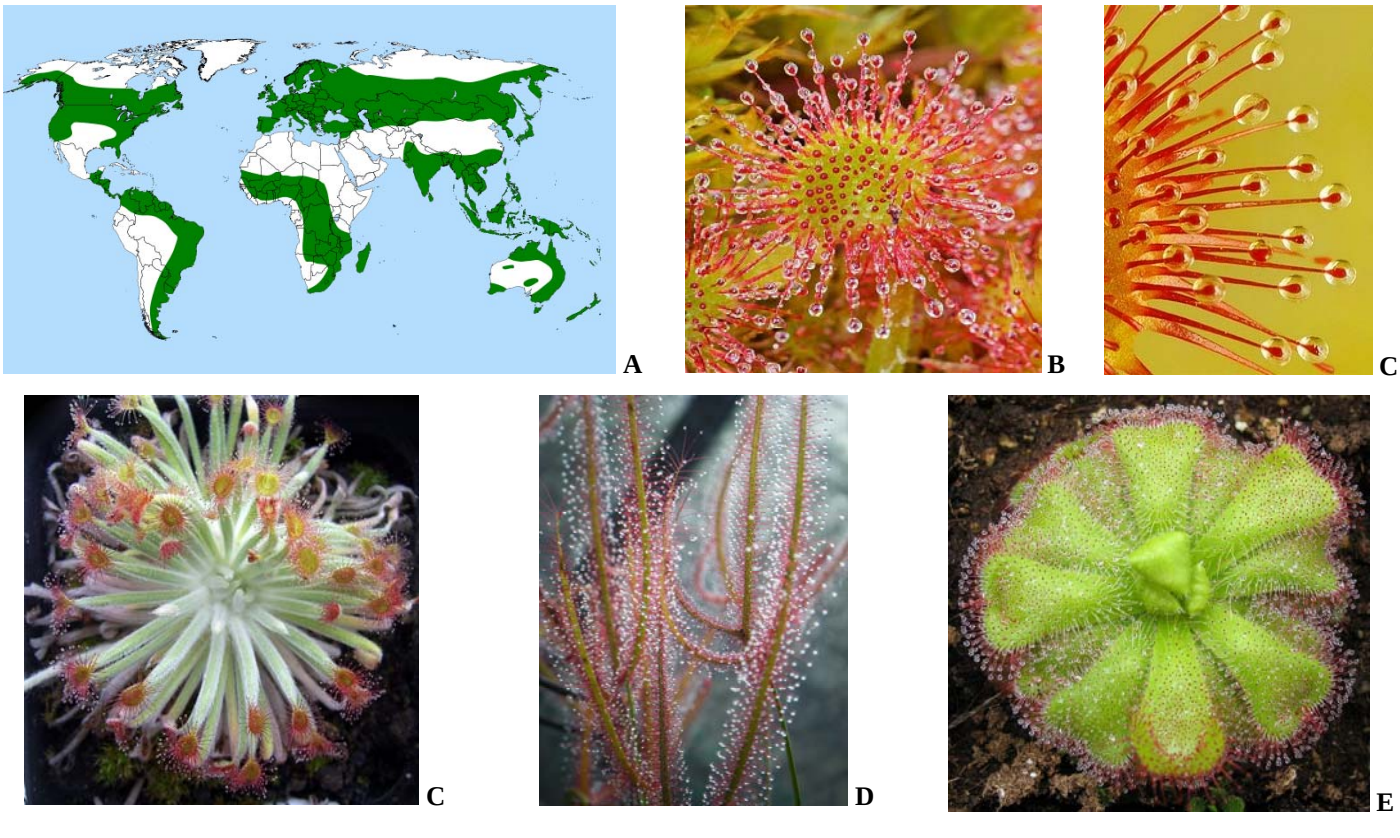


Figure 10 : **Les *Drosera*. A :** répartition géographique du genre *Drosera*, **B.C. :** poils glanduleux de *Drosera*, **D.E.F. :** exemples de *Drosera* : *D.ordensis, D. binata, D. cuneifolia.*

2.2.1. Distribution et biotope

Il existe en Europe trois espèces de *Drosera*. Toutes présentent une rosette de feuilles colorées. Souvent ces espèces sont peu visibles sur fond d'éricacées sombres ou de sphaignes rougeâtres. La plus cosmopolite est *Drosera rotundifolia*, qui a des feuilles au limbe arrondi appliquées contre le sol. Les deux autres espèces ont les feuilles allongées et plus ou moins dressées (*Drosera anglica* et *Drosera intermedia*). Exigeante en lumière, cette espèce occupe les sols gorgés d'eau, acides et pauvres, tourbeux (tourbières à sphaignes, petits lacs tourbeux, cédrières, grèves sablonneuses ou prairies alpines). Toutes les espèces vivent sur des sols humides, pauvres et acides, généralement dans des marais, landes humides ou tourbières acides de l'hémisphère Nord, souvent en colonie de nombreux individus, faiblement enracinées au milieu des sphaignes. Les altitudes fréquentées vont de 0 à 2000 mètres, avec un optimum vers 1000 à 1200 mètres Cette plante est protégée au niveau national. On en trouve notamment dans le Parc Naturel des Vosges du Nord (Blondeau, 2001).

2.2.2. Description botanique

Drosera rotundifolia est une plante terrestre, vivace, disposée en rosette étalée au sol de 2 à 6 cm de diamètre. Les feuilles sont d'un vert olive, se teintant de rouge en exposition ensoleillée (Figure 11, A). Le limbe de forme orbiculaire se rétrécit brusquement en un pétiole velu et couvert de longs poils pourpres glanduleux sécrétant des substances mucilagineuses qui attirent et engluent les insectes. Les fleurs sont blanchâtres, disposées en épis lâches et pédonculées à l'extrémité d'une hampe non feuillée de 6 à 20 cm de haut dressée dès la base, en forme de crosse et rarement rameuse au sommet (Figure 11, B). La fleur possède 5 sépales, 5 pétales, 5 étamines et 3 carpelles (Figure 11, C). Une grande hampe florale permet de bien séparer les pièges des fleurs pour ne pas piéger d'insectes polinisateurs. Le fruit est une capsule contenant des graines albuminées, filiformes et ailées aux deux extrémités. *Drosera rotundifolia* possède 2n=20 chromosomes (Gervais and Gauthier, 1999).

En automne les feuilles arrêtent de se développer et restent embryonnaires, nombreuses et serrées au centre de la rosette formant un bourgeon d'hiver. Les feuilles d'été meurent et l'hibernacle supporte en dormance la saison froide. La saison de croissance s'étend de mai à octobre.

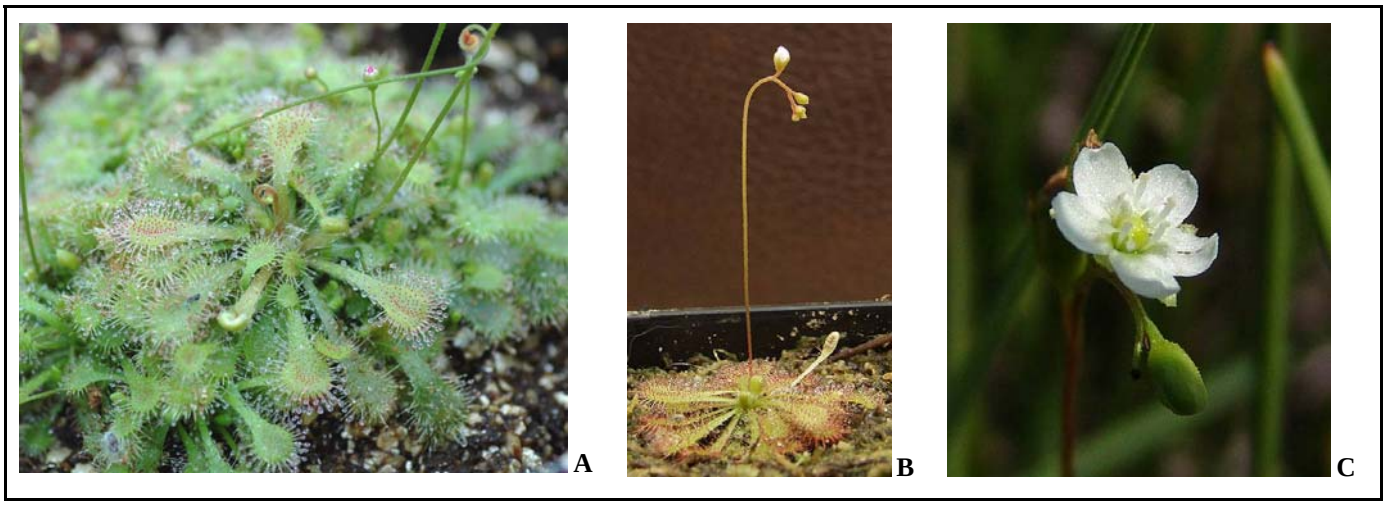


Figure 11 : ***Drosera rotundifolia*** **: A** : plante entière (Photo LAE/A.Guckert), **B** : hampe florale, C : fleur.

2.2.3. Le fonctionnement du piège

2.2.3.1. Description du piège et des glandes

C'est au début du 19ème siècle que la capacité de ces plantes à attraper des insectes a attiré l'attention. Darwin conclue même que le mucilage sert seulement à protéger la plante contre l'attaque d'insectes alors que le botaniste américain Bartram observe cette capture d'insectes sans comprendre quel en est l'avantage pour la plante (Slack, 2000). Ce n'est qu'au milieu du 19ème siècle que sa nature carnivore a été suspectée et démontrée par Darwin (Darwin, 1877).

Les *Drosera* sont dotés d'un piège semi-actif. En effet, celui-ci possède une action mécanique mais qui est de faible amplitude. Les *Drosera* utilisent probablement des mécanismes d'attraction des insectes. Les études faites sur ces mécanismes n'ont jamais pu montrer l'utilisation de phéromones par ces plantes. Il semblerait que les *Drosera* utilisent en priorité le sens de la vue des animaux. On constate qu'au soleil, le liquide permet à la feuille de briller comme si elles étaient recouvertes de rosée ou de nectar. Ses sécrétions sont de plus en plus abondantes avec la durée du jeûne (Slack, 2000).

Chaque feuille comporte une face de poils adhésifs pluricellulaires et vascularisés, appelés tentacules (Figure 12, A). Ils sécrètent à leur extrémité des gouttelettes de mucilage à pH acide, contenant des enzymes hydrolytiques et des polysaccharides qui confèrent l'attractivité au piège. Leur taille est variable : ils sont longs à la périphérie de la feuille, et deviennent progressivement plus courts en se rapprochant du centre. Cette différence est associée à leur capacité de mouvement : les longs tentacules ont un mouvement plus rapide, augmentant la zone potentielle de capture. Ils sont composés d'une « tête » glandulaire contenant une couche de cellules sécrétrices de mucilage interne et externe séparées des tissus réservoirs, les trachéides, par une barrière de cellules endodermiques contenant de la cutine. (Figure 12, C). La partie basale du poil est constituée d'un gros vaisseau de xylème reliant le poil à la feuille (Juniper *et al.*, 1989 ; Slack, 2000). En plus de ces tentacules, la surface des feuilles et des pétioles est recouverte de très nombreuses glandes sessiles (Figure 12, B). Leur origine est épidermique.

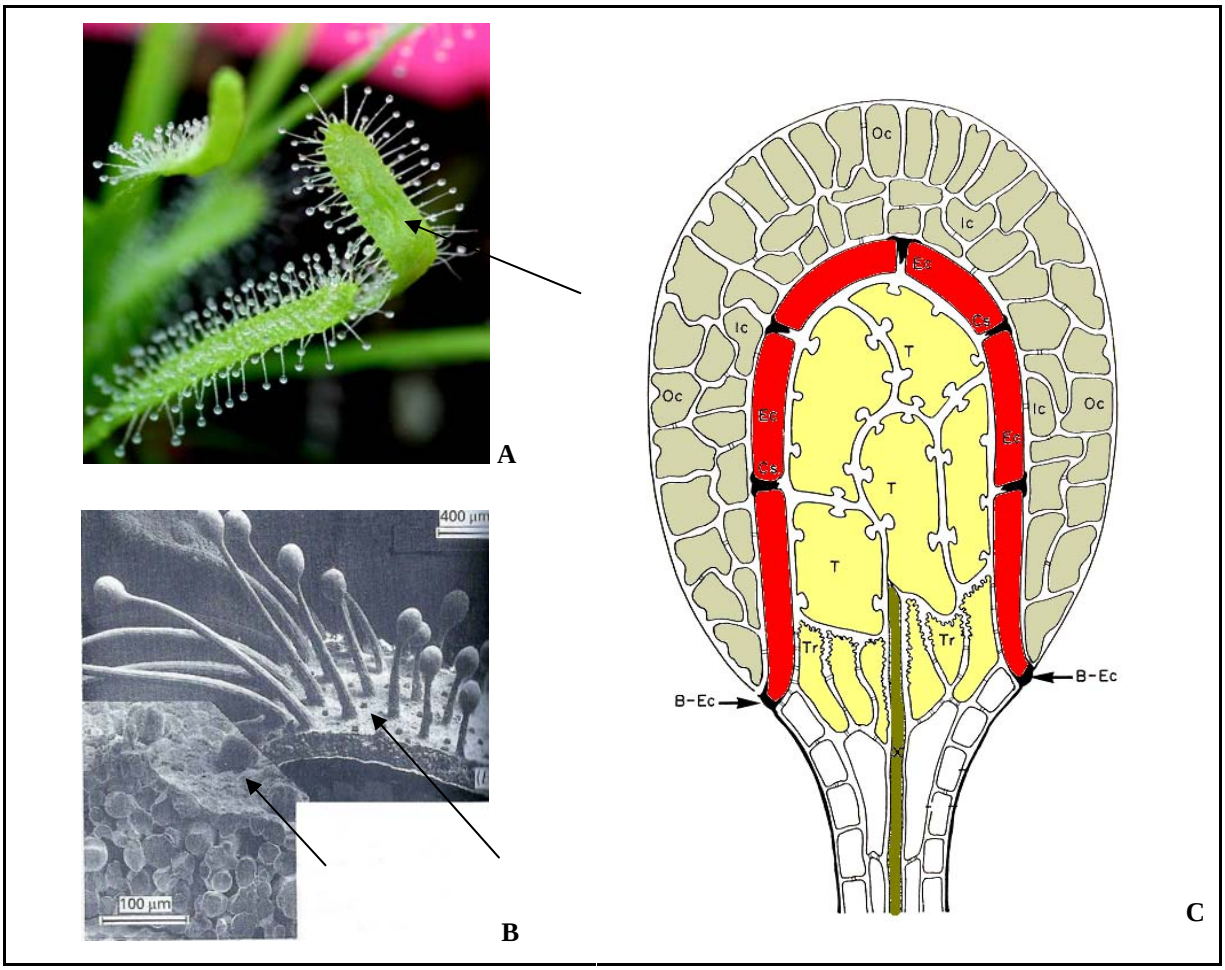


Figure 12: Les glandes digestives du genre *Drosera* : A : glandes situés sur face supérieure, flèche montrant face inférieure de la feuille de *Drosera capensis* qui se replie (Photo LAE/A.Guckert), **B** : photo de glandes sessiles à la surface de la feuille de *Drosera capensis* (Juniper *et al.*, 1989), **C** : Schéma de la structure d'une glande digestive de *Drosera capensis* (X=Xylème, T= Trachéide, Ec= Cellules endodermiques, Cs= Cadre de Caspary, In= Cellule glandulaire interne, Oc= Cellule glandulaire externe (X 500)) (Juniper *et al.*, 1989).

2.2.3.2. Mécanismes de capture des insectes : stimulation mécanique et chimique

La stratégie de capture de la proie est de type « *papier tue-mouche* ». La proie venant se poser sur une de ces feuilles, y est retenue par la glu des tentacules. Sa propre activité la met de plus en plus en contact avec la glu des poils. Son agitation pour se dégager stimule l'activité des cellules sécrétrices. Ensuite, les tentacules et le limbe de la feuille se mettent en mouvement très lentement. La proie va exciter les poils qui vont se recourber pour la ramener vers le centre de la feuille (Figure 13, A) et le limbe va se replier lentement pour empêcher l'insecte de s'échapper (Figure 13, B). Plusieurs heures sont nécessaires au repliement complet de la feuille. La proie, engluée, meurt d'asphyxie et est finalement digérée. Ce mouvement sert d'une part à éviter une perte de liquide nutritif lors de la digestion et d'autre part à accélérer le processus en favorisant le maintien de la proie et en augmentant la surface

pour l'action du liquide digestif. Cette dernière est dirigée vers le centre de la feuille où se situent les glandes digestives. Dans le cas de la prise d'un insecte, il ne subsiste plus après un ou deux jours, au milieu de la feuille, que le squelette chitineux de l'animal. La feuille mettra une à deux semaines pour reprendre sa forme initiale.


A


B

Figure 13 : Capture d'insecte par *D. capensis* : A : Repliement des poils autour de l'insecte, **B** : repliement du limbe de la feuille autour de l'insecte (Photographe Tommi Järvinen, 2004).

2.2.3.3. Les enzymes digestives

Une fois l'insecte capturé, il va être digéré grâce aux enzymes hydrolytiques contenues dans la glu. On retrouve chez le genre *Drosera* toute une batterie d'enzymes : estérase (Heslop-Harrison, 1975 ; Juniper *et al.*, 1989), phosphatase (Plachno *et al.*, 2006), protéase (Amagase, 1972 ; Amagase *et al.*, 1972 ; Clancy and Coffey, 1977), ribonucléase (Okabe *et al.*, 1997 ; Okabe *et al.*, 2005), chitinase (Matusikova *et al.*, 2005) et péroxydase (Heslop-Harrison, 1975). Une activité chitinolytique a été récemment démontrée dans les tissus de *Drosera rotundifolia* (Libantova *et al.*, 2008). La nature des enzymes contenues dans la glu de *Drosera rotundifolia* n'a pas été spécifiquement étudiée.

La production d'enzymes augmente 1 ou 2 jours après la capture d'un insecte et atteint un maximum, le 4ème jour pour régresser par la suite. Leur sécrétion est donc activée par la présence de la proie (stimulation chimique). L'activité phosphatase (phosphorylase monoester orthophosphorique) et protéasique atteignent leur optimum en milieu acide (pH 2,5-3,5). A noter que le mucilage est acide même lorsque la plante n'est pas stimulée (Clancy and Coffey, 1977).

Ces enzymes permettent à la plante de décomposer le corps de l'insecte, et d'assimiler azote, phosphore, et soufre. Une étude a démontré que 50 à 76% de l'azote assimilé par les *Drosera* sont apportés par l'insecte (Millett *et al.*, 2003). Le mécanisme moléculaire de la digestion d'une proie n'est pas connu en détails, et aucune distinction n'a été faite entre les secrétions produites par les glandes sessiles ou pédicellées.

2.3. Les *Nepenthes*

Parmi les plantes carnivores le *Nepenthes* est tout à fait original non seulement par son système de capture mais aussi par les relations particulières observées entre certaines espèces et les insectes. Cette plante tropicale d'Asie du Sud-Est, aujourd'hui menacée, fascine toujours autant les botanistes qui n'hésitent pas encore actuellement à sillonner les endroits les plus reculés de l'archipel indonésien pour découvrir et décrire de nouvelles espèces.

Le *Nepenthes* peut prendre plusieurs noms suivant le lieu géographique et l'attribution donnée par la population locale. Aux Seychelles, il est appelé "Pot à eau" mais cela peut être "urne des singes" en Asie ou même "pipe du Hollandais" pour les anciennes colonies néerlandaises (actuelle Indonésie). Tous les noms se basent sur l'urne suspendue par le prolongement de la feuille. En anglais "pitcher-plant" est un nom générique qui englobe toutes les plantes à urnes aussi bien les *Nepenthes* que les *Sarracenias* et *Cephalotus*.

Dès sa découverte par les Européens au milieu du XVII siècle, le genre *Nepenthes* a évoqué l'émerveillement. C'est l'un des genres de plantes carnivores à avoir une histoire botanique très riche et très intéressante. C'est le seul genre reconnu comme pouvant capturer de petits animaux, des rats ou des oisillons par exemple, ce qui contribua beaucoup à sa popularité, notamment artistique, à travers le monde.

La première espèce de *Nepenthes* découverte fut *N. madagascariensis*, décrite par le gouverneur français de l'île, Etienne de Flacourt, en 1658. Il parla alors d'une plante portant des fleurs concaves, ou des fruits ressemblant à de petits vases, chacun possédant son propre petit capuchon. Il appela cette plante "Amramicato" probablement du nom donné par la population.

N. distillatoria a été découvert au Sri Lanka, par Carl von Linné, qui découvrit d'abord des spécimens desséchés. Euphorique, il pensa à Homère et à son *Odyssée*, dans laquelle Hélène de Troie usait d'une drogue, nommée "Nepenthe", pour alléger les peines des soldats.

"Si ce n'est pas le Népenthe d'Hélène, ça le sera pour tous les botanistes" dit-il. C'est une des premières espèces à rejoindre l'Europe en 1717 appelé alors "Badura" par Paul Hermann professeur de botanique à Leiden. *N. mirabilis* fut l'espèce suivante, découverte par Georg Everhard Rumphius.

En 1737, c'est Carl von Linné qui donna définitivement à cette plante tropicale le nom de *Nepenthes* dans son *Hortus Cloffortianus*. Le genre reçoit officiellement le nom de *Nepenthes*. Personne ne se doutait encore que la plante était carnivore ; on pensait alors que les urnes servaient à recueillir l'eau de pluie, de manière à aider la plante à survivre aux périodes de sécheresse.

C'est au XIXe siècle que l'intérêt pour ces plantes prend de l'importance. Les horticulteurs se spécialisent dans la vente de plantes rares. L'un des premiers, Loddiges nursery, en Angleterre, introduit *N. khasiana* sur le marché dès 1825.

De nouvelles espèces sont alors régulièrement découvertes. Le docteur William Jack découvre en 1819 *N. rafflesiana* et *N. ampullaria*. Neuf espèces étaient connues en 1839, mais beaucoup d'autres allaient suivre: la maison Low décrivit *N. lowii*, *N. rajah*, *N. villosa*, *N. edwardsiana.*

Les *Nepenthes* reçoivent alors les noms d'éminents personnages de la botanique: Sir Stamford Raffles, qui prit le contrôle de Singapour pour l'Angleterre et fonda le jardin botanique de Bogor en Indonésie (*N. rafflesiana*) ; C.G.C Reinwardt, son assistant (*N. reinwardtiana*) ; Marianne Noth, artiste qui découvrit *N. northiana* ; Frederick Burbidge, ami de Veitch (*N. burbidgeae*).

L'aspect carnivore de la plante fut prouvé par les expériences de Darwin et de Sir Joseph Hooker directeur du fameux Jardin Botanique Royal de Kew publiées en 1874 dans le *Gardener Chronicle*.

A la fin du XIXe siècle, les *Nepenthes* sont devenus assez communs ; nombreux sont ceux qui maitrisent leur culture. Posséder un *Nepenthes* vigoureux dans sa serre génère la fierté, et est aussi la preuve d'une certaine richesse. Des hybrides fantaisistes furent crées, les plus célèbres étant ceux de l'époque victorienne, dominants par leur taille: *N. sanguinae*, *N. maxima*, *N. x mixta*, *N. x coccinae*.

Cinquante-huit espèces étaient connues en 1908. Près d'une centaine le sont au début du XXIe siècle.

Au XXe siècle, l'intérêt pour les plantes en serres devient moins ardent. Il faut attendre la seconde moitié du vingtième siècle pour que le genre conquièrt à nouveau l'intérêt de certains, et trouve l'état de répartition que l'on connait aujourd'hui (Lecoufle, 1989).

2.3.1. Distribution géographique et biotope

L'aire de répartition des *Nepenthes* est vaste (Figure 14, A) puisqu'elle regroupe tout le Sud-Est asiatique du Vietnam au Nord au Cap York du Queensland (Australie) au Sud, mais on trouve également des *Nepenthes* dans des îles aussi éloignées que Madagascar (*N. madagascariensis* et *N. masoalensis*), les Seychelles (*N. pervillei*), le SriLanka (*N. distillatoria*) ou la Nouvelle Calédonie (*N. vieillardii*). Le centre originel de l'ère de répartition est Bornéo (et Sumatra) avec 28 espèces sur les 80 actuellement répertoriées. Danser (1928) expliqua l'origine de ces espèces si éloignées par la dérive des continents. (Boulay, 1997 ; Clarke, 1997).

Les *Nepenthes* comme la plupart des plantes carnivores poussent sur des sols déficients en éléments nutritifs. On les trouve sur les sols pauvres et acides des "Kerangas", forêts sur terre de bruyère, sur des sols tourbeux dans les forêts marécageuses de basse altitude, ou sur des accumulations tourbeuses dans des zones de forêts humides. Cependant quelques rares espèces (*N. northiana*, *N. campanulata*) poussent sur des promontoires de calcaire métamorphique isolés dans les plaines de Bornéo (Clarke, 1997).

Les plus spectaculaires poussent sur les versants élevés des montagnes dans les forêts d'altitude dites "forêts moussues" (2000 à 3500m) ou forêts d'Ericacées. Ils sont rares voire absents des forêts de chênes qui sont trop sombres.

Les *Nepenthes* sont ainsi classés en deux groupes : les *Nepenthes* de basse altitude et ceux de haute altitude. Selon certains auteurs le *Nepenthes* serait une plante épiphyte et dépourvue de racines. Ceci est à nuancer. En effet, seules quelques rares espèces telles que *N. veitchii* sont considérées comme épiphytes strictes. La plupart des *Nepenthes* sont rampants ou grimpants. Comme toutes les autres plantes, les *Nepenthes* sont pourvus de racines, mais celles-ci sont fines et fragiles (Clarke, 1997).

La plupart des espèces se trouve en lisière de forêts, rarement à l'intérieur. On trouve cependant certaines espèces dans des zones exposées aux embruns ou même comme *N. mirabilis* poussant sur le sable des mangroves en bordure de mer (Clarke, 1997).

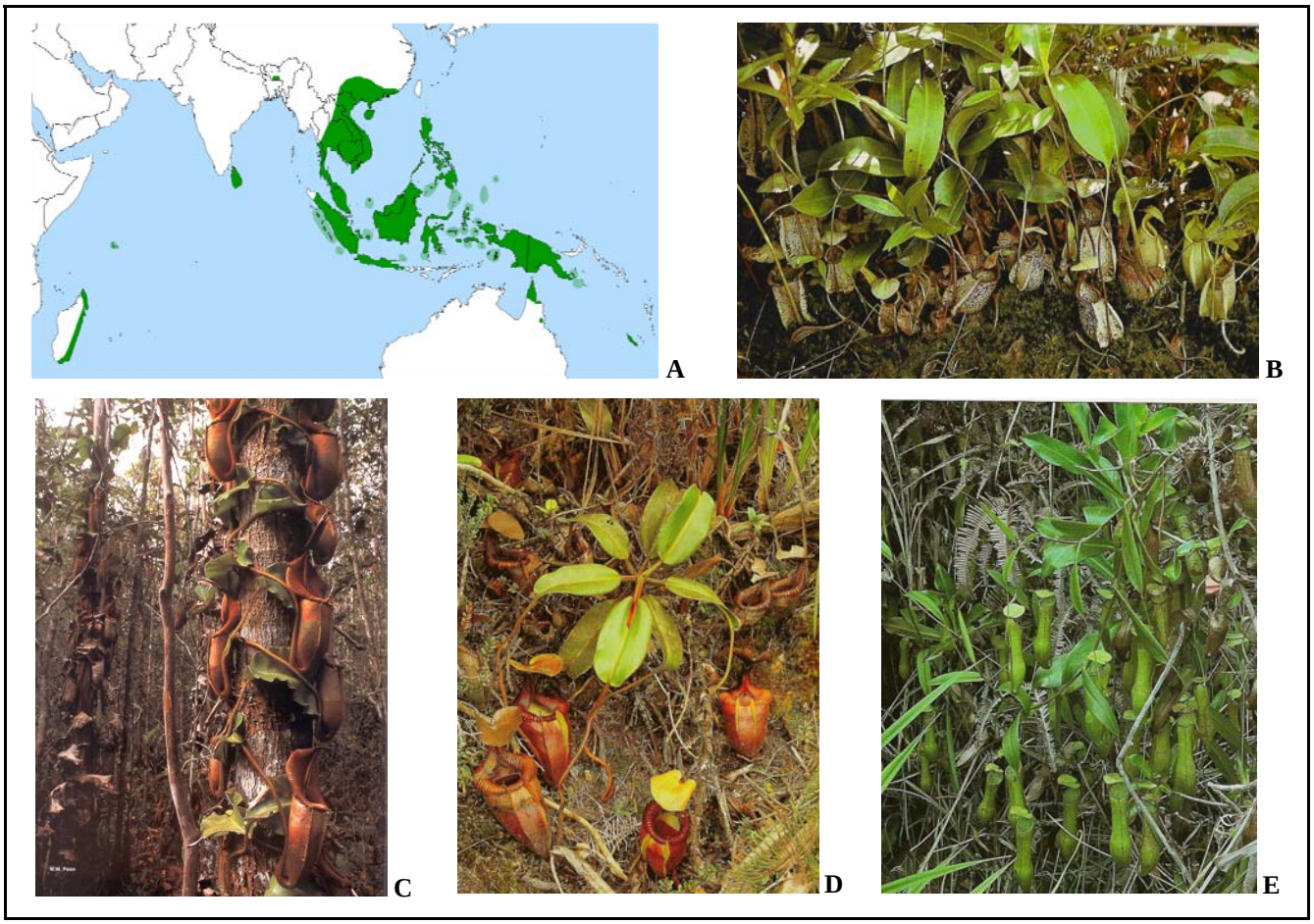


Figure 14 : Les *Nepenthes* dans leur milieu naturel. A : Aire de répartition géographique du genre *Nepenthes*, **B** : *N. rafflesiana* (Bornéo, Sabah), **C :** *N.veitchii* grimpante (Bornéo, Maliau basin), **D :** *N. villosa* (Bornéo, mont Kinabalu), **E :** *N. gracilis* (Bornéo, Brunei) (Clarke, 1997).

2.3.2. Description botanique

Le *Nepenthes* est comparable à une liane grimpante (Figure 14, C) et présente généralement très peu de ramifications. La plante présente au cours de sa croissance deux formes morphologiques différentes correspondant à la maturation sexuelle.

Au premier stade dit "juvénile" la plante se trouve sous forme de rosette avec des entre-noeuds courts (Figure 14, D). Puis, parvenue à maturité sexuelle, les entrenoeuds s'allongent et la plante devient grimpante ou rampante.

Les feuilles sont alternes, ovales, lancéolées, la nervure centrale se vrille et se prolonge en tendril pour former à chaque extrémité une urne membraneuse ou ascidie surmontée d'un opercule.

L'inflorescence de *Nepenthes* est généralement érigée de type grappe ou panicule. La floraison se produit généralement lorsque la plante se trouve assez haut dans la canopée. Il a été prouvé que l'ensoleillement ainsi que la nourriture apportée par les insectes étaient nécessaires pour obtenir une bonne floraison.

Le *Nepenthes* étant dioïque, il y a donc des inflorescences mâles et des inflorescences femelles sur des pieds séparés. Les fleurs (jaune-verdâtres, brunes…, suivant les espèces) présentent quatre tépales disposés en un verticille pourvu de glandes à nectar pour attirer les insectes (Figure 15, A.B.C). Les fleurs mâles possèdent des anthères disposées sur un seul verticille à l'extrémité d'une colonne, qui est parfois interprétée comme la fusion des filets des étamines (Figure 15, B). Les fleurs femelles ont un ovaire ellipsoïde divisé en quatre chambres (Figure 15, A). Les fleurs produisent de grandes quantités de nectar en début de soirée et pendant la nuit, la journée celui-ci s'évapore. Les papillons noctures, principaux pollinisateurs de *N. gracilis* de Sumatra, visitent les fleurs la nuit, tandis que des mouches les visitent principalement en début de soirée. Mais, peu d'insectes sont attirés par les fleurs en milieu de journée. Les papillons, fourmis, coléoptères et autres types de scarabées sont souvent les agents de transport du pollen des *Nepenthes* (Slack, 2000).

Une fois fécondée, la fleur femelle développe une capsule qui peut renfermer plusieurs centaines de graines (Figure 15, C). Les graines mesurent de 5mm à 30 mm de long. Elles sont fines, longiformes avec peu de tégument, peu d'endosperme et sont très légères (Figure 15, D) (Boulay, 1997). A maturité une capsule peut contenir plus de 500 graines, celle-ci s'ouvre alors pour permettre la dissémination des graines par le vent. Mais malgré l'importante quantité produite par une plante chaque année, très peu germent et seule une très faible quantité de semis parviendra au stade adulte.

D’un point de vue génétique, les *Nepenthes* possèdent 2n=78 chromosomes (Kondo, 1969). Cependant, une étude plus récente a montré que le nombre de chromosomes (très stable à l’intérieur du genre) serait 2n=80 (Heubl and Wistuba, 1997).

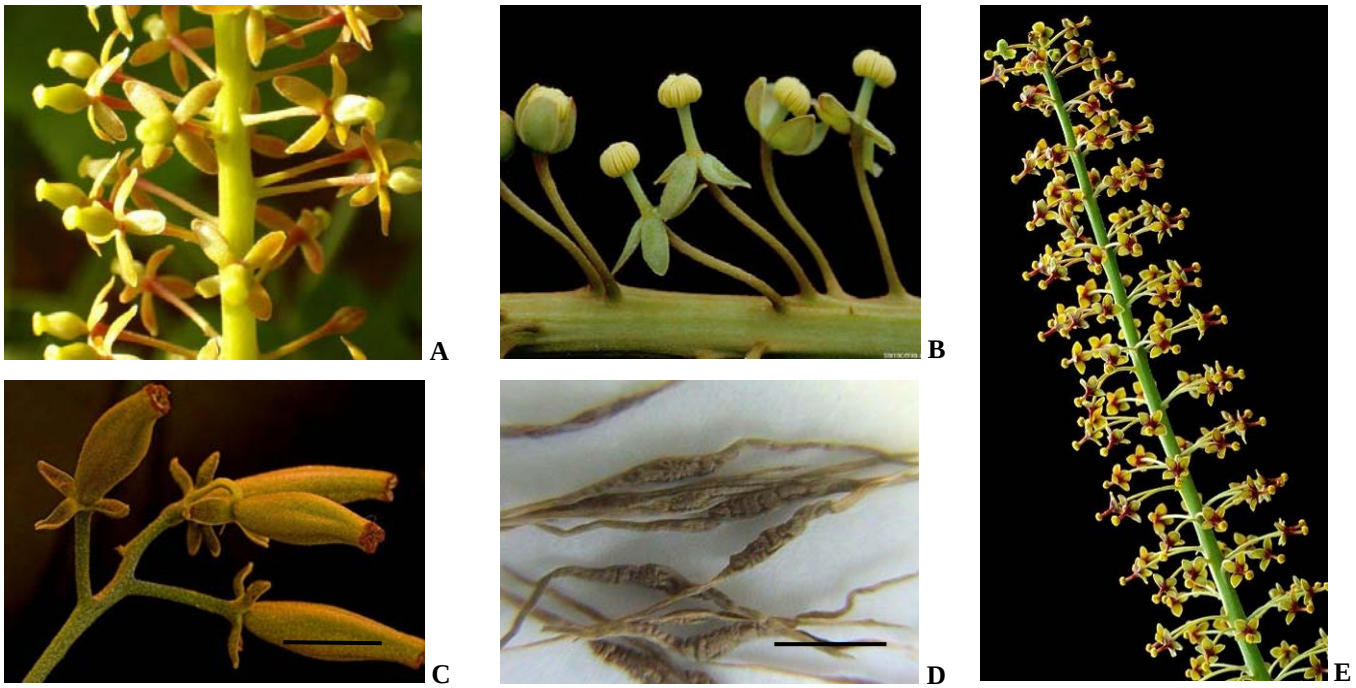


Figure 15 : Inflorescences, fruits et graines de *Nepenthes* : A : fleurs femelles de *N. x ventrata*, **B :** fleurs males de *N. ventricosa*, **C :** fruits de *N. spathulata* (barre : 1 cm), **D :** graines de *N. spathulata* (barre : 4 mm), **E :** inflorescences males (grappe) de *N.maxima.*

La fraicheur des graines pour les espèces tropicales est primordiale pour la germination. En effet, quelques jours à quelques semaines (cela dépend des espèces) après l'ouverture du fruit, la graine n'est plus viable (Rasco and Maquilan, 2005 ; Khompat *et al.*, 2007). Elles dégénèrent rapidement pendant la période de stockage. Le *Nepenthes* est un genre tropical et la plupart des espèces, dont le *N. gracilis*, sont trouvées exclusivement dans les régions tropicales où la croissance est continue. Chez cette espèce, le maximum de germination (80%) est obtenu quand les graines sont semées le jour même de la collecte, il chute à 66% après 24 heures, et à 34% après 48 heures (Lim and Prakash, 1973). De longues périodes de dormance des graines, pour assurer la survie au-delà des saisons non favorables, ne sont donc pas nécessaires et une viabilité limitée des graines n'affecte probablement pas la survie des espèces.

Pour les graines des espèces subtropicales, zones où les saisons sont plus marquées, la tendance est plutôt inversée. De basses températures en hiver ou un soleil très fort en été peuvent affecter la germination. Dans ces conditions, la capacité d'avoir une période de dormance est probablement une pré-nécessité pour la survie. Ainsi des graines de *N. mirabilis* restent viables pendant au moins quatre mois. Semées 24 heures après leur collecte, elles ne germent pas, et seulement 8% germent si elles sont semées 48 heures après leur collecte, produisant des plantules chétives qui ne survivent pas. Le pourcentage de germination

augmente avec la durée de stockage, atteignant un maximum (84%) après deux mois, pour redescendre ensuite. Cet état de dormance pendant un ou deux mois permet aux plantules d'apparaître en période favorable. (Corker, 1986)

- *Nepenthes alata*

Le nom latin de l'espèce, *alata*, signifie "aile". En effet, les urnes sont garnies de deux extensions membraneuses dentées et longitudinales. *Nepenthes alata* fut décrit par Blanco en 1837. La coloration du péristome chez le *Nepenthes alata* est inexistante, et ce dernier est régulier. Des tâches de couleur sont présentes sur la paroi intérieure de l'urne. Ses feuilles sont ovales et lancéolées, prolongées par un appendice, le tendril, qui porte des urnes cylindriques légèrement rouges sur la partie supérieure (Figure 16, A) pouvant aller de 10 à 25 cm de longueur. Il faut être extrêmement prudent lors de l'achat de ce *Nepenthes*, car la plupart des plantes vendues sous ce nom en jardinerie sont en réalité des hybrides, il s'agit souvent de *N. x ventrata* (*N.alata* x *N.ventricosa*), parfois ils sont indéterminables (le péristome est rouge, irrégulier et ondulé tel que le *Nepenthes ventricosa*, il n'y a pas de tâche de couleur sur la paroi intérieure de l'urne (Figure 16, B)). Le *Nepenthes x ventrata* a tout de même parfois une partie ailée certes beaucoup moins marquée mais tout de même présente). Le véritable *Nepenthes alata* est finalement assez rare en culture. C'est une espèce endémique des Philippines, et vit à l'état naturel dans les forêts de montagne, entre 800 et 2400 mètres d'altitude (Clarke, 1997).



A



B

Figure 16 : *Nepenthes alata*, et l'hybride *N.* x *ventrata* : A : Urne de *N.alata*, **B** : urnes de *N.* x *ventrata*.

2.3.3. Ecologie

Une grande variété d'insectes, spécialement des fourmis, forme la plupart des proies capturées. Cependant on y trouve également des proies telles que des scorpions, araignées, myriapodes, escargots ou grenouilles, suivant la hauteur où se trouve le piège. Des petits mammifères (rat, souris) ont également déjà été observés dans des pièges de *N.rajah*. Ces proies plus accidentelles sont plus attirées par l'eau ou les insectes en décomposition que par le nectar secrété par les glandes situées sous l'opercule. (Boulay, 1997)

Les vieilles urnes servent de biotope à une microfaune constituée principalement de larves d'insectes qui s'y développent, créant ainsi une micro-chaîne alimentaire dans chaque ascidie.

2.3.4. Le fonctionnement des pièges

2.3.4.1. Description des urnes et formation

Le piège ressemble à une urne ou ascidie surmontée d'un couvercle ou opercule. A l'intérieur de l'urne, se trouve le liquide digestif remplissant généralement un tiers du volume total. L'opercule qui surplombe l'entrée du piège préserve le liquide digestif d'une dilution par l'eau de pluie (Figure 19). Dans le cas d'espèces où les pièges sont dépourvus d'opercule comme *N. ampullaria* ou *N. lowii*, la dilution éventuelle par l'eau de pluie est compensée par une activité accrue des glandes digestives ou par une intense activité bactérienne.

La taille des ascidies est très variable suivant les espèces. Elle va de quelques centimètres chez *N. ampullaria* (Figure 17, D) à 30 ou 40 centimètres voire plus chez certaines espèces telles que *N. rajah* (Figure 17, A et B) *N.* x *kinabaluensis (N.rajah* x *N.villosa)* ou *N. bicalcaratala* (Figure 17, C). La capacité des urnes peut alors atteindre alors 3 à 4 litres (1 litre à 1,5 litre de liquide digestif).



Figure 17 : Différentes urnes de *Nepenthes* : A, B : Urne de *N.rajah* (Clarke, 1997), **C :** urne de *N.bicalcarata* (Clarke, 1997), **D :** urne de *N. ampullaria* (barre = 1cm) (Photographe Tommi Järvinen, 2004).

Les urnes se forment progressivement à l'extremité de chaque nouvelle feuille en formation, elle peut mettre plusieurs semaines avant que le péristome ne s'ouvre.



Figure 18 : Evolution d'une urne de *Nepenthes* en formation. Du renflement de l'extrémité de la feuille, à l'ouverture de l'ascidie (Photos infocarnivores.com).

La morphologie des ascidies est fortement corrélée avec la maturité sexuelle du végétal. L'ascidie dite "inférieure" correspondant au stade juvénile est généralement de plus grande taille que les ascidies supérieures (correspondant au stade mature). Elle présente un aspect plus renflé. La partie inférieure du piège est large et solide de façon à supporter l'usure provoquée par le frottement sur le sol. L'ouverture du piège est dirigée vers l'intérieur c'est à dire vers la plante.

L'ascidie dite "supérieure" plus petite est d'aspect infudibuliforme et l'ouverture du piège est tournée vers l'extérieur. Le prolongement de la nervure de la feuille forme une vrille en s'allongeant avant de former le piège. Cette vrille (tendril) a un rôle d'amortisseur en

supportant l'inertie du piège suspendu. Elle est douée d'haptotropisme, elle peut au contact d'une branche, s'enrouler autour de celle-ci pour stabiliser le piège.

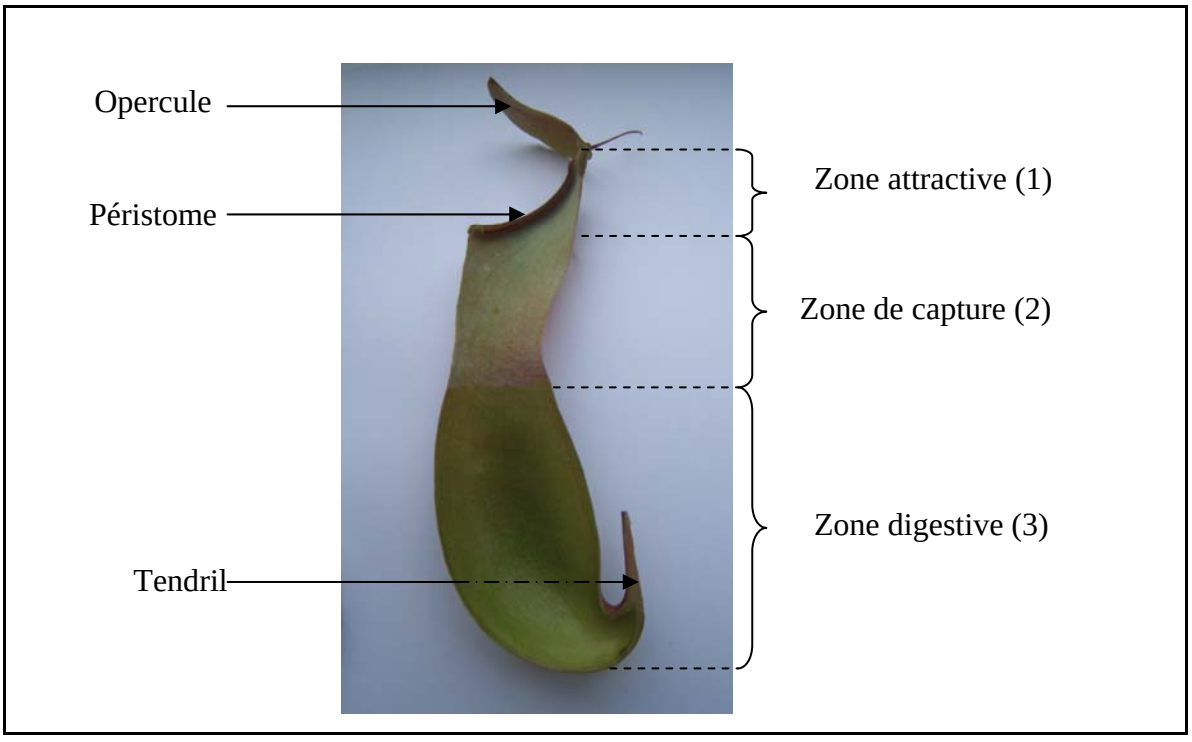
Entre les deux formes inférieure et supérieure, on distingue généralement 5 à 10 ascidies dites "intermédiaires".

La pérennité des pièges est variable suivant les espèces. Elle peut aller de moins d'un mois pour certaines espèces comme *N. gracilis* à huit mois comme pour *N. bicalcarata*. La plus longue a été observée chez *N. villosa* où une urne peut effectuer tout le cycle (développement activité et dépérissement) en 20 mois. Les ascidies de *N. lowii* vivent également plus d'un an (Boulay, 1997).

2.3.4.2. Mécanismes de capture des insectes

Selon Darwin une plante carnivore est une plante qui attire, capture et digère sa proie. De même il a montré que le complément en éléments nutritifs apporté par les proies est nécessaire pour le développement et l'épanouissement de la plante. Les *Nepenthes* n'échappent pas à cette règle (Darwin, 1877).

Le piège, c'est à dire l'urne, est constitué de trois parties, ayant des fonctions différentes (Gaume *et al.*, 2002) : la zone attractive (1), la zone de capture (cireuse) (2) et la zone digestive (3).



<u>Figure 19</u> : Coupe longitudinale d'une urne de *N. x ventrata*, description des différentes zones (Photo F. Biteau).

Le système de capture est "passif" c'est à dire qu'il n'y a pas de mouvement dans la capture de la proie par opposition aux plantes à pièges "actifs" comme *Dionaea*.

La zone d'attraction (Figure 19, (1)) :

L'entrée du piège est bordée par une structure dentée appelée péristome. Cette structure est très variable suivant les espèces de *Nepenthes*. Elle peut être très dentée comme chez *N. villosa* lisse ou même absente comme chez *N. albomarginata*.

Les insectes sont attirés par les couleurs vives et par le nectar sucré produit par les glandes situées autour du péristome et sur la face interne de l'opercule. Ceux-ci s'aventurent alors sur des surfaces glissantes qui les déstabilisent et ils finissent par tomber au fond du piège (Boulay, 1997).

La zone de capture (Figure 19, (2)) :

La zone cireuse située juste au-dessous du péristome occupe une surface très variable selon les espèces. Lorsqu'elle est présente cette zone interne généralement de couleur pâle est recouverte d'écailles visqueuses et lisses, orientées vers le bas. Ces écailles fragiles se dérobent sous les pattes de l'insecte qui, cherchant à escalader le piège, tombe à nouveau dans le liquide digestif (Boulay, 1997). Cette zone est absente chez certaines espèces, spécialisées dans la capture de gros insectes volants (Gaume and Forterre, 2007).

La zone digestive (Figure 19, (3)) :

Cette zone, située dans la partie inférieure du piège contient les glandes digestives. Ces glandes secrètent un liquide viscoélastique, qui joue un rôle crucial dans la capture de l'insecte (Gaume and Forterre, 2007), en plus de contenir de nombreuses enzymes lytiques. Une fois le piège ouvert, les parties molles des proies sont rapidement digérées et assimilées par la plante (Boulay, 1997).

La surface de la zone glandulaire est recouverte de façon régulière de glandes. Les glandes montrent des profils différents dans les parties supérieures et médianes de cette zone. Ce sont des glandes sessiles pluricellulaires, composées de 3 couches cellulaires épidermiques avec une couche de cellules sécrétrices en contact avec les secrétions de l'urne. Les 2 autres couches sont imprégnées de cutine, formant une barrière au transport apoplastique (Owen Jr *et al.*, 1999). La glande est donc constituée d'un épiderme, qui est en continuité avec l'épiderme de l'intérieur de l'urne et d'un sous-épiderme représenté par les couches

cellulaires 4 et 5. Des vaisseaux conducteurs se trouvent à la base de la glande (Owen Jr and Lennon, 1999 ; Thornhill *et al.*, 2008) (Figure 20).

Ces glandes ont deux fonctions successives : la sécrétion d'enzymes digestives, et l'absorption des nutriments résultants de cette digestion (Schweikert *et al.*, 2006). A maturité, et lorsque l'urne entre en sénescence, la sécrétion est bloquée par l'endoderme, et la fonction d'absorption se met en place. La sécrétion (enzymes hydrolytiques, des acides organiques, des ions Cl^- et Na^+, de l'eau) se fait par la voie de l'apoplasme, alors que l'absorption (ions, solutés de faible masse moléculaire résultant de la digestion de l'insecte (An *et al.*, 2002b)) est apoplastique à travers la première couche cellulaire et devient ensuite symplastique à cause de la présence de l'endoderme. Chaque glande est caractérisée par la présence de cellules épidermiques modifiées, appelées crête épidermique (Figure 21, D), qui la recouvre en partie (Owen Jr *et al.*, 1999). A noter que de nombreuses mitochondries ont été observées dans les cellules de glandes. Ceci indique que l'énergie nécessaire aux flux repose sur la respiration des mitochondries et non sur le processus de photosynthèse.

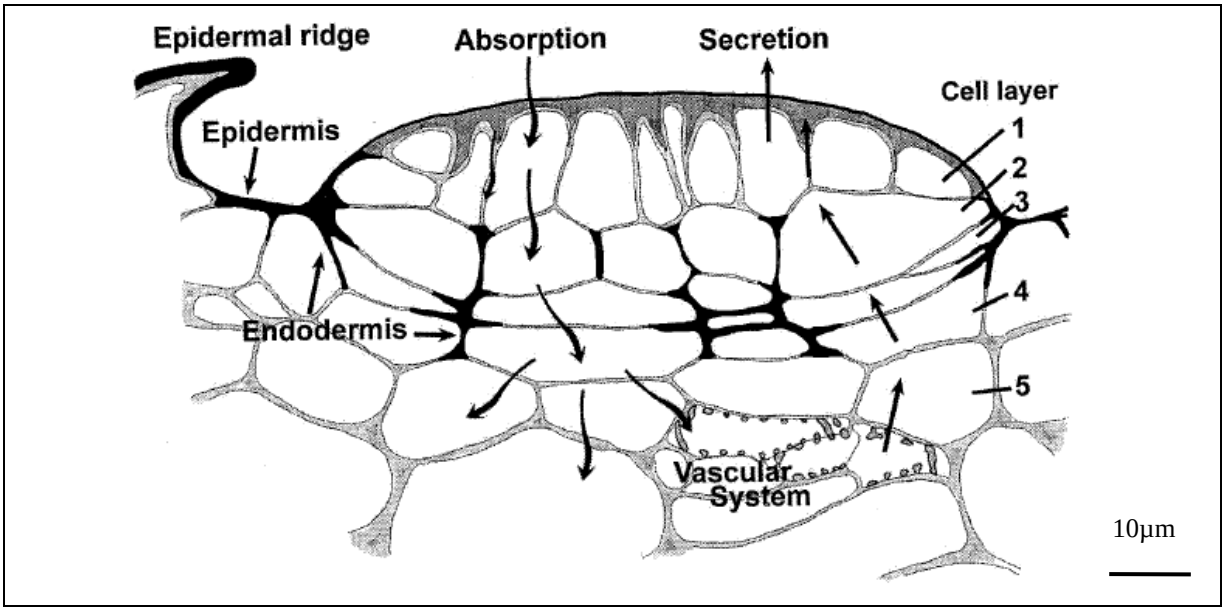


Figure 20 : Coupe transversale de glande de *Nepenthes alata* (Owen Jr *et al.*, 1999)

La répartition et la taille des glandes varient suivant le niveau dans la zone digestive. Dans les deux cas, elles sont localisées dans des dépressions profondes (22-28 µm). Les glandes de la partie supérieure sont plus petites (environ 12000µm^2), presque rondes ou légèrement allongées dans le sens longitudinal (Figure 21, C). Dans le centre de la zone

digestive, les glandes sont plus larges (92000µm^2), rondes ou légèrement allongées dans le sens transversal, et présentent une crête moins recouvrante (Figure 21, B). La densité des glandes est considérablement plus élevée dans la partie distale de la zone digestive (8,87 glandes/mm^2 chez *N. khasiana*) que dans le fond de l'urne (3,72 glandes/mm^2 chez *N. khasiana*) (Gorb *et al.*, 2004).

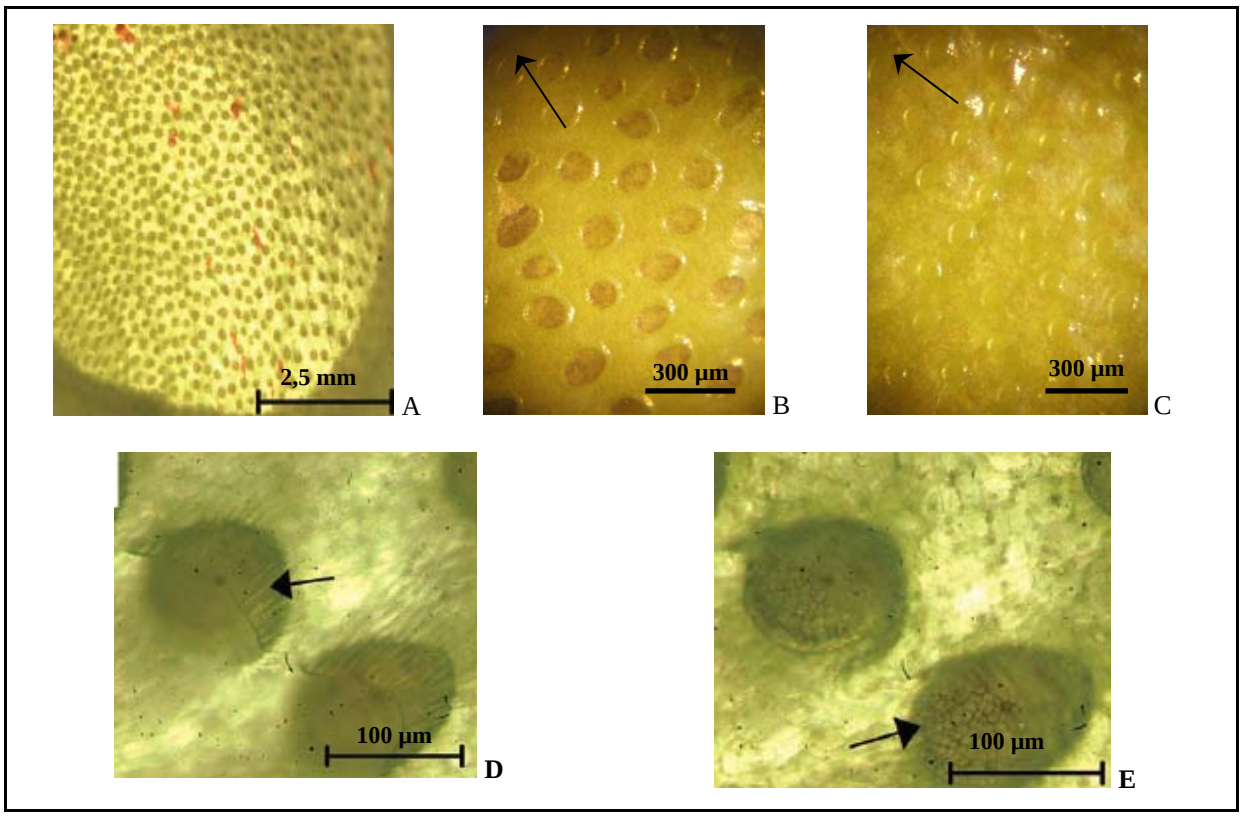


Figure 21 : Les glandes de la partie digestive de l'urne, A : coupe longitudinale de la partie inférieure de l'urne de *Nepenthes khasiana* tapissée de glandes (Eilenberg *et al.*, 2006), **B :** vue générale des glandes de la partie inférieure de la zone digestive d'urne de *N.x ventrata*, flèche montrant la direction du péristome (photo F. Biteau) , **C :** vue générale des glandes de la partie supérieure de la zone digestive d'urne de *N.x ventrata* (photo F. Biteau), **D :** Crête épidermique recouvrant partiellement les glandes de *N. khasiana* (Eilenberg *et al.*, 2006), **E :** glande *N. khasiana* remplie de granules de sécrétion (Eilenberg *et al.*, 2006).

2.3.4.3. Les enzymes digestives contenues dans les sécrétions des urnes

Les enzymes sont présentes dès l'ouverture du piège (Thornhill *et al.*, 2008), leur quantité augmente pendant plusieurs jours et en l'absence de proies, diminue après deux semaines. Les *Nepenthes* semblent avoir également la capacité de moduler l'efficacité de leurs pièges en variant l'activité protéolytique avec le pH du fluide digestif (Higashi *et al.*, 1993).

L'étude des enzymes de *Nepenthes* a commencé en 1874, mais c'est à partir des années 1964 que des études plus précises ont pu être menées (Frazier, 2000). La première enzyme de *Nepenthes* a été décrite et purifiée par chromotographie par Steckelberg et ses collaborateurs (Steckelberg *et al.*, 1967), son activité protéolytique optimale a été observée à pH 2,2, avec une faible activité observée à pH 4. Nakayama et Amagase ont aussi purifié une enzyme par filtration sur gel et chromatographie. Ils ont montré que l'enzyme était stable à des températures supérieures à 60°C, et qu'elle coupait les peptides préférentiellement à proximité des résidus d'acide aspartique dans la chaine polypeptidique. Ils ont proposé le nom de népenthésine pour cette protéase (Nakayama and Amagase, 1968). En 1972, Amagase observe sur gel une bande de même taille que la népenthésine dans la glu de *Drosera peltata*, et suggère que la protéase est similaire, voire identique chez les deux plantes (Amagase, 1972). En 1972, Jentsch utilise la chromatographie sur colonne échangeuse d'ions pour isoler la protéase cette fois à partir d'urnes fermées, il l'appellera Nepenthacin (Jentsch, 1972).

L'équipe de Lobareva a démontré que l'activité de la protéase disparaissait en présence de l'inhibiteur DDE (comme pour des protéases acides de champignons ou d'animaux), et suggère que le centre actif de l'enzyme est fonctionnellement similaire aux enzymes animales (Lobareva *et al.*, 1973). Dans cette même voix, Takahashi et ses collaborateurs ont trouvé deux autres inhibiteurs potentiels de l'enzyme : le DAN et la pepstatine (Takahashi *et al.*, 2005), travaux confirmés par l'équipe d'Athauda (Athauda *et al.*, 2004).

Récemment, Athauda et ses collaborateurs ont purifié les népenthésines I et II de *Nepenthes distilloria*. L'activité optimale de ces 2 enzymes se situe aux alentours des pH 2,5-3 et à 50°C, pour être quasiment nulle à pH supérieur à 6 (figure n°22).

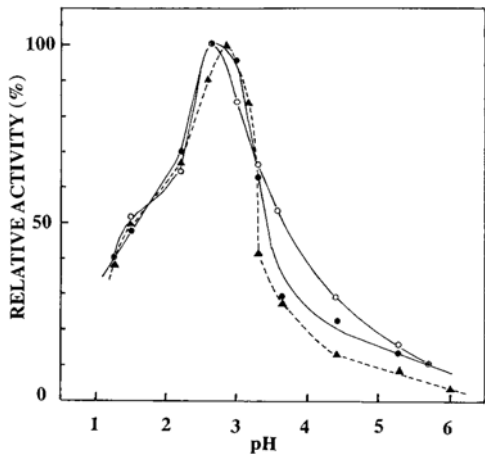


Figure 22 : pH-dépendance de l'activité des nepenthesines de *N. distillatoria* envers l'hémoglobine dénaturée : Activité mesurée à 37°C, disque noir : Népenthésine I, disque blanc : Népenthésine II, triangle : fluide digestif (Athauda *et al.*, 2004).

Ils ont également déterminé partiellement leur séquence (Athauda *et al.*, 2004). Il est apparu que les deux enzymes présentent un grand nombre de résidus cystéine (12 résidus / molécules), qui leur permettent de former 6 ponts disulfures, supposés contribuer à leur remarquable stabilité (pH, température) (Athauda *et al.*, 2004). Les népenthésines I et II matures sont constituées de 359 résidus. Leur glycosylation a aussi été étudiée : la népenthésine I comporte 6 sites potentiels de N-glycosylation alors que la népenthésine I n'en possède pas.

Les masses moléculaires approximatives des deux enzymes chez *N. distillatoria* ont été estimées sur SDS-PAGE à 45 et 35 kDa respectivement en conditions natives, et à 51 et 45 kDa en conditions dénaturantes. Mais la masse moléculaires théorique des 2 népenthésines s'élève à 37,5 kDa. Cette différence de masse moléculaire en conditions natives est supposée être due à la présence d'hydrates de carbone sur la népenthésine I, qui est glycosylée. La différence de masse moléculaire de 6 et de 10 kDa entre les népenthésines I et II en conditions natives et dénaturantes indiquent que les hydrates de carbone de la népenthésine I représentent plus de 10% de sa masse (Athauda *et al.*, 2004).

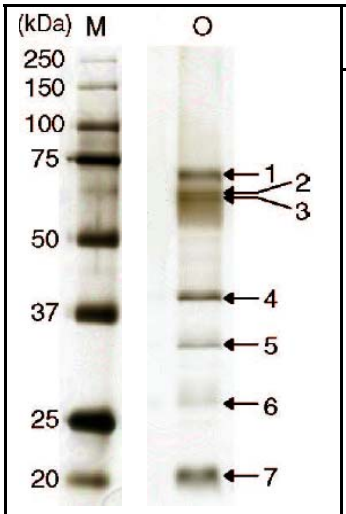
Ils ont établi que les séquences d'acides aminés des népenthésines I et II de *N. distilloria* étaient identiques à 93% et 94% (respectivement) à celle de *N. gracilis* (Athauda *et al.*, 2004). Ceci laisse penser que les protéases diffèrent légèrement selon les espèces et que la plante s'adapte à la biodisponibilité de la faune endémique. Il n'y a aucun doute que ces protéases soient les constituants majeurs du pool d'enzymes digestives de *Nepenthes*.

Cependant, il a été rapporté que les sécrétions des urnes contenaient d'autres activités enzymatiques. Tökes et ses collaborateurs ont montré que les sécrétions d'urnes fermées présentaient une activité lipasique (Tökes *et al.*, 1974). L'équipe d'Higashi a, quant à elle, trouvé une forte activité phosphatase (acides et alcalines), phosphoamidase, esterase C4 et C8 dans le jus de *Nepenthes hybrida* (Higashi *et al.*, 1993). Les analyses par SDS-PAGE leur ont aussi indiqué que les secrétions contenaient d'autres protéines. Eilenberg et ses collaborateurs ont montré dernièrement qu'une des bandes majeures observée dans le pool d'enzymes d'urnes fermées de *N. khasiana* présentait une activité endochitinase (Eilenberg *et al.*, 2006).

Récemment, An et ses collaborateurs ont purifié et caractérisé les protéases aspartiques (PA) de fluides stériles d'urnes de différentes espèces de *Nepenthes*. Cependant, il n'y avait pas d'information sur les séquences et l'expression des gènes de protéase aspartiques chez *Nepenthes*. Par des approches de RT-PCR avec des amorces dégénérées dessinées avec les séquences conservées des gènes de PA de plantes, ils ont pu cloner des homologues de PA de *N.alata*. Ils ont montré que l'expression de certains homologues était plus forte dans les

tissus de la partie inférieure de la zone digestive d'urne ouverte depuis 7 jours contenant des proies. Ceci suggère que l'expression de ces protéases serait induite par la capture d'insectes (An *et al.*, 2002a).

Afin d'identifier toutes les activités enzymatiques contenues dans les secrétions des urnes, Hatano et ses collaborateurs ont très récemment analysé le protéome des secrétions de *Nepenthes alata* par spectrométrie de masse (Hatano and Hamada, 2008). Les protéines des secrétions ont été séparées par SDS-PAGE, et 7 bandes ont été détectées par coloration au nitrate d'argent. Chaque protéine a été *de novo* séquencée et des homologies de séquences avec d'autres protéines ont pu être recherchées dans les bases de données, afin de déterminer leur nature. 6 protéines ont été identifiées, et 3 d'entres elles sont nouvelles dans le genre *Nepenthes* : β-D-xylosidase, β-1,3-glucanase, et protéine thaumatin-like. Les résultats sont résumés en figure 23 (Hatano and Hamada, 2008).



Bandes	Masse moléculaire (Kda)	Protéines	Fonction
1	70	β-D-xylosidase	Ouverture urne ?
2	65	Népenthésine I	Digestion proie
3	63	Népenthésine II	Digestion proie
4	40	?	?
5	32	β -1,3-glucanase	Effet antibactérien
6	27	chitinase	Digestion proie/ Effet antibactérien
7	21	Protéine Thaumatin-like	Effet antibactérien

Figure 23 : Analyse du protéome des urnes de *Nepenthes alata* (Hatano and Hamada, 2008)

Les népenthésines I et II sont bien sûr présentes. Leurs masses moléculaires sont plus élevées que celles des népenthésines de *N. distillatoria* décrites précédemment, preuve que les enzymes peuvent être différentes suivant les espèces.

La β-1,3-glucanase, la chitinase IV et la protéine thaumatin-like ont été déterminées comme étant des Pathogenesis-Related (PR) protéines, car elles empêcheraient la croissance des pathogènes. Ces protéines sont généralement résistantes aux protéases, grâce à une structure stabilisée par de nombreux ponts disulfures. Elles permettraient le contrôle de la

quantité de bactéries symbiotiques dans l'urne, pour assurer à la plante une assez grande disponibilité de nutriments nécessaires à sa croissance (Hatano and Hamada, 2008).

En effet, la chitinase hydrolyse la chitine, les polymères linéaires de β-1,4-N-acetylglucosamine, qui sont les composés majeurs de l'exosquelette des insectes et de la paroi des champignons. Il est possible que cette enzyme joue un double rôle : dans la digestion des proies, et dans la défense contre l'attaque de pathogènes (Hatano and Hamada, 2008).

Quant à la β-1,3-glucanase, elle hydrolyse les β-1,3-glucane, constituant essentiel des parois cellulaires des champignons pathogènes et de certaines bactéries. La protéine thaumatin-like agirait comme la β-1,3-glucanase (Hatano and Hamada, 2008).

Ces trois enzymes permettraient ainsi d'inhiber la prolifération bactérienne sur les proies en cours de digestion.

La β-D-xylosidase hydrolyse le xyloglucane, le xylane, l'arabinoxylane et l'arabinane, qui sont les composants de l'hémicellulose des cellules végétales. Cette enzyme aurait un rôle dans le métabolisme cellulaire et le développement de la plante. Elle serait impliquée dans l'ouverture des urnes, car son niveau diminue rapidement une fois que l'urne est ouverte. Cependant, la fonction biochimique précise reste indéterminée (Hatano and Hamada, 2008).

2.3.4.4. Evolution du pH de l'urne au cours du temps

L'acidification des sécrétions des urnes joue un rôle important dans la digestion et l'absorption des proies. Il a été observé que le pH d'une urne fermée se situe aux alentours de 5, alors que le pH d'une urne fraichement ouverte (depuis 7 à 10 jours) chute à pH 2,5-3 en réponse à la présence d'insectes. L'acidification des urnes serait aussi induit par l'ammonium (Higashi *et al.*, 1993), suggérant que le pH des sécrétions des urnes diminue en réponse à l'ammonium dérivant des insectes en décomposition (An *et al.*, 2001). Sans apport d'insectes et donc en absence d'ammonium, le pH reste maintenu aux alentours de pH 5. Sachant que le pH optimal des enzymes protéolytiques présentes dans les sécrétions se situe aux alentours de 2-3 (Amagase, 1972 ; An *et al.*, 2002a ; Athauda *et al.*, 2004), cette acidification des secrétions permet dans un premier temps aux enzymes d'être actives et de digérer la proie.

L'expression de gènes codant pour des transporteurs de composés azotés (azote, acides aminés et peptides) a déjà été démontrée dans les tissus des urnes de *Nepenthes alata*. Les ARNm des transporteurs ont été localisés dans les cellules épidermiques en surface de la glande. Il a été rapporté que l'absorption de l'azote *via* ces transporteurs dépendrait de la

force du gradient de protons à travers la membrane plasmique (Schulze *et al.*, 1999). Ceci suggère que l'acidification des sécrétions des urnes est également très importante pour l'absorption des nutriments. Même si le mécanisme d'acidification et d'assimilation n'est pas clairement connu et démontré, il semblerait qu'une enzyme H^+-ATPase présente dans la membrane plasmique génère un gradient électrochimique, qui serait utilisé pour conduire les solutés à travers la membrane (An *et al.*, 2001).

Par la suite, le pH d'une urne ouverte depuis plusieurs semaines (5 à 6) voit son pH remonter aux alentours de pH 7. Ces urnes ne sont plus capables de remplir leur fonction assimilatrice de nutriments (An *et al.*, 2001). Le piège meurt, il entre alors en sénescence.

2.3.4.5. Nutrition de la plante : flux de nutriments

L'ajout de traceur fluorescent dans l'urne a permis de suivre le devenir des produits absorbés dans la plante. L'absorption est rapide et les produits sont redistribués en moins de 3 jours dans les parties de la plante nécessiteuses en nutriments *via* des tissus vasculaires interconnectés directement sous les glandes (Schulze *et al.*, 1999 ; Thornhill *et al.*, 2008). Des transporteurs d'ammonium ont été mis en évidence dans les glandes et dans les vaisseaux du phloème (Schulze *et al.*, 1999). Le traceur fluorescent a été repérée notamment dans l'urne juvénile au niveau des zones de croissance tissulaire le long d'un cercle, et dans les glandes nectarifères (Owen Jr *et al.*, 1999).

2.3.5. Utilisation traditionnelle

Curiosités de la nature pour les botanistes, certains *Nepenthes* sont également considérés par les indigènes de Bornéo, les Dayak, comme des plantes médicinales employées contre les fièvres et la dysenterie. La plante entière est utilisée comme une liane solide résistante à la moisissure comme le rotang. Certaines tribus s'en servent pour lier les faîtières de leur "longhouse" (longue maison communautaire généralement sur pilotis)(Boulay, 1997).

Les plantes étaient autrefois utilisées par des tribus indigènes d'Indonésie pour traiter certaines maladies. Par exemple, les racines de *Nepenthes* broyées en poudre permettaient de soigner les maux d'estomac dans des tribus de Malaisie. (L'effet devant être du à la présence de naphtoquinones dans ses tissus). L'infusion de tiges était également utilisée pour traiter la fièvre. La plante servait aussi comme émétique contre les empoisonnements ou les intoxications (Juniper *et al.*, 1989).

Le jus des urnes de *Nepenthes* était aussi bu ou utilisé dans quelques tribus :

Le nom commun « Monkey cups » pour les urnes de *Nepenthes* fait référence aux singes observés en train de boire le jus de ces plantes. Le jus était par exemple utilisé par les habitants de Bornéo en cas d'indigestion.

Au sultanat du Brunei, le jus d'urne fermée (n'importe quelle espèce) était utilisé comme masque capillaire et pour l'inflammation des yeux. Le liquide d'urne fermée de *Nepenthes gracilis* était également ingéré pendant la grossesse des femmes pour prévenir l'asthme des nouveaux nés. La population Dusun en Sabah utilise le jus d'urne fermée de *N. lowii* et *N. edwardsiana* comme lotion pour la peau. A Java, le jus des urnes de *N. gymnamphora* est bu comme remède contre la toux

Selon les analyses de certains jus par le département d'agriculture de Brunéi, certains ont des propriétés astringeantes et stimulantes.

Plus récemment en 1976, aux Phillipines, il a été rapporté que le fluide d'urne fermée de *N. alata* était utilisé contre les diarrhées, et à Sumatra, le jus de *N. tobaica* est utilisé pour soigner les brulures (Clarke, 1997).

Néanmoins, l'utilisation la plus commune des urnes de Nepenthes de Bornéo reste la source d'eau pour des randonneurs assoiffés (urnes fermées ou ouvertes depuis longtemps et remplies d'eau de pluie).

Enfin, Les Kadians, en 1897, utilisaient les ascidies pour cuisiner le riz. Cette utilisation est toujours d'actualité dans certaines parties de l'Ile de Bornéo aujourd'hui. De grandes urnes de *N. reinwardtiana* sont lavées, et après les avoir farcies avec du riz, elles sont cuites à feu doux une journée entière. Selon les dires, ce mode de cuisson donne une saveur particulière au riz. Les urnes de *Nepenthes* sont également utilisées en Thaïlande pour faire cuire le riz (Clarke, 1997).

Beaucoup de ces traditions sont actuellement en déclin, pour laisser place bien sûr à d'autres médecines. Aujourd'hui, cependant, les *Nepenthes* font toujours partie de la pharmacopée malaysienne et chinoise.

3. La transformation génétique chez les végétaux supérieurs

3.1. Les différentes techniques de transformation génétique des végétaux

La transformation génétique chez les végétaux a pour but l'introduction, l'insertion et l'expression de nouveaux caractères (ou la suppression de caractères) dans le génome des cellules végétales par des techniques de recombinaison de l'ADN exogène (Birch, 1997), suivie de la régénération et de la sélection des plantes transformées. Il existe différents types de transfert de gènes : les méthodes dites directes et les indirectes.

3.1.1. Les méthodes de transferts directs

Les principales techniques de transformation directe sont la biolistique, la microinjection, l'électroporation, et le transfert utilisant le Poly Ethylène Glycol.

La biolistique a été mise au point au départ, pour permettre la transformation génétique de plantes monocotylédones, résistantes à l'infection par *Agrobacterium tumefaciens* avant la construction de souches adaptées. Cette technique peut s'appliquer à toutes les espèces végétales.

En biolistique ou bombardement de particules (Sanford, 1988 ; Klein *et al.*, 1992 ; Sanford, 2006), les cellules végétales sont bombardées par des particules de tungstène ou d'or de l'ordre du micromètre de diamètre sur lesquelles l'ADN à transférer est adsorbé. Ces billes seront progressivement ralenties en traversant les différentes couches cellulaires végétales. Quand une de ces billes atteint le noyau, l'ADN porté peut y est introduit, et peut s'intégrer dans le génome de façon aléatoire. Cette technique nécessite l'utilisation d'un appareil capable d'accélérer les particules métalliques ou canon à particules. Suivant les espèces, la période avant d'obtenir une lignée transgénique stable peut varier de quelques jours à plusieurs mois. Cette méthode peut être appliquée à des méristèmes ou des embryons immatures, ce qui évite les problèmes de régénération à partir de cellules ou de tissus. Mais la plante développée étant chimérique, il faut souvent attendre la génération suivante pour sélectionner les descendants transformés. Cette technique est également utilisée pour effectuer la transformation des génomes des organites, chloroplastes ou mitochondries (Maliga, 2002).

Il est également possible de transférer des organites subcellulaires et de l'ADN grâce à la micro-injection. Le transfert d'ADN dans des protoplastes issus de cellules de mésophylle

de tabac a permis d'obtenir 14 % de transformant sans avoir recours à la sélection (Crossway *et al.*, 1986).

L'électroporation de protoplastes et de cellules intègres (Fromm *et al.*, 1985) est basée sur la capacité des macromolécules présentes dans le milieu extracellulaire d'être acceptées à l'intérieur de cellules vivantes après un cours choc électrique. Le champ électrique provoque la déstabilisation de la membrane plasmique de la cellule et conduit à l'ouverture des pores membranaires, facilitant ainsi le passage de l'ADN dans le noyau.

La technique de la lipotransfection est également une méthode dite directe. Le but de cette méthode est d' «emprisonner» le gène d'intérêt dans un liposome, c'est-à-dire une structure sphérique constituée de lipides. Ceux-ci ont la capacité de fusionner avec la membrane de protoplastes, ils libèrent ainsi leur contenu (ici le gène d'intérêt) dans le cytoplasme du protoplaste. Cependant, seule une minorité de ces gènes pourront parvenir jusqu'au noyau et s'intégrer par la suite au génome de la cellule, c'est pourquoi cette méthode est peu utilisée (Felgner and Lingold, 1989 ; Zhen *et al.*, 1994 ; Patrick *et al.*, 1999)..

Enfin, la transformation de protoplastes est aussi possible par des méthodes chimiques en présence de PolyEthylène Glycol (PEG), qui déstabilise la membrane plasmique des cellules. Elle a été utilisée pour la première fois par Uchimiya et ses collaborateurs pour la transformation de protoplastes de riz (Uchimiya *et al.*, 1986).

3.1.2. Les méthodes de transferts indirects

Les méthodes indirectes utilisent des agents pathogènes tels que les virus (Porta and Lomonossoff, 2002 ; Gleba *et al.*, 2007) ou les bactéries.

Les vecteurs les plus souvent utilisés sont les agrobactéries : *Agrobacterium tumefaciens* (responsable de la galle du collet ou crown gall), et *A. rhizogenes* (responsable de la prolifération anarchique du chevelu racinaire ou hairy roots). L'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* présente certains avantages sur les méthodes directes. En effet, le nombre de copies du transgène transféré à la plante est réduit, ce qui diminue le risque potentiel de co-suppression (cf 1.2.6.2.6) et d'instabilité du transgène (Hansen *et al.*, 1997). De plus, c'est un système où une cellule unique est transformée, ce qui évite l'obtention de plantes chimères comme c'est très souvent le cas en transformation directe (Enriquez-Obregon *et al.*, 1997 ;

Enriquez-Obregon *et al.*, 1998). Et enfin, le transgène est souvent inséré dans des régions du génome transcriptionnellement actives.

Seul le système de transformation génétique utilisant *Agrobacterium tumefaciens* sera présenté en détail dans la suite de la synthèse bibliographique.

Les virus phytopathogènes présentent plusieurs avantages. Ils sont capables d'infecter des cellules intactes de plantes et d'y introduire leur acide nucléique. Ensuite, les cellules infectées produisent de grandes quantités de virus, engendrant un niveau d'expression du transgène très élevé. Les infections virales sont souvent systémiques, permettant l'expression rapide du transgène dans toutes les cellules. Finalement, tous les virus de plantes connus ont une réplication épisomique, c'est pourquoi le transgène qu'ils portent n'est pas soumis aux effets de position qui influencent souvent l'expression des transgènes intégrés. Par contre, une transformation stable par infection virale n'est pas possible, ni l'obtention d'une lignée transgénique (Primrose *et al.*, 2004).

Il est cependant possible d'introduire une copie complète de génome viral dans des cellules de plantes isolées ou dans des plantes entières via *Agrobacterium* ou par transfert direct d'ADN. De cette façon, il est possible de générer des lignées de cellules transformées de façon transitoire ou des plantes transgéniques portant un génome viral recombinant intégré. Dans le cas de virus à ARN, la transcription d'une copie d'ADNc intégré dans le génome fournit des ARN viraux compétents pour la réplication, qui seront amplifiés de façon épisomique, et facileront un haut niveau d'expression du transgène. Les plantes transgéniques sont infectées de façon persistante par le virus et peuvent produire de grandes quantités de protéines recombinantes. Dans le cas des virus à ADN, la transformation transitoire ou stable à l'aide d'*Agrobacterium* avec un ADN-T contenant un génome viral partiellement dupliqué peut conduire à la réplication épisomique de gènomes intactes (escape replication). Ce dernier procédé, est mieux connu sous le nom « d'agro-infection » ou « d'agro-inoculation » (Primrose *et al.*, 2004).

3.2. Mécanismes de l'infection des plantes dicotylédones par *d'Agrobacterium tumefaciens*

Il s'agit d'un processus naturel réalisé par une bactérie gram négatif du sol de la famille des rhizobiaceae *Agrobacterium tumefaciens*, entrainant la galle du collet (Smith and Townsend, 1907). Cette bactérie a la propriété remarquable de transférer une partie de son ADN dit ADN-T (Matthysse and Stump, 1976 ; Chilton *et al.*, 1977a ; Zupan *et al.*, 2000)

dans le génome de cellules végétales. Elle les asservit à ses besoins en leur faisant produire des opines (substrat aminocarboné que seule la bactérie peut cataboliser) en réponse à l'émission de signaux chimiques de la plante hôte blessée (Gelvin, 2006).

3.2.1. Le plasmide Ti et l'ADN-T

Les agrobactéries capables d'infecter des cellules végétales possèdent en plus de leur génome chromosomique un plasmide Ti de 200 kb responsable de leur virulence. Si ce plasmide est transféré dans une souche non virulente d'agrobactéries ou de bactéries génétiquement proches telles *Rhizobium trifolii* (qui induit la formation de nodules racinaires), celle-ci devient à son tour capable d'infecter les cellules végétales (Hooykaas *et al.*, 1977). Néanmoins, la seule présence de ce plasmide n'est pas suffisante pour rendre virulente une souche bactérienne comme *Escherichia coli*. Il y a donc des particularités au sein même du génome d'*Agrobacterium tumefaciens* qui la rendent capable d'infecter des cellules végétales.

Le plasmide Ti d'*Agrobacterium* est composé de différents éléments (Figure 24) :

- Un ADN-T (ADN de transfert) flanqué de bordures droite et gauche de 25 pdb en orientation directe. Elles sont appelées RB et LB pour Right et Left Borders.
- Une région de virulence comprenant des gènes *vir* organisés en 8 opérons permettant le transfert de l'ADN-T à la cellule végétale.
- De gènes servant au transfert de plasmides entre bactéries par conjugaison.
- D'une séquence servant à sa réplication.
- De gènes impliqués dans le catabolisme des opines.

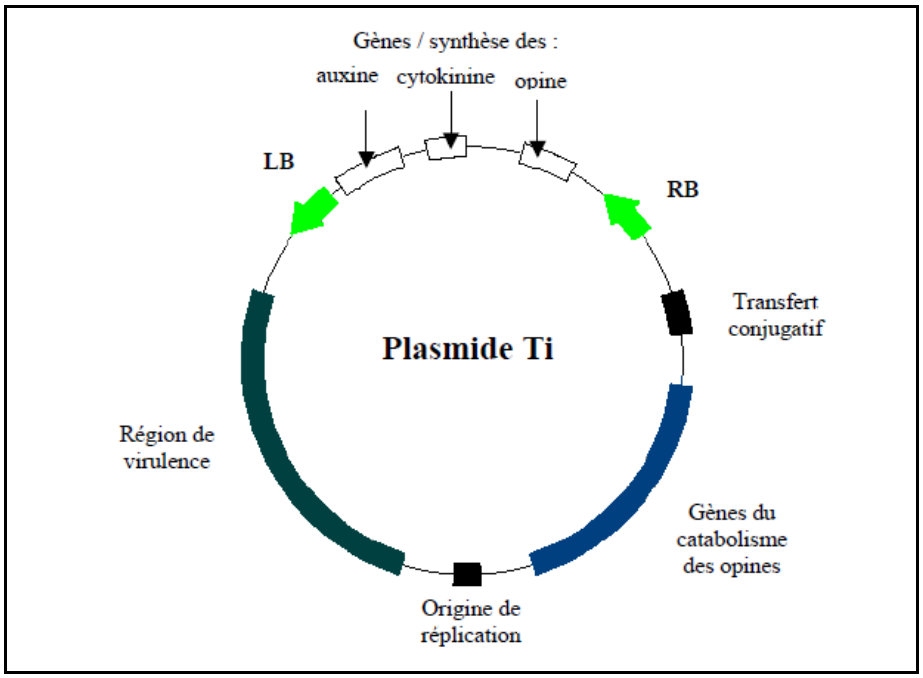


Figure 24 : Principales régions du plasmide Ti *d'Agrobacterium tumefaciens*.

L'ADN-T est une séquence d'ADN encadrée par des bordures droite et gauche et constituée de plusieurs types de gènes. Certains d'entre eux sont des oncogènes (*onc*) codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse de phytohormones telles que les auxines (*iaaM* et *iaaH*) et les cytokinines (*ipt*). Ils sont responsables de la formation de tumeurs chez la plante infectée (Hooykaas and Schilperoort, 1992). D'autres gènes codent pour la synthèse d'opines. Ces composés, produits par la condensation d'acides aminés et de sucres, sont synthétisés et excrétés par les cellules tumorales végétales et sont des sources de carbone et d'azote pour *Agrobacterium tumefaciens*. Le type d'opines présent dans la tumeur dépend de la souche d'agrobactérie infectante (Dessaux *et al.*, 1993) (La nature des opines produites a d'ailleurs permis une classification des bactéries (souches à nopaline, octopine, agropine succinamopine…).

La région *vir* du plasmide Ti est un régulon de 30 kb composé de 8 opérons. Certains sont essentiels au transfert de l'ADN-T (*virA*, *virB*, *virD*, *virG*, *virF*), d'autres augmentent l'efficacité du transfert (*virC* et *virE*) (Hooykaas and Schilperoort, 1992 ; Zupan and Zambryski, 1995), et enfin, le dernier est de moindre importance (*vir* H) (De La Riva *et al.*, 1998). Chacun de ces opérons est constitué de un ou plusieurs gènes : 1 gène pour *virA* et *virG*, 2 pour *virC* et *virE*, 5 pour *virD* et 11 gènes pour *virB*.

3.2.2. Induction du système de virulence de la bactérie

Principe général :

Le transfert de gènes d'*Agrobacterium tumefaciens* à la plante nécessite un grand nombre d'étapes distinctes et essentielles. Tout d'abord, la plante doit être blessée pour induire la reconnaissance plante-bactérie. Les composés que synthétise la plante blessée activent le système de virulence de la bactérie et induisent son attachement à la cellule végétale (Stachel *et al.*, 1985). L'ADN-T est ensuite transféré puis transcrit dans les cellules de la plante avant même d'être intégré dans le génome. On parle d'expression transitoire. Après son intégration, le niveau d'expression de l'ADN-T est en partie déterminé par son site d'insertion dans le génome végétal. Les cellules de la plante se multiplient et forment des tumeurs grâce à la synthèse continue d'auxines et de cytokinines. Les cellules végétales transformées continuent à synthétiser des opines qui sont des sources de carbone et d'azote métabolisables par *Agrobacterium tumefaciens* (Klapwijk *et al.*, 1978). Elles favorisent, de ce fait, la multiplication des agrobactéries.

Le transfert de l'ADN-T fait intervenir à la fois des gènes portés par la région *vir* du plasmide Ti et des gènes chromosomiques de la bactérie (Doty *et al.*, 1993).

Les rôles des gènes d'origine chromosomique sont très divers : certains interviennent dans l'attachement d'*Agrobacterium* aux parois des cellules végétales. C'est le cas des loci *chvA* et *chvB*, qui sont impliqués dans la synthèse et l'excrétion de β-1,2 glucane (Cangelosi *et al.*, 1989). Les loci *cel*, *pscA* (exoC chez Rhizobium), *att*, servent à l'adhésion de la bactérie aux cellules végétales. En effet, *Cel* permet la synthèse des fibrilles de cellulose (Matthysse, 1983), *pscA* intervient dans la synthèse de glucanes cycliques et d'acides succinoglycane (Cangelosi *et al.*, 1987), et enfin *att* code pour une protéine de la surface cellulaire (Matthysse, 1987 ; Matthysse *et al.*, 2000). Le locus *chvE* intervient comme régulateur (en association avec VirA) des gènes de la région de virulence du plasmide (De La Riva *et al.*, 1998). La reconnaissance des composés phénoliques (Bolton *et al.*, 1986 ; Kumar and Rajam, 2005) (telle que l'acétosyringone) par le complexe protéique transmembranaire formé de *chvE* et *virA* (la seule protéine vir exprimée constitutivement) et l'acidité du milieu extérieur (pH 5,0 à 5,5) entraînent une autophosphorylation de la protéine *virA* (Johnson and Das, 1998). VirA est capable de phosphoryler à son tour la protéine cytoplasmique virG (Jin et al., 1990), qui active et régule la transcription de l'ensemble des gènes *vir* (Stachel and

Zambryski, 1986) dont les 11 gènes de l'opéron *virB* impliqués dans la synthèse et l'assemblage du T-pilus (Fullner *et al.*, 1996 ; Lai and Kado, 1998 ; Lai and Kado, 2002).

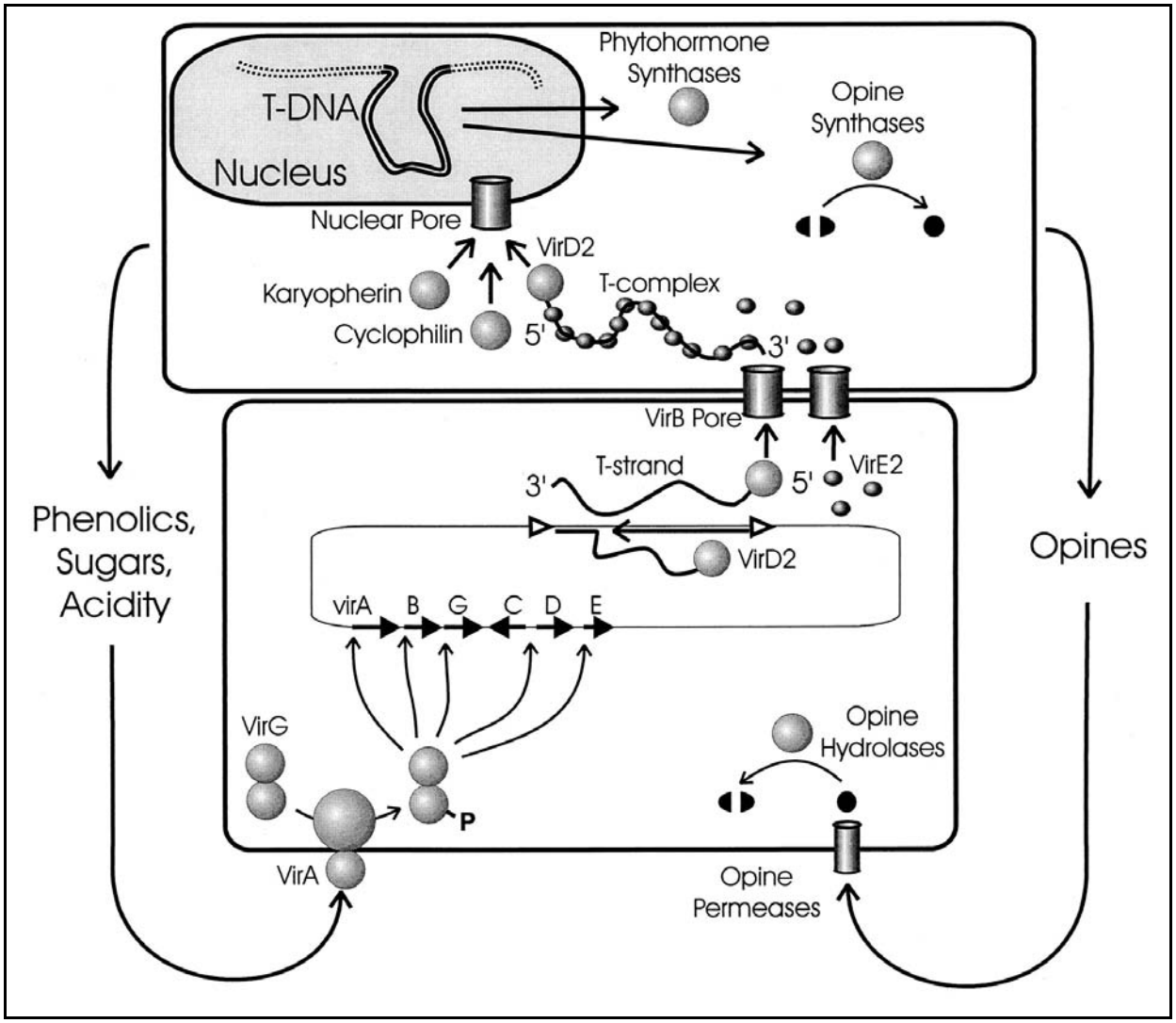


Figure 25 : Mécanismes et principaux gènes impliqués dans le transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales : La plante blessée émet des composés phénoliques et des sucres qui sont perçus grâce au complexe virA/virG. Leur phosphorylation déclenche l'activation des gènes de virulence d'*Agrobacterium tumefaciens*. L'attachement de la bactérie à la surface de la cellule végétale se fait grâce à ses gènes chromosomiques. Une copie simple brin de l'ADN-T est synthétisée grâce au complexe virD1/virD2, puis, elle est conduite dans la cellule végétale grâce aux protéines virD2. Les protéines virB établissent un canal entre la cellule bactérienne et la cellule végétale. Le complexe T formé de l'ADN-T et des protéines virD2 (en 5' de l'ADN-T) et virE2 (le long de la séquence) entre dans la cellule végétale, où VIP1 facilite leur migration dans le cytoplasme. Puis, il se dirige vers le noyau de la cellule végétale et l'ADN-T s'intègre dans le génome (Zhu *et al.*, 2000).

3.2.3. Le transfert de gènes *d'Agrobacterium tumefaciens* à la plante

Il s'ensuit une cascade d'événements qui aboutit au transfert de l'ADN-T bactérien dans le génome de la plante.

La seule condition *sine qua non* au transfert des gènes de l'ADN-T d'*Agrobacterium* aux cellules végétales est l'intégralité de la séquence des bordures et en particulier de la bordure droite. Elle est essentielle au transfert de l'ADN dans la plante, suggérant qu'il s'initie au niveau de la bordure droite RB et se poursuit vers la bordure gauche LB (Miranda *et al.*, 1992) (Figure 25).

L'initiation du transfert commence quand le complexe virD1/virD2 reconnaît les séquences des bordures droite et gauche de l'ADN-T, les clivent à une distance de 4 nucléotides de leur extrémité gauche et déclenche la synthèse d'un ADN-T simple brin (Scheiffele *et al.*, 1995). L'initiation de cette copie est possible à partir des 2 bordures. Cependant, la fixation de virC1 sur la séquence over-drive, à proximité de RB, stimule la synthèse du simple brin d'ADN-T à partir de RB vers LB. VirD2 permet le clivage de l'ADN-T au niveau des 2 bords et détermine donc la séquence d'ADN-T qui sera intégrée (Yanofsky *et al.*, 1986). La protéine virD2 y reste alors fixée de manière covalente en 5' le protégeant des exonucléases (Durrenberger *et al.*, 1989) et le guidant vers le noyau de la cellule végétale (Durrenberger *et al.*, 1989 ; Pansegrau *et al.*, 1993).

Le transfert de l'ADN simple brin (Yusibov *et al.*, 1994) nu est guidé par la protéine virD2 vers la cellule végétale. Les protéines VirE2 migrent séparément vers la cellule végétale puis elles se fixent au complexe ADN-virD2 (Sundberg *et al.*, 1996) pour former le complexe T (Howard and Citovsky, 1990) dans le cytoplasme de la cellule végétale (Zhu *et al.*, 2000). Elles protègent le simple brin d'ADN de la dégradation des nucléases dans la cellule végétale (Christie *et al.*, 1988 ; Gelvin, 1998).

Le transfert de l'ADN-T vers la cellule végétale se fait au travers d'un canal composé de sous-unités virB. Le canal ressemble à un pilus observé lors d'une conjugaison bactérienne (Fullner *et al.*, 1996). Une fois dans la cellule végétale, les récepteurs cytoplasmiques de la plante se fixent aux signaux de localisation nucléaires (NLS) présents sur les protéines virD2 et virE2, et permettent le transfert de l'ADN-T vers le noyau végétal (Citovsky *et al.*, 1992 ; Citovsky *et al.*, 1997).

Peu de gènes végétaux ont été identifiés comme ayant un rôle dans le transfert de l'ADN-T. Le plus étudié est le gène *vip1*. La protéine VIP1 intervient dans le transport du complexe-T du cytoplasme de la cellule végétale vers le noyau, en se fixant à virE2 (Tzfira *et al.*, 2001 ; Ward *et al.*, 2002 ; Dafny-Yelin *et al.*, 2008).

3.2.4. L'intégration de l'ADN-T dans les cellules végétales

L'insertion de l'ADN-T se fait au hasard et sous forme de recombinaison illégitime (Mayerhofer *et al.*, 1991) dans le génome végétal. Stabilisé, il est ensuite transmis classiquement par division cellulaire aux cellules filles (Zhu *et al.,* 2000). Les gènes de l'ADN-T seront exprimés et permettront la synthèse d'auxines, de cytokinines (responsables de la tumeur végétale), et d'opines. La bactérie détourne ainsi la machinerie biosynthétique de la plante à son profit.

L'intégration de l'ADN-T se fait aléatoirement mais de préférence dans les régions transcriptionnellement actives du génome de la plante (Feldmann and Marks, 1987). Plusieurs ADN-T peuvent être transférés dans la même cellule par des bactéries différentes et il arrive souvent que les ADN-T co-transférés s'intègrent au même endroit dans le génome cellulaire. Ceci suggère l'existence de "points chauds" favorables à l'intégration de l'ADN-T (De Block and Debrouwer, 1991). Ces hot spots pourraient être des endroits où l'ADN génomique est endommagé et où seraient présentes les enzymes nécessaires à sa réparation.

L'insertion de l'ADN-T dans le génome végétal se fait par recombinaison illégitime. En effet, la comparaison de séquence d'ADN génomique avant et après insertion de l'ADN-T montre que les homologies de séquences ne sont pas nécessairement très grandes (Hooykaas and Schilperoort, 1992 ; Tinland, 1996).

Le modèle proposé par Tinland (1996) tient compte de ces éléments. L'association de l'ADN-T et de l'ADN de la cellule hôte se ferait en 3' de l'ADN-T au niveau d'une courte séquence homologue. L'ADN végétal simple brin déplacé serait alors la cible d'activités endonucléasiques expliquant la délétion de quelques nucléotides dans la séquence finale autour du site d'insertion (13-73 pb) de l'ADN-T (Hooykaas and Schilperoort, 1992). Il s'avère que le côté gauche de l'ADN-T (en 3' du simple brin) est peu conservé et a une courte région homologue avec le site de pré-insertion (au moins 5 nucléotides consécutifs). Une partie de cette extrémité de l'ADN-T serait digérée afin qu'il y ait un meilleur appariement avec l'ADN végétal. La partie 5' de l'ADN-T liée à virD2 se fixerait au brin d'ADN végétal complémentaire au niveau d'une « micro-homologie » (souvent, seulement un nucléotide). Les extrémités de l'ADN-T sont ainsi liées à l'ADN. Une digestion du brin supérieur de l'ADN, suivie d'une réparation et d'une réplication de l'ADN-T permet d'obtenir un double

brin d'ADN comprenant la séquence d'ADN-T. Ce modèle indique donc que l'intégration de l'ADN-T se fait à l'état de simple brin (Tinland *et al.*, 1994).

Il a été montré que l'ADN-T est parfois rejeté du génome-hôte, en y laissant quelques empreintes de son intégration passée (Marton *et al.*, 1994). Cette instabilité semble cependant être limitée au processus d'intégration, puisqu'une fois intégrée dans le génome des plantes, l'ADN-T réagit comme l'ADN hôte et est transféré dans la descendance (Tinland, 1996).

3.3. Utilisation de la souche *Agrobacterium tumefaciens* pour la transformation génétique des plantes

Agrobacterium tumefaciens est devenu un outil permettant la transformation génétique de végétaux avant même que les mécanismes moléculaires permettant ce transfert d'information génétique ne soient totalement connus (Chilton *et al.*, 1977b ; Hernalsteens *et al.*, 1980).

Le fait qu'aucun des gènes de l'ADN-T ne soit nécessaire à son transfert dans les cellules végétales a ouvert de grandes perspectives. Il est possible de remplacer ces gènes par des gènes d'intérêt sous contrôle de promoteurs (constitutifs ou non) et de maintenir le processus de transformation génétique, tout en enlevant les effets tumorigènes indésirables. Un plasmide Ti dont la partie oncogène a été éliminée est un plasmide Ti désarmé.

Afin d'utiliser *Agrobacterium tumefaciens* comme vecteur pour la transformation génétique des végétaux, différents systèmes ont été mis en place pour modifier l'ADN-T et y insérer des gènes d'intérêt. La taille des séquences d'ADN transférables sans modification peut atteindre 150 Kb grâce au vecteur binary-BAC (Hamilton *et al.*, 1996). La construction de plasmides Ti synthétiques dans *E. coli*, beaucoup plus petits (environ 10 Kb) que le plasmide d'origine tel qu'il était lors de sa découverte (150 Kb) est un des grands avantages de cette technique. Deux systèmes de transformation ont été développés : le système de co-intégration et le système binaire.

3.3.1. Le système de co-intégration

Le système de co-intégration est basé sur la recombinaison de deux plasmides, et le but est d'obtenir un plasmide comportant à la fois la région *vir* et l'ADN-T. La première construction (transgène + marqueur de sélection) est clonée dans un petit plasmide chez *Escherichia coli*. Ce plasmide est introduit par conjugaison ou électroporation dans

Agrobacterium tumefaciens qui renferme le plasmide contenant les gènes *vir*. Les deux plasmides se recombinent grâce à une région homologue pour former le plasmide final (Zambryski *et al.*, 1983 ; Deblaere *et al.*, 1985). C'est pourquoi pour cette méthode, on parle de vecteur co-intégré. Diverses constructions sont possibles. Une d'entre elles est décrite figure 26. Elle correspond au cas où le gène d'intérêt lié au marqueur de sélection végétale est cloné dans un petit plasmide entre les deux bordures LB et RB, le marqueur de clonage et la séquence homologue étant en dehors de cette zone. Il y a alors insertion du gène d'intérêt et des marqueurs de sélection.

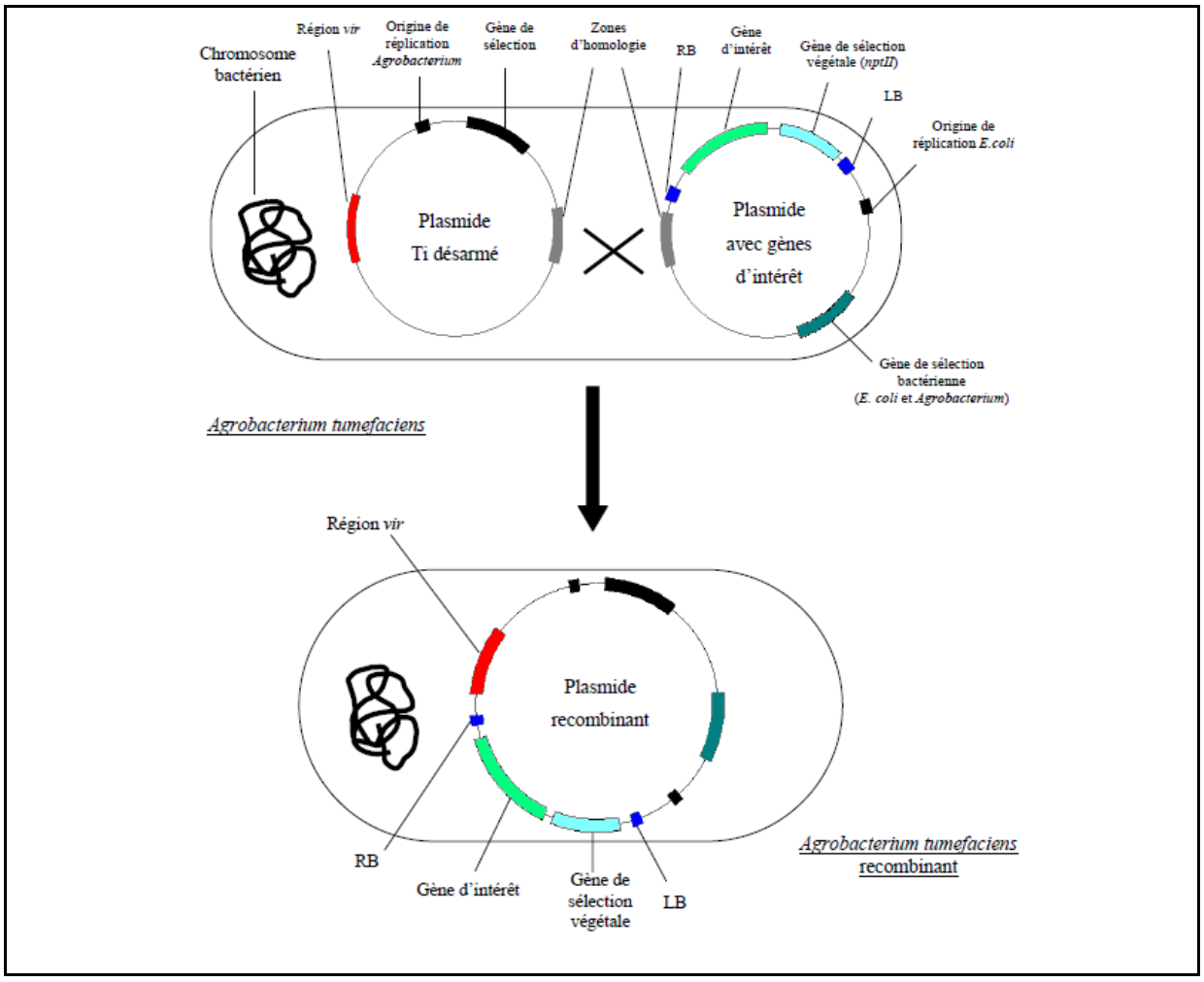


Figure 26 : Représentation schématique du système de co-intégration. Le plasmide qui contient la région *vir* est maintenu dans *Agrobacterium tumefaciens*. Le plasmide qui comporte l'ADN-T (gène de sélection végétale et gène d'intérêt) est introduit dans *Agrobacterium* soit par électroporation, soit par conjugaison bactérienne via *E. coli*. L'ADN-T s'intègre dans le plasmide Ti par recombinaison homologue : les régions *vir* et l'ADN-T sont sur le même plasmide. L'agrobactérie recombinante ainsi obtenue peut alors être utilisée pour transformer génétiquement des cellules végétales.

3.3.2. Le système binaire

Une autre étape a été franchie lors de la séparation des gènes *vir* et de l'ADN-T sur deux plasmides différents. En effet, à l'état naturel, les gènes *vir* et l'ADN-T sont situés sur le même plasmide, mais leur action est aussi possible en *trans* (non lié aux autres éléments) c'est-à-dire quand ils sont sur deux plasmides différents (Bevan, 1984). Le plasmide de petite taille portant le gène d'intérêt et le marqueur de sélection entre les bordures droites et gauche, une origine de réplication fonctionnelle dans *Agrobacterium* et le gène de sélection bactérienne en dehors des bordures, est tout d'abord construit dans *E. coli* (figure 27). Ce plasmide dit « binaire » par référence à la méthode utilisée est donc capable de se répliquer à la fois dans *E.coli* et dans *Agrobacterium* (Hoekema *et al.*, 1983).

Il est ensuite introduit par conjugaison bactérienne dans *Agrobacterium tumefaciens* qui renferme déjà un plasmide (dit « assistant ») avec une région vir et l'origine de réplication du plasmide Ti. Il n'y a cette fois pas de recombinaison entre eux. Un troisième plasmide dit «helper» qui ne peut pas se répliquer chez *Agrobacterium* est également utilisé pour augmenter le taux de transfert par l'action de ses protéines tra et mob (pour transfer et mobilization), codées respectivement par les gènes *tra* et *mob*, dans le cadre d'une conjugaison triparentale.

Depuis le développement de cette technique, de nombreux vecteurs binaires ont été construits (Hellens *et al.*, 2000b) et ont été améliorés du point de vue de leur flexibilité, (permettant leur utilisation sur un grand nombre d'espèce végétale), et de leur format facilitant la manipulation de gène *in vitro* (exemples : pGreen0029 (Hellens *et al.*, 2000a), pBin20 (Hennegan and Danna, 1998), pPZP111(Hajdukiewicz *et al.*, 1994), pJJ1881 (Jones *et al.*, 1992), pCGN1547 (McBride and Summerfelt, 1990), pBIN19 (Bevan, 1984)…).

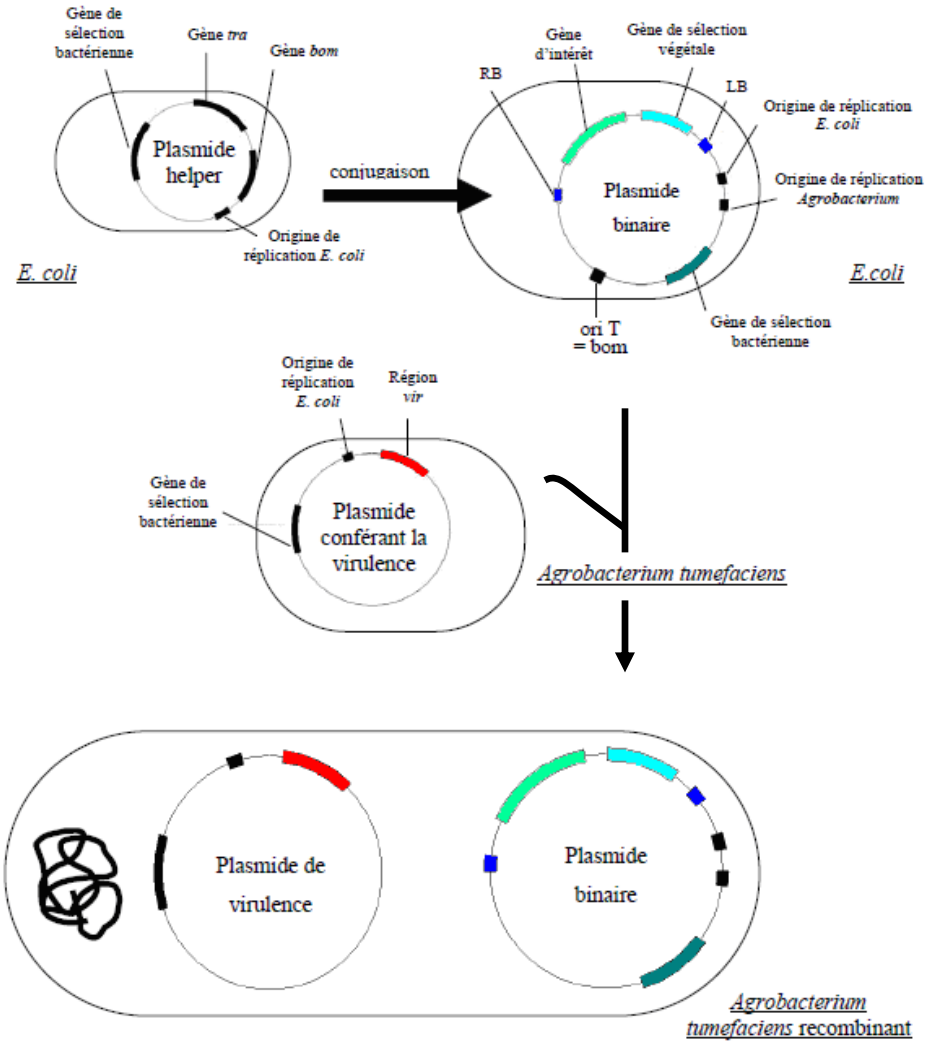


Figure 27 : Représentation schématique du système binaire après conjugaison triparentale. Le plasmide de virulence est maintenu dans *Agrobacterium tumefaciens*. Le plasmide binaire, qui contient l'ADN-T, est introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* par électroporation ou par conjugaison bactérienne (cas schématisé). En général, on utilise un plasmide « helper », pour améliorer le transfert du plasmide binaire d'*E. coli* vers *A. tumefaciens* grâce à ses gènes *tra* et *mob*. C'est une conjugaison triparentale. Le plasmide « helper » ne possède pas d'origine de réplication d'*A. tumefaciens*, il est éliminé au cours des divisions successives. La présence des gènes *vir* va permettre le transfert de l'ADN-T (gène de résistance et gène de sélection) dans les cellules végétales.

3.3.3. Les gènes de sélection

Le taux de transformation génétique des plantes est en général très faible, c'est pourquoi des marqueurs de sélection sont utilisés. Les gènes de sélection couramment utilisés dans le cadre de la transformation génétique de plantes codent pour des protéines qui métabolisent l'agent sélectif et le rendent ainsi moins cytotoxique. On parle de sélection négative, car seuls les transformants vont survivre (Bevan *et al.*, 1983 ; Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Toutefois, certaines cellules non transformées présentent une résistance intrinsèque à

l'agent sélectif et se multiplient comme les cellules véritablement transformées : c'est le phénomène d'échappement.

Le type de sélection utilisé lors d'une transformation génétique doit être choisi en fonction de la plante pour laquelle on veut obtenir des transformants et du matériel végétal utilisé. En effet, certaines plantes peuvent s'avérer extrêmement résistantes à certains composés habituellement utilisés comme agent de sélection (McLaughlin and Ahmad, 1984).

Les gènes de sélection négative couramment utilisés en transformation génétique confèrent une résistance soit aux antibiotiques, soit aux herbicides. Par exemple :

- Le gène *nptII* isolé du transposon Tn5 d'*E. coli,* code pour la néomycine phosphotransférase II et confère la résistance à la kanamycine ou à la néomycine (aminosides) (Fraley *et al.*, 1983).
- Le gène *hpt* isolé d'*E. coli* code pour l'hygromycine B phosphotransférase et confère la résistance à l'hygromycine et la généticine G418 (aminosides) (Waldron *et al.*, 1985 ; Wagner *et al.*, 1997).
- Le gène *bar* isolé de *Streptomyces hygroscopicus,* code pour la phosphinotricine acétyltransférase ou PAT et confère la résistance à des herbicides appelés phosphinotricine glycosinate ou PPT (principe actif de l'herbicide BASTA®) qui est un inhibiteur de la glutamine synthétase (De Block *et al.*, 1987 ; Thompson *et al.*, 1987).

Il existe d'autres gènes de sélection, peu utilisés dans les techniques de transformation génétique de plantes, mais dont l'utilisation semble prometteuse. Ils permettent de sélectionner les plantes transformées sans tuer celles qui ne le sont pas. La sélection positive est basée sur l'état auxotrophique de la plupart des espèces végétales cultivées *in vitro*. En effet, il leur est impossible de se développer sans l'ajout de plusieurs substances (hormones, sucres). Cet aspect a été exploité pour mettre au point de nouveaux systèmes de sélection basés sur la complémentation. L'insertion d'un gène dans les cellules leur permet de produire une substance essentielle à leur croissance, elles peuvent alors se développer sur un milieu non supplémenté contrairement à celles n'ayant pas reçu ce gène (Wenck and Hansen, 2005).

Ces gènes de sélection positive codent pour des enzymes de conversion d'un sucre non-métabolisable (mannose, xylose) présent dans le milieu en une source carbonée utilisable.

A titre d'exemple :

- Le gène *pmi* isolé d'*E. coli* code la phosphomannose isomérase qui permet la conversion du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate qui est un sucre métabolisable (Joersbo *et al.*, 1998 ; Lucca *et al.*, 2001 ; Zhengquan *et al.*, 2004).
- Le gène *xylA* isolé de *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* code pour la xylose isomérase qui permet la conversion du xylose en xylulose qui est alors métabolisé dans la voie des pentoses phosphate (Haldrup *et al.*, 1998 ; Haldrup *et al.*, 2001).
- Le gene dog^R1 code pour la 2-déoxyglucose-6-phosphate phosphatase (2-DOG-6-P), et est utilisé pour la sélection positive de plants de tabac et de pomme de terre (Kunze *et al.*, 2001). C'est un gène isolé à partir de la levure, conférant une résistance au 2-déoxyglucose (2-DOG) lorsqu'il est exprimé dans les plantes transgéniques.

Comparée à la sélection négative, de meilleurs taux de transformation sont obtenus. Cette technique provoque moins de nécrose des explants et facilite l'apparition de tiges feuillées transgéniques. En effet, dans la sélection négative, certaines des cellules transformées, étant entourées de cellules nécrosées, ne peuvent pas se multiplier. Les gènes de sélection positive offrent également l'avantage d'éviter la dissémination potentielle de gènes de résistance à des antibiotiques ou d'herbicides (AragaÌƒo and Brasileiro, 2002 ; Wenck and Hansen, 2005 ; Darbani *et al.*, 2007).

3.3.4. Les gènes rapporteurs

Un gène rapporteur est un gène-témoin codant pour une protéine d'activité connue et détectable, utilisée souvent pour localiser l'expression d'un gène.

Son activité se traduit par une modification d'un caractère visible de la plante dans des conditions particulières (présence d'un substrat, pH, UV). Cela permet notamment l'étude de promoteurs.

Tout comme le gène de sélection, le choix du gène rapporteur doit se faire en fonction de la nature du matériel végétal. En effet, certaines plantes ont des activités endogènes qui sont capables de masquer l'expression d'un gène rapporteur. Citons quelques exemples :

Le gène lacZ code pour une enzyme ayant une activité β-galactosidase. L'expression de ce gène est facilement mise en évidence par l'apparition de composés colorés après ajout

de substrats tels que l'ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) ou le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). Néanmoins, l'existence d'activité β-galactosidase endogène chez bon nombre de plantes rend le gène rapporteur peu utilisé (Matsumoto *et al.*, 1988).

Le gène GUS ou *uid A*, isolé à partir d'*Escherichia coli*, code pour l'enzyme ayant une activité β-glucuronidase capable d'hydrolyser certains composés glucuroniques. Cette enzyme, en présence du substrat X-Gluc (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) conduit à l'apparition d'un produit de couleur bleue (Jefferson, 1987). La β-glucuronidase libère de l'umbelliférone à partir de dérivés umbelliferyl comme le MUG (4-Méthylumbelliféryl β-D-Glucuronide) et permet la mesure de l'activité enzymatique par fluorimétrie (Jefferson *et al.*, 1987).

Le gène GFP code pour la Green Fluorescent Protein (protéine verte fluorescente). Cette protéine de 27 kDa a été isolée de la méduse *Aequora victoria*. Elle devient verte fluorescente quand elle est excitée par des ultraviolets ou de la lumière bleue (Haseloff and Amos, 1995 ; Hu and Cheng, 1995 ; Baulcombe *et al.*, 1998). La protéine est constituée de 11 feuillets β disposés en parallèle, d'une hélice α qui contient le chromophore (Figure 28). Les 11 feuillets β forment une cage dans laquelle est emprisonné le chromophore. Cette forme surprenante de la GFP est appelée forme « β-can».

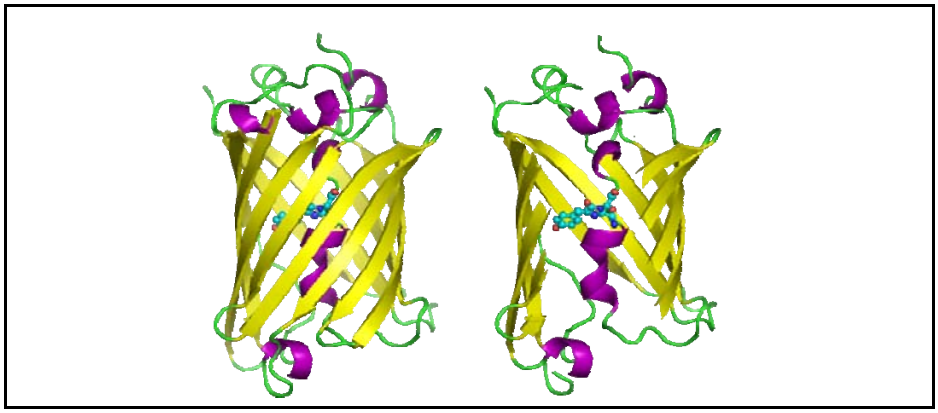


Figure 28 : Structure 3D de la protéine GFP (en coupe à droite enfin de bien visualiser le centre de la cage) : En jaune : les feuillets β, en violet : l'hélice α, au centre : le chromophore.

Son utilisation comporte de nombreux avantages parce qu'elle ne nécessite pas l'addition de substrat, ni de co-facteur, et surtout parce qu'elle ne nécessite pas la destruction de l'échantillon étudié. Ceci permet notamment un suivi des variations de son expression au

sein des mêmes tissus au cours du temps (Sheen *et al.*, 1995). Des protéines GFPs modifiées ont été créées avec un coefficient de fluorescence plus grand, de meilleures expressions chez les eucaryotes ou des propriétés d'absorption altérées (Heim and Tsien, 1996 ; Reichel *et al.*, 1996). La forme m-GFP5-ER (λ d'absorption 395 et 473, λ d'émission de 507 nm) a subi plusieurs modifications pour améliorer son expression dans les plantes transgéniques (Siemering *et al.*, 1996 ; Harper and Neal Stewart, 2000). Un intron empêchant son expression chez *Arabidopsis* (Haseloff *et al.*, 1997) et chez le tabac (Reichel *et al.*, 1996) a été éliminé de la séquence de m-GFP-5ER. Elle est adressée dans le réticulum endoplasmique par la fusion d'une séquence chitinase d'*Arabidopsis* à l'extrémité N terminal et par la fusion d'une séquence polypeptidique His-Asp-Glu-Leu à l'extrémité C terminal (Haseloff *et al.*, 1997). Elle comporte 3 mutations donnant à cette GFP de nouvelles propriétés : le suivi possible de la protéine à haute température, et des maximas d'excitation identiques atteints dans le bleu ou dans l'ultraviolet (Siemering *et al.*, 1996).

De nombreuses autres protéines fluorescentes semblables à la GFP mais n'émettant pas aux mêmes longueurs d'ondes, sont utilisées comme gène rapporteur, par exemple : la YFP Yellow Fluorescent Protein et la dsRed (Jach *et al.*, 2006 ; Berg *et al.*, 2008).

D'autres gènes engendrent une modification morphologique des plantes transformées par l'expression d'enzymes liées à la synthèse d'hormones. Par exemple, le gène *ipt* codant pour l'isopentenyl transférase, isolé de l'ADN-T du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, catalyse la condensation de l'isopentenyl pyrophosphate avec l'AMP pour produire l'isopentenyl AMP, un précurseur de plusieurs cytokinines (notamment la zéatine). Les cytokinines sont des phytohormones stimulant l'organogénèse de tissus végétaux cultivés *in vitro*. Les plantes obtenues présentent une morphologie différente des plantes non transformées : elles perdent leur dominance apicale, forment des bourgeons de morphologie anormale (ESP : extreme shooty phenotype) et sont incapables de former des racines à cause de la surproduction de cytokinines. Ce gène permet à des plantes transformées de se développer sur un milieu sans hormones, faisant office de gène de sélection. Le gène *ipt* peut être utilisé visuellement comme gène rapporteur de transformation génétique (Ebinuma *et al.*, 1997). L'excision du gène *ipt* grâce à la présence d'une cassette «hit-and-run » permet ensuite aux plantes sélectionnées de retrouver leur phénotype normal (Figure 29). Les plantes transformées obtenues sont donc dénuées de gène marqueur (marker-free) (Ebinuma *et al.*, 1997 ; Ebinuma and Komamine, 2001). Cette technique, brevetée par l'entreprise anglaise Zeneca mais exploité par Nippon Paper Industries Co., est appelée Multi-Auto-

Transformation (MAT) vector system (Ebinuma and Komamine, 2001). Elle peut notamment aider à la transformation génétique de plantes récalcitrantes à la régénération (Zuo *et al.*, 2002) et donc permettre de régénérer et de transformer la plante en une seule étape. Cependant, ce système ne fonctionne pas forcément sur toutes les espèces végétales (Khan *et al.*, 2006b).

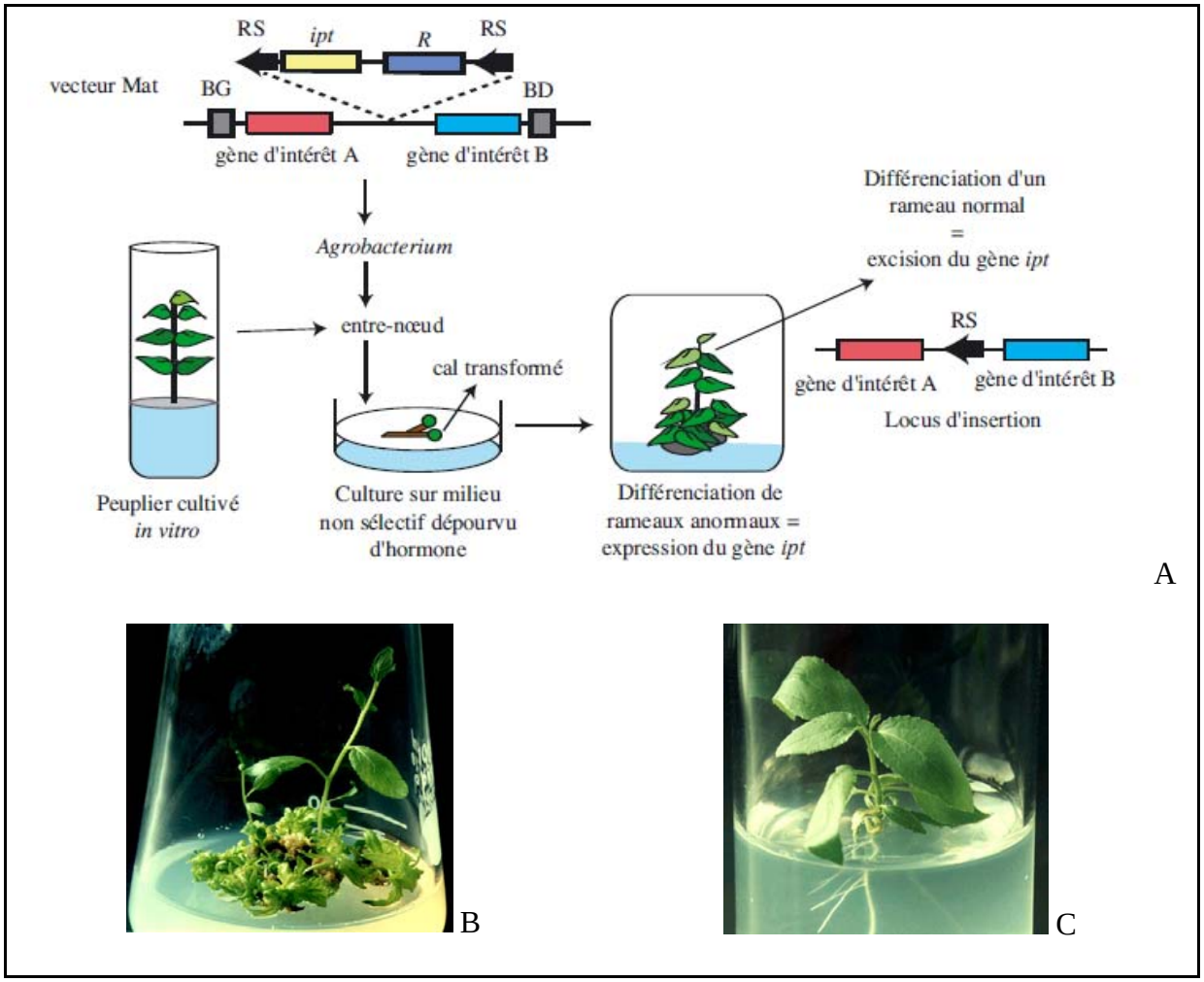


Figure 29 : MAT system vector system utilisé chez le peuplier (site Web Nippon Paper Group : http://www.np-g.com/e/about/research/topix_study/mat/matvector_01.html): **A** : Les entre-noeuds sont cultivés en présence d'*Agrobacterium*, puis placés sur milieu nutritif ; seules les cellules ayant reçu le gène *ipt* peuvent se développer en l'absence d'hormones. Les cals sont cultivés jusqu'à l'obtention de bourgeons. En raison de l'expression du gène *ipt*, le phénotype de ces rameaux est anormal. Cependant, grâce à l'excision du gène *ipt* résultant du système de recombinaison R/RS, des rameaux normaux sont obtenus sur 13 à 40 % des cals. Seuls les gènes d'intérêt sont insérés dans ces plantes transformées. RS : site de recombinaison ; R : gène de recombinase ; *ipt* : isopentényl transférase ; BD : bordure droite ; BG : bordure gauche. **B** : explant de peuplier ayant retrouvé un phénotype normal après excision du gène *ipt*, entouré de ESP : extreme shooty phenotype. **C** : enracinement possible de la plante marker free.

3.3.5. Les promoteurs

Un promoteur très actif est nécessaire pour obtenir une expression du transgène permanente et à haut niveau chez la plante. Chez les dicotylédones, les promoteurs d'*Agrobacterium* de la nopaline synthétase (nos), de l'octopine synthétase (ocs) et de la mannopine synthétase (mas) ont été largement utilisés. Le promoteur le plus populaire pour l'expression de transgènes chez les dicotylédones est celui de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV 35S). Il est très actif et peut encore être amélioré par une duplication de la région amplificatrice (Rathus *et al.*, 1993). A noter que ces promoteurs sont bien moins actifs chez les monocotylédones. D'autres promoteurs comme l'ubiquitine-1 du maïs ou l'actine-1 du riz ont été très largement utilisés (McElroy and Brettell, 1994).

En même temps que les promoteurs à expression permanente, un grand nombre de promoteurs ont été utilisés pour diriger l'expression de transgènes dans des tissus particuliers (comme par exemple le promoteur Gsn9) (Huang *et al.*, 2001 ; Dezar *et al.*, 2005).

Les promoteurs endogènes inductibles par un stimulus externe (éthanol-inductibles, tétracycline-inductibles ou encore inductibles au froid…) présentent également l'avantage de pouvoir choisir le moment de l'expression du transgène (Gatz and Lenk, 1998 ; Dezar *et al.*, 2005 ; Kálai *et al.*, 2008).

3.4. L'étape de régénération de la plante en vue de sa transformation génétique.

Les différentes étapes de la transformation génétique, allant de l'introduction d'ADN étranger dans une cellule jusqu'à son expression par la plante, sont d'abord dépendantes du degré d'aptitude d'une espèce végétale donnée à la régénération *in vitro*, c'est-à-dire de sa capacité à produire des plantes entières à partir de différents tissus ou organes par caulogenèse adventive ou par embryogenèse somatique.

Dans la plupart de ces systèmes, la première étape d'un protocole de transformation consiste à déterminer des conditions de régénération de la plante. Différents matériels végétaux de départ peuvent être utilisés et chacun a ses caractéristiques propres avec ses avantages et ses inconvénients. Il est possible de les distinguer selon leur nature : les cellules différenciées (explants : hypocotyles, feuilles…) et les cellules indifférenciées (cals, suspensions cellulaires) qui nécessitent toutes deux des phases de culture *in vitro* longues à la différence de la transformation *in planta*.

Le choix du matériel de départ est orienté par les possibilités qu'offre l'espèce végétale en question, et par le type de matériel transformé désiré. En effet, la transformation *in planta*, par exemple, ne pourra s'effectuer que sur des espèces dont on pourra obtenir facilement des fleurs, et plus particulièrement des organes reproductifs (Trieu *et al.*, 2000).

3.4.1. Utilisation de cellules différenciées : l'organogénèse directe

Cette méthode correspond à la formation spontanée d'organes (bourgeons, racines) directement sur la surface d'explants intacts cultivés, comme par exemple les feuilles, les tiges, les entre-noeuds, les racines, les hypocotyles, sous l'action d'une balance hormonale adéquate établie dans le milieu de culture (Singh *et al.*, 2002 ; Chitra and Padmaja, 2005 ; Kumar *et al.*, 2005). Le processus d'organogénèse directe ne comporte pas la formation de cal, ce qui permet d'obtenir généralement des plantes transformées rapidement, et de limiter les risques de variation somaclonale. Il nécessite la formation de zones de division cellulaire au niveau du tissus qui permettent l'organisation de centres méristématiques appelés méristémoïdes, capable de générer un organe entier. Cette méthode est surtout applicable aux espèces végétales non récalcitrantes à la régénération.

3.4.2. Utilisation de cellules indifférenciées : la régénération indirecte

Les plantes considérées comme récalcitrantes à la régénération, sont la plupart du temps régénérées par embryogenèse somatique indirecte et/ou par organogenèse indirecte. Par régénération indirecte, on entend la formation de tiges feuillées ou la formation d'embryons somatiques, à partir d'une ou plusieurs cellules de l'explant ayant subi :

- un processus de dédifférenciation cellulaire sous l'action de balance hormonale et
- une déviation du programme interne de différenciation cellulaire vers un programme de prolifération.

Ceci permet l'apparition d'amas non structuré de cellules végétales indifférenciées théoriquement totipotentes appelés cal (processus de callogénèse).

3.4.2.1. L'embryogénèse somatique

L'utilisation de l'embryogenèse somatique comme méthode de multiplication, de conservation ou de régénération dans un protocole de transformation génétique est courante

chez des plantes récalcitrantes, comme le coton (Shoemaker *et al.*, 1986), la betterave sucrière (Zhang *et al.*, 2001), la vigne (Marsoni *et al.*, 2008), le tournesol (Saji and Sujatha, 1998) ou la rose (Li *et al.*, 2002).

En fait, il existe deux types d'embryogenèse somatique (Figure 30) :

- le terme d'embryogenèse somatique directe est appliqué à la formation d'un embryon à partir d'un explant différencié (feuilles, tiges…). Son origine est unicellulaire ou pluricellulaire et requiert des conditions favorables pour le développement de l'embryon.
- Le terme d'embryogenèse somatique indirecte réfère à la formation d'un embryon après une intense prolifération cellulaire (formation d'un cal). Son origine peut être unicellulaire ou pluricellulaire. C'est à cette voie que l'on s'intéresse dans cette partie.

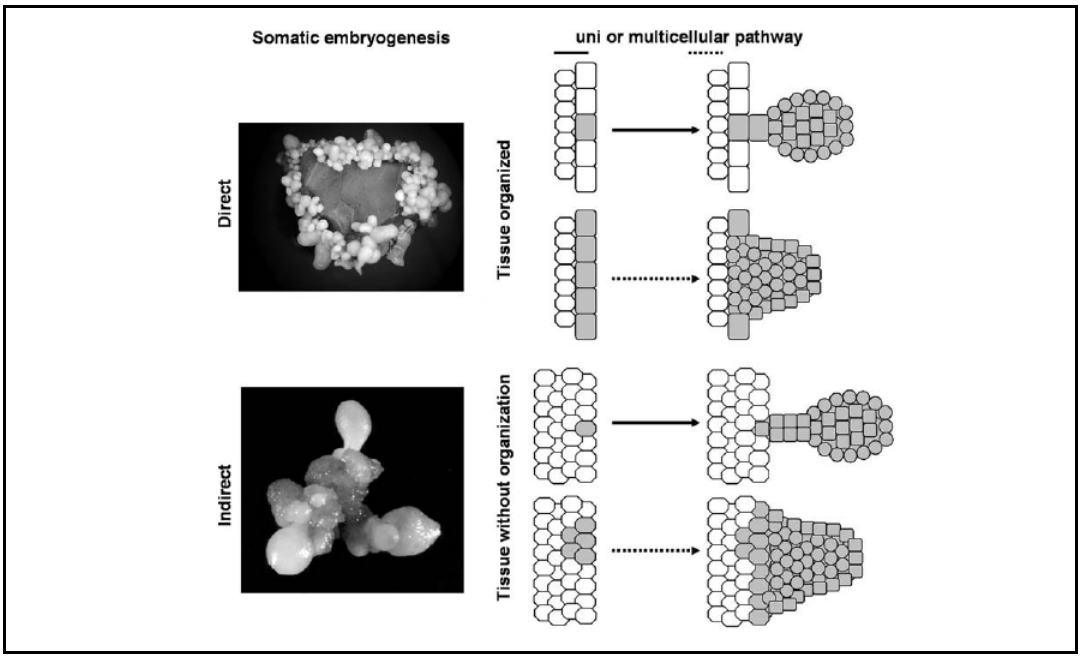


Figure 30 : Représentation schématique de l'embryogénèse somatique directe et indirecte. Les embryons résultant d'une cellule sont reliés aux cellules maternelles par une structure suspentrice, alors que ceux d'origine pluricellulaire sont fusionnés aux cellules maternelles par leur partie basale (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

C'est un processus permettant de générer des unités bipolaires appelées embryons somatiques à partir de cellules somatiques. Leur organisation est quasi similaire à celle d'un embryon zygotique, exceptions faites de l'absence ou du retard dans le développement du suspenseur, de période de dormance et d'enveloppe protectrice présente dans une graine. Leur développement suit quatre étapes principales (Figure 31) : globulaire (A), ovale, cordiforme

(B), allongé, torpédo (C) et cotylédonaire (D) (par ordre d'apparition) (Zimmerman, 1993 ; Dodeman *et al.*, 1997 ; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

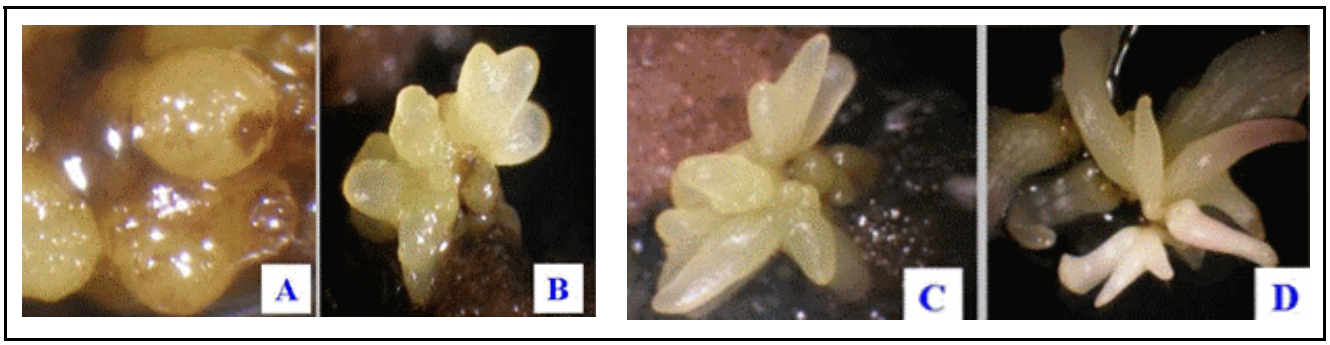


Figure 31 : Les différents stades de l'embryon somatique chez la mangue (*Mangifera indica*). A : stade globulaire, **B :** stade cordiforme, **C :** stade torpédo, **D :** stade cotylédonaire. (http://www.as-best.sinica.edu.tw/en/gr/wo/4?page=1)

La technique de la régénération par l'embryogénèse somatique indirecte repose sur l'utilisation de régulateurs de croissance naturels ou synthétiques pour induire tout d'abord la dédifférenciation des tissus et la formation de tissus (cals) embryogènes. L'acquisition du potentiel embryogénique dans des cellules somatiques nécessite une reprogrammation du profil d'expression des gènes qui s'accompagne de changements morphologiques, physiologiques et métaboliques au sein des cellules (Namasivayam, 2007).

Ce cal embryogénique est le lieu même de la formation et de la maturation de masses pro-embryogéniques (MPEs) définies suivant 3 stades caractérisés par des agrégats cellulaires distincts. Ce sont des amas cellulaires ayant acquis un potentiel embryogénique pouvant donner des embryons sans stimuli exogènes (Namasivayam, 2007). C'est à partir de ces masses cellulaires que le développement des embryons puis la régénération de plantules sont réalisées. La régénération par embryogenèse somatique indirecte comporte plusieurs étapes théoriques (Figure 32) (Kallerhoff *et al.*, 2003) :

- l'induction de la callogenèse, à partir d'un explant (à déterminer selon les plantes) sous l'action d'une combinaison hormonale à déterminer (nature, et concentrations).
- l'acquisition du potentiel embryogénique du cal, la formation et la maturation des MPEs, en présence d'auxines.
- la prolifération en suspension cellulaire ou en milieu solide,
- la formation (passage d'un stade MPEs III à l'embryon globulaire) et la maturation des embryons (notamment l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et l'accumulation des réserves),
- la régénération et le développement d'une plante entière.

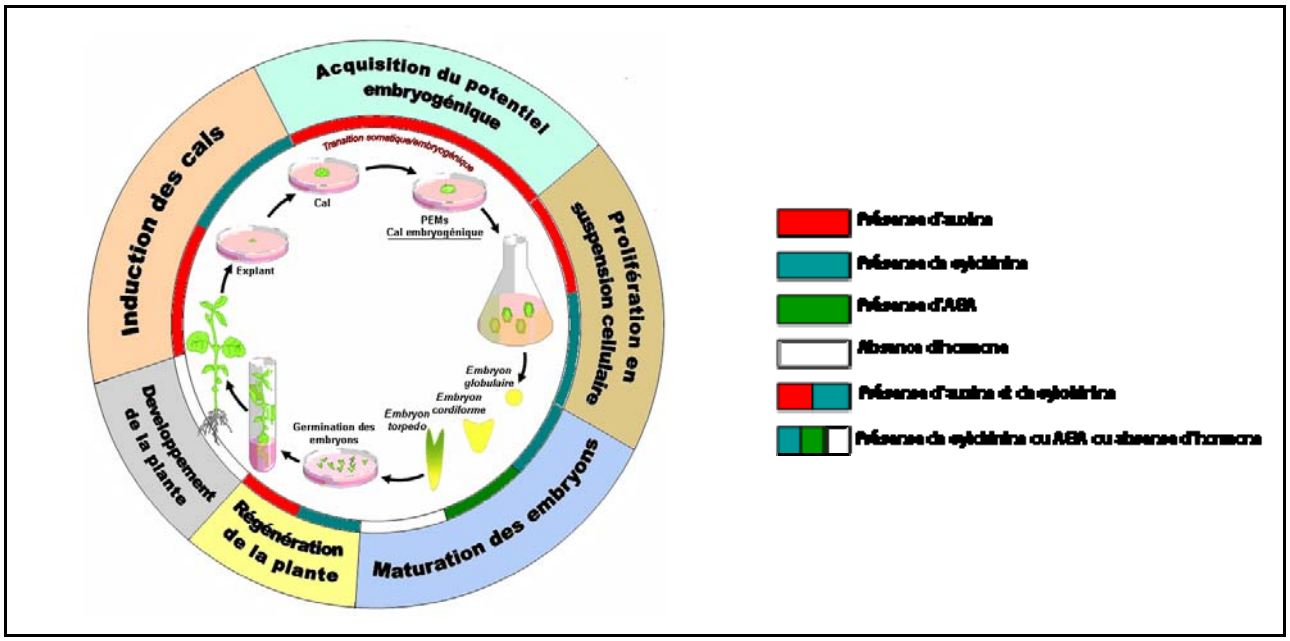


Figure 32 : Les différentes étapes de la régénération de plantule par la voie de l'embryogénèse somatique indirecte, et les hormones végétales nécessaires aux différents stades (Zimmerman, 1993 ; Strosse *et al.*, 2003).

L'élaboration d'un protocole de régénération par embryogenèse somatique pour une plante donnée peut s'avérer très fastidieux et très long. En effet, le schéma ci-dessus en une représentation théorique des différentes étapes. Un protocole de régénération peut être très différent d'une plante à l'autre, de par les explants de départ utilisés, les combinaisons, les doses et les temps d'exposition aux hormones végétales pour chaque étape, la composition des différents milieux de cultures (composition en micro-éléments, macroéléments, sucres, acides aminés...), et les conditions de cultures (lumière, température…).

Cette technique offre cependant de nombreux avantages en culture *in vitro* (Kallerhoff *et al.*, 2003):

- la capacité d'obtenir des structures ayant à la fois un méristème apical et un méristème racinaire, permettant ainsi aux racines de se développer sans l'apport d'auxines exogènes,
- la capacité de produire un grand nombre de plantules régénérées de bonne qualité,
- la capacité d'induire la dormance et d'encapsuler les embryons somatiques dans des billes de matrice gélatineuse, pour produire des semences artificielles, et
- la capacité de transformer génétiquement une plante sans aucun risque de chimère dans le cas d'une origine unicellulaire de l'embryon (transformation *via Agrobacterium tumefaciens*, micro-injection, électroporation, ou biolistique).

3.4.2.2. L'organogénèse indirecte à partir de cals

La régénération par organogénèse indirecte à partir de cals correspond à la formation d'une tige feuillée à partir de cellules indifférenciées (Ewa Sroga, 1987 ; Coulombe *et al.*, 1990 ; Das *et al.*, 1996 ; Ramanayake and Wanniarachchi, 2003). Pour cela, il est nécessaire d'avoir un taux de cytokinines endogènes élevé, qui va permettre de générer les tiges feuillées. Malgré un risque élevé d'obtention de chimères au cours d'une transformation génétique (due à l'origine pluricellulaire des bourgeons), ce procédé constitue un excellent moyen d'obtenir en peu de temps un grand nombre de plantules.

Néanmoins, l'utilisation de ce type de matériel végétal n'est pas sans inconvénient. En effet, il faut conserver les cals en bon état, ce qui implique des repiquages réguliers. D'autre part, la culture à long terme de cellules indifférenciées est à l'origine de variations somaclonales, mais aussi de perte des fonctions menant à la régénération de plantes entières anormales (Sala *et al.*, 2003a ; Bordallo *et al.*, 2004).

L'organogenèse indirecte est une méthode utilisée dans la multiplication, la conservation ou la transformation génétique de plantes récalcitrantes, comme la betterave sucrière (Zhang *et al.*, 2004) ou l'orge (Chauhan and Kothari, 2004).

3.5. La transformation génétique *in planta*

Plusieurs protocoles de transformation *in planta* ont été décrits. Cette approche permet de transformer des plantes pour lesquelles la culture *in vitro* et la régénération sont difficiles. Le principe en est le suivant : l'inoculation de la plante va permettre la transformation de certaines zones qui seront à l'origine de lignées germinales. Certains des descendants seront donc transformés avec le gène d'intérêt. L'inoculation avec *Agrobacterium* se fait soit sur les organes reproducteurs, soit sur les graines.

3.5.1. Par inoculation de graines

Le premier protocole de transformation *in planta* a été mis au point sur *Arabidopsis thaliana* (Feldmann and Marks, 1987). Il consiste à incuber des graines d'*Arabidopsis* une nuit dans une culture d'*Agrobacterium*, puis à les faire germer. A maturité, ces plantes produisent des graines dont seules les transformées germent sur un milieu de sélection. Un grand nombre de plantes transgéniques contenant l'ADN-T a pu être obtenu, mais cette

technique est en général peu reproductible. D'autres méthodes plus efficaces de transformation *in planta* d'*Arabidopsis* ont depuis été mises au point. Elles font intervenir l'inoculation des parties florales comme décrit dans la partie suivante.

3.5.2. Par inoculation de parties florales

Bechtold et ses collaborateurs (Bechtold *et al.*, 1993) ont décrit une méthode plus fiable, dans laquelle les bactéries sont infiltrées, par dépression sous vide, dans des fleurs d'*Arabidopsis*. Une technique encore plus simple, appelée « trempage des fleurs » a été largement utilisée (Clough and Bent, 1998). Elle consiste à simplement tremper les fleurs d'*Arabidopsis* dans une suspension de bactéries au moment de la fertilisation. Dans ces deux méthodes, les plantes transformées sont chimériques, mais donnent naissance à un petit nombre de descendants transgéniques (en général un 1% des graines obtenues (Bent, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006)).

Ces méthodes de transformation *in planta*, sont généralement assez peu efficaces. C'est pourquoi la petite taille d'*Arabidopsis* et sa capacité à produire plus de 10 000 graines par plants sont avantageuses. Cette limitation a jusqu'à présent été un obstacle à l'adoption généralisée des techniques *in planta* pour d'autres espèces végétales. Une technique similaire a été adaptée à *Medicago truncatula* (Trieu *et al.*, 2000), et s'est montrée très efficace. Le taux de transformation moyen est de 36 % (4,7 à 76 %) des graines testées, ce qui est de loin supérieur aux valeurs observées lors de la transformation génétique d'*Arabidopsis*.

Des approches similaires utilisant le transfert direct d'ADN ont été tentées chez d'autres espèces, mais la transformation de la lignée germinale n'était pas reproductible. De l'ADN nu a, par exemple, été injecté dans les pièces florales de plants de seigle (De la Pena *et al.*, 1987) après leur fertilisation, cela a permis d'obtenir quelques plantes transgéniques.

3.5.3. Par inoculation de méristèmes

Une alternative à la transformation des tissus de la lignée germinale consiste à introduire l'ADN dans les méristèmes apicaux *in planta*, puis à faire croître les pousses transgéniques. Chez *Arabidopsis*, ceci a été réalisé en coupant simplement des pousses apicales à leur base, et en inoculant le tissu coupé dans une suspension d'*Agrobacterium (Chang et al., 2003).* Par cette méthode, on obtient des plantes transgéniques à partir des tiges

transformées avec une fréquence d'environ 5%. Une technique de transformation génétique de méristèmes apicaux d'embryons de graines de riz par *Agrobacterium* a récemment été décrite (inoculation avec une aiguille). Elle a donné un taux de transformation d'environ 40% pour la génération de plantes T1 (Supartana *et al.*, 2005).

PRESENTATION DES

OBJECTIFS

Objectifs de recherche : Production de protéines recombinantes *via* des plantes carnivores génétiquement transformées

L'idée de créer une plateforme de production de molécules recombinantes à haute valeur commerciale dans un système plantes carnivores est née fin 2005 au sein de l'entreprise Plant Advanced Technologies SAS à Nancy.

Il existe chez les plantes carnivores un système d'expression et de transport d'enzymes digestives dans les pièges, où ces protéines, présentes dans un liquide, plus ou moins visqueux et collant, sont directement accessibles dans le milieu extérieur. Ce système pourrait donc représenter un excellent système d'expression de protéines recombinantes, en présentant les caractéristiques suivantes :

➔ **Collecte facilitée :**

- Les pièges sont naturellement des organes facilement accessibles (Hua and Li, 2005), permettant ainsi une collecte aisée des sucs digestifs. Les plantes carnivores du genre *Nepenthes* ont développé des pièges particulièrement adaptés à l'excrétion de protéines. Par exemple, *Nepenthes rajah* produit plus de 500 ml de liquide digestive par urne, avec environ une dizaine de pièges par plante (Juniper *et al.*, 1989).
- La plante ne serait pas détruite ni même significativement amoindrie par la collecte et pourrait donc être conservée en culture pour d'autres collectes ultérieures.
- Chez certaines plantes carnivores, notamment celles possédant des pièges à urnes, les sucs digestifs sont produits et excrétés en une certaine quantité dans des pièges fermés au milieu extérieur, le piège n'étant ouvert qu'une fois prêt pour la digestion de proies. Même si la plante est cultivée dans un environnement non stérile, durant la période de préparation du piège, les sucs digestifs sont excrétés en conditions naturellement stériles. Sous réserve de réaliser la collecte de sucs digestifs avant l'ouverture du piège et de quelques précautions, la collecte des protéines recombinantes pourrait donc être réalisée dans certains modes de réalisation dans des conditions stériles, avantages non négligeables pour la production de protéines utilisées en pharmaceutique.

➔ **Extraction/Purification facilitée**

- Le fait que la protéine recombinante à purifier soit présente dans un milieu liquide extérieur à la plante, et non dans un tissu végétal solide (telle qu'une feuille ou une graine),

supprimerait l'étape d'extraction et simplifierait énormément l'étape de purification de la protéine recombinante.

- De plus, comme décrit dans la bibliographie, les sécrétions de cette plante ne contiennent que 6 protéines (Hatano and Hamada, 2008), permettant une purification facilitée à partir d'un milieu relativement simple.

➔ **Système inductible**

- Ce système pourrait être induit dans la mesure où l'excrétion des sucs digestifs peut être augmentée par des signaux mécaniques et/ou chimiques mimant la présence d'une proie. Le stimulus chimique pourrait être remplacé par l'application d'une solution contenant de l'azote organique, de la gélatine, de l'acide salicylique, ou de la chitine (Matusikova *et al.,* 2005), permettant ainsi potentiellement d'augmenter facilement la production des protéines purifiées à partir des sucs digestifs.

➔ **Faibles coûts de production et faibles risques de dissémination**

- Les plantes carnivores sont relativement bien cultivables en serres, et sont faciles à multiplier. En effet, ce sont pour certaines (Nepenthes) des plantes épiphytes, préfèrant les milieux ombragés, permettant une production à haute densité dans une surface réduite de serres S2, où le confinement est assuré.

➔ **Contrôle de la protéolyse**

- Les protéases naturelles des fluides digestifs des plantes carnivores représentent un risque majeur pour des protéines recombinantes, excrétées dans ce milieu, d'être dégradées en peptides. Cependant, ce risque n'est pas spécifique aux plantes carnivores, il est aussi présent dans les autres systèmes d'expression végétaux (Rivard *et al.*, 2006 ; Benchabane *et al.,* 2008). Des analyses récentes des secrétions des urnes de Nepenthes ont révélé la présence de seulement 2 Nepenthécines, appartenant à la famille des protéases aspartiques (Hatano and Hamada, 2008). En l'occurrence, ce nombre limité d'enzymes est extrêmement favorable à une stratégie de knock-out par des approches ARN interférent. Un contrôle chimique serait également possible : l'ajout tout simple d'inhibiteur de protéases pourrait être aussi une solution. De plus, ces protéases ont une activité optimale à pH acide, suggérant la possibilité de les bloquer par un maintien des secrétions à pH neutre/basique.

La thématique de la thèse correspond au développement d'une nouvelle technologie au sein de l'entreprise Plant Advanced Technologies SAS, basée sur la mise en place de ce nouveau système d'expression hétérologue végétale à partir des plantes carnivores. Les grands axes du projet sont décrits ci-dessous et seront développés dans les parties suivantes :

I. 1er axe de recherche : Production de protéines recombinantes par la plante *Drosera rotundifolia* (Chapitre 1 – résultats)

1. Réaliser la preuve de concept de la technologie : Transformer génétiquement la plante *Drosera rotundifolia* avec deux gènes marqueurs et étudier l'expression des protéines recombinantes :

L'enjeu est tout d'abord de réussir à transformer génétiquement une plante carnivore nommée *Drosera rotundifolia* avec deux gènes marqueurs, et de réaliser une première preuve de concept quant à la sécrétion des protéines recombinantes dans les gouttelettes de glu situées à l'extrémité des poils des feuilles (glu destinée initialement à la capture et à la digestion d'insectes). La transformation génétique de cette plante est déjà décrite dans la littérature (Hirsikorpi *et al.*, 2002). C'est une des rares plantes carnivores dont la régénération par néoformation de bourgeons (à partir d'une cellule) a été étudiée. La validation du concept devant être réalisée rapidement, il a été préférable de se tourner dans un premier temps vers cette plante, même si elle ne représente pas un modèle industrialisable pour la production de protéines recombinantes. *Drosera rotundifolia* est le modèle expérimental.

2. Confirmer la première preuve de concept : Transformer génétiquement la plante *Drosera rotundifolia* avec deux gènes humains et étudier l'expression des protéines recombinantes :

Le deuxième objectif est de parvenir à transformer la plante *Drosera rotundifolia* avec cette fois des gènes humains codant pour des protéines à intérêt pharmaceutique : l'interféron gamma et du facteur intrinsèque. Très peu de travaux ayant été réalisés sur cette plante, il faudra donc mettre au point tous les protocoles expérimentaux nécessaires à la caractérisation génétique et biochimique des plantes transformées.

II. 2ème axe de recherche : Production de protéines recombinantes par la plante *Nepenthes alata*

La plante du genre *Nepenthes* représente un modèle industriel intéressant par rapport à *Drosera*, car elle possède à l'extrémité de chaque feuille une urne, pouvant contenir de quelques millilitres à un litre de liquide digestif suivant les espèces. Ces urnes pourraient servir de bioréacteurs pour la production de protéines recombinantes. Cependant, la présence de protéases naturelles dans les sécrétions des urnes pourrait être un facteur limitant. De plus, la transformation génétique de cette plante n'est pas décrite dans la littérature. Les objectifs de recherche pour cet axe sont donc les suivants :

1. **Evaluation du potentiel de *Nepenthes* pour la production de protéines recombinantes dans les urnes :** Etude quantitative et qualitative des enzymes naturellement présentes dans les sécrétions des pièges. (chapitre 2 – résultats)

Afin de mieux évaluer le potentiel de cette plante pour la production de protéines à intérêt pharmaceutique dans les urnes, l'activité protéolytique des enzymes sera étudiée, notamment dans différentes conditions de pH. Le but de ces expérimentations est de pouvoir par la suite contrôler chimiquement la protéolyse dans le fluide protéique des urnes. Des inhibiteurs de protéases seront également testés.

La composition protéique des sécrétions et sa diversité sera aussi explorée pour évaluer les étapes nécessaires à la purification d'une protéine recombinante sécrétée dans ce milieu.

Enfin, la capacité de production des urnes en terme de rendement protéique sera étudiée, par des dosages effectués dans différentes conditions (urnes fermées, ouvertes, vidées…).

2. **Elaboration d'un protocole de régénération de *Nepenthes alata* à partir d'une cellule en vue de la transformation génétique de la plante** (chapitre 3- résultats)

Comme décrit dans la bibliographie, l'élaboration d'un protocole de transformation génétique d'une plante dépend dans un premier temps de sa capacité à être régénérée. Aucuns travaux n'ont jusqu'alors été réalisés sur cette plante. Il faut donc examiner toutes les voies possibles de régénération à partir d'une cellule végétale, et déterminer laquelle semble la plus prometteuse.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel végétal et conditions de culture des plantes

1.1. Matériel végétal

1.1.1. *Drosera rotundifolia*

Les *Drosera rotundifolia in vitro* étaient déjà présents au laboratoire Agronomie & Environnement depuis plusieurs années, et étaient utilisées pour les Travaux Pratiques de Culture *in vitro* des étudiants de l'ENSAIA. Les plantes, ont été fournies par l'IUT de Nancy Brabois et ont été à l'origine achetées en conditions *in vitro* à l'A.S.L.B **CEDEVIT**, (ULg, Institut de botanique, B-4000 Liège, Belgique).

1.1.2. *Nepenthes alata*

Les *Nepenthes alata in vitro* proviennent de deux fournisseurs différents : de l'A.S.L.B **CEDEVIT**, (ULg, Institut de botanique, B-4000 Liège, Belgique) et de chez DEROOSE **PLANTS** (Weststraat 129A, B-9940 Sleidinge, Belgique).
Les *Nepenthes x ventrata* cultivés en terre viennent du magasin **BOTANIC** (Les Grands Grougniots, 1, rue de Vandoeuvre, 54180 Heillecourt, France) et de chez **KARNIVORES (**voie communale 1 Mittlerer Erlen Weg, 68000 Colmar, France)

Certaines expériences ont été réalisées sur des *Nepenthes* et des *Drosera* plus âgées du Jardin Botanique du Montet (100 rue du jardin botanique, 54600 Villers les Nancy, France).

1.2. Conditions de culture des plantes

1.2.1. Culture des plantes en conditions *in vitro*

La culture *in vitro* des plantes se déroule en chambre de culture dans les conditions suivantes : 23°C/20°C (jour/nuit), 40% d'humidité relative, 160 µmol.m^2.s^{-1} d'intensité lumineuse avec une photopériode de 16 H (Figure 33, A).

La multiplication par micropropagation des plantes est effectuée en pots en verre de 100 ml pour *Drosera rotundifolia* et 175 ml pour *Nepenthes alata* (Figure 33, B).

Toutes les étapes de manipulation des plantes *in vitro* se déroulent sous hotte à flux laminaire vertical ou horizontal nettoyée à l'alcool à 70°. Le matériel métallique (pinces, scalpels) utilisé est préalablement stérilisé au four pasteur à 170°C au minimum une nuit. Les milieux de culture, les pots et bouteilles (Schotts) en verre, les boites de pétri en verre pour le découpage du matériel végétal et les papiers absorbants sont stérilisés à l'autoclave (phase de 20 min à 120°C à 1 bar).

1.2.2. Milieux de culture de micropropagation *in vitro*

Les plantes sont multipliées sur un milieu Murashige et Skoog dilué 2 fois (MS, macro/microéléments et vitamines voir annexe 1) (Murashige and Skoog, 1962) supplémenté de 20g/L de saccharose, 0,5g/L d'hydrolysat de caséine, de 2g/L de charbon actif (pour *Nepenthes* seulement), et de 3g/L de phytagel. Le milieu de multiplication est appelé Milieu MS(dro) pour *Drosera* et MS(nep) pour *Nepenthes*.

1.2.3. Culture des plantes en sol

Le transfert en sol des plants cultivés *in vitro* est précédé par une étape d'adaptation. Les racines des plantes sont débarrassées de leur gélose par un rinçage à l'eau distillée pour limiter le risque de développement de contaminants. Les plantes sont ensuite placées dans des pots contenant un mélange de tourbe blonde (50%), de sphaigne vivante (25%) (Cette plante, voisine des mousses, produit la tourbe blonde en se décomposant), de fibre de coco (10%), de vermiculite (10%) et d'écorces de pins (5%).

De nombreuses espèces carnivores poussent dans les terrains pauvres. Il est donc nécessaire de réaliser un substrat qui ait des qualités physiques et chimiques propres de ce type de sol. Les matériaux qui le constituent permettent une bonne circulation de l'air et de l'eau. Ils ralentissent le compactage du sol qui est préjudiciable au système racinaire.

En conditions *in vitro*, l'atmosphère est confinée, saturée d'humidité et la plante ne possède pas de cuticule. Il s'agit d'une fine pellicule sécrétée par l'épiderme des tissus aériens ayant pour rôle de limiter la transpiration. Il faut donc recréer autour de la plante une atmosphère humide pour lui éviter de se dessécher. Ceci est possible dans une mini-serre à l'étouffée ou tout simplement en recouvrant la plante d'une cloche en verre.

Le pot sera placé dans une coupelle avec de l'eau distillée à température ambiante (20 à 22°C) ou sur un fond de billes d'argile. Les *Drosera rotundifolia* sont ensuite recouverts d'une mini-serre individuelle constituée d'un fond de bouteille en plastique pendant 3 semaines. La mini-serre est ensuite progressivement surélevée chaque semaine afin d'habituer la plante à son nouvel environnement, jusqu'à son retrait après 8 semaines de culture.

Après une période d'adaptation en phytotron (23°C/20°C, les *Drosera rotundifolia* sont cultivées en serre (20°C le jour, 15°C la nuit). La sortie de culture *in vitro* des *Nepenthes alata* ne nécessite pas cette étape.

Les *Nepenthes alata* (du commerce ou issus de vitroplants) sont cultivées en chambre de culture dans les conditions suivantes : 28°C/24°C (jour/nuit), 80 à 90% d'humidité relative, environ 70 µmol.m^2.s^{-1} d'intensité lumineuse, avec une photopériode de 16 h. Les plantes sont placées dans des bacs contenant des billes d'argile pour garder l'humidité au pied des pots (Figure 33, C). Les bacs sont remplis tous les 2 jours avec de l'eau de pluie, de l'eau déminéralisée ou de l'eau osmosée ou à défaut avec de l'eau distillée. L'eau du robinet, trop calcaire, fait dépérir la plante en quelques semaines.


A


B


C

<u>Figure 33</u> : Environnement de culture des plantes : A : Chambre de culture *in vitro* des plantes carnivores, **B :** *Nepenthes alata in vitro*. **C** : *Nepenthes alata* issu de vitroplants, placé dans des bacs de billes d'argile.

2. Culture bactérienne

2.1. Milieux de culture

Les souches bactériennes sont cultivées sur différents milieux de culture solide : Le milieu LB (Luria-Bertani) pour les souches *Escherichia coli*, et YEB (Vervliet *et al.*, 1975) pour *Agrobacterium tumefaciens*. Leurs compositions sont données en annexe 2. Les milieux solides sont obtenus par ajout de 16 g/L d'agar après ajustement du pH à 5,8 et avant autoclavage.

2.2. Antibiotiques de sélection

Les antibiotiques sont utilisés pour la sélection d'une souche bactérienne recombinante particulière, à la concentration finale indiquée dans le tableau 5, après dilution de leur solution stock (annexe 3) préalablement filtrées à 0,2µ. Les antibiotiques sont toujours ajoutés au milieu après autoclavage. Dans le cas des milieux solides, ils sont ajoutés lorsque le milieu est en surfusion (environ 50°C) juste avant de le couler dans les boîtes de pétri.

	Souche	Plasmide	Résistance
Conjugaison triparentale	***Escherichia coli*** HB101	pRK2013	Kanamycine (25µg/ml)
	MC1061	pTDE4	Streptomycine (25µg/ml) Carbénicilline (100µg/ml)
	MC1061	pBin-X	Kanamycine (25µg/ml)
	Agrobacterium tumefaciens C58C1Rif^{R}	pGV2260	Rifampicine (100µg/ml) Carbénicilline (100µg/ml)
	C58C1Rif^{R}	pGV2260, pTDE4	Rifampicine (100µg/ml) Carbénicilline (100µg/ml) Streptomycine (25µg/ml)
	C58C1Rif^{R}	pGV2260, pBin-X	Rifampicine (100µg/ml) Carbénicilline (100µg/ml) Kanamycine (25µg/ml)
Amplification de plasmides	***Escherichia coli*** One Shot® TOP 10	pCR8-*X*	Spectinomycine (50µg/ml)
	GeneHogs®	pBin-*X*	Kanamycine (25µg/ml)
	ccdB Survival™	pBin-Gw	Chloramphénicol (30µg/ml)

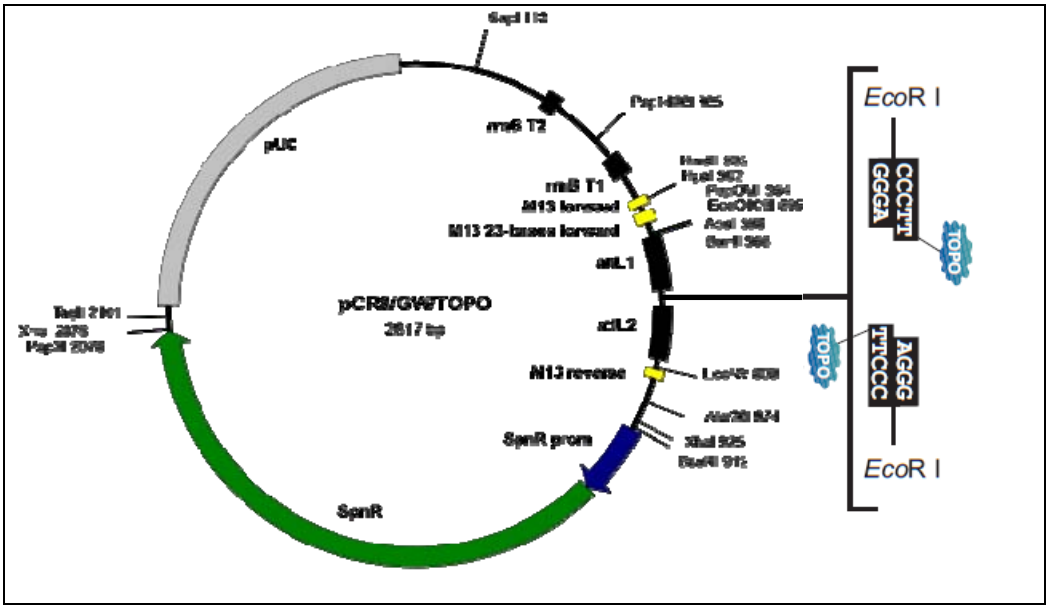
Tableau 5 : Concentrations finales d'antibiotiques à ajouter au milieu nutritif en fonction de la souche bactérienne et du plasmide utilisé

3. <u>Matériel plasmidique</u> (de départ)

3.1. Le plasmide pCR8®/GW/TOPO®

Le vecteur pCR8®/GW/TOPO® (Invitrogen, Figure 34) est un vecteur d'entrée de type Gateway® utilisé pour cloner rapidement et directement des produits de PCR avec une efficacité supérieure à 95%. Il est fixé de façon covalente à une topoisomérase de type I pour une ligation rapide. Ce vecteur possède deux extrémités sortantes 3'-T permettant la ligation de produits de PCR et empêchant sa recircularisation. Elles offrent une extrémité complémentaire aux produits de PCR dont les extrémités 3' ont été additionnées d'une adénine grâce à la *Taq* DNA polymérase.

Le vecteur pCR8®/GW/TOPO® comporte un gène conférant la résistance à la spectinomycine pour une sélection efficace dans *E.coli* et une origine pUC pour un grand nombres de copies du plasmide et le maintien dans la bactérie. Deux sites *Eco*RI flanquent le site d'insertion de l'amplicon afin de permettre une meilleure excision de l'insert et une vérification rapide de la présence de l'insert par digestion. Il comporte également des sites GW primer localisés à moins de 55 paires de bases du site d'insertion du produit de PCR dans le but d'optimiser le séquençage. Les sites M13 forward et reverse permettent de vérifier par PCR le sens d'insertion du gène d'intérêt dans le plasmide. Les sites *att*L1 et *att*L2 sont des séquences de recombinaison (issues de bactériophage λ) qui permettent le clonage d'un gène d'interet (compris entre ces sites) vers un vecteur de destination Gateway® (voir Matériels et Méthodes 4.1.10).



<u>Figure 34</u> : Carte physique du plasmide pCR8®/GW/TOPO®

3.2. Le plasmide pBin-Gw

La construction du pBin-Gw (Figure 35) a été réalisée par Sébastien Doerper durant sa thèse au laboratoire. C'est un plasmide de destination Gateway®, à faible nombre de copies. Entre les bordures droite et gauche délimitant l'ADN-T de ce plasmide se situent le gène de sélection *npt II* et la cassette de recombinaison RfB flanquée par les sites *att*R1 et *att*R2. Le gène *nptII* conférant la résistance à la kanamycine est sous le contrôle du promoteur et du terminateur de la nopaline synthase (Pnos, et 3'nos). La cassette de recombinaison RfB, est encadrée en amont par le promoteur 35S et en aval par le terminateur 3'nos. Elle comporte le gène de résistance au chloramphénicol et du gène *ccdB*. L'amplification de ce pBin-Gw est réalisée en transformant la souche *Escherichia coli* ccdB Survival™. En effet, seule cette souche est résistante aux effets CcdB et peut supporter la propagation de plasmides contenant le gène *ccdB*. En dehors de l'ADN-T, se trouve un gène conférant la résistance à la kanamycine, permettant de sélectionner les bactéries *E.coli* recombinantes.

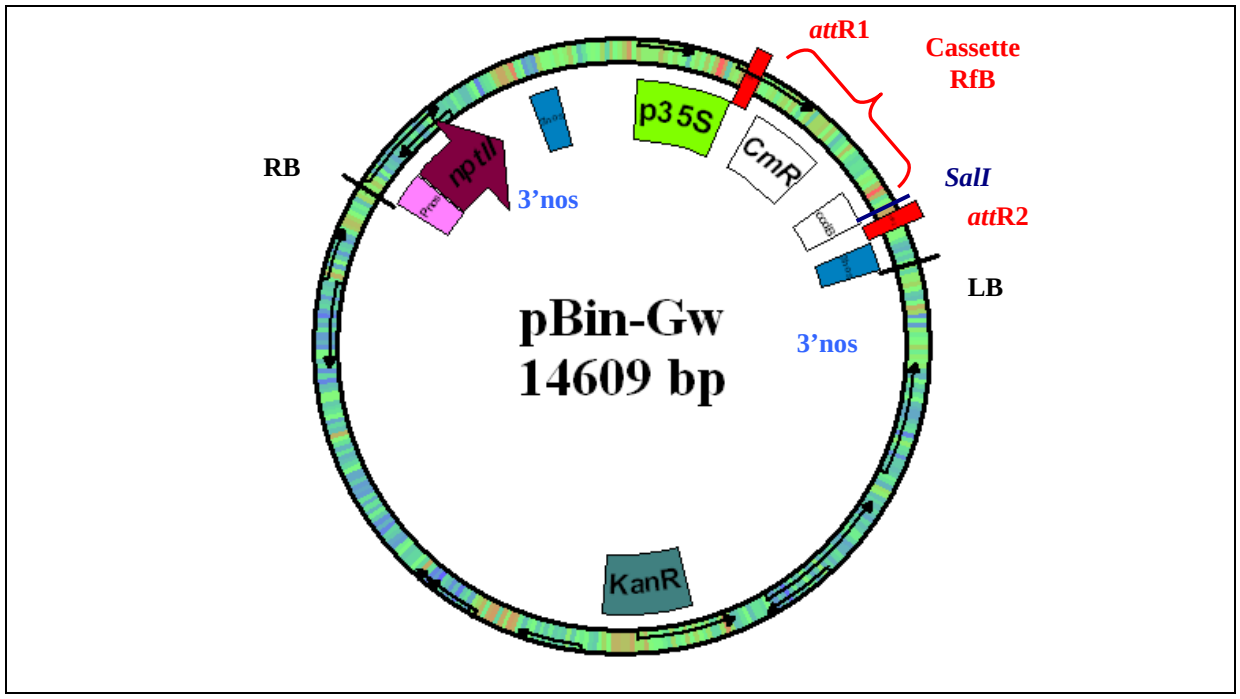
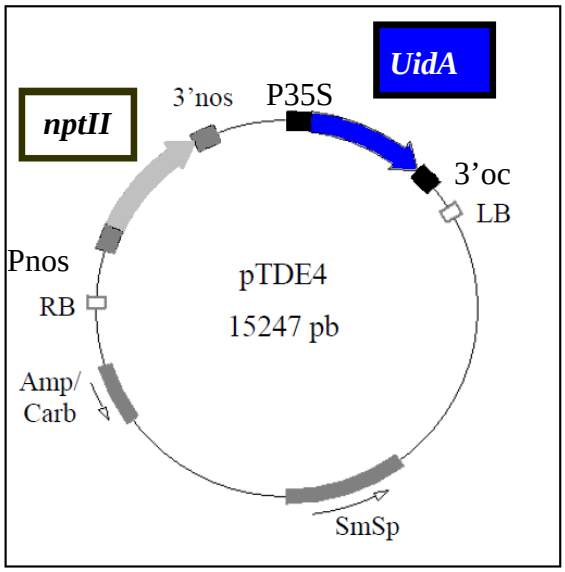


Figure 35 : Carte physique du plasmide pBin-Gw.

3.3. Le plasmide pTDE4

Il a été fourni au laboratoire lors de la thèse de Karine Lièvre (2004) par le laboratoire de génétique du Professeur Van Montagu et le laboratoire « plant Genetic System » à Gand (Belgique). La carte du plasmide est présentée sur la figure 36. Il possède en dehors de l'ADN-T des séquences conférant les résistances à la spectinomycine, à la streptomycine et à la carbénicilline. L'ADN-T, délimité par les bords LB et RB, est constitué du gène *nptII* et du gène rapporteur *uidA*. Le gène *nptII*, confère aux plantes transformées la résistance à la kanamycine. Il code pour la néomycine phosphotransférase, et est utilisé comme gène de sélection chez les plantes. Il est sous le contrôle du promoteur de la nopaline synthase Pnos ; son terminateur est celui de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* 3'oc.

Le gène rapporteur *uidA* code pour la β-glucuronidase. Cette enzyme, en présence de son substrat X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide**)** permet l'obtention d'une coloration bleue des tissus transformés. Le gène *uidA* est sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et du terminateur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* 3'nos.



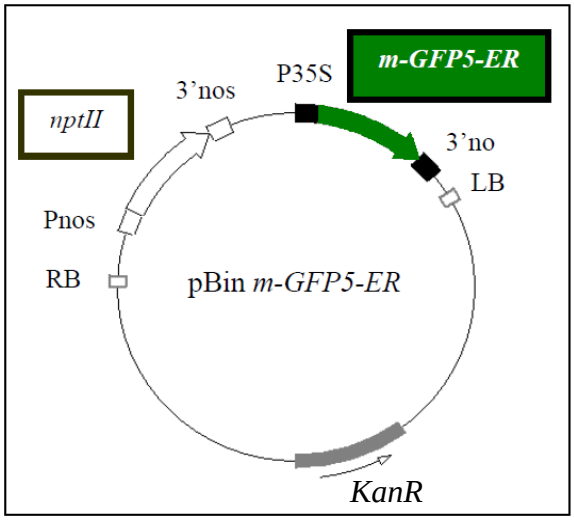
- gène *uidA* codant pour la β-glucuronidase,
- *nptII* : gène codant pour la néomycine 3'-O-phosphotransférase conférant la résistance à la kanamycine,
- P35S : promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur,
- Pnos, 3'nos : promoteur et terminateur de la nopaline synthase d'*A.tumefaciens.*
-3'oc : terminateur de l'octopine synthase
- *SmSp* : gènes de résistance à la streptomycine et à la spectinomycine, *Amp/Carb* : gènes de résistance à l'ampicilline et à la carbéniciline,
- RB, LB: bords droit et gauche de l'ADN-T

Figure 36 : Carte physique du plasmide pTDE4.

3.4. le plasmide pBin-*m-gfp5-ER*

Le plasmide pBIN *m-gfp5-ER* a été fourni par le professeur Jim Haselhoff, Division of Cell Biology, MRC Laboratory of Molecular Biology, Addenbrookes Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, UK.

C'est un plasmide navette à faibles copies ayant la capacité de se répliquer aussi bien dans *Escherichia coli* que dans *Agrobacterium tumefaciens*. L'ADN-T de ce plasmide contient le gène *nptII* et le gène rapporteur *m-gfp5-ER* codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) modifiée (Haseloff *et al.*, 1997) sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur 3'nos. Le promoteur et le terminateur du gène *nptII* sont ceux de la nopaline synthase (Pnos et 3'nos). Le plasmide porte également, à l'extérieur de son ADN-T, un second gène conférant une résistance à la kanamycine aux *E. coli* recombinantes (Séquence différente du gène *nptII* de l'ADN-T) (Figure 37).



- gène *m-gfp-5-ER* codant pour la protéine verte fluorescente GFP
- *nptII* : gène codant pour la néomycine 3'-O-phosphotransférase conférant la résistance à la kanamycine,
- P35S : promoteur 35S constitutif du virus de la mosaïque du chou-fleur,
- Pnos, 3'nos : promoteur constitutif et terminateur de la nopaline synthase d'*A.tumefaciens.*
- RB, LB: bords droit et gauche de l'ADN-T.

Figure 37 : Carte physique du plasmide pBin *m-gfp5-ER*

4. Techniques de biologie moléculaire

4.1. Construction de plasmides recombinants

Un des objectifs de notre étude est de transformer génétiquement les plantes *Drosera rotundifolia* avec des gènes humains : celui de l'interféron gamma et du facteur intrinsèque. Contrairement aux gènes rapporteurs *uidA* et *m-gfp-5ER*, nous ne disposons pas au laboratoire

de plasmides recombinants comportant nos gènes d'intérêt. Pour cela, nous devons les préparer à partir de l'ADNc des gènes.

4.1.1. Amplification du gène à cloner par PCR

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR est une méthode d'amplification génique *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique (quelques picogrammes), d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie (l'amplicon).

Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Elles définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. La méthode consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrice pour les étapes suivantes. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

Les amplifications PCR (Mullis and Faloona, 1987) sont conduites dans un thermocycler Icycler (Bio Rad) ou Gradient Cycler PTC-200 (MJ Research). De façon générale, les réactions sont réalisées dans un volume de 20 µL contenant : 0,4 µM de chaque amorce sens et antisens, 0,4 mM de dNTP, 2 µL de tampon d'activité polymérase 10X, 2 à 5 U de *Taq* DNA polymerase et de 10 à 100 ng d'ADN matrice.

La réaction débute par une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 à 10 min. Cette étape permet de : déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution. Elle est suivie de 25 à 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation (95°C pendant 30 secondes), une étape d'hybridation (entre 50 et 60°C pendant 45 secondes) et une étape d'élongation (72°C en comptant 1 minute pour 1Kb à amplifier). L'hybridation des amorces au niveau des séquences complémentaires des ADN matrices s'effectue à une température optimale permettant un appariement spécifique. Cette dernière dépend de la température de fusion Tm (C'est la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme monobrin et l'autre moitié sous forme double brin.) des deux amorces déterminée par leur longueur, leur teneur en base purique, et la concentration en ion Na du milieu réactionnel.

Pour un oligonucléotide de taille comprise entre 14 et 20 nucléotides, le calcul (reommandé) du Tm est :

Tm = (wA+xT) x 2 + (yG+zC) x 4

où w, x, y et z sont le nombre de nucléotides A, T, G et C respectivement.

Pour un fragment plus long (plus de 20 nucléotides), le calcul recommandé du Tm est:

$Tm = 81,5 + 16,6(\log_{10}(Na+)) + 0,41(\%G + \%C) - (675/N)$.

où N est le nombre total de nucléotides et (Na+) la concentration en sodium du milieu d'hybridation.

- Si la température du milieu réactionnel est supérieure au Tm, l'ADN et l'oligonucléotide ne s'hybrideront pas. Ils resteront sous forme monobrin.
- Si la température est égale (en pratique légèrement inférieure T_{Hyb} = Tm - 5°C) au Tm, il y aura hybridation spécifique, c'est à dire à l'endroit de la séquence cible qui est complémentaire de l'oligonucléotide.
- Si la température est très inférieure au Tm, il y aura hybridation sur la séquence complémentaire mais aussi hybridation non spécifique, c'est à dire à des endroits de la séquence cible qui ne sont pas parfaitement complémentaires de l'amorce. Cette situation est parfois intéressante, par exemple dans le cas d'expériences de mutagenèse dirigée.

L'étape d'élongation permet la synthèse du brin complémentaire par la *Taq* DNA polymerase à 72°C. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon. Une fois ce premier cycle terminé, le second commence et ainsi de suite jusqu'à atteindre le nombre de cycles nécessaire pour l'amplification désirée.

<u>Amplification spécifique à un clonage</u> :

L'ADNc du gène de l'interféron gamma (cloné dans le plasmide pSecTagIFNg) nous a été fourni par le laboratoire du Professeur Jean Louis Goergen, UPR6811 CNRS-Laboratoire des Sciences du Génie Chimique-2, Avenue de la Forêt de Haye BP 172 -54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex - France.

L'ADNc du facteur intrinsèque (produit de RT-PCR réalisé sur les ARNm issus de cellules pariétales humaines d'estomac) nous a été fourni par le laboratoire du Professeur Jean-Louis Guéant, INSERM U724**,** Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition - Faculté de Médecine - 9, av. de la Forêt de Haye - BP 184 - 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex France.

Afin d'amplifier les gènes d'intérêt et de les cloner dans notre vecteur de transformation génétique, une PCR avec une *Taq* Polymerase haute fidélité a été réalisée sur le plasmide fournie pSecTagIFNg (pour l'IFNγ) et sur le produit de la RT-PCR.

La Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity est un mélange d'enzymes composé de *Taq* DNA polymerase recombinante, de polymerase *Pyrococcus species* GB-D, et d'anticorps Platinum® *Taq*. La polymerase *Pyrococcus species* GB-D a la capacité de corriger les erreurs grâce à son activité exonucléase 3´- 5´. Ce mélange d'enzymes correctrices et de *Taq* DNA polymerase augmentent la fidélité de la réplication de 6 fois par rapport à la *Taq* DNA polymerase utilisée seule. Il est en effet nécessaire qu'il n'y ait pas de mutation sur le brin synthétisé, puisqu'il est destiné à s'incorporer dans le génome des plantes afin d'être transcrit et traduit en protéine.

Le mélange de PCR contient 0,2-0,4 µM de chaque oligonucléotide, une unité de Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 0,2mM de chaque dNTP, du tampon Platinum® High Fidelity 1X, 2 mM de $MgSO_4$ et 50 ng de vecteur.

La PCR débute à 94°C pendant 30s à 2min pour dénaturer l'échantillon et activer l'enzyme. La technologie Platinum® repose sur une activation « hot start » de la *Taq* polymerase augmentant sa spécificité et sa sensibilité. En effet, la présence d'anticorps anti-*Taq* DNA polymerase inhibent l'activité de l'enzyme à température ambiante. La dénaturation est suivie de 35 cycles d'amplification (15 à 30 secondes à 94°C, 15 à 30 secondes à la température d'hybridation des amorces, puis une minute par kb à 68°C), avant de terminer par 10 minutes à 68°C (T°C d'élongation propre à cette enzyme). La Platinium *Taq* DNA polymerase High Fidelity est déjà supplémentée de 5 unités par ml de Platinium *Taq* DNA Polymerase. Ceci permet l'ajout d'une adénine en 3' de chaque amplicon et facilitera le clonage du gène dans le vecteur d'entrée de type Gateway® : le plasmide pCR8®/GW/TOPO®.

Les amorces utilisées sont (Tm calculée avec 50mM Nacl et 0% formamide) :

- Amorce FI REV (*Eco*RI) : 5' GAA-TTC-TTA-GTA-CTG-TGT-GAA-ATT-GGC-TGT-G 3', Tm = 54°C

  Amorce FI DIR (*Bam*HI) : 5' GGA-TCC-ATG-GCC-TGG-TTT-GCC-C 3', Tm = 55, 31°C

  Taille attendue de l'amplicon : 1266 pdb.

- Amorce IFN REV (*Eco*RI) : 5'GAA-TTC-TTA-CTG-GGA-TGC-TCT-TCG-ACC 3', Tm = 54, 64°C

Amorce IFN DIR (*Bam*HI) : 5’ GGA-TCC-ATG-AAA-TAT-ACA-AGT-TAT-ATC-TTG-GCT-TTT-C 3’, Tm = 54, 96°C

Taille attendue de l’amplicon : 513 pdb.

4.1.2. Electrophorèse d’ADN sur gel d’agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode en biologie moléculaire pour séparer l'ADN (dans notre cas), ou l'ARN en fonction de leur taille.

Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

Le premier facteur affectant la migration est la longueur de la molécule d'ADN : la séparation se fait en fonction de sa taille. Toutefois la conformation de l'ADN est aussi importante. Pour éviter les problèmes liés à cette conformation, seul l’ADN linéaire est séparé sur ce gel (fragment d'ADN issu d'une digestion, ADN amplifié par PCR ou encore de l'ADNc). L'augmentation de la concentration d'agarose dans un gel réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragment d'ADN de plus petite taille.

Les ADN sont séparés sur gel d’agarose compris entre 0,8% et 2%, en fonction de leur taille et de la résolution attendue. Avant le dépôt, les échantillons d’ADN (20 µL) sont additionnés de 4 µL de tampon de charge (Tris 50 mM pH 7,5 ; EDTA 100 mM pH 7,5 ; 10 % glycérol ; 0,05 % bleu de bromophénol). Lors de la migration, le gel d’agarose, immergé dans du tampon TAE (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM : faible pouvoir tampon mais produit une meilleure séparation pour les fragments d'ADN de grande taille), est soumis à une tension d’environ 100 V (environ 10V/cm) pendant 40 minutes. La taille approximative des amplicons est déterminée grâce à un marqueur de taille ayant migré sur le gel en même temps que les échantillons (Fermentas massruler ready-to-use #SM0403).

La méthode de révélation la plus utilisée est la révélation au bromure d'éthidium ou BET. Il s’agit d’un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique en biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN. Le gel est ensuite mis à incuber pendant 10 minutes dans ce bain de bromure d’éthidium (1 µg/mL), puis les ADN sont observés sous UV (λ = 254 nm).

4.1.3. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

Après migration et révélation aux UV, la bande de gel contenant l'amplicon à cloner est découpée à l'aide d'une lame de scalpel propre, puis placée dans un microtube de 1,5 mL. L'ADN est ensuite extrait à l'aide du kit d'extraction MinElute™ (Qiagen) en suivant le protocole situé en annexe 4.

4.1.4. Clonage dans le plasmide pCR®8/GW/TOPO®

La technologie Gateway® est une méthode de clonage universelle basée sur les propriétés de recombinaison site spécifique du bactériophage lambda pour permettre un transfert rapide et efficace de notre gène d'intérêt vers de multiples systèmes plasmidiques. Pour exprimer notre gène d'intérêt dans les plantes en utilisant la technologie Gateway®, il suffit de :

- Cloner notre gène d'intérêt dans un vecteur d'entrée Gateway® tel que pCR8®/GW/TOPO®.
- Transférer le gène d'intérêt présent dans le vecteur d'entrée de type Gateway® dans notre vecteur de destination Gateway® en réalisant une réaction de recombinaison.
- Après transformation des agrobactéries avec notre nouveau vecteur, la transformation génétique des plantes peut être réalisée.

5 µl de produit de PCR, 1µl de pCR8®/GW/TOPO® et 1µl de solution saline (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl2, diluée 4 fois si la transformation bactérienne se fait par électroporation pour éviter l'arc électrique) sont mélangés délicatement à la pipette dans un tube. La ligation est généralement incubée toute la nuit à température ambiante (5min recommandées par le fournisseur).

Les différents plasmides recombinants issus de ce vecteur seront nommés pCR8-*X*.

4.1.5. Transformation génétique de bactéries

4.1.5.1. Par électroporation

Cette technique est utilisée pour transformer la souche bactérienne *Escherichia coli* GeneHogs® (Invitrogen, génotype annexe 9) rendue préalablement électro-compétente (Protocole de préparation de cellules compétentes annexe 6). Cette souche dérivée de *E. coli* DH10B™ est spécialement utilisée pour l'amplification des gros plasmides (jusqu'à 180kb) comme le plasmide pBin-*X* (environ 15Kb) dans notre cas.

L'électroporation consiste à introduire un plasmide dans des bactéries dont les membranes sont ponctuellement rendues poreuses par un choc électrique court et de haut voltage. La manipulation est réalisée en mélangeant 1 à 10 ng de plasmide ou de produit de ligation à un aliquot de bactéries électro-compétentes. Après les avoir mélangés délicatement à la pipette, les bactéries et le plasmide sont déposés dans une cuve à électroporation (2 mm de distance entre les électrodes), placée dans un Pulseur (Bio-Rad). Les bactéries sont soumises à un choc électrique (V = 2,5 kV ; R = 200 Ω ; C = 25 µF), puis elles sont suspendues dans 500 µL de milieu LB et placées pendant 1 heure au bain-marie à 37°C. Ce laps de temps permet aux bactéries transformées d'acquérir la résistance à l'antibiotique apportée par le plasmide. Les bactéries sont enfin étalées sur du milieu LB sélectif solide puis placé à 37°C pendant une nuit pour voir apparaître les colonies de transformants.

4.1.5.2. Par choc thermique

Cette technique est utilisée pour transformer les souches bactériennes chimio-compétentes *Escherichia coli* TOP10 et ccdB Survival™ (génotype annexe 9).

- *Escherichia coli* ccdB Survival™ (Invitrogen)

Cette souche est résistante aux effets toxiques du gène *ccdB* et est utilisée pour l'amplification et le maintien de vecteurs contenant ce gène (pBin-Gw).

- *Escherichia coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen)

Cette souche est utilisée pour l'amplification des constructions plasmidiques. Elle permet une réplication stable des plasmides à fort nombre de copies.

Pour chaque transformation, un aliquot d' *E. coli* chimio-compétentes conservé à -80°C est décongelé sur de la glace. 1 à 2 µL de plasmide ou de produit de ligation sont ajoutés. Le tube contenant le mélange est incubé sur de la glace pendant 30min. Un choc thermique de 30 secondes est alors réalisé en plongeant le tube dans un bain-marie à 42°C, puis en le transférant immédiatement dans la glace. 250 µL de milieu LB sont ajoutés et le tube est mis à incuber au moins 1 heure à 37°C. Pour terminer, la suspension est étalée sur un milieu LB solide (en boîte de pétri) contenant les antibiotiques adéquats.

À la suite de la transformation, il est nécessaire de s'assurer que les plasmides qui ont été intégrés par les transformants contiennent bien l'insert. On sélectionne une dizaine de colonies bactériennes que l'on repique dans 2,5ml de LB avec les antibiotiques adéquats. Ces cultures liquides sont mises à agiter une nuit à 37°C pour amplifier le plasmide, l'extraire par lyse cellulaire et ainsi vérifier la présence de l'insert dans le plasmide.

4.1.6. Extraction d'ADN plasmidique de bactéries

Après 15 heures de culture sous agitation à 37°C, les bactéries sont culotées par centrifugation (7000g pendant 5 minutes). Les plasmides sont extraits à l'aide du kit Genelute^{TM} miniprep plasmid (Sigma). L'ensemble du protocole se trouve en annexe 5. L'ADN plasmidique est élué dans 50 µL de tris-HCl pH 8 (1 mM).

4.1.7. Analyse plasmidique par digestion de restriction

La réaction de digestion est réalisée dans un volume de 20 µL contenant ; 2 µL de tampon d'activité 10 X, 10 UI d'enzyme de restriction et entre 0,1 et 1 µg d'ADN à digérer. Au besoin, et si les tampons d'activité sont compatibles, la réaction peut être menée avec deux enzymes en même temps. La digestion est généralement incubée une heure à la température d'activité optimale de l'enzyme. Le pCR8-*X* est généralement digéré avec l'enzyme EcoR1 (site de restriction flanquant le site d'insertion de l'insert).

4.1.8. Vérification du sens d'insertion du gène dans le vecteur pCR®8/GW/TOPO®

Le gène d'intérêt peut s'insérer dans le vecteur pCR®8/GW/TOPO® dans le sens directe ou reverse. Pour vérifier le sens d'insertion du gène et sélectionner un plasmide ayant un insert en sens Dir, on réalise une PCR avec les couples d'amorces M13f-Xrev et M13f-Xdir. La séquence M13f se trouve 145 pdb en amont de l'insert (Figure 34, p 131). Suivant le couple d'amorces avec lequel on obtient un amplicon à X+145 pdb, on en déduit le sens d'insertion du gène dans le plasmide. Pour une insertion en sens direct, l'amplicon est attendu pour la PCR avec le couple d'amorces M13f-Xrev (Figure 38, A). Pour un insert dans le mauvais sens (REV), on obtiendra un amplicon de (X + 145) pdb avec le couple d'amorces M13f-Xdir (Figure 38, B).

- Amorce M13f : 5' TTG-TGT-GGA-ATT-GTG-AGC-GGA-TAA-CAA-TTT-CAC-A 3', Tm = 55,73°C.

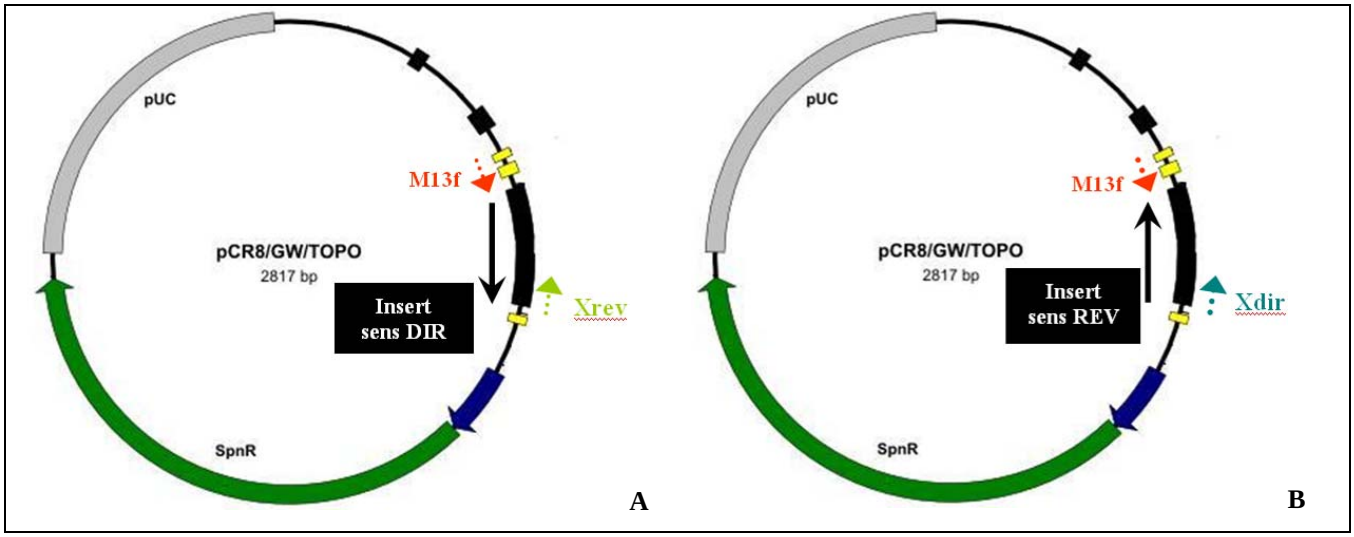


Figure 38 : Schématisation du sens d'insertion de l'insert dans la plasmide pCR®8/GW/TOPO®

4.1.9. Séquençage

Une fois le plasmide vérifié par PCR et par digestion, il est envoyé à séquencer à l'entreprise MWG Biotech en Allemagne.

4.1.10. Recombinaison dans un vecteur de destination par la technologie Gateway

Le système Gateway est un système de clonage basé sur deux étapes. La première étape consiste en l'insertion d'un fragment d'ADN généré par PCR dans un clone d'entrée (pCR®8/GW/TOPO®). Puis grâce à ce vecteur, il sera possible de transférer le fragment d'intérêt dans une multitude de vecteurs dits de destination par LR recombinaison, comme par exemple dans un vecteur d'expression hétérologue adapté aux plantes (dans notre cas pBin-Gw, page). La technologie utilise le système de recombinaison λ pour faciliter le transfert de séquences (flanquée par les sites *att*) d'ADN hétérologues entre vecteur d'entrée et vecteur de destination.

Ce transfert est réalisé grâce à une recombinaison homologue réalisée en une seule étape. La séquence qui se situe entre les sites *att*L1 et *att*L2 du plasmide pCR8-GW-X est recombinée avec la séquence se trouvant entre les sites attR1 et attR2 du plasmide de destination Gateway®. Dans notre cas, la recombinaison entre les sites *att*L du vecteur d'entrée et *att*R du vecteur de destination est catalysée par l'enzyme LR clonase™ (Invitrogen). Les différents plasmides recombinants issus de cette réaction seront nommés pBin-*X* (Figure 39).

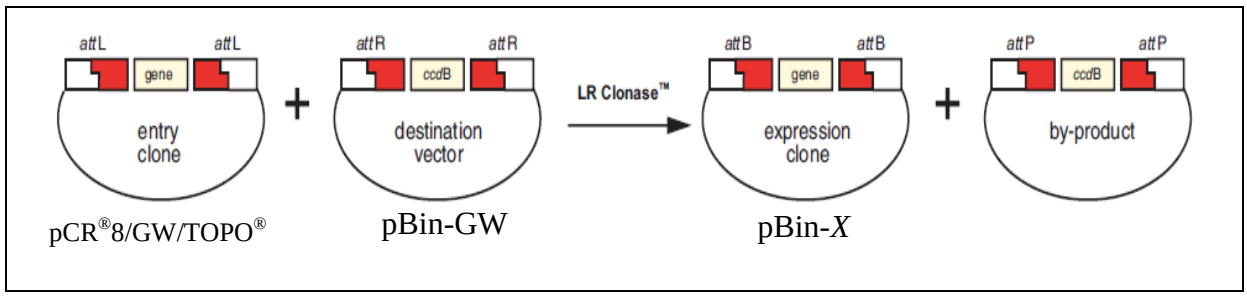


Figure 39 : Schéma représentant la LR recombinaison.

4.1.11. Obtention des plasmides recombinants pBin-*IFNγ* et pBin-*FI*

La recombinaison s'effectue entre un plasmide d'entrée de type Gateway® et un vecteur de destination Gateway®. La solution plasmidique est ensuite utilisée pour transformer des cellules compétentes *E. coli* GeneHogs®. Seules les cellules ayant incorporé les vecteurs recombinés (donc n'ayant plus le gène *ccd*B) pourront se développer sur milieu sélectif.

Réaction de LR recombinaison

Dans un tube de 1,5 mL, à température ambiante 150 ng de plasmide de destination pBin-Gw linéarisé au niveau du site de restriction *Sal*I (Figure 35), 150 ng de plasmide pCR8-GW-*X* et 2 µL d'enzyme LR Clonase™ (Invitrogen) sont mélangés dans un volume total de 10 µL. La réaction est incubée une nuit à 25°C. On ajoute ensuite 1 µL de protéinase K (2µg/µl, Invitrogen) au mélange avant de l'incuber 10 minutes à 37°C. La solution est ensuite utilisée pour transformer par choc thermique des cellules *E. coli* GeneHogs®. Les bactéries sont enfin étalées sur milieu LB sélectif puis placées à 37°C pendant la nuit.

Avant d'être intégrés dans les agrobactéries par conjugaison triparentale, les pBin-*X* seront vérifiés par digestion et par PCR (amorces spécifiques, et amorces 35S Dir/XRev). Les cartes des plasmides sont présentées en figure 40.

- Amorces 35S DIR : 5' CAC-TAT-CCT-TCG-CAA-GAC-CCT-TCC-TCT-ATA-TAA-GGA-A 3', Tm = 68,9°C

  Taille attendue de l'amplicon : X + 73 pdb

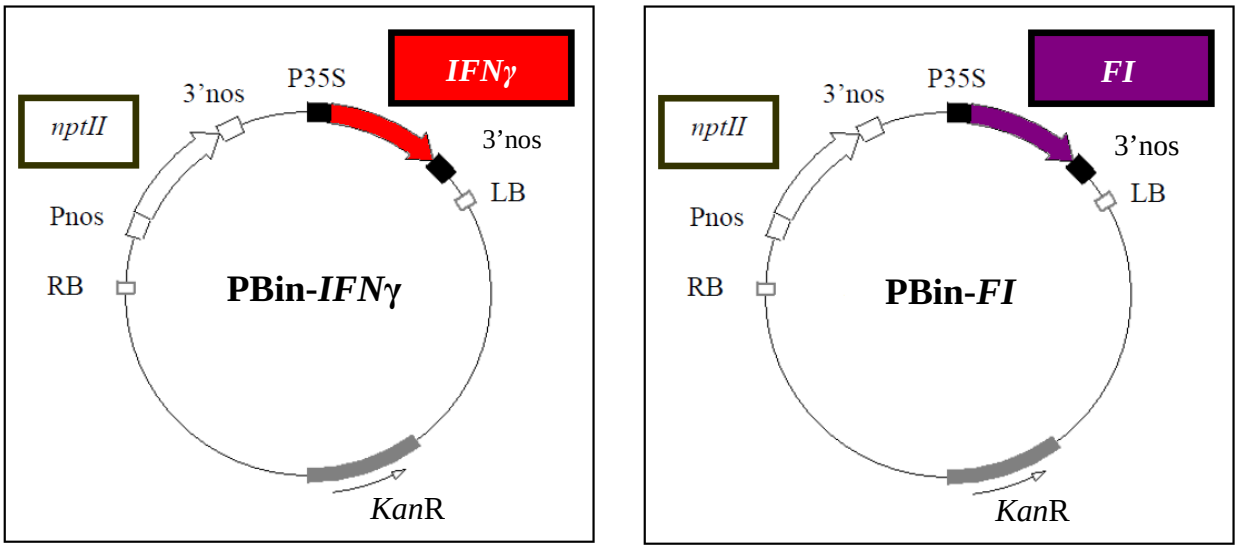


Figure 40 : Carte physique des plasmides pBin-*IFNγ* et pBin-*FI*
- *nptII* : gène codant pour la néomycine phosphotransférase conférant la résistance à la kanamycine,
- P35S : promoteur 35S constitutif du virus de la mosaïque du chou-fleur,
- Pnos, 3'nos : promoteur et terminateur de la nopaline synthase d'*A.tumefaciens.*
- RB, LB: bords droit et gauche de l'ADN-T.

4.2. Conjugaison triparentale

4.2.1. Les souches bactériennes

Les souches utilisées pour cette étape sont :

- *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^R (pGV2260)

Cette souche désarmée est utilisée comme vecteur de transformation génétique pour *Drosera rotundifolia*. Le gène de résistance à la rifampicine est porté par le chromosome bactérien. Le plasmide pGV2260 est un vecteur désarmé qui porte les gènes de virulence nécessaires à l'infection des plantes, ainsi que le gène de résistance à la carbénicilline.

- *Escherichia coli* HB101 (pRK2013)

Cette souche (génotype annexe 9) possède le plasmide helper pRK2013 facilitant la conjugaison entre bactéries. Elles permettent le transfert par conjugaison des plasmides portant les transgènes (pTDE4 et pBin-*X*) dans les agrobactéries. Elle porte le gène *mob* codant pour les protéines mob (mobilising) et le gène *tra* (transfer).

- *Escherichia coli* MC1061

Cette souche (génotype annexe 9) est utilisée pour véhiculer les plasmides pTDE4 et pBin-*X* vers la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^R par le mécanisme de conjugaison triparentale.

Cette étape permet l'intégration du plasmide vecteur (portant le gène d'intérêt) par conjugaison dans les agrobactéries.

4.2.2. Le principe de la conjugaison triparentale

Au préalable, les *E.coli* MC1061 sont rendues compétentes et sont transformées avec le plasmide vecteur pBin-*X* ou pTDE4 (Voir annexe 7 et 8). Le transfert du vecteur portant l'ADN-T dans *Agrobacterium tumefaciens* est facilité par la présence du plasmide helper pRK2013 présent dans une souche d'*Escherichia coli* HB101. Ce type de conjugaison est nommé la conjugaison triparentale (figure 41).

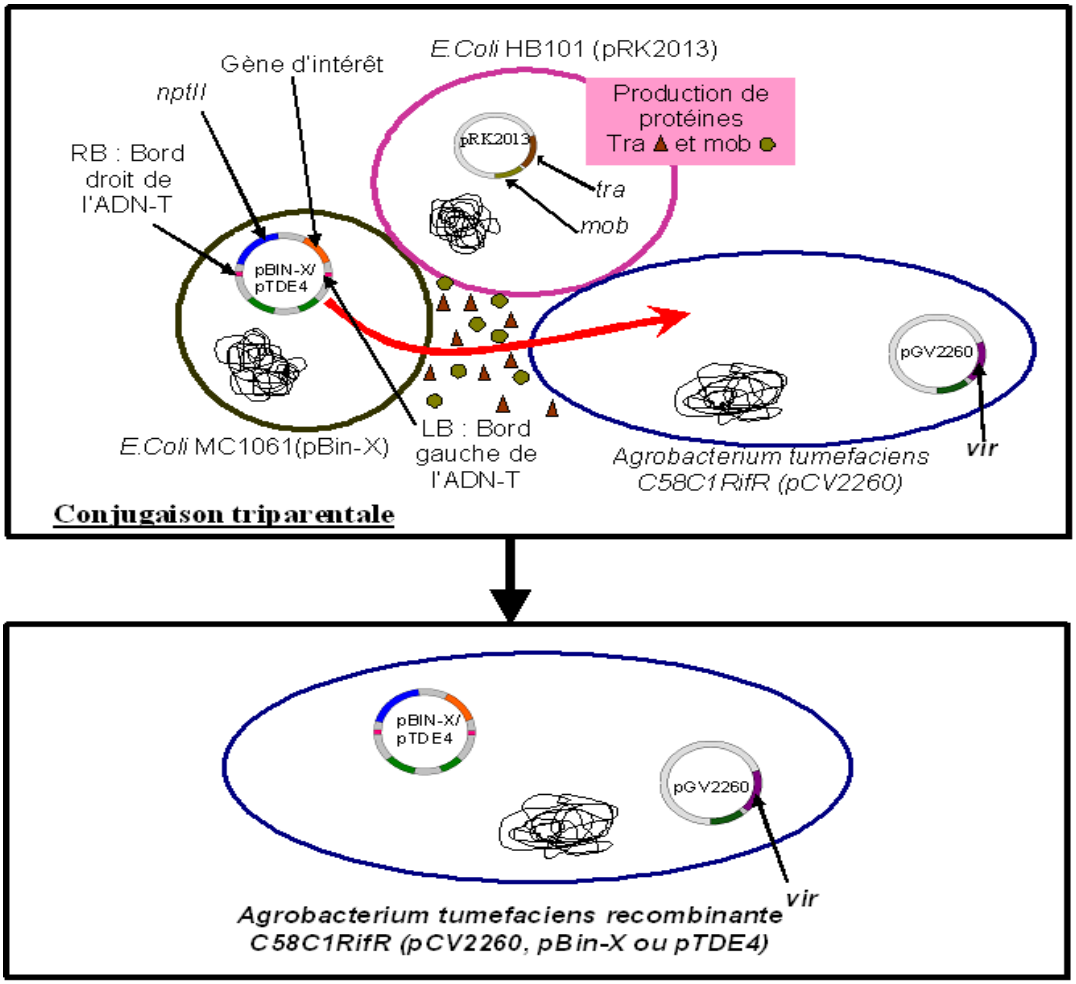


Figure 41 : schéma explicatif de la conjugaison triparentale

4.2.3. Protocole de conjugaison triparentale

Pour réaliser la conjugaison triparentale, les bactéries issues de glycérol stock sont d'abord mises en culture en milieu solide (voir tableau 5), puis en milieu liquide :

- Une colonie d'*Escherichia coli* MC1061 contenant un des plasmides pBin-*X* ou pTDE4 dans 2 mL de milieu LB additionnés de kanamycine (25 µg/mL) ou de Carbénicilline et de streptomycine (100 et 20µg/ml).
- Une colonie d'*Escherichia coli* HB101 contenant le plasmide pRK2013 dans 2 mL de milieu LB additionnés de kanamycine (25 µg/mL).
- Une colonie d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Rif^R (pGV2260) dans 2 mL de milieu YEB additionnés d'ampicilline (100 µg/mL) et de rifampicine (100 µg/mL).

Ces souches d'*Escherichia coli* et d'*Agrobacterium tumefaciens* sont mises en culture sous agitation (200 rpm) pendant une nuit, à 37°C pour les *E.coli* et 28°C pour les agrobactéries. 100 µL de chacune des 3 cultures sont prélevés et mélangés dans un tube de 1,5

mL stérile. L'ensemble est étalé stérilement à l'aide d'un râteau sur un milieu YEB Mg^{2+}. Après une nuit de culture à 28°C, la conjugaison triparentale est réalisée.

Le tapis de bactéries est récupéré avec 2 mL de milieu LB et placé dans un tube stérile de 2 mL. 500 µL de la solution sont étalés sur une boîte de pétri contenant du milieu YEB solide additionné des antibiotiques adéquates pour ne laisser pousser que les agrobactéries transformées.

Après 48 heures de culture à 28°C les agrobactéries C58C1RifR (pGV2260, pBin-*X* ou pTDE4) sont repiquées sur un nouveau milieu nutritif. Avant d'être utilisées pour la transformation génétique, une PCR sur colonie avec les amorces spécifiques aux transgènes en question sera effectuée. La PCR sur colonie (*Colony PCR*) est un protocole qui permet d'amplifier de façon simple de l'ADN bactérien en inoculant directement la colonie dans le milieu réactionnel de la PCR (conditions standards). Durant les premières étapes de dénaturation, les cellules bactériennes sont lysées et leur ADN est libéré dans le milieu réactionnel. L'ADN ainsi libéré peut alors servir de matrice.

Les amorces GUS, GFP et NptII utilisées (pour vérifier la présence des plasmides pTDE4 et pBin-*m-GFP-5ER*) sont :

- Amorces NptIIDIR : 5'ATT-GAA-CAA-GAT-GGA-TTG-CAC 3', Tm = 43,38°C
  Amorces NptIIREV : 5' TCG-TCA-AGA-AGG-CGA-TAG-AA 3', Tm = 48,13°C
  Taille attendue de l'amplicon : 775pdb
- Amorces GFPDIR : 5' GGA-TCC-AAG-GAG-ATA-TAA-CAA 3', Tm = 47,05°C
  Amorces GFPREV : 5' TCA-AGA-AGG-ACC-ATG-TGG 3', Tm = 42,9°C
  Taille attendue de l'amplicon : 751pdb
- Amorces GUSDIR : 5' ATG-GTC-CGT-CCT-GTA-GAA-ACC-CCA-ACC-C 3', Tm = 59,22°C
  Amorces GUSREV : 5' TAT-CGT-CCA-CCC-AGG-TGT-TCG-GCG-TG 3', Tm = 57,6°C
  Taille attendue de l'amplicon : 500pdb

4.2.4. Préparation de l'inoculum bactérien pour la transformation génétique de plantes

Les agrobactéries C58C1Rif^R (pGV2260, pBin-*X*) ou C58C1Rif^R (pGV2260, pTDE4) sont cultivées 3 jours à 28°C sur du milieu YEB solide supplémenté des antibiotiques adéquats (tableau 5, p 130). Pour la transformation, une colonie a été prélevée et mise en culture dans 30 mL de milieu liquide YEB (additionnés des mêmes antibiotiques) et cultivée à

28°C pendant 36 heures sous une agitation à 200 tours par minute. On ajoute alors de l'acétosyringone au milieu (concentration finale 0,1mM) pendant 4h. Cette dernière permet d'activer les gènes de virulence de l'agrobactérie. Quand l'absorbance à 550 nm est comprise entre 0,8 et 1, les agrobactéries sont centrifugées à 1500g pendant 10 minutes puis le culot est resuspendu dans 30 mL de milieu liquide YEB (sans antibiotiques). Les bactéries sont ensuite lavées trois fois avec 30ml de milieu YEB, avant d'être utilisées pour transformer les explants végétaux.

4.3. Caractérisation moléculaire des *Drosera rotundifolia* transformées

Le premier volet de la caractérisation des plantes transgéniques consiste à montrer l'insertion des transgènes dans le génome. Pour réaliser cette caractérisation moléculaire, nous avons été confrontés à deux problèmes majeurs. D'une part, il nous a fallu produire un ADN suffisamment pur ne contenant pas d'inhibiteur de la PCR. Cette partie a nécessité des étapes de mises au point du protocole d'extraction de l'ADN essentiellement liées à la richesse en métabolites secondaires présents dans ces plantes. D'autre part, le transgène recherché pouvant être un gène humain (*IFNγ* ou *FI*), il a fallu prendre toutes les précautions nécessaires pour ne pas contaminer les extraits avec de l'ADN humain exogène (ADN de l'expérimentateur, risque de faux positif). Pour cela, les extractions se sont faites sous hotte à flux laminaire avec vitre. Les solutions d'extraction ont été préparées avec de l'eau DEPC stérile, et ont été traitées aux UV pendant 4h. La verrerie et les outils (scalpel, pillons…) nécessaires aux extractions ont été rincés à la soude 1N puis à l'eau DEPC stérile avant d'être autoclavés. Le port de 2 épaisseurs de gants est nécessaire. Ces précautions sont également valables lors de la préparation des tubes pour la PCR (utilisation de Master Mix et d'eau stérile et d'amorces ouverts uniquement sous hotte, tubes PCR autoclavés).

4.3.1. Extraction d'ADN génomique de feuilles de *Drosera rotundifolia*

Les différents tests d'extraction d'ADN génomique de *Drosera rotundifolia* à l'aide de kits ne se sont pas révélés concluants. Nous nous sommes alors basés sur la méthode mise au point par Bekesiova et ses collaborateurs en la modifiant (Bekesiova *et al.*, 1999). Elle consiste en l'extraction d'ADN à partir de feuilles de *Drosera rotundifolia* à l'aide de CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide).

Toutes les solutions sont stérilisées par autoclave.

- Tampon I : 0.35M sorbitol, 0.1M Tris-HCl, 5mM sodium-EDTA. Le pH est ajusté à 7,5 et le tampon est stérilisé. Après autoclavage, le sodium bisulfite filtré à 0,2µ est ajouté à la concentration finale de 0,02M.
- Tampon II : 0.2M Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM sodium-EDTA (pH 7.5), 2M NaCl, 2% CTAB (w/v).
- 5% sodium N-lauroyl sarcosine (w/v).
- Chloroforme : alcool isoamylique (24:1).
- Tampon TE: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM sodium-EDTA (pH 8.0).
- Solution de précipitation : 8 vol. 96% éthanol, 2 vol. 1 M sodium acétate (pH 5.2).

250 mg de feuilles fraichement récoltées sont répartis dans 5 tubes de 2ml. Ceux-ci sont plongés dans l'azote liquide, puis les feuilles sont réduites en poudre aussi fine que possible à l'aide de pillons stériles.

Les 250mg de poudre végétale sont ensuite transférés dans un tube de polypropylène de 50ml stérile contenant 750 µl de chacun des tampons I et II. Le tube est agité vigoureusement pendant quelques secondes à température ambiante.

300µl de 5% sodium N-lauroyl sarcosine sont ajoutés et le mélange est agité de nouveau.

L'échantillon est incubé à 65°C pendant 20 min au bain-marie, et est refroidi pendant 10min à température ambiante. Le lysat doit être clair et légèrement visqueux.

Ce dernier est ensuite extrait avec 1,75 ml de mélange Chloroforme : alcool isoamylique (24:1). L'échantillon est centrifugé à 14 000g pendant 10min à 4°C.

La phase aqueuse est transférée dans un nouveau falcon. Si l'extrait est trouble, une deuxième extraction au chloroforme : alcool isoamylique (24:1) peut être faite.

L'ADN est précipité en ajoutant 2 ml de la solution de précipitation, et le tube est inversé doucement plusieurs fois avant de laisser l'ADN précipiter 5min à température ambiante. L'ADN est ensuite culoté à la vitesse maximale pendant 10min à 4°C.

Le culot est lavé deux fois avec de l'éthanol à 70% et est séché à l'air libre. Il est ensuite dissout dans 50µl de tampon TE en l'incubant 15 min à 65°C.

L'ARN est dégradé en ajoutant 5µl de RNase (100mg/ml) et en incubant le tube à 37°C pendant 30 min.

L'ADN est généralement quantifié à l'aide du Qubit Fluorometer^{TM} (Invitrogen) et est ensuite analysé ou stocké à -20°C.

4.3.2. Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

A partir de l'extrait d'ADN génomique réalisé sur les feuilles de *D. rotundifolia*, le transgène peut être mis en évidence par PCR.

Une PCR avec les amorces spécifiques d'un gène de Drosera (putative glucanase gene, ref NCBI : AY622820) est faite sur les échantillons d'ADN végétaux afin de valider le bon fonctionnement de la réaction. Pour la PCR avec les amorces du gène X, le plasmide pCR8-Gw-X sert de témoin positif puisqu'il renferme le gène en question. L'extrait d'ADN génomique de plante sauvage sert de témoin négatif de PCR. Dans le cas de mise en évidence d'un gène humain (IFNγ et FI), l'ADN de la plante sauvage est extrait en même temps que celui de la plante transformée afin de valider qu'il n'y a pas eu contamination par de l'ADN humain exogène durant l'extraction. La même PCR est réalisée sur l'eau afin d'éliminer tout doute de contamination par de l'ADN humain durant la préparation des tubes de PCR.

De façon générale, les réactions de PCR sont réalisées dans un volume de 20 µL contenant : 0,4 µM de chaque amorce sens et antisens, 10µl de PCR Master Mix (x2) (Fermentas, contenant 0.4 mM de chaque dNTP, le tampon de réaction, 0,4 mM de $MgCl_2$ et 0.05 u/µl de *Taq* DNA polymerase) et de 10 ng d'ADN matrice (correspondant à 1µl de notre extrait d'ADN : quantité optimum pour avoir suffisamment d'ADN pour qu'il soit amplifié, sans ajouter trop de contaminants pouvant gêner la réaction de PCR).

La séquence des amorces du gène de la glucanase de *Drosera rotundifolia* utilisé comme témoin de PCR est :

- Amorce DrosDIR : 5' GAG-ATA-CAT-AGC-TGT-TGG-GA 3', Tm = 48,13°C

  Amorce DrosREV : 5' GAA-CAT-GTC-AAA-GAT-GTA-AGT-C 3', Tm = 47,94°C

  Taille attendue de l'amplicon : 595 pdb

5. Etude des protéines produites par les plantes carnivores (naturelles et recombinantes)

5.1. Révélation histochimique de l'activité GUS (*Drosera rotundifolia*)

Pour éviter tous risques de faux positifs, cette révélation doit se faire en conditions stériles car le gène *uidA* que l'on cherche à mettre en évidence est un gène bactérien (*E. coli*). Le substrat X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl ß- D –glucuronide) est dilué dans du tampon (100mM Tris HCl, NaCl 50 mM, pH 7) à une concentration finale de 1mM. Les gouttelettes de glu de plantes transformées et de plantes sauvages sont prélevées par absorption sur des bandelettes de papier Wattman autoclavées. Les feuilles, quant à elles, sont prélevées stérilement. Chaque feuille ou bandelette est ensuite incubée dans 0,5 ml de tampon X-Gluc stérile (filtré à 0,2µ). Le tout est placé à 37°C à l'obscurité pendant 12 h. Les feuilles sont ensuite immergées dans un bain d'éthanol à 95° afin d'éliminer la chlorophylle, et de mieux voir la coloration bleue due à l'éventuelle présence de l'enzyme GUS.

5.2. Observation de la protéine GFP sous microscopie à fluorescence (*Drosera rotundifolia*)

La protéine GFP a la particularité d'émettre de la fluorescence sous UV sans ajout de substrats ou de co-facteurs. La GFP modifiée m-GFP-5ER excitée à une longueur d'onde de 473 nm (lumière bleue) réémet la fluorescence à 507 nm.

Afin d'observer l'éventuelle présence de la protéine GFP dans les gouttelettes de glu de *Drosera rotundifolia* au microscope UV à fluorescence, des carrés de papier transparent ont été découpés, et autoclavés afin d'absorber stérilement sur le papier la glu de plantes sauvages témoins et de plantes transformées.

5.3. Dosage des protéines totales

Les protéines totales des fluides digestifs des urnes de *Nepenthes* sont dosées par fluorimétrie par le Qubit ™ fluorometer (Invitrogen). La méthode Quant-iT™ utilise des fluorophores qui deviennent fluorescents lorsqu'ils se lient aux protéines, les contaminants n'interfèrent donc pas dans le dosage (SDS, EDTA, Triton X-100, …). Cette technique est 1000 fois plus sensible que la détection par l'absorbance en UV, c'est pourquoi 1µl d'échantillon à doser suffit ($V_{échantillon}$ 1à 20 µL). Le volume est complété à 200 µl avec la

solution de réaction (tampon + réactif fluorescent) comme indiqué par le fournisseur, puis le mélange est vortexé avant la lecture dans le fluoromètre (après calibration de l'appareil avec les solutions standards de BSA fournies dans le kit).

5.4. Concentration des protéines des fluides digestifs

Avant d'être analysées sur SDS-PAGE (Sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ou par zymogrammes, les protéines des urnes de *Nepenthes* sont préalablement concentrées par précipitation à l'acétone.

100µl de sécrétions digestives sont prélevées dans une urne (fermée ou ouverte) de plante *in vitro* ou en pot, et 400µl d'acétone sont ajoutés. Les échantillons sont placés au congélateur à -20°C pendant 1h. Ils sont ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 10min, afin de culoter les protéines ayant précipité. Le culot est enfin remis en suspension dans 10µl de tampon de migration. Dans le cas d'une simple migration sur gel, l'echantillon est dénaturé 10 min à 95°C.

5.5. Extraction de protéines de feuilles de *Drosera rotundifolia* par le Trizol Reagent®

Parallèlement, nous avons initié des travaux permettant de mettre en évidence la production des protéines IFNγ et FI dans les feuilles. Pour atteindre ce but, nous avons utilisé une approche basée sur l'immunodétection. La première étape de cette caractérisation a consisté à mettre au point un protocole d'extraction de protéines suffisamment efficace pour s'affranchir de métabolites secondaires produits massivement par ce type de plante. Un protocole d'extraction au Trizol® reagent (Invitrogen) a été utilisé.

Le Trizol® est une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate. Il résulte de la méthode d'isolation en une étape de l'ARN développée par Chomczynski et ses collaborateurs (Chomczynski and Sacchi, 1987 ; Chomczynski, 1993 ; Chomczynski *et al.*, 1994). Pendant la lyse des échantillons, le Trizol® reagent maintient l'intégrité des ARN pendant qu'il désorganise les cellules et dissout les composés cellulaires. L'addition de chloroforme suivi d'une centrifugation sépare la solution en une phase aqueuse et une phase organique. La phase aqueuse contient les ARN, ceux-ci peuvent être récupérés par précipitation à l'alcool isopropylique. Les ADN et les protéines, contenus dans la phase organique peuvent être récupérés par précipitation séquentielle (par l'éthanol pour faire

précipiter l'ADN puis par l'acétone pour précipiter les protéines). Dans notre cas, seules les protéines seront conservées (L'extraction d'ADN à partir de feuilles de *Drosera rotundifolia* a en effet donné un rendement médiocre). Cette méthode permet d'éliminer les ADN et les ARN de l'extrait protéique et aussi beaucoup d'autres contaminants (polyphénols, polysaccharides…) grâce aux nombreux lavages du culot de protéines.

Les feuilles fraichement récoltées (1g de feuilles de plantes sauvages ou transformées) sont réparties dans 10 tubes de 2ml. Ceux-ci sont plongés dans l'azote liquide, puis les feuilles sont réduites en poudre aussi fine que possible à l'aide de pilons stériles.

Le gramme de poudre végétale est ensuite transféré dans un falcon de 50ml contenant 10ml de Trizol® Reagent (1ml pour 100mg de poudre). L'échantillon est homogénéisé pendant quelques secondes et est incubé pendant 5 min à température ambiante, afin de permettre une complète dissociation des complexes nucléo-proteines.

2ml de chloroforme sont ajoutés (200µl par ml de Trizol® reagent), le tube est agité 15 secondes vigoureusement puis est incubé 2 à 3 min entre 15 et 30°C.

L'échantillon est centrifugé à 12000g pendant 15min à 4°C. Seule la phase organique (inferieure) est conservée (contient l'ADN et les protéines).

L'ADN est alors précipité en ajoutant 3ml d'éthanol absolu à la phase organique. (300µl par ml de Trizol® utilisé au départ). L'échantillon est homogénéisé par inversion, puis est incubé 3min à température ambiante. Il est ensuite centrifugé à 2000g pendant 5min à 4°C, afin de récupérer le culot d'ADN. Le surnageant phénol-éthanol est conservé (contient les protéines).

Afin de faire précipiter les protéines, 15 ml d'acétone sont ajoutés au surnageant (1,5ml par ml de Trizol®). Le mélange est conservé 10 min à température ambiante et est centrifugé à 12000g pendant 10min à 4°C.

Le surnageant est éliminé et le culot de protéines est lavé 3 fois dans 20ml d'une solution éthanolique à 95% contenant 0,3M de guanidine hydrochloride (chaotrope qui augmente la solubilité des protéines hydrophobes et dénature les protéines en altérant leur structure tridimensionnelle). Durant chaque cycle de lavage, le culot est vortexé (voire cassé avec un cône de pipette s'il ne se disperse pas) et conservé dans la solution de lavage pendant 20 min avant d'être centrifugé à 7500g pendant 5min à 4°C. Enfin, un dernier lavage est réalisé dans 20 ml d'éthanol absolu (pour continuer à éliminer le phénol et les colorants).

Après centrifugation, le culot est ensuite séché pendant 30min à température ambiante. Il est remis en suspension dans 1ml de SDS 1% (volume nécessaire pour réussir à bien

dissoudre le culot) avant d'être incubé à 50°C pendant 1h pour extraire les protéines solubles du culot. Les matériaux insolubles sont enfin sédimentés par centrifugation à 10 000g pendant 10min à 4°C, et le surnageant est transféré dans un nouveau tube.

Afin d'obtenir un échantillon plus concentré, les protéines peuvent être précipitées dans 4 volumes d'acétone refroidi préalablement à -20°C (4ml pour 1ml d'extrait protéique). Le mélange est stocké 1h à -20°C, puis est centrifugé à 10 000g pendant 10min. Le culot est ensuite resuspendu dans 50µl de SDS 1%.

5.6. Détection immunologique des protéines

5.6.1. par Dot Blot

Le Dot blot est une technique immunohistologique comparable au western blot mais sans séparation des protéines par électrophorèse. En effet, les dépôts d'échantillons se font en point (dot) dans cette technique.

Les extraits de protéines de feuilles de *Drosera rotundifolia* (5 à 25 µg de protéines totales, ceci dépend du rendement d'extraction obtenu par la méthode du Trizol® reagent) sont déposés sur une membrane de nitrocellulose (Protran Nitrocellulose Sheets 0,2 µ, Schleicher and Schuell). A chaque fois, un extrait de protéines de feuilles de plante sauvage (témoin négatif) est également déposé à la même concentration. Suivant la protéine recherchée, un standard IFNγ ou FI est déposé (5µl de standart IFNγ (20µg/ml) fourni par le laboratoire du Professeur JL Goergen, ou 5µl de standart FI (400µg/ml dans phosphate de sodium 0,2M pH 7,4) fourni par le laboratoire du Professeur JL Guéant).

La membrane de nitrocellulose est d'abord lavée dans du tampon PBS-Tween pH 7,4 (NaCl 150mM, KH_2PO_4 1,4mM, Na2HPO4 10mM, KCl 2,7mM, Tween 20 1%).

Avant de traiter le dot blot à l'aide d'un ligand spécifique, tous les sites de fixation potentiels non utilisés de la membrane doivent être bloqués. Cette opération est particulièrement importante car c'est elle qui assure la spécificité de la technique. Si elle n'était pas réalisée, la fixation de l'anticorps primaire sur la membrane donnerait un bruit de fond élevé. Le blocage est effectué en trempant la membrane dans une solution de blocage (PBS-Tween-lait 5%, Figure 42). Dans notre cas, nous utiliserons un détergent non ionique, le Tween 20 (polyéthylène sorbitan monolaurate), et comme protéine, du lait non gras.

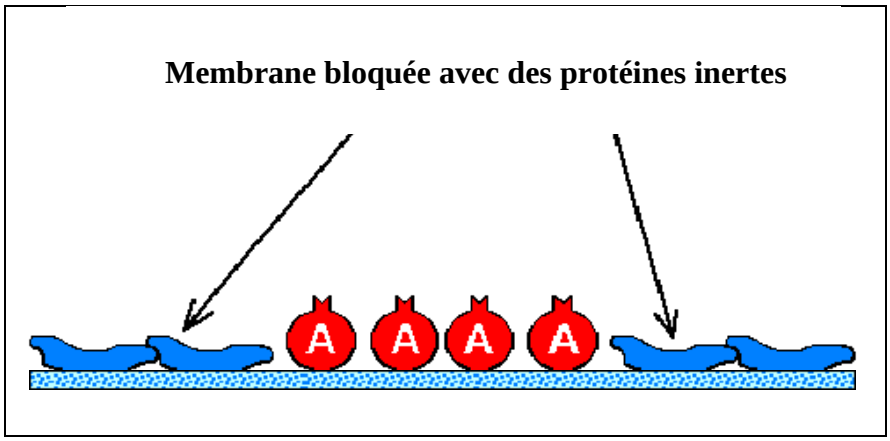


Figure 42 : blocage de la membrane

Elle est ensuite incubée dans le sérum anti protéine d'intérêt dilué au 1/1000ème dans du PBS-Tween additionné de lait en poudre 5% pendant 2h à température ambiante sous agitation mécanique, ou pendant la nuit à 4°C (Figure 43, La température d'incubation de 4°C diminue considérablement le nombre de liaisons non spécifiques, et évite aussi que le lait ne « tourne » ou soit le lieu de développement de bactéries). L'anticorps IgG anti-IFNγ utilisé est un anticorps polycolonal produit dans le lapin (P700 Pierce-Endogen). L'anticorps IgG anti-FI est lui monoclonal et est produit dans la souris (BM 551 Acris Antibodies).

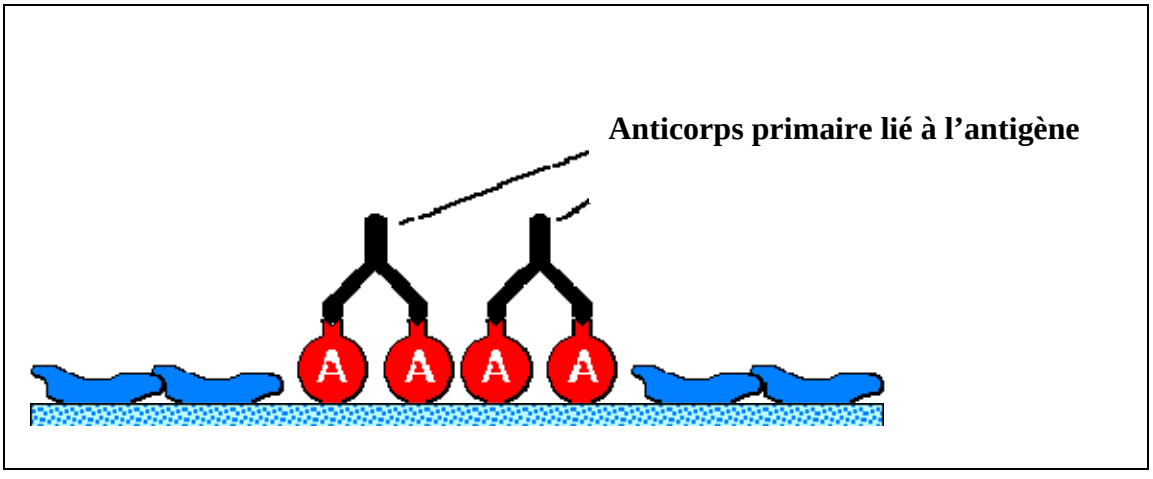


Figure 43 : fixation de l'anticorps primaire.

La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 10 min dans le tampon PBS-Tween avant d'être incubée dans le sérum anti IgG de lapin ou de souris (Sigma A-0418 et A-3563 suivant l'anticorps primaire) couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/2000ème pendant 1h30 à température ambiante (Figure 44).

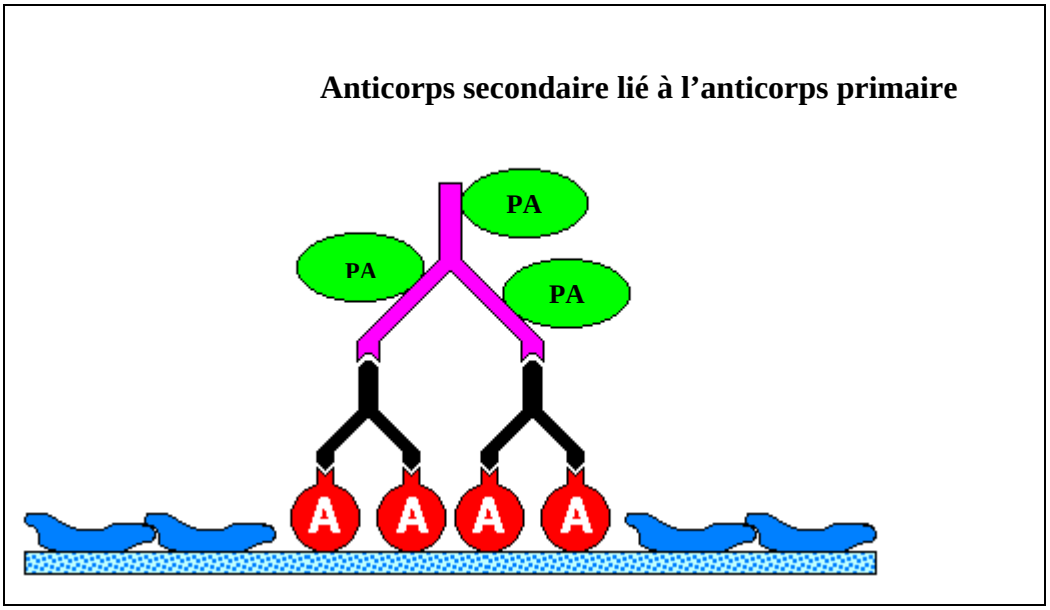


Figure 44 : fixation de l'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (PA)

La membrane est enfin lavée 2 fois pendant 20 min dans le PBS-Tween puis 2 fois pendant 10 min dans le tampon de détection (Tris 0,1M NaCl 0,1M pH 9,6) avant d'être révélée soit par chimioluminescence soit par colorimétrie.

5.6.2. Par Western Blot

Le western blot est une technique permettant de détecter une protéine spécifique dans un échantillon donné. Elle utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes pour séparer les protéines, selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées du gel vers une membrane. Celle-ci est traitée avec un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un extrait et d'évaluer sa taille apparente.

La technique de l'électrophorèse permet d'identifier les protéines selon leurs poids moléculaires apparents et consiste en la migration de particules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique, ceci se faisant au travers d'un gel de polyacrylamide en présence de Sodium DodécylSulfate (SDS). On parle alors de SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

- Préparation du gel de polyacrylamide

Le réseau de polyacrylamide est formé par polymérisation de monomère d'acrylamide en présence de petite quantité de bis acrylamide (NN'méthylène-bisacrylamide). Le taux de réticulation, qui correspond à la porosité du gel, dépend de la quantité d'acrylamide et de bis-acrylamide contenue dans 100 mL. Le gel de concentration est de 5%, et le gel de séparation entre 7 et 15 % suivant la taille des protéines que l'on veut séparer. Pour une bonne séparation de la protéine étudiée (FI ou IFN) par rapport aux autres protéines, nous utiliserons un gel à 10% (composition en annexe 10).

Suivant la taille du gel et des puits, 10 à 30 µl d'échantillons protéiques sont additionnés de 10 à 30µl de tampon de charge x2 (Tris HCl pH 6,8 125 mM, SDS 5%, Glycérol 20%, β-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,05%) et sont chauffés 5min à 95°C pour être dénaturés. Ce tampon donne une densité à l'échantillon lui permettant d'être déposé facilement au fond des puits (60µl). La présence du détergent anionique SDS hautement chargé masque complètement les charges naturelles de la protéine en la recouvrant uniformément. La charge électrique propre à chaque molécule devient alors négligeable. C'est ainsi que chaque protéine acquiert une densité de charge identique. Le fait que le SDS rende négatives les protéines permet de les séparer en fonction de leurs tailles (masse moléculaire) et non pas en fonction de leur charges.

Le système utilisé pour le western blot comprend deux modes successifs de migration électrophorétique, une isotachophorèse (gel de concentration), puis une électrophorèse de zone monophasique (gel de séparation). Le passage de l'une à l'autre se fait avec un changement de pH et par une augmentation de concentration en acrylamide du gel. L'objectif du gel d'électrophorèse en deux parties est de pallier aux problèmes liés aux faibles quantités de protéines et aux volumes parfois non négligeables déposés dans les puits. On réalise donc une étape de concentration des échantillons jusqu'à l'obtention de zones protéiques très fines dans le gel de concentration (stacking gel), qui migreront dans le gel de séparation (resolving gel).

Le gel est mis à migrer en cuve d'électrophorèse dans un tampon de migration (Tris/Glycine x1 (à partir de tampon x10 : Tris 30,4g, Glycine 144g pour 1L pH 8,3), SDS 0,1%) à 100V pendant 1h30 pour un petit gel et jusqu'à 15 heures pour un grand gel (avec un grand gel de résolution).

- Transfert sur membrane PVDF

La méthode de transfert utilisée sera le transfert liquide. Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines sont séparées mais restent "emprisonnées" dans le gel de polyacrylamide. Les différentes protéines contenues dans le gel seront transférées sur un support immobilisant (membrane GE Healthcare Amersham PVDF Hybond^{TM}-P).

Le gel et la membrane de nitrocellulose sont manipulés avec des gants pour éviter toute contamination. Les réservoirs contenant les tampons électrophorétiques sont constitués de feuilles de papier filtre imbibées de solution tampon (tampon Tris/Gly x1, EtOH 20%). Les électrodes prennent en sandwich le gel et la membrane de nitrocellulose entourée de filtres afin d'éviter les espaces morts entre le gel et la membrane (figure 45). Le temps de transfert est d'environ 1 h, à 100V. On se base sur le marqueur de taille coloré présent initialement sur le gel pour observer l'état du transfert. Un bloc froid est ajouté à la cuve pour éviter au tampon de chauffer.

Le principe du transfert est le même que l'électrophorèse. Les protéines, après séparation, sont toujours entourées de SDS et donc sous l'influence d'un champ électrique, les protéines vont migrer de l'anode vers la cathode.

On peut, juste après le transfert, colorer le gel avec un colorant spécifique des protéines, comme le Page BlueTM Staining solution (Fermentas #R0571) qui contient du bleu de coomassie. Ce colorant se lie préférentiellement à l'arginine, mais aussi à la tyrosine, au tryptophane, à l'histidine, et à la phénylalanine. Cette opération de coloration va permettre de se rendre compte si l'électrophorèse et le transfert se sont bien passés.

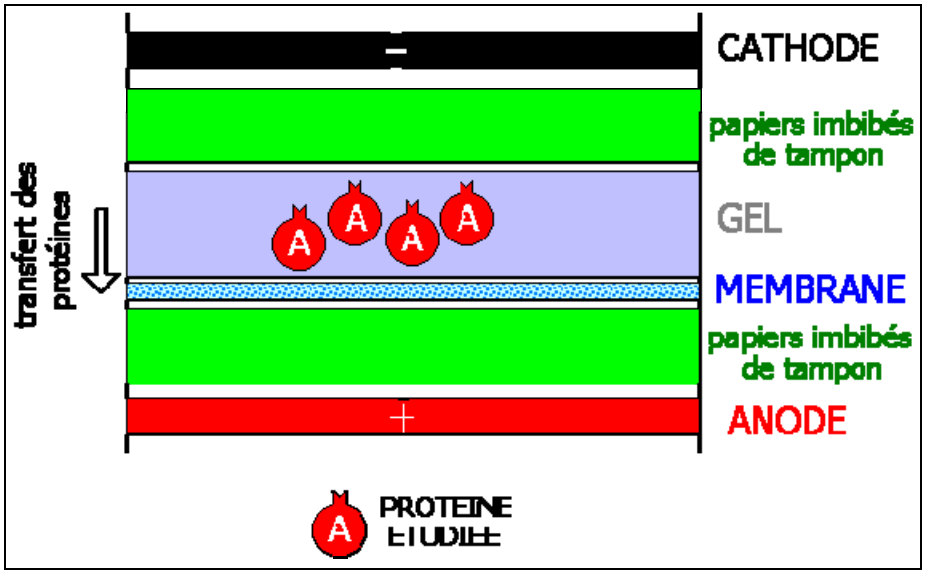


Figure 45 : Détail du montage du transfert

- La membrane est ensuite traitée à l'aide des anticorps spécifiques comme pour le dot blot.

5.6.3. Révélation des blots : détection des complexes antigènes/anticorps

L'anticorps secondaire anti-IgG de lapin est conjugué de manière covalente à la Phosphatase alcaline. Son activité enzymatique pourra être détectée par 2 méthodes différentes (faisant intervenir 2 substrats différents de l'enzyme) pour localiser les complexes antigène-anticorps.

5.6.3.1. Révélation par réaction colorimétrique (NBT/BCIP)

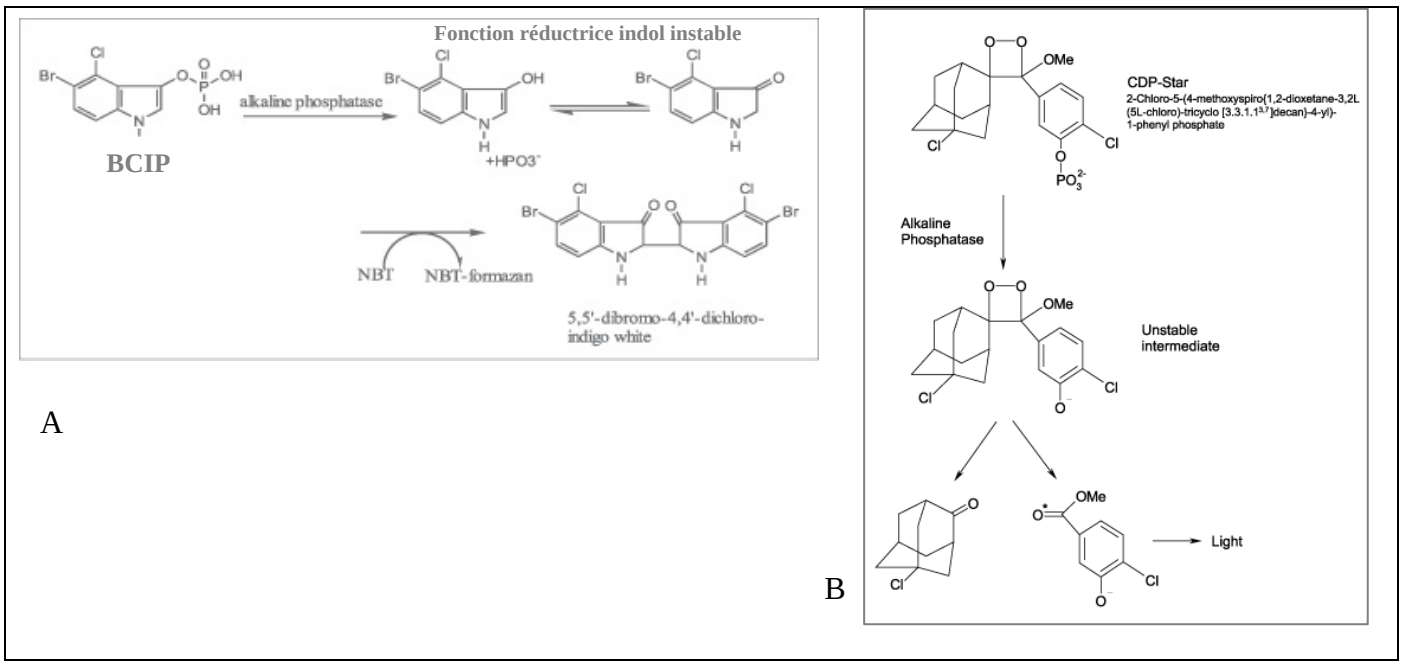
Le BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) est un substrat artificiel incolore de la phosphatase alcaline. En sa présence, l'enzyme déphosphoryle le BCIP et libère une intermédiaire instable. Deux de ces molécules vont alors se lier pour former le 5-5'-dibromo-4-4'-dichloro-indigo, produit insoluble et faiblement coloré, ceci en réduisant le NBT. Le 4-Nitroblue tetrazolium chloride réduit change alors de couleur et devient le bleu de formazan (Figure 46, A).

37,5µl de BCIP (à 100mg/ml, Roche) et 50µl de NBT (à 16,6mg/ml, Roche) sont mélangés dans 10ml de tampon de détection (Tris 0,1M NaCl 0,1M pH 9,6). Le mélange est versé à l'obscurité sur la membrane à révéler. La durée de la révélation est fonction de la quantité de protéine présente sur la membrane. Celle-ci est ensuite abondamment rincée à l'eau distillée.

5.6.3.2. Révélation par chimioluminescence

Le CDP-*star* (Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo (3.3.1.13,7) decan}-4-yl) phenyl phosphate est un substrat chimioluminescent de la phosphatase alcaline. Sa déphosphorylation par l'enzyme conduit à la formation d'un intermédiaire métastable, qui se décompose en émettant une lumière visible (Figure 46, B). Le substrat (25mM, Roche) est dilué au 1 : 100ème dans le tampon de détection, et 500µl de cette solution est déposé sur la membrane avant exposition à l'obscurité. L'émission luminescente va pouvoir être enregistrée sur des films ECL (GE Healthcare Amersham Hyperfilm^{TM} ECL). A la différence des techniques colorimétriques, différents temps d'incubation peuvent être

réalisés. La révélation se fait par développement classique du film photographique (révélateur/eau/fixateur/eau).



<u>Figure 46</u> : Réaction des substrats BCIP (A) et CDP-Star (B) avec l'enzyme Phosphatase Alcaline.

5.7. Etude de l'activité pH-dépendante des protéases par zymogramme

Afin de mettre en évidence l'activité protéasique des enzymes contenues dans les jus des urnes de Nepenthes, et de montrer qu'elle est pH dépendante, celles-ci sont mis à migrer sur zymogramme.

<u>Principe</u> :

La zymographie est une technique de séparation de protéines, basée sur SDS-PAGE ou PAGE, qui inclut un substrat copolymérisé avec le gel de polyacrylamide, pour la détection d'activité enzymatique (Lantz and Ciborowski, 1994). L'étude d'enzymes par SDS-PAGE a pour limite que certaines ne se renaturent pas après migration et leurs activités ne peuvent être détectées. Cependant, un avantage majeur est qu'il est possible d'estimer une masse moléculaire de l'enzyme. La séparation de protéines sur PAGE natif permet la détection d'une multiple d'activités enzymatiques, cependant, mais on ne peut pas estimer une masse moléculaire de l'enzyme (Lantz and Ciborowski, 1994). En effet, sans SDS, des protéines ayant des masses moléculaires similaires migreront différemment à cause de leur

différence de charge (due à des points isoélectriques différents). L'ajout de SDS résout ce problème, puisqu'en se liant à la protéine et en la dépliant, il lui donne une charge négative.

Dans notre étude, les zymogrammes ont été réalisés sur SDS-PAGE. Le gel de polyacrylamide à 10% additionné de 0,1% de gélatine ou de caséine est préparé (composition annexe 10). Les échantillons concentrés de protéines d'urnes (ouvertes ou fermées) sont additionnés de tampon de charge x2 non dénaturant sans β-mercaptoéthanol (62,5mM Tris HCl pH6,8, SDS 2% w/v, Sucrose 2% w/v, bleu de bromophénol 0,001%) (Hummel *et al.*, 1996 ; Visal-Shah *et al.*, 2001). Les échantillons ne sont pas chauffés préalablement au chargement sur le gel. Après migration, le gel est incubé à différents pH (2/3/4/5/6/7/8/9). Il est d'abord rincé 2 fois 15 min dans une solution de renaturation (Triton X-100 2,5%, dont le pH a été ajusté pour correspondre à chaque modalité) pour éliminer le SDS, puis il est activé toute la nuit dans un tampon au pH testé à 37°C. (T°C optimale des enzymes (Athauda *et al.*, 2004)). Les tampons utilisés pour 100 ml :

- Tampon pH2 : acide citrique 9,8mM, phosphate disodique 0,24 mM
- Tampon pH3 : acide citrique 8mM, phosphate disodique 4mM
- Tampon pH4 : acétate sodique 1,6mM, Acide acétique 8,3mM
- Tampon pH5 : acétate sodique 6,8mM, Acide acétique 3,2mM
- Tampon pH6 : acide citrique 3,7mM, phosphate disodique 12,5mM
- Tampon pH7 : acide citrique 1,9mM, phosphate disodique 16,2mM
- Tampon pH8 : Acide Borique demi neutralisé 12mM, HCl 4,5mM
- Tampon pH9 : Acide Borique demi neutralisé 16,7mM, HCl 1,6mM

Après incubation, le zymogramme est coloré au Page BlueTM Staining solution (Fermentas #R0571). Le fond du gel se colore en bleu (présence de gélatine ou de BSA) et par contraste, des plages blanches de lyse peuvent être observées en cas de dégradation du substrat par les enzymes des sécrétions des urnes de *Nepenthes.*

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

CHAPITRE 1 : Preuve de concept de la technologie PAT Friday®
Production de protéines recombinantes par des *Drosera rotundifolia* génétiquement transformées

Dans cette partie, seront exposés les résultats relatifs à la transformation génétique de *Drosera rotundifolia* et à l'analyse moléculaire et biochimique de ces plantes.

1. Transformation génétique de *Drosera rotundifolia*

La transformation génétique par *A. tumefaciens* est aujourd'hui une technique appliquée à un grand nombre de plantes. La contrainte majeure de cette approche est d'être capable de régénérer une plantule à partir d'une seule cellule. Cette régénération se fait par organogénèse directe sur feuilles chez *Drosera rotundifolia*.

La transformation de *D. rotundifolia in vitro* est menée selon la technique décrite par Hirsikorpi et ses collaborateurs (Hirsikorpi *et al.*, 2002), modifiée à différents niveaux pour notre stratégie (Figure 49, p 171).

Ces modifications ont été apportées au protocole original afin d'augmenter le nombre de régénérants. Ces conditions concernent plus précisément la régénération et la sélection des plantes.

1.1. Détermination des conditions de transformation génétique de *Drosera rotundifolia*

1.1.1. Conditions de régénération des plantules

Basé sur les travaux de Bobak et de ses collaborateurs, l'explant de départ choisi pour la régénération directe de *Drosera rotundifolia* est le limbe foliaire. Ces auteurs ont montré que les cellules épidermiques foliaires avaient le meilleur potentiel pour mener à la régénération spontanée de bourgeons (Bobak *et al.*, 1995). L'organogénèse directe sur feuille de *Drosera rotundifolia* peut être obtenue sans ajout d'hormones dans le milieu (Bobak *et al.*, 1995), mais l'apparition de bourgeons est plus rapide et le taux de régénération est augmenté sous l'influence d'une combinaison hormonale cytokinine/auxine. Pour compléter ces travaux, des tests de régénération ont cependant également été réalisés sur des racines. Mais la néoformation de bourgeons s'est révélée plus difficile et plus lente.

Hirsikorpi et ses collaborateurs utilisent un milieu de co-culture (milieu Hirsi) composé d'un milieu MS dilué deux fois supplémenté de saccharose (20g/L), de myoinositol (100 mg/L), de BAP (Benzylaminopurine) (0.1 mg/L), de NAA (Naphthalene Acetic Acid) (0.05 mg/L), et de phytagel (2g/L), à pH 5,8. Quant au milieu de régénération post co-culture, il est de même composition que le milieu de co-culture mais est supplémenté en céfotaxime (200mg/L) et en kanamycine (400mg/L).

En ce qui concerne la régénération, les travaux d'Hirsikorpi suggèrent (données non présentées) que la régénération à partir de feuilles serait accélérée et plus efficace sur un milieu MS non dilué supplémenté de saccharose (20g/L), de myoinositol (100 mg/L), de BAP (Benzylaminopurine) (0.45 mg/L), de NAA (Naphthalene Acetic Acid) (0.372 mg/L), et de l'agar (7g/L), à pH 5,8 (milieu FlB).

Dans le cadre de nos travaux, nous avons réalisé un test comparatif de ces deux milieux. Des tests de régénération ont été réalisés en plaçant 40 feuilles de *Drosera rotundifolia* sur chacun de ces 2 milieux (face inférieure en contact avec le milieu).

Après 2 mois de culture, le taux de multiplication obtenu est de 62,5% (25 bourgeons néoformées sur les 40 explants) sur le milieu Hirsi, et de 80% sur le milieu FlB (32 bourgeons néoformés sur les 40 explants).

Les résultats indiquent que le milieu FlB est plus favorable à la régénération que le milieu Hirsi. En outre, nous avons également constaté que le milieu FlB permettait un bourgeonnement plus rapide (1 mois et demi suffise à l'apparition d'une trentaine de bourgeons pour 40 explants). Ces expériences préliminaires nous ont convaincus d'utiliser ce milieu pour nos expérimentations ultérieures. Nous le choisirons pour le protocole de transformation génétique en tant que milieu de co-culture (FlB) et de régénération (milieu R1, milieu FlB supplémenté en céfotaxime et kanamycine, concentration déterminée dans les paragraphes suivants). D'autres modofications dans la composition du milieu ont été introduites : l'agar sera remplacé par le phytagel (3g/L), mieux adapté à la culture de la plante (comparaison faite sur le développement de plantes en micropropagation).

1.1.2. Conditions de sélection des plantules transformées

La distinction entre des cellules transformées et témoins nécessite la détermination de conditions de sélection. Le gène *nptII* présent sur l'ADN-T des différents plasmides utilisés pour la transformation génétique est transféré dans le génome de la cellule végétale et lui

confère la résistance à la kanamycine. Afin de sélectionner les cellules ayant intégrée l'ADN-T, la dose de kanamycine à ajouter au milieu de culture est à déterminer. Les plantes présentent souvent une résistance intrinsèque à l'antibiotique en dessous de laquelle les cellules non transformées résistent. Il faut donc trouver une dose de kanamycine qui sera toxique pour les cellules non transformées, mais qui permettra une régénération efficace des plantes transformées.

La résistance intrinsèque de *Drosera rotundifolia* à la kanamycine a été testée en cultivant des jeunes plantules sauvages sur un milieu MS(dro) (milieu de micropropagation, Matériels et Méthodes partie 1.2.2.), supplémenté des différentes concentrations de kanamycine à tester : 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mg/L. 5 plantules sauvages par concentration de kanamycine ont été cultivées pendant 8 semaines.

Les différentes observations (survie de la plante, et couleurs des nouvelles feuilles le cas échéant) ont permis d'établir une concentration optimale de sélection des plantes, pour induire la nécrose des plantes non transformées et pour ne laisser pousser que les plantes génétiquement transformées.

Les concentrations de kanamycine comprises entre 0 et 250 permettent une croissance normale : les plantes sont vertes et d'apparence vigoureuse (pour 100% des plantules initiales, figure 47, A). Après 8 semaines, les plantes sauvages cultivées sur un milieu contenant 300 mg/L de kanamycine sont vivantes (Figure 47, B), elles présentent des feuilles vertes mais également des feuilles nécrosées de couleur marron. Par contre, les concentrations 350, 400, 450, et 500 mg/L sont létales et toutes les plantes sont de couleur marron (Figure 47, C).


A


B


C

<u>Figure 47</u> : Culture de *Drosera rotundifolia* sauvages sur un milieu enrichi en différentes doses de kanamycine. A : plante cultivée sur un milieu supplémenté de 250 mg/L de kanamycine. **B** : plantes cultivées sur un milieu additionné de 300 mg/L de kanamycine. **C** : plante cultivée sur un milieu additionné de 400 mg/L de kanamycine.

La concentration de 350 mg/L de kanamycine est donc choisie pour sélectionner les *Drosera rotundifolia* transformées.

Cette concentration est relativement élevée par rapport à celle requise pour la sélection de certaines plantes transformées. En effet, 25 mg/L de kanamycine suffisent à sélectionner les *Gerbera hybrida* transgéniques (Elomaa *et al.*, 1993), 40mg/L pour *Eucalyptus camaldulensis* transformés (Ho *et al.*, 1998), ou encore 75mg/L pour *Ruta graveolens* transformés (Lièvre *et al.*, 2005).

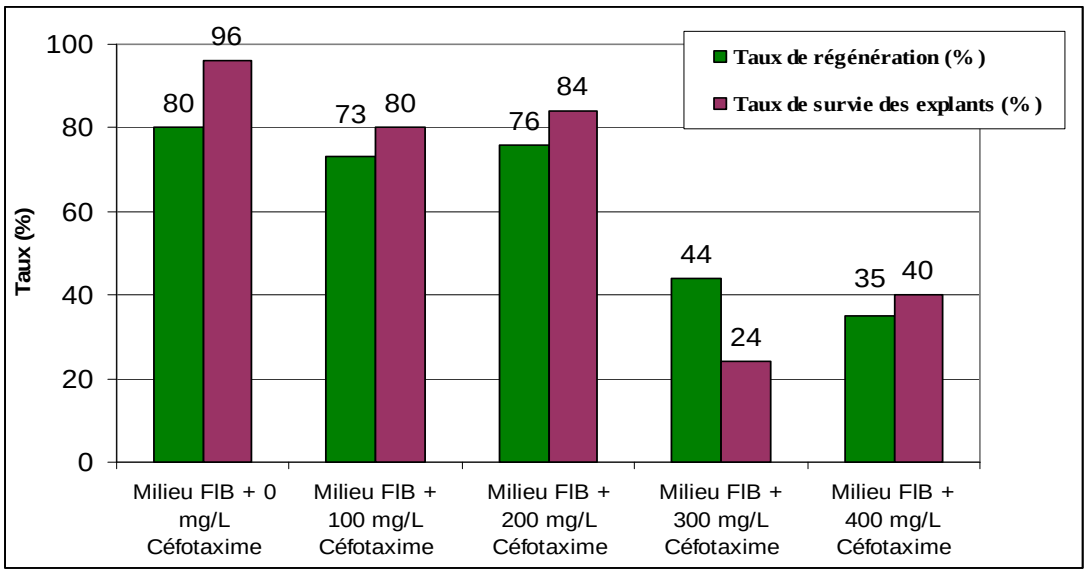
On en déduit donc que *Drosera rotundifolia* a une résistance intrinsèque très élevée à la kanamycine. Hirsokorpi et ses collaborateurs utilisent dans leur protocole une dose de sélection de 400mg/L de kanamycine. Notre souche de *Drosera rotundifolia* présente *a priori* une résistance intrinsèque légèrement inférieure. Ceci peut expliquer le très faible taux de régénérants obtenu en suivant les conditions de régénération de l'équipe d'Hirsikorpi.

1.1.3. Utilisation du céfotaxime pour l'élimination des agrobactéries suite à la co-colture

1.1.3.1. Résistance intrinsèque des explants au céfotaxime

Dans le cadre d'une transformation génétique *via Agrobacterium tumefaciens*, la bactérie doit être éliminée rapidement après la co-culture et le transfert de gènes. En effet, sa prolifération excessive peut entraîner la mort des explants transformés. Le céfotaxime est un antibiotique bactéricide de synthèse de la classe des céphalosporines de troisième génération, appartenant à la famille des bêta-lactamines. Son large spectre lui confère une activité bactéricide sur les bactéries à gram positif et à gram négatif. Cette molécule peut aussi inhiber la croissance végétale, c'est pourquoi il est nécessaire de déterminer la sensibilité de *Drosera rotundifolia* à cet agent. Afin de déterminer la dose pour laquelle la régénération est possible, nous avons réalisé l'expérience suivante.

Des limbes foliaires blessés (conditions identiques à une transformation génétique) ont été cultivés pendant 8 semaines sur le milieu FlB enrichi en différentes doses de céfotaxime : 0, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L (40 feuilles /modalité). Les résultats concernant la survie des explants et la régénération sont présentés sur la figure 48.



<u>Figure 48</u> : Taux de survie des explants et taux de régénération obtenu sur des feuilles de *Drosera rotundifolia* cultivées sur un milieu FlB enrichi en différentes concentrations de céfotaxime : 0, 100, 200, 300, 400 mg/L (calculés par rapport au nombre d'explants mis en culture).

Pour les concentrations 100 et 200 mg/L, on obtient un taux de régénération très proche de celui du témoin, alors que le taux de survie est légèrement plus faible. Par contre, pour des doses d'antibiotique supérieures, on observe une décroissance concomitante entre le taux de survie des explants et la régénération alors que la concentration en céfotaxime augmente. Après 2 mois de culture sur le milieu supplémenté de 300 mg/l de céfotaxime, un explant sur quatre est mort. La régénération en est logiquement affectée. A des doses supérieures à 200 mg/L, l'antibiotique semble avoir un effet néfaste sur les cellules végétales, diminuant ainsi le pourcentage de cellules pouvant potentiellement régénérer des tiges feuillées.

La dose de céfotaxime pouvant être employée pour la suite des expériences ne devra donc pas dépasser les 200 mg/L.

1.1.4. Conditions d'élimination des agrobactéries

Afin d'éliminer les agrobactéries après la période de co-culture, il faut déterminer la concentration en céfotaxime qui permettra de les supprimer. Les agrobactéries de la souche C58C1Rif^{R} (pGV2260, pTDE4) ont été mises en culture sur un milieu YEB additionné de différentes doses de céfotaxime : 0, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L (3 boîtes de pétri mises en culture par modalité). Elles ont ensuite été incubées pendant une semaine à 28°C.

Les bactéries ont formé un tapis bactérien sur le milieu YEB pour les concentrations 0 et 100 mg/L de céfotaxime. Pour les concentrations supérieures ou égales à 200 mg/L, les agrobactéries ne se sont pas multipliées.

200 mg/L de céfotaxime ajouté au milieu de culture suffisent à éliminer les agrobactéries de la souche C58C1Rif^{R}.

Le recoupement des 2 expérimentations précédentes nous ont permis de déterminer une concentration optimale de céfotaxime permettant la régénération des plantes, et l'élimination des agrobactéries :

La concentration de 200 mg/L sera retenue pour les bains de rinçage des explants suite à la co-culture et pour les milieux de régénération des bourgeons (R1).

1.2. Protocole de transformation génétique

L'établissement du protocole de transformation génétique de *Drosera rotundifolia* nécessite différentes étapes méthodologiques. Il faut tout d'abord inoculer les explants avec les agrobactéries pour permettre le transfert génétique durant la co-culture.

Ensuite, il faut éliminer les bactéries sans altérer le développement des cellules transformées. Celles-ci doivent pouvoir se multiplier et donner naissance à des tiges feuillées, qui vont ensuite s'enraciner.

Les résultats préliminaires précédents nous ont permis de mettre au point ces différentes étapes. Elles sont décrites dans cette partie et sont illustrées par la figure 49.

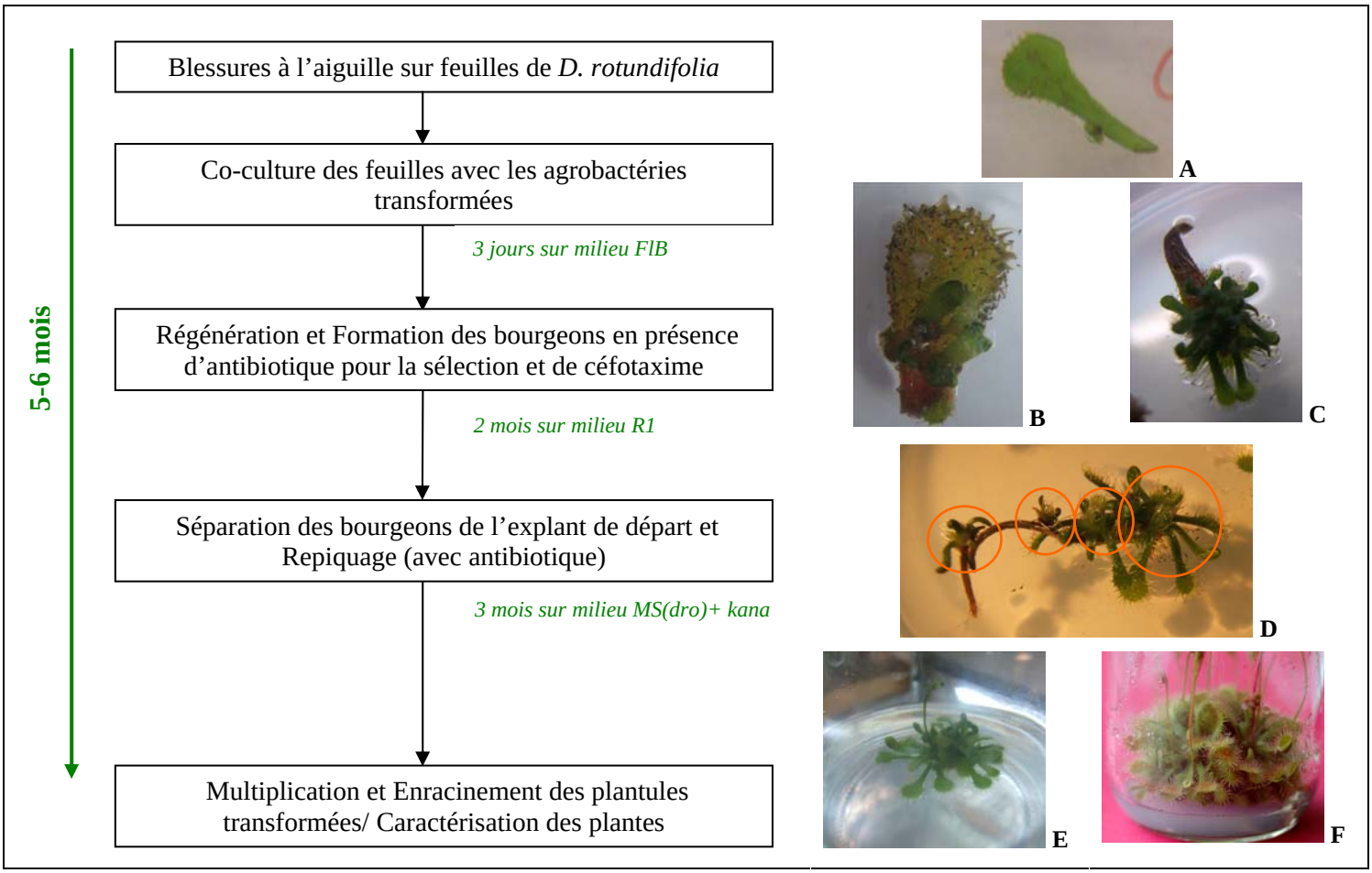


Figure 49 : **Principe de la transformation génétique de *D. rotundifolia via Agrobacterium tumefaciens* selon la technique de Hirsikorpi et de ses collaborateurs (2002) modifiée. A** : Feuilles blessées à l'aide d'une aiguille stérile. **B** et **C** : néoformation de bourgeons transformés sur le limbe de feuilles blessées sur milieu FlB après 1 mois et 2 mois de culture. **D** : Bourgeons transformés se développant sur le limbe, assez développés pour être séparés de la feuille. **E** : Bourgeons transformés isolés et repiqués sur milieu de sélection, phase d'enracinement. **F** : Plante transformée adulte cultivée sur milieu de sélection R1.

1.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Les agrobactéries C58C1Rif^R (pGV2260, pBin-*X*) ou C58C1Rif^R (pGV2260, pTDE4) sont cultivées 3 jours à 28°C sur du milieu YEB solide (annexe 2) supplémenté des antibiotiques adéquats (tableau 5, p 130). Pour la transformation, une colonie est prélevée et est mise en culture dans 30 mL de milieu liquide YEB (additionnés des mêmes antibiotiques). Elle est cultivée à 28°C pendant 36 heures sous une agitation à 200 tours par minute. L'acétosyringone (permettant l'activation des gènes de virulence de l'agrobactérie) est alors ajouté au milieu (concentration finale 0,1mM) et ce dernier est remis en culture pendant 4 heures. Quand l'absorbance de la suspension bactérienne à 550 nm est comprise entre 0,8 et 1, les agrobactéries sont centrifugées à 1500g pendant 10 minutes puis le culot est remis en suspension dans 30 mL de milieu liquide YEB (sans antibiotiques). Les bactéries sont ensuite

lavées trois fois avec 30ml de milieu YEB, avant d'être utilisées pour transformer les explants végétaux.

1.2.2. Préparation des explants et inoculation avec les agrobactéries

Environ 80 grandes feuilles (> 1 cm de longueur du pétiole à l'extrémité du limbe si possible) de *D. rotundifolia* sont prélevées à l'aide d'un scalpel en conditions stériles, puis blessées par des piqûres d'aiguille (Figure 49, A) dans une grande boîte de pétri en verre préalablement autoclavées. Les explants obtenus sont régulièrement transférés dans des boîtes de pétri fermées afin d'éviter le desséchement. En effet, une grande attention doit être également accordée à la température à laquelle se déroule cette étape (proximité de la flamme) : un stress hydrique important peut causer le desséchement des explants, et avoir des répercutions néfastes sur la suite de l'expérimentation. Dans l'idéal, un lot d'explants doit être découpé et blessé en 10 minutes environ. Les feuilles sont ensuite immergées pendant 10 minutes dans 2 x 30 ml de solution YEB contenant les agrobactéries (voir Matériel et Méthodes, partie 4.2.4. préparation de l'inoculum, p 147) et le mélange est agité par intermittence.

1.2.3. Co-culture

Après séchage sur du papier absorbant stérile, les feuilles sont placées sur un milieu de co-culture FlB solide durant 3 jours à raison de 3 explants par boite de pétri (boites de 5cm de diamètre fermées par du film alimentaire). La co-culture est réalisée en chambre de culture dans les conditions suivantes : 23°C/20°C (jour/nuit), 40% d'humidité relative, 160 $\mu mol.m^2.s^{-1}$ d'intensité lumineuse avec une photopériode de 16 H. La température est une condition à bien contrôler : si elle est trop élevée durant cette étape (> 28°C), les bactéries perdent leur virulence, et il n'y a pas de transfert d'informations génétiques dans les cellules végétales (Fullner and Nester, 1996).

L'acétosyringone est connue pour activer les gènes de virulence d'*Agrobacterium tumefaciens*, ce qui permet de déclencher les différentes étapes menant au transfert de l'ADN-T vers les cellules végétales. Dans le cas des *Drosera rotundifolia*, l'ajout d'acétosyringone dans le milieu de co-culture n'augmente pas significativement l'efficacité de la transformation (Hirsikorpi *et al.*, 2002). Ce paramètre n'a pas été réétudié.

1.2.4. Elimination des agrobactéries

Après la co-culture, les explants foliaires sont prélevés des boîtes de pétri et sont immergés pendant 15 min dans de l'eau distillée stérile ou dans un milieu MS stérile dilué 2 fois supplémenté de 200 mg/L de céfotaxime (conditions déterminées en 1.1.4 de ce chapitre). Cette étape permet d'éliminer une grande partie les bactéries de surface. Les feuilles sont ensuite séchées sur du papier filtre stérile.

1.2.5. Régénération et sélection des transformants

Les feuilles sont ensuite transférées sur un milieu solide contenant du céfotaxime (200 mg/L) et de la kanamycine (350 mg/L), l'antibiotique de sélection des plantes transformées (milieu R1) à raison de 3 feuilles par boîte de pétri. Ces dernières sont scellées à l'aide de film alimentaire et sont mises en culture en phytotron dans les mêmes conditions que pour la co-culture. Seules les cellules transformées survivent en présence de la kanamycine. Les premiers bourgeons (Figure 49, B) apparaissent au niveau des blessures des feuilles et sont observés après environ un mois de culture (Figure 49, C ; temps légèrement plus long que dans 1.1. dû à la présence de kanamycine).

1.2.6. Repiquage des bourgeons transformés et enracinement

Lorsque leur taille est suffisante (au moins 5 mm de diamètre) (Figure 49, D), les bourgeons sont séparés des explants et transférés en boîte de pétri sur un milieu MS(dro) (Matériels et Méthodes partie 1.2.2., p 128) supplémenté de 350 mg /L de kanamycine (le céfotaxime et les hormones végétales ne sont plus nécessaires) pour garder une forte pression de sélection. Afin d'avoir une traçabilité des plantules supposées transformées, chacune d'entre elle est annotée de la façon suivante :

Nom de la série de transformation (ex : GUS2) / lettre pour l'événement de transformation (ex : A) / numéro du clone suite à la micropropagation de l'événement A (ex : 4) ➔ exemple : plante GUS2A4.

Les bourgeons ayant résisté à la pression de sélection sont mis en culture en pot stérile de 100ml (Figure 49, E) contenant du milieu MS(dro) enrichi en kanamycine et est repiqué

tous les mois. En effet, la kanamycine se dégrade au cours du temps, et ceci pourrait permettre le développement de cellules non transformées. L'enracinement de la plante se fait dans ce même milieu. Après environ trois mois de culture, la plante a atteint sa taille adulte et des gouttelettes de glu sont visibles aux extrémités des poils glanduleux (Figure 49, F).

2. Etude des plantes génétiquement transformées avec les gènes marqueurs codant pour les protéines GFP et GUS

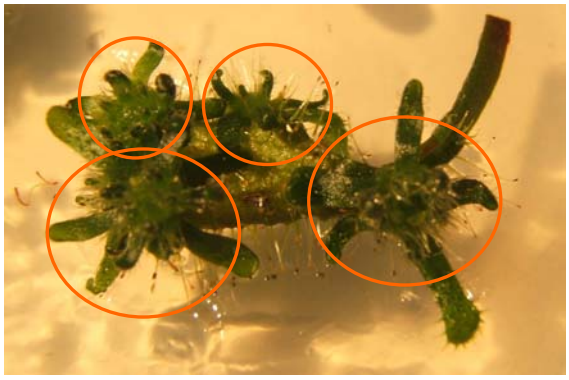
2.1. Obtention des transformants GFP et GUS

2.1.1. Obtention des régénérants

5 séries de transformation génétique ont été réalisées pour chacun des gènes *uidA* et *m-gfp-5ER*. Pour chaque série, environ 70 à 80 grandes feuilles de *Drosera rotundifolia* ont été blessées et mises en co-culture.

2 à 3 mois plus tard, des bourgeons sont apparus sur les limbes foliaires et sont généralement bien séparés les uns des autres : un bourgeon correspond donc pour un événement de transformation (Figure 50, A). Parfois, plusieurs bourgeons se développent côte à côte (Figure 50, B) et il est difficile de savoir si chacun des bourgeons provient d'événement de transformation différent, ou s'ils sont issus de la multiplication du premier bourgeon apparu à cet endroit (influence de la balance hormonale NAA/BAP) : dans ce cas, un seul des bourgeons est prélevé et compte pour un événement de transformation.

Le nombre d'événements différents obtenu s'est élevé à 54 pour la transformation génétique avec le gène *uidA* et à 44 avec le gène *m-gfp-5ER*. En rapportant cette valeur aux nombres d'explants mis en culture au début de chaque série de transformation génétique, le taux d'événements de transformation (taux de régénération) obtenu s'élève à 15,3% pour le gène *uidA* et à 11% pour le gène *m-gfp-5ER*.



A

➔ 4 bourgeons séparés
= 4 évènements de transformation



B

➔ 3 bourgeons accolés
= 1 seul prélevé = un événement de transformation

<u>Figure 50</u> : Détermination des événements de transformation genetique en fonction de la localisation des bourgeons néoformés. **A :** les bourgeons sont séparés les uns des autres, chaque bourgeon est issu d'événement de transformation différent. **B :** les bourgeons sont proches les uns des autres, ils pourraient être issus du même événement : un seul est prélevé.

2.1.2. Vérification de l'absence de contamination des plantes par les agrobactéries

Avant d'utiliser le matériel végétal pour les analyses moléculaires et histochimiques relatives à la présence et à l'expression du gène rapporteur *uidA* ou *m-gfp-5ER*, l'absence sur les plantes d'agrobactéries C58C1Rif^{R} (pGV2260, pTDE4) ou C58C1Rif^{R} (pGV2260, pBin *m-gfp-5ER*) utilisées lors de la transformation génétique a été contrôlée. En effet, leur présence peut fausser les résultats. La souche bactérienne C58C1Rif^{R} (pGV2260, pTDE4) peut dégrader le substrat X-gluc, induisant l'apparition du précipité bleu caractéristique de l'activité β-glucuronidase ; et la souche C58C1Rif^{R} (pGV2260, pBin *m-gfp-5ER*) peut exprimer la protéine GFP. Pour la caractérisation biomoléculaire des plantes, la contamination par des agrobactéries transformées peut causer un risque de faux positifs pour les amplifications des fragments gènes recherchés par PCR.

Bien qu'un contrôle visuel des cultures de plantes supposées transgéniques n'indique aucune contamination, une vérification plus approfondie a été entreprise. 10 feuilles de 5 plantes supposées transformées avec le gène *uidA* et 10 feuilles de 5 plantes supposées transformées avec le gène *m-gfp-5ER* ont servi à inoculer 10 x 3 ml de milieu de culture YEB (un tube par plante testée). Deux témoins positifs ont été réalisés en inoculant le milieu YEB avec une colonie d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^{R}(pGV2260, pTDE4) et avec une colonie de la souche C58C1Rif^{R} (pGV2260, pBin *m-gfp-5ER*). Les tubes de culture contenant le milieu de culture et le matériel végétal ont été mis en culture sous agitation à 28°C pendant

une nuit. 3 dépôts de 500 µl de chacun de ces inoculum a été effectué sur 3 boites de pétri différentes contenant le milieu de culture solide spécifique à chacune des souches (voir Matériels et Méthodes, tableau 5, p 130). Les boîtes de Pétri ont ensuite été mises en culture à 28°C pendant 1 semaine.

Les témoins positifs ont montré un développement des agrobactéries et aucune des plantes testées n'a révélé de contamination. La fiabilité des tests de caractérisation moléculaire et histochimique des plantes transgéniques s'en trouve renforcée.

2.2. Caractérisation biochimique des plantes

2.2.1. Observations de plantes *Drosera rotundifolia* transformées avec le gène codant pour la GFP

Sur les 44 événements de transformation génétique obtenus pour la transformation génétique de *Drosera rotundifolia* avec le gène *m-gfp-5ER*, 14 plantes issues d'événements différents ont été étudiées et observées sous miscroscope à épifluorescence.

2.2.1.1. Observations de feuilles au microscope à fluorescence

Des limbes de feuilles de plantes carnivores témoins et transformés GFP ont été observés au microscope à fluorescence. Certaines feuilles transformées GFP montrent des plages fluorescentes marquées (Figure 51, B et C), alors que les feuilles des plantes témoins n'en présentent pas (Figure 51, A) :

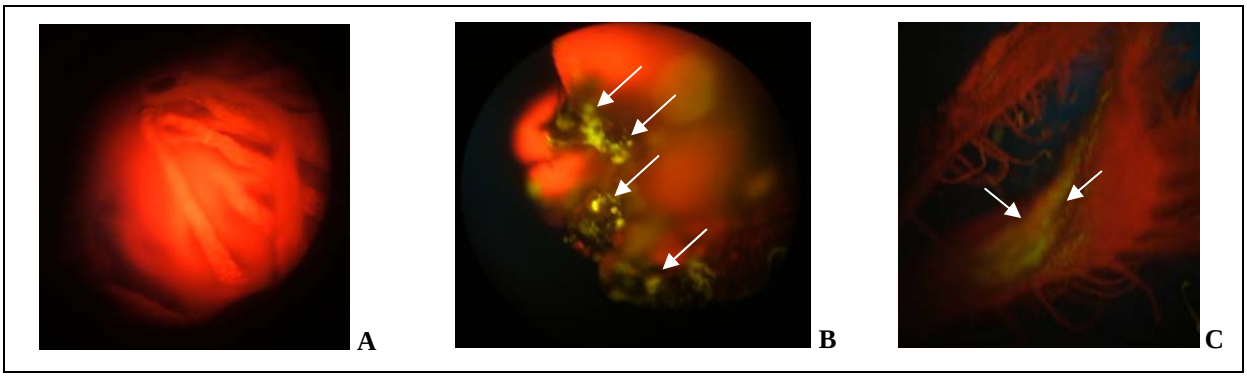


Figure 51 : **Observations de limbe de feuille au microscope à fluorescence. A** : limbe de plante témoin sauvage (x400). **B** et **C** : limbe de plantes transformées avec le gène *m-GFP-5ER* (x400 et x25).

Ces observations au microscope montrent que les plantes sont transformées, et expriment la protéine dans les cellules du limbe foliaire.

2.2.1.2. Observations de poils glanduleux et de mucilage au microscope à fluorescence

La recherche de fluorescence a ensuite été axée sur l'observation de poils pédicellés présents sur les feuilles comportant des glandes sécrétrices d'enzymes digestives d'insectes, et sur l'observation de gouttelettes de glu ou mucilage produites par ces glandes.

Sur les plantes témoins sauvages, les poils observés ne présentent pas de fluorescence (Figure 52, A). Par contre sur les plantes transformées, on distingue bien la fluorescence à l'extrémité des poils, preuve que la protéine y est présente (Figure 52, B et C). Les gouttelettes de glu à l'extrémité du poil ne sont pas visibles. En effet, sous la chaleur du faisceau UV, elles s'évaporent très rapidement.

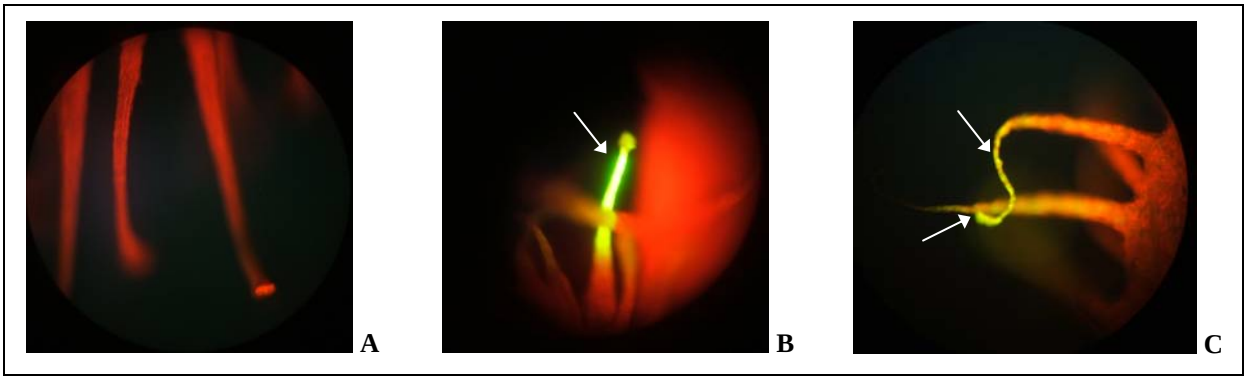


Figure 52 : **Observations de poils de feuille de *Drosera rotundifolia* sauvage ou transformée avec le gène *m-gfp-5ER* au microscope à fluorescence (x400).** A : poils de plante témoin sauvage. B et C : poils de plantes transformées avec le gène *m-gfp-5ER*.

Pour observer ces gouttelettes de glu de plantes sauvages et transformées, il a donc fallu les absorber au préalable sur des supports papiers transparents stérilisés (papiers à cigarette). Ce support souple permet, lors des prélèvements, de ne pas abimer les tissus et limite le risque de prélever de la GFP provenant de cellules éventuellement blessées du limbe. Ces papiers ont ensuite été observés sous microscope à fluorescence. Des spots fluorescents (Figure 53, B) ont pu être observés sur le papier ayant absorbé la glu de plante transformées avec le gène *m-gfp-5ER*. Le papier témoin ayant absorbé la glu de plante sauvage n'en présente aucun (Figure 53, A).



Figure 53 : Observations au microscope à fluorescence de papiers ayant absorbés des gouttelettes de glu de *Drosera rotundifolia* sauvage ou transformée avec le gène *m-gfp-5ER* (x40). A : glu de plante sauvage. **B** : glu de plante transformée avec le gène *m-gfp-5ER,* les flèches blanches montrent les spots fluorescents.

Cette observation montre que la Green Fluorescent Protein est exprimée dans les gouttelettes de mucilage des feuilles de plantes transformées avec le gène *m-gfp-5ER* et est fonctionnelle (même après absorption).

Ces observations ont été reproduites sur 14 plantes issues d'événements de transformation différents. Sur les 14 plantes transformées testées, 10 ont présenté des plages fluorescentes au niveau du limbe foliaire, et ont présenté des poils glanduleux fluorescents. Seules 4 plantes issues de transformation génétique avec le gène *m-gfp-5ER* et résistantes à la kanamycine ne semblent pas exprimer la protéine recherchée dans la plante. Les gouttelettes de *Drosera rotundifolia* sont difficilement observables sous microscope UV et la faible production de mucilage par les plantes en conditions *in vitro* n'a pas toujours suffi pour effectuer le prélèvement sur papier absorbant. Seule la glu de deux plantes a pu être prélevée et testée. Une seule des deux observations a permis de mettre en évidence des spots fluorescents sur le papier sous UV (Figure 53, B). L'observation difficile de la GFP dans la glu peut s'expliquer par la forte température à laquelle est soumise le papier absorbant (et la protéine) sous le faisceau UV, pouvant altérer rapidement la protéine, la rendre non fonctionnelle et non visible.

Ces résultats indiquent donc, que dans 71,4% des cas, les plantes supposées transformées avec le gène *m-gfp-5ER* expriment la protéine rapporteur. En rapportant cette valeur au nombre d'explants mis en culture pour obtenir ces plantes transformées, le taux de plantes supposées transformées exprimant le gène rapporteur *m-gfp-5ER* est de 7,8%.

2.2.2. Observations de plantes *Drosera rotundifolia* transformées avec le gène codant pour la protéine GUS

Sur les 54 événements de transformation génétique obtenus pour la transformation génétique de *Drosera rotundifolia* avec le gène *uidA*, 22 plantes issues d'événements différents ont été étudiées et caractérisées par le test révélateur de l'activité GUS.

2.2.2.1. Observations de feuilles après incubation avec le substrat X-Gluc

Afin de vérifier la présence de l'enzyme recombinante dans les tissus végétaux, des feuilles de plantes transformées ou sauvages ont été infiltrées par le substrat de la β-glucuronidase, le X-gluc. Après 12h de réaction et après élimination de la chlorophylle dans un bain d'éthanol à 95%, les limbes ont pu être observés.

Les feuilles supposées « GUS positives » présentent des plages bleues marquées (Figure 54, B) par rapport aux feuilles témoins (Figure 54, A). La coloration bleue correspond au substrat métabolisé et reflète la présence d'enzyme fonctionnelle. La coloration non homogène des feuilles présentées sur la figure 54 (B et C) pourrait être liée à un problème de pénétration du substrat dans les tissus. En effet, les feuilles sont épaisses et charnues et le substrat peut avoir du mal à s'infiltrer dans toutes les cellules. A noter que les feuilles témoins issues de plantes non transformées présentent des colorations bleues artéfactuelles au niveau des sections faites lors de la séparation feuille/plante. Les limbes, par contre, ne présentent pas de coloration (Figure 54, A).

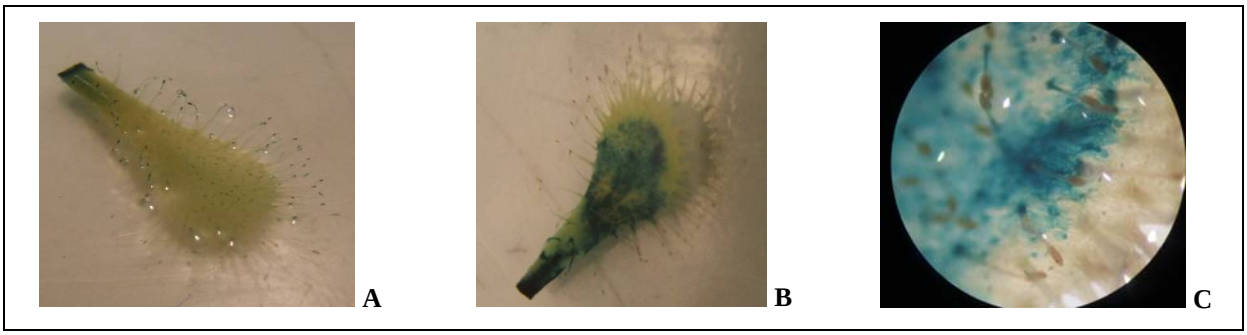


Figure 54 : Observations de limbes de feuille de plantes sauvage et transformées avec le gène *uidA* après révélation de l'activité GUS et élimination de la chlorophylle. A : Feuille de plante sauvage. **B** : Feuille de plante transformée avec le gène *uidA* (plante GUS2.2A1). **C** : Observation à la loupe binoculaire (x50) du limbe de feuille de plante transformée avec le gène *uidA* (même feuille qu'en B).

2.2.2.2. Observations, à la loupe binoculaire, de feuilles et de poils de feuilles de *Drosera rotundifolia* après incubation avec le substrat X-Gluc

Après l'infiltration du substrat X-Gluc, les feuilles de plantes témoins non transformées et de plantes transgéniques ont été observées à la loupe binoculaire afin de localiser exactement la coloration bleue.

Les feuilles de plantes transformées (Figure 55, B) présentent une coloration sur la partie inférieure du poil uniquement (Figure 55, B). L'extrémité du poil, lieu de formation de la glu, n'est pas colorée. Les poils des feuilles des plantes témoins ne présentent aucune coloration (Figure 55, A).

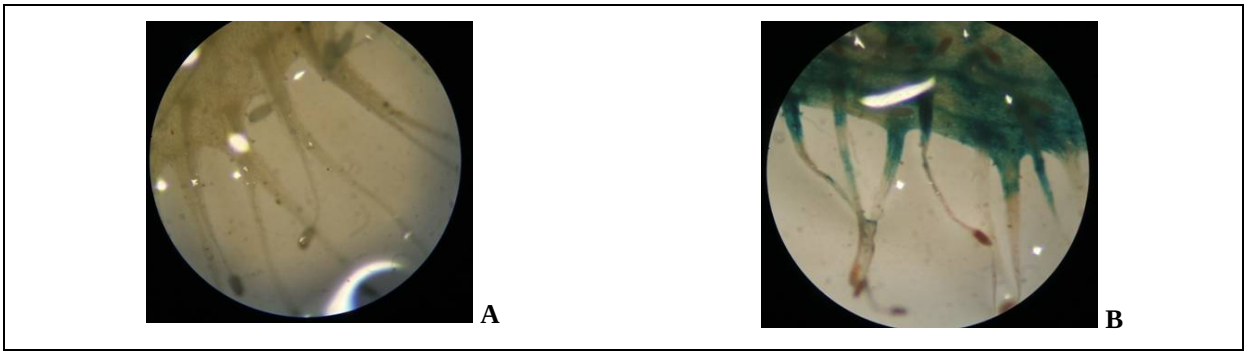


Figure 55 : Observations à la loupe binoculaire de poils de feuille de plantes sauvage et transformée avec le gène *uidA* après révélation de l'activité GUS et élimination de la chlorophylle (x 50). A : de plante sauvage. **B** : de plante transformée avec le gène *uidA* (plante GUS2.2A1).

2.2.2.3. Observations de gouttelettes de glu sur papier Whatman après réaction avec le substrat X-Gluc

Comme pour la caractérisation de la GFP, la glu de plantes transformées avec le gène *uidA* et de plantes sauvages a été absorbée sur du papier Whatman™ préalablement stérilisé. Après coloration en présence du substrat X-gluc, le papier portant des gouttelettes de glu de feuille GUS (Figure 56, A et B) présente une coloration bleue colocalisée avec les dépôts. Le papier portant des gouttelettes de glu de feuilles témoins (Figure 56, C) ne présente aucune coloration.

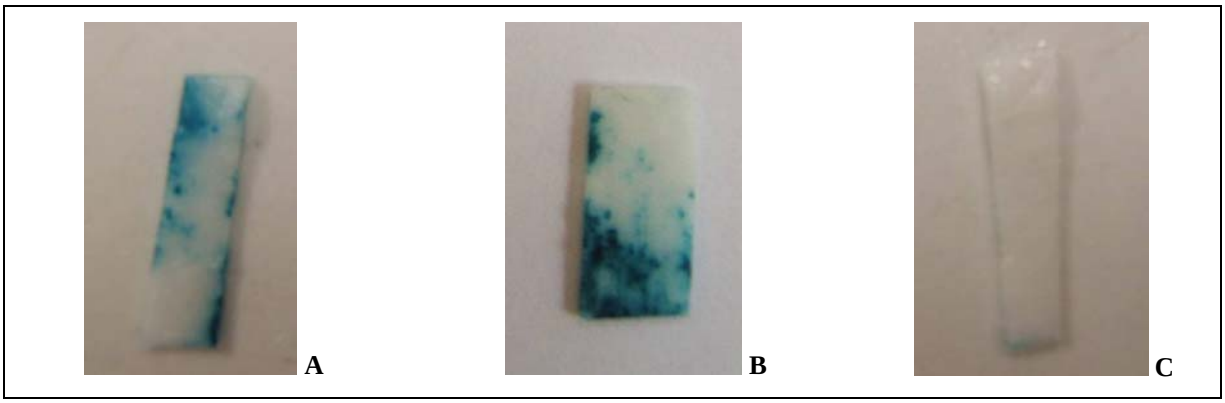


Figure 56 : **Papiers ayant absorbé de la glu de feuilles de *Drosera rotundifolia* transformée avec le gène *uidA* et sauvage après révélation de l'activité GUS. A, B** : Glu de plantes transformées GUS2.2A1 et GUS2.2O23 avec le gène *uidA.* **C** : glu de plante sauvage.

Ces résultats montrent que la β-glucuronidase est exprimée dans la glu des *Drosera rotundifolia* transformées avec le gène *uidA* et que la protéine est fonctionnelle.

Ces expériences ont été reproduites sur 22 plantes issues d'événements de transformation différents. Sur les 22 plantes transformées testées, 17 ont présenté des plages bleues au niveau du limbe foliaire, et 14 ont présenté des gouttelettes contenant la β-glucuronidase. Seules 3 plantes issues de transformation génétique avec le gène *uidA* et résistantes à la kanamycine ne semblent pas exprimer la protéine recherchée dans les gouttelettes. Ces résultats indiquent donc, que dans 77,3% des cas, les plantes résistantes à la kanamycine supposées transformées avec le gène *uidA* expriment l'enzyme β-glucuronidase et que celle-ci est présente dans les gouttelettes de mucilage des pièges dans 63,6% des cas. En rapportant ces valeurs au nombre d'explants mis en culture pour obtenir ces plantes transformées, le taux de supposés transformants exprimant le gène rapporteur est de 11,8%, et le taux de supposés transformants exprimant la protéine GUS dans les gouttelettes de glu est de 9,7%.

2.3. Caractérisation moléculaire des plantes

La caractérisation moléculaire des transformants consiste à vérifier la présence du transgène au sein de l'ADN génomique des différentes plantes potentiellement transformées. Ces plantes résistantes sont capables de se développer sur un milieu nutritif contenant de la kanamycine. La résistance à cet antibiotique est conférée par la présence de la néomycine phosphotransférase exprimée par le gène *nptII* situé lui aussi sur l'ADN-T.

Les plantes transformées possèdent au moins une copie du gène *uidA* ou *m-gfp5-ER* codant pour les protéines GUS ou GFP, sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du CaMV. Cette insertion est concomitante à celle du gène *nptII* se trouvant également sur l'ADN-T. En effet, comme cela a été expliqué dans le chapitre Matériels et Méthodes, l'ADN-T des plasmides pTDE4 ou pBin *m-gfp5-ER* contient le gène d'intérêt et le gène conférant la résistance à la kanamycine. Les plantes sont transformées pour les 2 gènes. Ainsi, la présence dans le génome de la plante du gène *nptII* suggère la présence dans le génome de la plante du gène *uidA*, démontrant ainsi la transformation de la plante.

Le fait que toutes les *Drosera rotundifolia* se soient parfaitement bien développées en culture *in vitro* sur milieu sélectif enrichi en kanamycine est un bon indicateur de leur état de transformation. Toutefois, l'acquisition de cette résistance à l'antibiotique ne permet pas d'attester de l'état transformé. En effet, par échappement, certains individus ont la capacité de résister naturellement à la concentration de kanamycine présente dans le milieu sélectif, d'où la nécessité de vérifier la présence de ce gène dans le génome de la plante.

Pour la caractérisation moléculaire de ces plantes supposées transformées avec les gènes *uidA* et *m-gfp-5ER*, le protocole d'extraction d'ADN décrit dans la partie Matériels et Méthodes n'avait pas encore été mis au point. L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit DNeasy plant minikit de Qiagen, utilisé comme indiqué par le fournisseur (annexe X). L'ADN est élué dans un volume de deux fois 50 µL de Tris HCl pH 8 (1 mM).

Seule la présence du gène *nptII* a été montrée par amplification par PCR d'un fragment de ce gène (en utilisant les amorces *NptII*DIR 5'-ATTGAACAAGATGGATTGCAC-3' et NptIIREV 5'-TCGTCAAGAA GGCGATAGAA-3') pour une plante chez laquelle les tests enzymatiques ont déjà indiqué la présence du gène *uidA*. En effet, la qualité de l'ADN extrait et le rendement obtenu n'ont pas suffi à obtenir des amplifications par PCR répétables pour un fragment du gène *uidA* (pour une plante exprimant la protéine GUS), ni pour un fragment des gènes *nptII* et *m-gfp5-ER* (pour une plante exprimant la protéine GFP).

Les résultats sont présentés sur la figure 57, et montrent que le fragment du gène *nptII* est bien amplifié par PCR sur l'ADN génomique de la plante, démontrant ainsi l'insertion dans le génome de la plante du gène de sélection, et l'état transformé de la plante. Afin de vérifier la spécificité de l'amplification, la même PCR avec les mêmes amorces a été réalisée sur l'eau (témoin négatif de PCR), sur l'ADN extrait d'une plante sauvage (témoin négatif d'extraction) et sur le plasmide pTDE4 (témoin positif).

Après amplification, chaque échantillon est analysé sur un gel d'agarose à 1,5%. La taille attendue est de 775 pdb.

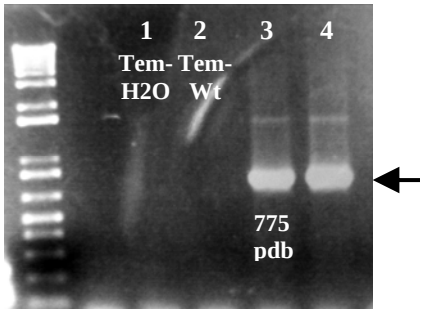


Figure 57 : Amplification par PCR d'un fragment de gène *nptII* pour une plante exprimant la protéine GUS. Puit **1** : témoin négatif : PCR sur H_2O, Puit **2** : témoin négatif : PCR sur plante sauvage, Puit **3** : témoin positif sur pTDE4, Puit **4** : PCR sur plante exprimant la protéine GUS.

Ce résultat ne permet pas d'affirmer formellement que le transgène *uidA* est bien présent dans le génome de la plante testée. Mais la présence du gène de sélection *nptII* et les tests histochimiques GUS positifs réalisés sur les limbes de feuilles de cette plante laisse présager de l'état transgénique de la plante.

- **Preuve de concept réalisée**

Les résultats présentés ci-dessus indiquent clairement qu'il est possible de générer une plante carnivore génétiquement modifiée dans laquelle le gène d'une protéine d'intérêt a été inséré, et de récolter la protéine d'intérêt au niveau des sucs digestifs des pièges excrétés naturellement par la plante (ici, de la glu).

En outre, les tests réalisés sur les deux protéines d'intérêt utilisées (GUS et GFP) indiquent que les protéines obtenues sont fonctionnelles, malgré l'existence d'enzymes digestives.

Nos travaux constituent ainsi une première preuve de concept sur l'utilisation de plantes carnivores pour la synthèse de protéines recombinantes végétales**.**

Une demande de brevet, décrivant cette technologie pour la production de protéines à usage thérapeutique par les plantes carnivores, a été déposée (le 3 octobre 2006) par la société Plant Advanced Technologies SAS en France et aux Etats-unis. Le rapport de recherche fourni par l'office européen des brevets n'a pas révélé d'antériorité sur le domaine revendiqué dans le brevet, **il a donc été délivré le 10 avril 2008 :**

BITEAU F., BOURGAUD F., GONTIER E., FEVRE J.P., 2006. Brevet FR 06/08693
International Publication Number : WO 2008/040599A1. (Extension PCT).
Procédé de production de protéines recombinantes à l'aide de plantes carnivores.
BITEAU F., BOURGAUD F., GONTIER E., FEVRE J.P., 2006, PATENT US 60/856,784
Process for the production of recombinant proteins using carnivorous plants.

3. Etude des plantes transformées avec les gènes humains IFNγ et FI

Après avoir validé le concept à l'aide de deux protéines marqueurs GUS et GFP, l'étape suivante a été de transformer ces plantes avec des gènes codant pour des protéines d'intérêt thérapeutique.

Notre choix s'est porté premièrement sur l'interféron gamma humain, représentant un modèle de glycoprotéine intéressant, étant donné les différents profils de glycosylation obtenus (3 glycoformes possibles) par différents systèmes d'expression, particulièrement les cellules CHO (Xie and Wang, 1997 ; Goldman *et al.*, 1998). L'hétérogénéité des glycosylations étant toujours une limitation majeure pour l'acceptabilité d'une protéine médicament, ce modèle permettra d'étudier non seulement la macrohétérogénéité (occupations des sites de glycosylation) mais également la microhétérogénéité (structure des glycannes) des glycosylations produites dans notre système.

Une deuxième protéine humaine a été choisie comme modèle cette fois pour son potentiel thérapeutique non pleinement exploité et son aptitude à gagner rapidement le marché en tant que nouveau médicament : il s'agit du facteur intrinsèque. Il peut aussi être utilisé comme réactif de diagnostic. Il a récemment été produit sous forme fonctionnelle dans un autre modèle végétal : *Arabidopsis thaliana* (Fedosov *et al.*, 2003). Comme décrit dans la bibliographie, des personnes souffrant d'insuffisance en facteur intrinsèque peuvent être soignées en administrant oralement du FI recombinant. Cette prise *per os* détermine un faible risque immunogénique pour les patients vis-à-vis des motifs de glycosylation, et ne nécessite pas de conditions stériles pendant le procédé de production.

3.1. Construction des plasmides pBin-GW-IFNγ et pBin-GW-FI

La première étape de ce travail a consisté à construire des plasmides recombinants incluant les nouveaux gènes d'intérêt en vue de transformer *Drosera rotundifolia*. Ce travail délicat s'est déroulé sur plusieurs mois. Le protocole suivi est décrit dans la partie Matériels et Méthodes (Partie Matériels et méthodes, 4.1. Construction de plasmides recombinants).

- Construction des plasmides pCR8-*IFNγ* et pCR8-*FI*.

Le gène codant pour l'IFNγ (avec le petide signal) a été amplifié à partir du plasmide pSecTagIFNg (fourni par le laboratoire UPR6811 CNRS des Sciences du Génie Chimique) avec les amorces IFN DIR (*Bam*HI) : 5' GGA-TCC-ATG-AAA-TAT-ACA-AGT-TAT-ATC-TTG-GCT-TTT-C 3' et IFN REV (*Eco*RI) : 5'GAA-TTC-TTA-CTG-GGA-TGC-TCT-TCG-ACC 3'. Le gène codant pour le Facteur Intrinsèque (avec le peptide signal) a lui été amplifié à partir du produit de RT-PCR (fourni par le laboratoire INSERM U724 de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition) réalisé sur les ARNm issus de cellules pariétales humaines d'estomac avec les amorces FI DIR (*Bam*HI) : 5' GGA-TCC-ATG-GCC-TGG-TTT-GCC-C 3' et FI REV (*Eco*RI) : 5' GAA-TTC-TTA-GTA-CTG-TGT-GAA-ATT-GGC-TGT-G 3'. Ces amorces sont spécifiques des extrémités du gène. On y a ajouté des sites de restriction supplémentaires pour pouvoir réaliser d'éventuels sous-clonages ultérieurs dans d'autres vecteurs d'expression.

Les amplicons obtenus ont été isolés sur gel d'agarose 1 % et purifiés avec le kit d'extraction MinElute™ (Qiagen) (Annexe 4). Les produits d'amplification ont ensuite été clonés dans le plasmide pCR8®/GW/TOPO® en suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Avec ces deux produits de ligation, deux transformations de cellules *E. coli* TOP10 ont été effectuées puis ces dernières ont été étalées sur des boîtes de milieu LB sélectif contenant 50µg/ml de spectinomycine. Une dizaine de colonies transformées (pour chaque plasmide) a ensuite été cultivée pendant une nuit dans du LB sélectif liquide, et les plasmides ont été extraits à l'aide du kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma).

- Vérification des plasmides pCR8-*IFNγ* et pCR8-*FI* obtenus.

Les plasmides ont ensuite été digérés. Le site d'insertion du plasmide pCR8®/GW/TOPO® est flanqué des sites de restriction *Eco*R1 (Figure 34, p 131), et un site de restriction *Eco*RI a été ajouté à l'extrémité 3' des gènes d'intérêt. Le profil de digestion obtenu à partir des plasmides amplifiés digérés par cette enzyme de restriction a été comparé

au profil théorique attendu, à savoir 3 fragments d'ADN de tailles différentes (Figure 58, B et E). Pour l'Interféron gamma, le fragment comprenant l'insert a une taille attendue de **519 pdb**, celui contenant le reste du plasmide a une taille théorique de **2799 pdb**, et le troisième, non visible sur gel d'agarose à 1%, a une taille de 12 pdb (Figure 58, C, puit 1). Pour le Facteur intrinsèque, le fragment comprenant l'insert a une taille attendue de **1272 pdb**, celui contenant le reste du plasmide a une taille théorique de **2799 pdb,** et le troisième, non visible sur gel d'agarose à 1%, a une taille de 12 pdb (Figure 58, F, puit 4). Une deuxième vérification de l'insertion du gène a été faite par amplification par PCR avec les couples d'amorces IFN REV / IFN DIR et FI REV / FI DIR sur les pCR8-*IFNγ* et pCR8-*FI* respectivement (Figure 58, C et F, puits 2, 3 et 5, 6). Cette seconde vérification permet également de vérifier l'identité des gènes clonés.

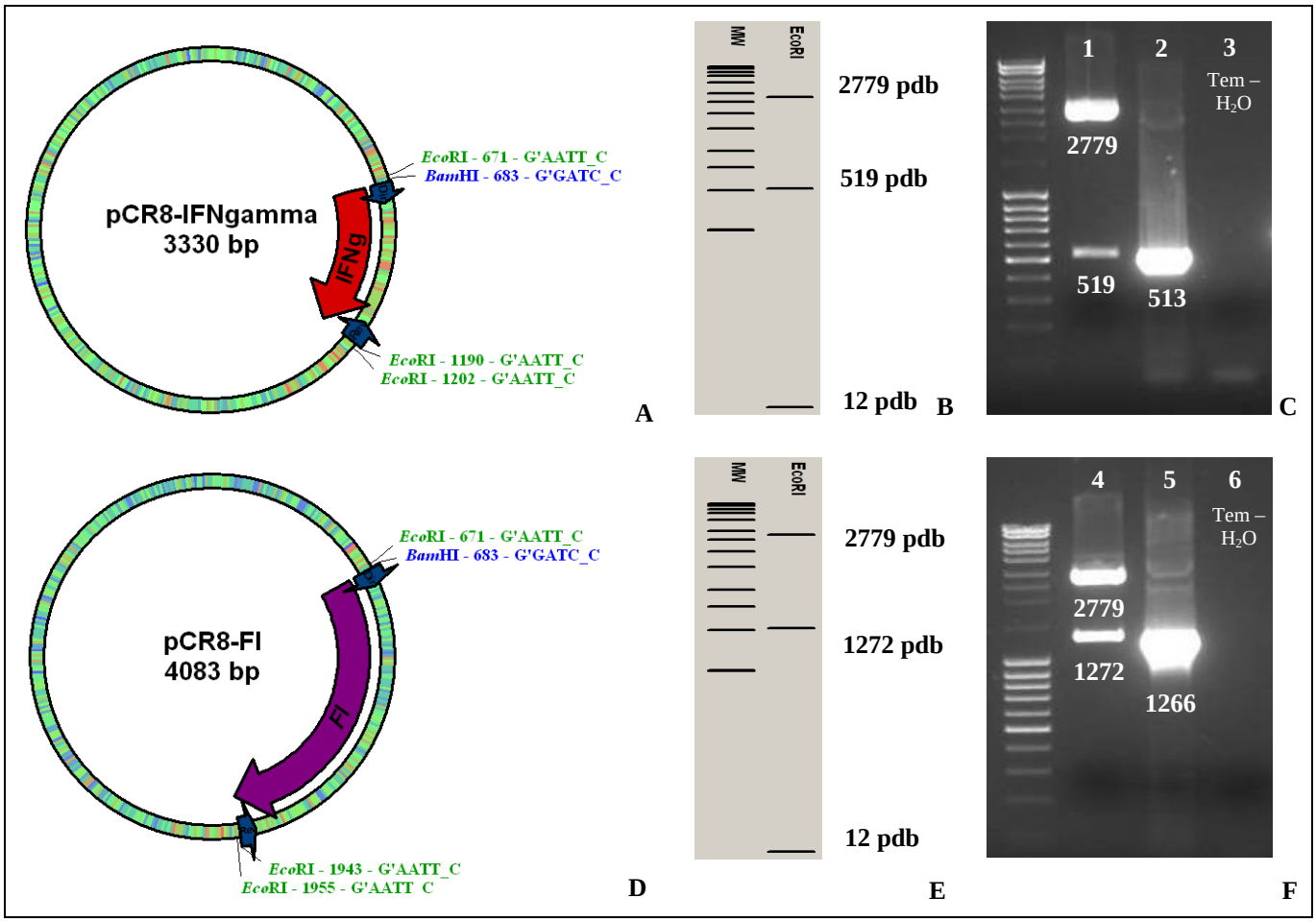


Figure 58 : Vérification des plasmides PCR8-*IFNγ* et pCR8-*FI*. **A** : Carte de restriction du plasmides pCR8-*IFNγ* avec les enzymes *Eco*RI et *Bam*HI. **B** : Profil de digestion du plasmide pCR8-*IFNγ* par l'enzyme *Eco*RI sur gel d'agarose 1%. **C : pCR8-*IFNγ*** : puit 1 : Digestion avec l'enzyme *Eco*RI, puit 2 : PCR avec les amorces IFN REV et IFN DIR, puit 3 : témoin négatif de PCR (H_2O). **D** : Carte de restriction du plasmide pCR8-*FI* avec les enzymes *Eco*RI et *Bam*HI. **E** : Profil de digestion du plasmide pCR8-*FI* par l'enzyme *Eco*RI sur gel d'agarose 1%. F : **pCR8-*FI*** : puit 4 : Digestion avec l'enzyme *Eco*RI, puit 5 : PCR avec les amorces FI REV et FI DIR, puit 6 : témoin négatif de PCR (H_2O).

Un des problèmes liés au clonage d'un fragment de PCR dans le système pCR8®/GW/TOPO® est qu'il n'est pas orienté. Or, pour le transfert ultérieur de l'insert dans le plasmide pBIN-GW par LR recombinaison, il est nécessaire de travailler avec une orientation directe, et donc de réaliser la recombinaison avec un plasmide pCR8-*X* dont l'insert est orienté dans ce sens. Sur les plasmides pCR8-*IFNγ* et pCR8-*FI*, une PCR avec les amorces M13f - IFN REV et M13f - IFN DIR ou M13f - FI REV et M13f - FI DIR a été réalisée afin de sélectionner ceux ayant intégré le gène d'intérêt dans le sens direct (Partie 4.1.8. Matériels et Méthodes, figure 38, p 142). Pour les plasmides conformes, des amplicons de 658 pdb et 1411 pdb sont attendus respectivement pour le plasmide pCR8-*IFNγ* et pour le plasmide pCR8-*FI* avec les couples d'amorces M13f - IFN REV et M13f - FI REV (Figure 59, B et C).

Un plasmide pCR8-*IFNγ* et un plasmide pCR8-*FI* ayant donné les résultats escomptés ont été sélectionnés. Les résultats de digestion et de PCR de ces plasmides sont présentés sur la figure suivante :

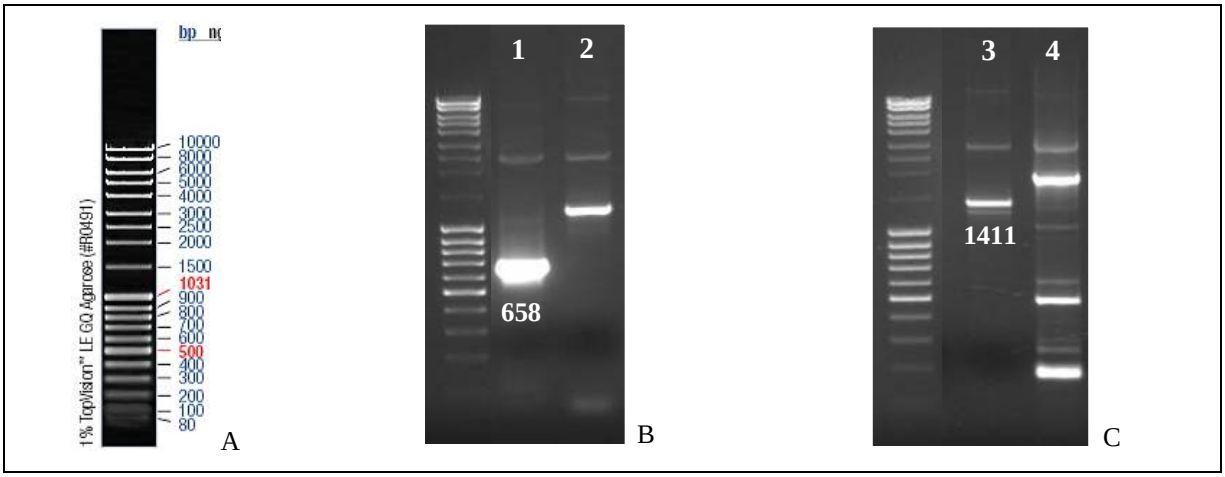


Figure 59 : Vérification du sens d'insertion des inserts par PCR sur les plasmides pCR8-*IFNγ* et pCR8-*FI*. A : Marqueur de taille MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use, en pdb. **B** : PCR sur le plasmide pCR8-*IFNγ* : **1** : PCR avec les amorces M13f et IFN REV, **2** : PCR avec les amorces M13f et IFN REV. **C** : PCR sur le plasmide pCR8-*FI* : **3** : PCR avec les amorces M13f et FI REV, **4** : PCR avec les amorces M13f et FI REV.

Ces plasmides ont ensuite été séquencés : Pour le plasmide pCR8-*IFNγ*, aucune erreur de séquence n'a été mise en évidence par rapport à celle trouvée dans les bases de données (Homo sapiens interferon gamma (IFNG), mRNA : NM_000619). Par contre, pour le pCR8-*FI*, 2 mutations ont été décelées par rapport à la séquence présente dans les banques de gènes (Homo sapiens gastric intrinsic factor (vitamin B synthesis), mRNA : NM_005142),

mais elles se sont avérées silencieuses (C246T, donnant le codon AGT au lieu de AGC (les deux codent pour la sérine), et C942T, donnant le codon GTT au lieu de GTC (codent pour la valine)). Le produit de RT-PCR (réalisée sur les ARNm issus de cellules pariétales humaines d'estomac) a été amplifié à l'aide d'une *Taq* polymérase haute fidélité. Les séquençages de deux plasmides pCR8-*FI* différents ont donné les mêmes résultats. Il peut s'agir ici non pas d'erreurs lors de la RT-PCR ou de la PCR mais de variants alléliques qui ne sont pas présents dans les banques de gènes. Cependant, ces mutations n'ont *a priori* pas d'incidence sur l'expression : l'ADNc obtenu code pour une séquence protéique conforme au Facteur intrinsèque.

Les deux plasmides ont pu être utilisés pour réaliser la recombinaison avec le plasmide pBIN-GW.

- LR Recombinaison entre le plasmide pBIN-GW et le plasmide pCR8-*IFNγ* ou pCR8-*FI.*

Les plasmides pCR8-*IFNγ* et pCR8-*FI* ont été utilisés pour réaliser la recombinaison avec le plasmide pBIN-GW en suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Des cellules *E. coli* GeneHogs® ont été transformées avec le produit de recombinaison avant d'être étalées sur un milieu LB contenant 25 µg/mL de kanamycine. Une dizaine de colonies transformées (par plasmide) ont été ensuite cultivées en milieu selectif liquide afin de réaliser une extraction d'ADN plasmidique avec le kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Annexe 4).

- Vérification des plasmides pBin-*IFNγ* et pBin-*FI* obtenus

Une digestion avec les enzymes *Bam*H1 et *Eco*R1 (sites de restriction flanquant les gènes d'intérêt, Figure 60, A et B) et une PCR avec les amorces IFN REV-IFN DIR ou FI REV-FI DIR (Figure 60, D puit 2, E puit 7) ont permis de vérifier que la recombinaison a bien eu lieu. Pour la digestion, la taille des deux fragments attendue est de 12849 et 507 pdb pour le pBin-*IFNγ* (Figure 60, C) et de 12849 et 1260 pour le pBin-*FI* (Figure 60, E, puit 6). Enfin, une PCR avec les amorces 35S DIR / IFN REV et 35S DIR / FI REV (taille attendu : 586 pdb et 1339 pdb) a permis de contrôler l'orientation du gène inséré (Figure 60, D puit 4, E puit 9).

Deux plasmides pBin-*IFNγ* et pBin-*FI* ayant donné des résultats satisfaisants de digestion et de PCR ont été sélectionnés. Les résultats sont présentés sur la figure suivante :

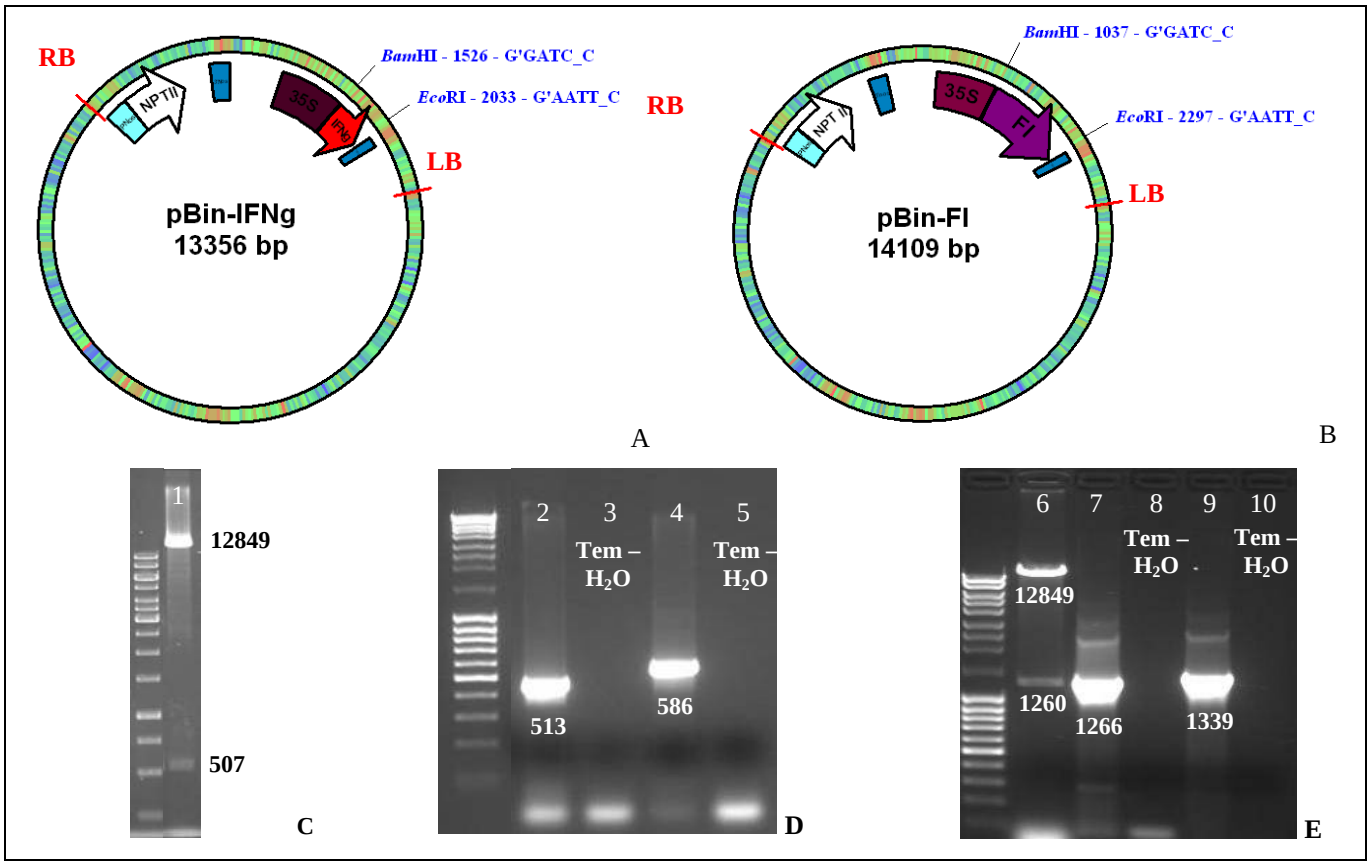


Figure 60 : Vérification des plasmides pBin-*IFNγ* et pBin-*FI*. **A :** carte du plasmide pBin-*IFNγ* (2 fragments attendus pour la digestion avec *Bam*H1 et *Eco*R1 de 12849 et 507 pdb). **B :** carte du plasmide pBin-*FI* (2 fragments attendus pour la digestion *Bam*H1 et *Eco*R1 de 12849 et 1260 pdb). **C :** Digestion du plasmide pBin-*IFNγ* par *Eco*R1 et *Bam*H1 (Marqueur de taille différent). **D :** PCR sur le plasmide pBin-*IFNγ* : puit 2 : avec les amorces IFN REV et IFN DIR, puit 3 : PCR sur l'eau (témoin négatif) avec les amorces IFN REV et IFN DIR, puit 4 : PCR avec les amorces 35S DIR et IFN REV, puit 5 : PCR sur l'eau (témoin négatif) avec les amorces 35S DIR et IFN REV. **E :** Digestion et PCR sur le plasmide pBin-*FI* : puit 6 : Digestion du plasmide pBin-*FI* par *Eco*R1 et *Bam*H1, puit 7 : PCR sur le plasmide avec les amorces FI REV et FI DIR, puit 8 : PCR sur l'eau avec les amorces FI REV et FI DIR, puit 9 : PCR sur le plasmide avec les amorces 35S DIR et FI REV, puit 10 : PCR sur l'eau avec les amorces 35S DIR et FI REV.

Chacun des 2 plasmides a été transféré dans les agrobactéries qui ont été utilisées pour effectuer une vingtaine de séries de transformation génétique de *Drosera rotundifolia*. Des plantules génétiquement modifiées ont été obtenues et ont fait l'objet de caractérisation en utilisant diverses approches :

i) caractérisation moléculaire des plantes par PCR afin de vérifier l'insertion des gènes d'intérêt dans le génome de la plante.

ii) test de l'expression des protéines dans les tissus par des approches d'immuno-détection.

iii) test de fonctionnalité des protéines recombinantes.

3.2. Obtention des plantes génétiquement transformées IFNγ et FI

Douze séries de transformation génétique ont été réalisées pour le gène *IFNγ* et 8 pour le gène *FI*. Pour chaque série, comme pour les gènes *uidA* et *m-gfp-5ER*, environ 70 à 80 grandes feuilles de *Drosera rotundifolia* ont été blessées et mises en co-culture.

2 à 3 mois plus tard, le nombre d'événements de transformation génétique différents obtenus s'est élevé à 43 pour le gène *IFNγ* et à 21 pour le gène *FI*. En rapportant cette valeur aux nombres d'explants mis en culture au début de chaque série de transformation génétique, le taux d'événements de transformation obtenu s'élève à 4,8% pour le gène *IFNγ* et à 3,5% pour le gène *FI*.

3.3. Caractérisation moléculaire des plantes

3.3.1. Mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN à partir de feuilles

Suite aux problèmes d'extraction d'ADN rencontrés sur les plantes transformées avec les gènes *uidA* et *m-gfp-5ER*, différents protocoles d'extraction d'ADN à partir de feuilles de *Drosera rotundifolia* (différents Kits, Trizol® Reagent) ont été testés. Cependant, le rendement et la qualité des extraits obtenus étaient insuffisants pour pouvoir analyser ces ADN par PCR.

Notre plante modèle contient en effet une très grande quantité de polysaccharides (dans la glu), de polyphénols, et de métabolites secondaires. Ces molécules lient fermement les acides nucléiques durant l'extraction de l'ADN et interfèrent avec les différentes réactions de l'extraction (Pirttila *et al.*, 2001). C'est un problème récurrent rencontré pour la purification de l'ADN de certaines plantes médicinales (Webb and Knapp, 1990 ; Moyo *et al.*, 2008).

Bekesiova et ses collaborateurs ont développé une méthode fondée sur une extraction au CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) à partir de feuilles de *Drosera rotundifolia in vitro* (Bekesiova *et al.*, 1999). Le CTAB est un détergent cationique qui précipite les protéines et les polysaccharides. Son utilisation a été décrite dans plusieurs protocoles d'extraction d'ADN de plantes récalcitrantes (Webb and Knapp, 1990 ; Dehestani and Kazemi Tabar, 2007 ; Mafra *et al.*, 2008 ; Moyo *et al.*, 2008 ; Zain Hasan *et al.*, 2008). Nous nous sommes basés sur la méthode mise au point par Bekesiova et ses collaborateurs en

la modifiant, notamment par rapport à la quantité de biomasse à extraire. Le protocole est décrit dans la partie Matériels et Méthodes (partie 4.3.1.).

3.3.2. Mise en évidence de l'intégration du transgène dans le génome de la plante par PCR

Les mises au point du protocole d'extraction d'ADN génomique ont été effectuées sur une plante transformée avec le gène de l'Interféron Gamma : la plante IFN 8B1.

Une PCR avec les amorces spécifiques d'un gène de *Drosera rotundifolia* (putative glucanase gene) est faite sur les échantillons d'ADN végétaux afin de valider le bon fonctionnement de la PCR.

Pour la PCR avec les amorces du gène IFN gamma,

- le plasmide pCR8-*IFNγ* sert de témoin positif puisqu'il renferme le gène en question.
- La plante sauvage sert de témoin négatif de PCR. Son ADN est extrait en même temps que la plante IFN8B1 afin de valider qu'il n'y a pas eu contamination par de l'ADN humain exogène durant l'extraction.
- La même PCR est enfin réalisée sur l'eau afin d'éliminer tout doute de contamination par de l'ADN humain durant la préparation des tubes de PCR.

Les résultats obtenus et décrits sur la figure 61 montrent que la PCR a bien fonctionné sur les ADNs génomiques extraits (bande à 595 pdb pour le gène de Drosera, puit 2). La PCR sur le gène IFN est négative pour la plante WT et pour l'eau (puit 5 et 6), ce qui montre qu'il n'y a pas eu de contamination pendant l'extraction, ni pendant la préparation de la PCR. Le témoin pCR8-*IFNγ* est positif (bande à 513 pdb, puit 4), la PCR a bien fonctionné sur ce gène. Enfin, une amplification par PCR avec les amorces du gène *IFNγ* est observable pour l'ADN extrait de la plante IFN8B1 (puit 7). Tous les témoins étant corrects, on peut donc conclure que la plante IFN8B1 contient le transgène IFN gamma.

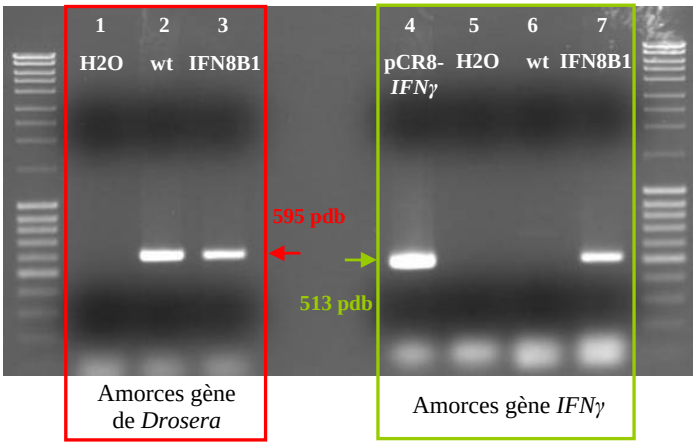


Figure 61 : PCR de mise en évidence du transgène IFN dans la plante transformée IFN8B1. Dans l'encadré rouge : PCR réalisée avec les amorces du gène de glucanase de *Drosera rotundifolia* sur l'eau, sur l'ADN génomique de la plante sauvage et de la plante transformée. Dans l'encadré vert : PCR réalisée avec les amorces du gène *IFNγ* sur le plasmide pCR8-*IFNγ*, sur l'eau, et sur l'ADN génomique de la plante sauvage et de la plante transformée.

Les résultats obtenus démontrent que la plante est réellement transformée. A ce stade, il semble possible que l'utilisation de la seule amplification par PCR des transgènes pour attester de leur intégration dans le génome de la plante soit discutable. En effet, elle peut signifier la présence d'agrobactéries recombinantes résiduelles ayant le plasmide pBin-*IFNγ* suite au protocole de transformation. Cependant, pour nous affranchir d'un risque de contamination et pour infirmer cette hypothèse, des feuilles de *Drosera rotundifolia* transformées ont été incubées dans un milieu de culture bactérien YEB liquide pendant une nuit à 28°C comme cela a été fait pour les plantes transformées avec les gènes *uidA* et *m-gfp-5ER* (2.1.2. Résultats, Chapitre 1). Le milieu a ensuite été étalé sur boîtes de pétri contenant du milieu YEB. Elles ont été incubées pendant une semaine à 28°C afin de vérifier qu'aucune bactérie ne se développe. L'ensemble des tests réalisés s'est révélé négatif, ce qui signifie qu'aucune plante n'était contaminée par des bactéries. La plante testée est donc génétiquement transformée.

Cette mise en évidence du transgène a été effectuée sur une plante transformée avec le gène *IFNγ*. La faible biomasse disponible sur les plantes transformées avec le gène *FI* (car utilisée préférentiellement pour les extractions de protéines et la caractérisation biochimique des transformants) n'a pas permis de réaliser l'extraction d'ADN et la caractérisation biochimique par PCR.

3.4. Mise en évidence de l'expression des protéines humaines par immuno-révélation

3.4.1. Mise au point d'un protocole d'extraction de protéines à partir de feuilles de *Drosera rotundifolia* par le Trizol Reagent®

Afin de mettre en évidence la présence des protéines d'intérêt dans les tissus par immuno-détection, il a fallu mettre au point un protocole d'extraction de protéines à partir de feuilles de *Drosera rotundifolia*. Les premiers essais ont été réalisés simplement par broyage de la biomasse végétale (après congélation à l'azote liquide) et remise en suspension dans un tampon TrisHCl 10mM pH7, suivi d'une précipitation à l'acétone. Il s'est avéré que les échantillons (même après une dénaturation de 20 min à 95°C), présentaient une activité phosphatase alcaline interne interférant avec le substrat de révélation du blot (substrat de la phosphatase alcaline, enzyme couplée à l'anticorps secondaire), nous donnant des faux-positifs pour les extraits de plante sauvage. En effet, les plantes du genre *Drosera* produisent des phosphatases naturelles destinées à digérer les proies (Juniper *et al.*, 1989 ; Plachno *et al.*, 2006). L'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à une autre enzyme a été envisagée (par exemple à la péroxydase), mais étant données les nombreuses enzymes digestives produites par la plante, le risque était d'être confronté au même problème.

Il a donc fallu trouver une méthode d'extraction dénaturante pour éliminer cette activité enzymatique de l'extrait. Le Trizol® est une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate, qui sont deux agents dénaturants puissants. Ce réactif est utilisé pour l'extraction en une étape de l'ARN, de l'ADN et de protéines à partir d'un même tissu (Chomczynski and Sacchi, 1987 ; Chomczynski, 1993 ; Chomczynski *et al.*, 1994). L'utilisation de guanidine hydrochloride lors des différents rinçages du culot de protéines les dénature également en altérant leur structure tridimensionnelle. Nous avons donc adapté cette technique à l'extraction de protéines de feuilles de *Drosera rotundifolia*. La quantité de biomasse de départ pour obtenir un rendement d'extraction suffisant a été déterminée à 1g de biomasse fraîche.

Cette méthode a permis d'obtenir des extraits protéiques dénaturés relativement « propres », ne contenant ni ADN ni ARN. De plus, les nombreux lavages du culot de protéines par une solution éthanolique à 95% contenant 0,3M de guanidine hydrochloride ont permis une élimination maximum des contaminants (polyphénols, polysaccharides…). Ces extraits ont pu être par la suite utilisés directement en Dot Blot, sans chauffage préalable.

3.4.2. Mise en évidence des protéines recombinantes dans les feuilles par Dot Blot

➢ Dot Blot FI

Les protéines totales ainsi extraites de feuilles de *Drosera rotundifolia* sauvages et transformées aves le gène *FI* ont été déposées sur des membranes d'Immobilon® et testées dans le cadre d'expérimentation d'immunorévélation. Les résultats que nous avons obtenus sont présentés en figure 15. 2 µg de Facteur Intrinsèque (FI recombinant dérivant plante, Cobento, phosphate de sodium 0,2M pH 7,4) servant de témoin positif sont déposés sur la membrane. L'extrait réalisé sur la plante sauvage sert de témoin négatif. Les résultats sont présentés sur la figure 62 :

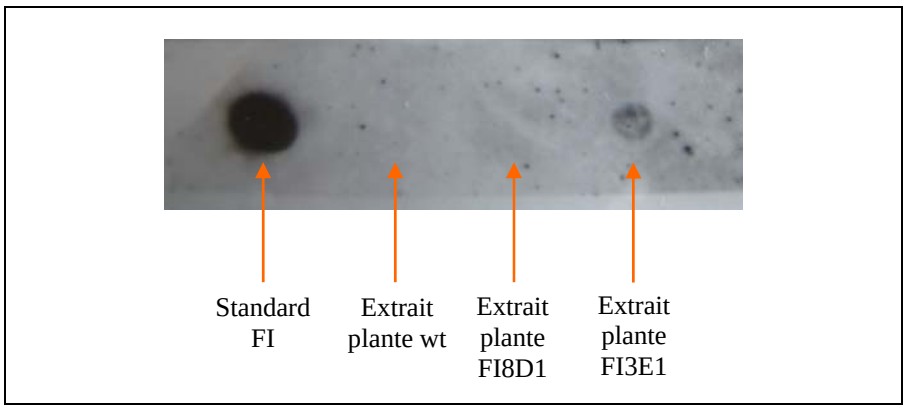


Figure 62 : **Dot Blot sur des extraits de feuilles de *Drosera rotundifolia* sauvage et transformées avec le gène codant pour le FI.**

Le Dot Blot FI présente un spot bien visible pour la plante transformée FI3E1, et aucun signal pour la plante FI8D1 et pour la plante sauvage. Ce résultat nous indique que la plante FI3E1 est bien transgénique et qu'elle exprime dans ses tissus la protéine recombinante. Par contre, la plante FI8D1 n'est soit pas transformée ou n'exprime pas en quantité suffisante le Facteur Intrinsèque pour que celui-ci soit détectable par cette méthode.

Ces expériences (extraction de protéines + Dot Blot) ont été reproduites sur 11 autres plantes supposées transformées issues d'événements de transformation différents. Sur ces 13 plantes, seules 4 ont présenté un spot positif en Dot Blot. Ces résultats indiquent donc que dans 31% des cas, les plantes résistantes à la kanamycine supposées transformées avec le gène *FI* expriment la protéine d'intérêt en quantité suffisante pour être détectée. En rapportant ces valeurs aux nombres d'explants mis en culture pour la transformation génétique de ces plantes, le taux de plantes supposées transformées exprimant le gène *FI* est de 1,07 %.

➢ Dot Blot IFNγ

De même, les protéines totales extraites de feuilles de *Drosera rotundifolia* sauvages et transformées aves le gène *IFNγ* ont été testées en Dot blot (Figure 63). 100 ng de standard interféron gamma (rhIFN-g d'*E.coli* dans PBS à 0,2% BSA, ref 285-IF R&D Systems), servant de témoin positif, sont déposés sur la membrane. Les résultats sont présentés sur la figure 63.

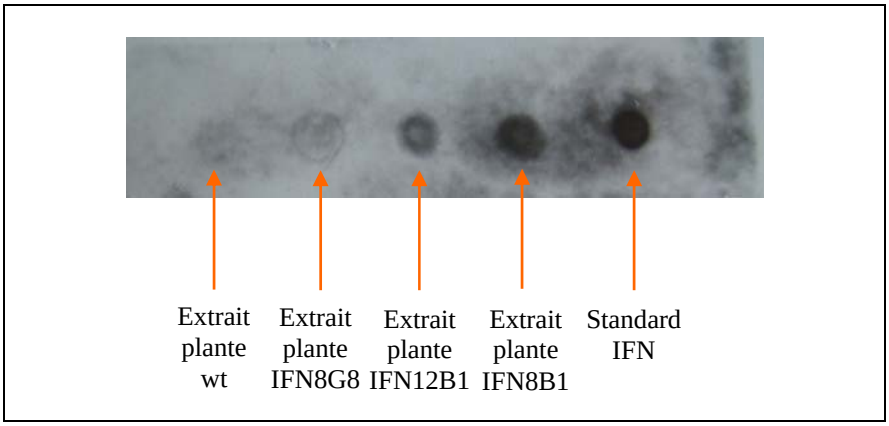


Figure 63 : **Dot Blot sur des extraits de feuilles de *Drosera rotundifolia* sauvage et transformées avec le gène codant pour l'IFN gamma**

Le Dot Blot présente des signaux bien marqués pour les plantes IFN8B1 (plante sur laquelle la présence du gène *IFNγ* a été montrée par PCR) et IFN12B1, et un peu moins fort pour la plante IFN8G8. La plante sauvage témoin ne présente pas de signal dû à la révélation immonulogique (la légère auréole visible est due au dépôt de l'échantillon). Ce Dot blot nous indique l'état transgénique des 2 plantes IFN12B1 et IFN8B1 (avec certitude, interprétation plus difficile pour IFN8G8) et permet de valider la présence de la protéine recombinante Interféron Gamma dans les tissus foliaires de ces *Drosera rotundifolia* transformées.

Ces expériences ont également été réalisées sur 11 autres plantes supposées transformées avec le gène *IFNγ* issues d'événements de transformation différents. Sur ces 14 plantes, seules 4 ont présenté un spot positif en Dot Blot. Ces résultats indiquent donc que dans 29% des cas, les plantes résistantes à la kanamycine supposées transformées avec le gène *IFNγ* expriment la protéine d'intérêt. En rapportant ces valeurs aux nombres d'explants mis en culture pour la transformation génétique de ces plantes, le taux de plantes supposées transformées exprimant le gène *IFNγ* est de 1,4 %.

Les signaux pour les extraits de plante IFN sont plus marqués que le signal observé pour la plante FI. Ceci peut s'expliquer par une concentration plus élevé de protéines d'intérêt dans les plantes IFN testées, mais aussi par la sensibilité des anticorps utilisés. L'anticorps

anti-Fi est monoclonal et semble, pour la même dilution, moins sensible que l'anticorps anti-IFNγ (polyclonal). Ceci explique la différence de concentration choisie pour les standards FI et IFN.

Une limite de ces approches par dot blot (dépôt de protéines sur une membrane) réside dans le fait qu'on ne connaît pas la taille de la protéine qui est reconnue par les anticorps. Afin de vérifier que la protéine immunomarquée est intègre, il est nécessaire de passer par une étape de séparation des protéines par SDS-PAGE avant d'effectuer une immunodétection (Western blot). Cette étape de western blot nécessite des mises au point au préalable comme, par exemple, obtenir une solution protéique suffisamment concentrée pour pouvoir détecter la protéine. En effet, par rapport à un Dot blot, la migration puis le transfert des protéines sur membrane fait perdre au signal de son intensité. Malheureusement, la biomasse végétale disponible (plantes transformées positives en Dot blot) ne nous a pas permis de mener cette expérimentation à son terme.

4. Discussion relative à la transformation génétique des *Drosera rotundifolia* et à la production des protéines recombinantes dans les feuilles et dans la glu

Le protocole de transformation génétique de *Drosera rotundifolia* a été mis au point en se basant sur les travaux de l'équipe d'Hirsikorpi et de ses collaborateurs (Hirsikorpi *et al.*, 2002). Les conditions décrites par cette équipe n'a pas permis d'obtenir un nombre de régénérants satisfaisants, c'est pourquoi certains paramètres ont été de nouveau étudiés.

Le protocole est basé sur l'utilisation de limbe de feuilles comme matériel de départ, ce qui permet une régénération directe des tiges feuillées transformées, sans passer par un stade de dédifférenciation des cellules végétales. Ceci réduit de plus le risque de variations soma-clonales. Cette technique présente aussi l'avantage d'obtenir des plantes transformées rapidement (5 à 6 mois).

L'effet de certains facteurs a été étudié sur la transformation génétique de *Drosera rotundifolia* : Les conditions de régénération des plantules, les conditions de sélection des bourgeons transformés, et enfin la résistance intrinsèque des explants au céfotaxime et les conditions d'élimination des agrobactéries après la co-culture.

La nature de l'explant de départ avait également été testé : sur racines et sur feuilles. Mais la régénération à partir de feuilles sur un milieu enrichi en BAP (0,45mg/L) et NAA (0,375 mg/L) s'est avérée beaucoup plus efficace, même si elle fonctionnait sur les racines.

Les conditions de sélection des plantules transformées ont été déterminées. En effet, l'ajout de 400mg/L de kanamycine au milieu de culture comme le préconisent Hirsikorpi et ses collaborateurs s'est avéré trop élevé pour notre plante. Les cellules, même transformées ne semblaient pas résister à une telle pression de sélection. Il s'est avéré qu'une concentration de 350mg/L de kanamycine a suffi à sélectionner les plantes transformées. Le cultivar de *Drosera rotundifolia*, dont nous disposons, présente une résistance intrinsèque à la kanamycine moins élevée que la souche utilisée par l'équipe d'Hirsikorpi, bien que très élevée par rapport à d'autres plantes.

Afin d'éliminer les agrobactéries suite à la co-culture, il a fallu déterminer une concentration de céfotaxime, n'ayant pas d'impacts négatifs sur la régénération et la croissance des plantes. 200mg/L est la dose qui a été choisie, suite aux expérimentations menées. La même dose de bactériostatique est utilisée par Hirsikorpi et ses collaborateurs. En effet, la même souche d'agrobactéries C58C1Rif^{R} est utilisée dans les deux cas, il est donc normal que la même dose suffise à les éliminer. Mais il n'était pas évident que les plantes aient la même résistance intrinsèque au céfotaxime, étant donnée la différence de sensibilité déjà observée entre les deux génotypes. Il était donc plus prudent de vérifier cette donnée.

Les taux de régénération et les taux de transformants obtenus lors des transformations génétiques diffèrent d'un gène à l'autre. Les différents résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

	Taux de régénération	**Taux de transformation génétique** (calculés sur le nombre de plantes où la présence de protéines recombinantes a été montrée)
Gène *uidA*	15,3 %	11,8 %
Gène *m-gfp5-ER*	11 %	7,8 %
Gène *IFNγ*	4,8 %	1,4 %
Gène *FI*	3,5 %	1,07 %

Tableau 6 : Récapitulatif des taux de régénération, et des taux de transformation génétique obtenus pour la transformation génétique de *Drosera rotundifolia* avec les différents gènes utilisés.

Les résultats concernant le taux de transformation génétique est à prendre avec précaution. En effet, tous les événements de transformation génétique obtenus n'ont pas été

testés. Il se pourrait que les résultats aient été différents dans ce cas. La transformation avec le gène *uidA* connaît les meilleurs taux de régénération et de transformation génétique. La transformation avec le gène *m-gfp5-ER* présente des taux inferieurs à ceux du gène *uidA*, mais le taux reste cependant élevé (proche de 10 %).

Par contre, les taux de transformation obtenus pour les 2 gènes humains sont vraiment très inférieurs à ceux obtenus pour les deux gènes marqueurs. En effet, le taux de régénération a vraiment chuté pour ces transformations génétiques. L'insertion de certains transgènes dans le génome d'une plante peut donner lieu par effet pléiotropique, c'est-à-dire par interaction avec le fonctionnement d'autres gènes, à une modification dans le métabolisme de la plante. La présence de nouveaux ARNs et de nouvelles protéines pouvant interagir spécifiquement avec des molécules de la plante en est une des causes. De plus, la production de protéines recombinantes peut établir de nouveaux puits métaboliques pour certains acides aminés ou pour des substrats non spécifiques (lorsque la protéine recombinante est une enzyme) (Filipecki and Malepszy, 2006).

La régénération serait donc beaucoup moins efficace avec les gènes humains qu'avec les 2 gènes rapporteurs. Une hypothèse serait que la production de protéines recombinantes aussi complexe que les protéines humaines dérègle la machinerie métabolique de la plante et ceci au détriment de sa croissance, et de sa régénération. En effet, on observe que plus la protéine est complexe, plus le taux de régénération obtenu est bas. La protéine marqueur β-glucuronidase n'étant pas glycosylée (enzyme bactérienne) ne nécessite pas de modifications post-traductionnelles très élaborées pour être fonctionnelle, par rapport à une protéine recombinante humaine. Quant à la protéine GFP, elle est non glycosylée mais demande la formation d'un chromophore au sein de la cage (partie bibliographie, Figure 28, p 107) grâce à une modification post-traductionnelle autocatalytique des acides aminés 65-67. Ces trois résidus sont dans un premier temps cyclisés puis oxydés pour former le chromophore p-hydroxybenzylidene-imidazolidinone (Chattoraj *et al.*, 1996). C'est seulement après l'oxydation que la GFP est fluorescente. Cette oxydation est également suivie d'un cycle de protonation-déprotonation. La transformation avec ce gène présente un taux de régénération deux fois plus faible qu'avec le gène *uidA*.

Enfin les protéines humaines IFN et FI demandent toutes deux des modifications post-traductionnelles élaborées, comme la glycosylation. Les transformations génétiques avec ces deux gènes présentent les taux les plus faibles de régénération.

L'expérience montre qu'un autre facteur peut avoir une influence notable sur la réussite de la transformation génétique : la taille de l'expérimentation. Les résultats présentés ont été obtenus pour des expérimentations de taille volontairement restreinte ne comprenant en général pas plus de 80 explants. En effet, des essais à plus grande échelle non décrits ici se sont soldés pour une mort prématurée des explants. Il n'est pas toujours facile de contrôler les différents paramètres externes, telle la température régnant sous la hotte à flux laminaire, sur une longue période de travail. Or, une chaleur excessive à un stade quelconque de la transformation génétique inhibe la virulence des bactéries, et surtout peut causer la mort des explants par desséchement.

Des plantes transformées avec les 4 gènes (*uidA*, *m-gfp-ER IFNγ*, *FI*) ont donc été obtenues et analysées. Il a été démontré que les protéines marqueurs GUS et GFP étaient exprimées dans les tissus foliaires des *Drosera rotundifolia* transformées mais aussi dans les gouttelettes de glu, malgré la présence de protéases. Les plantes *in vitro* ne sont pas stimulées par la présence d'insectes ; la production d'enzymes n'atteint donc jamais son maximum. Mais des enzymes hydrolytiques sont néanmoins présentes et sont actives dans les conditions de pH acide de la glu.

Pour les protéines humaines IFNγ et FI, il a été démontré que les protéines recombinantes sont bien exprimées dans les feuilles des plantes. La fonctionnalité du FI produit sera prochainement caractérisée en collaboration avec le laboratoire INSERM U724 de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition du Professeur Jean- Louis Guéant.

Comme pour les protéines marqueurs, les gouttelettes de glu des plantes transformées ont été testées. Etant très difficilement prélevables par micro-pipettes, des gouttelettes de glu de plantes sauvages et de plantes transformées ont été absorbées sur membrane de nitrocellulose afin de réaliser un Dot blot. Mais l'activité phosphatase alcaline interne présente dans la glu a donné un signal positif pour le témoin négatif (plante sauvage), nous empêchant de conclure sur la présence des protéines dans la glu. Une solution serait de réaliser le dot blot avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme absente de la glu (nous disposions d'un anticorps couplé à la peroxydase, mais cette activité a été également montrée dans la glu (Heslop-Harrison, 1975)). Une autre solution serait de multiplier une plante transformée en 5 à 6 clones et, une fois adultes, sacrifier 3 de ces plantes en les rinçant avec de l'acétone afin de collecter les gouttelettes. Après précipitation des protéines, le culot pourrait être repris dans une solution dénaturante et être chauffé avant d'être déposé en Dot blot. Le manque de biomasse et la faible production de gouttelettes de glu en conditions *in*

vitro ne nous a pas permis de réaliser cette expérience. La multiplication des plantes transformées en conditions *ex-vitro* permettrait une production accrue de glu, mais l'acclimatation des plantes n'est pas totalement maitrisée et génèrerait beaucoup de pertes.

Lorsque ces rinçages de glu seront possibles, si la protéine recombinante y est mise en évidence, elle pourra ensuite être quantifiée par test ELISA (avec un anticorps secondaire n'ayant pas d'interférence possible avec les enzymes naturellement présentes dans la glu).

Un autre sujet se prêtant à la discussion concerne la vérification de l'intégration du transgène dans le génome des plantes transformées. En effet, seule la présence du gène *nptII* a été montrée par amplification par PCR d'un fragment du gène *nptII* pour une plante ayant révélée une activité GUS. La qualité de l'ADN extrait et le rendement obtenu à l'aide du kit d'extraction n'ont pas suffi à obtenir des amplifications par PCR répétables pour un fragment du gène *uidA.* La présence des transgènes dans les plantes exprimant la protéine GFP n'a pas non plus pu être montrée. Suite à l'obtention des plantes transformées avec les deux gènes humains, un protocole d'extraction d'ADN a été mis au point en se basant sur la méthode décrite par Bekesiova et ses collaborateurs (Bekesiova *et al.*, 1999). Les extraits d'ADN génomique obtenus ont permis de mettre en évidence par PCR la présence du transgène IFN dans une plante exprimant la protéine. Les plantes FI n'ont pas pu, pour le moment, être caractérisées à cause d'un manque de biomasse (utilisée préférentiellement pour l'extraction de protéines et la caractérisation biochimique des transformants). Nous ne disposions plus de plantes transformées GUS ou GFP au moment précis de la validation de notre protocole d'extraction d'ADN, mais la démonstration de l'intégration des transgènes est prévu sur des plantes issues de transformation génétique en cours. Cependant, les résultats obtenus sur la production des protéines marqueurs laissent présager de l'état transgénique des plantes.

Un autre problème s'est posé lors de la mise en évidence du transgène dans les plantes IFN. Le gène recherché étant un gène humain, il a fallu prendre des précautions drastiques pour ne pas contaminer les extraits avec de l'ADN humain exogène (décontamination des outils, solutions, etc…). En effet, le laboratoire ne disposant pas de salle blanche (en surpression pour éviter l'entrée d'éléments exogènes), les extractions ont été réalisées sous hotte à flux laminaire avec vitre. Les témoins positifs de PCR ont été préparés séparément des autres tubes et il a été fait constamment recours aux témoins négatifs d'extraction (témoin plante sauvage) et d'amplification (PCR sur l'eau) pour valider chaque étape. Malgré toutes ces précautions, il a été difficile d'obtenir les résultats présentés figure 14 de façon répétable (le témoin négatif de PCR étant très fréquemment positif). Une solution aurait été d'utiliser le

couple d'amorces 35S DIR et IFN REV pour palier ce problème de contamination. Cette amorce spécifique au promoteur sera utilisée pour la recherche du transgène FI dans les plantes issues de cette transformation.

La transformation d'autres espèces de *Drosera* présentant une plus grande surface foliaire et produisant de plus grande quantité de glu est une autre perspective. En effet, les espèces *Drosera regia* (Figure 64, A) ou *Drosera adelae* (Figure 64, B) sont de meilleures productrices de liquide digestif que *Drosera rotundifolia*. Sans pour autant envisager une production industrielle avec ces plantes, l'obtention de transformants de ces espèces permettrait de réaliser plus facilement la mise en évidence des protéines d'intérêt dans les feuilles et dans la glu, grâce à une biomasse disponible plus importante. Des tests de régénération *in vitro* ont d'ores et déjà été effectués sur des feuilles de *Drosera adelae*, sur une balance hormonale auxine/cytokinine. Les résultats obtenus nous ont montré qu'il était possible, tout comme *Drosera rotundifolia*, de régénérer cette plante par la voie directe (Figure 64, C). Les conditions de transformation génétique pourraient être étudiées et déterminées, afin de transformer cette plante avec nos deux gènes humains.



Figure 64 : Espèces de *Drosera* à grandes feuilles : *Drosera regia* et *Drosera adelae*. A : Feuilles de *Drosera regia* (jardin botanique du Montet). **B :** *Drosera adelae* (jardin botanique du Montet). **C :** Observations sous loupe binoculaire de bourgeons néoformés sur feuilles de *Drosera adelae* (régénération directe).

CHAPITRE 2 : Etude du potentiel de la technologie PAT Friday® appliquée au genre Nepenthes

Etude quantitative et qualitative des protéines contenues dans les urnes de *Nepenthes*, Mise en évidence et contrôle de l'activité protéasique.

Nous avons montré dans le chapitre 1 que des plantes carnivores transgéniques telles que les *Drosera rotundifolia* sont capables d'excréter des protéines recombinantes marqueurs fonctionnelles qui ne sont pas altérées par les protéases naturelles présentes dans la glu. Nous avons également montré leur capacité à synthétiser des protéines recombinantes humaines.

Ces résultats ont mené à la demande d'un dépôt de brevet. Après réception d'un rapport préliminaire très positif, l'INPI (Institut National de la propriété intellectuelle) a confirmé les droits à la propriété intellectuelle pour PAT SAS sur ce procédé innovant. Dans ce brevet, le genre *Drosera* mais aussi les autres genres de plantes carnivores sécrétrices de fluides digestifs ont été revendiquées.

Drosera rotundifolia est un excellent modèle expérimental qui nous a permis de réaliser une preuve de concept de la technologie très rapidement (environ 8 mois). Cependant, ce ne sont pas des plantes adaptées à la production industrielle de protéines recombinantes. Ceci est du à leur taille et à leur biomasse limitées, et à leur faible production de liquide protéique à la surface des feuilles (en terme de volume). De plus, les gouttelettes de glu sont difficiles à récupérer ce qui rendrait la collecte en conditions industrielles très fastidieuse.

L'objectif est donc d'étendre cette technologie à une autre plante mieux adaptée : Les plantes du genre *Nepenthes* nous ont semblé être d'excellentes candidates. La production d'urnes pouvant contenir un large volume de fluide protéique extracellulaire, très facile à collecter par simple retournement du piège, sont des atouts majeurs de ces plantes.

Leur potentiel industriel à produire des protéines recombinantes a donc été réellement évalué au travers d'une étude quantitative et qualitative des protéines contenues dans les fluides digestifs. L'étude quantitative a été menée sur l'espèce *N. alata* (biomasse disponible au jardin Botanique du Montet de Villers les Nancy permettant de nombreuses mesures) et sur d'autres espèces disponibles au jardin botanique de Montet présentant des urnes viables, pour pouvoir les comparer entre elles, et identifier celle qui serait la mieux adaptée à la production de protéines recombinantes. Pour les études qualitatives, l'espèce hybride *Nepenthes* x *ventrata* (*N. ventricosa* x *N. alata*) a été choisie préférentiellement de part son approvisionnement relativement aisé (disponible en jardinerie), et sa capacité à produire un

grand nombre de pièges (sécrétions disponibles pour les expérimentations). Le contrôle des protéases contenues dans les urnes a également été étudié.

1. Etude quantitative des protéines des fluides digestifs de Nepenthes

Les études réalisées dans cette première partie n'ont pour l'heure, qu'une valeur indicative. En effet, il s'agit de résultats préliminaires ayant comme objectif d'évaluer le potentiel du modèle *Nepenthes* au sein de la technologie PAT Friday®. La première étape de cette étude a consisté à quantifier les protéines totales contenues dans les sécrétions digestives des urnes du genre *Nepenthes*. Nous avons ensuite vidé des urnes de leurs sécrétions et nous avons observé plusieurs paramètres durant cinq semaines : éventuel remplissage, volume de fluide produit et concentration protéique de ce nouveau fluide. Les différentes espèces utilisées pour cette étude sont présentées sur la figure 65.

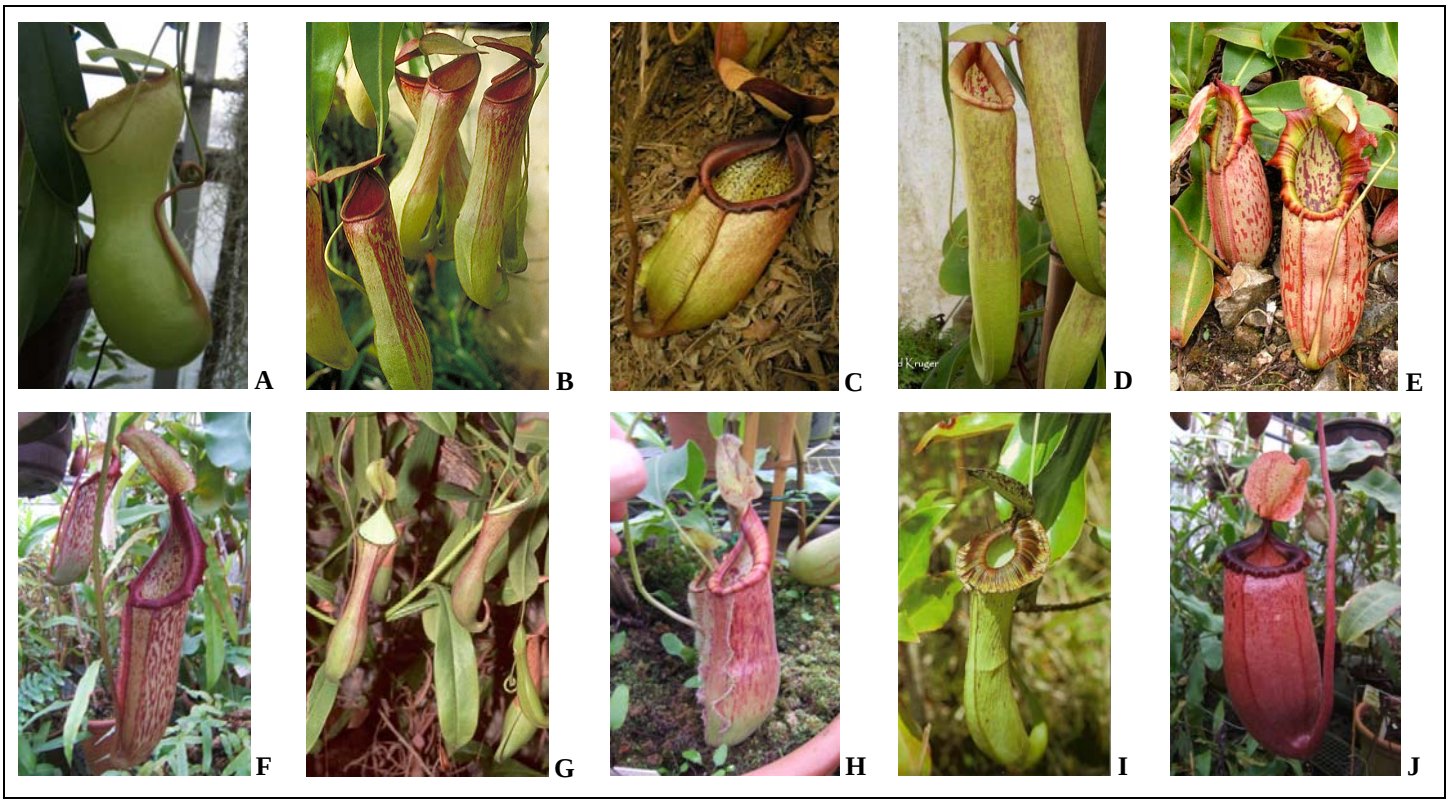


Figure 65 : Urnes des différentes espèces de *Nepenthes* utilisées pour l'étude quantitative des protéines des fluides digestifs. A : *N. ventricosa*. **B** : *N. khasiana*. **C** : *N. merilliana*. **D** : *N. thorelii*. **E** : *N. northiana*. **F** : *N. x mixta*. **G** : *N. x hybrida*. **H** : *N. x wrigleyiana*. **I** : *N. mirabilis*. **J** : *N. sibuyanensis*.

1.1. Quantification des protéines totales dans les fluides digestifs

➢ *Nepenthes alata* adultes

15 échantillons de fluides protéiques (1 ml) ont été prélevés dans des urnes ouvertes distinctes sur une dizaine de *N. alata* différents. Ces prélèvements ont été effectués sur des plantes de taille adulte (pieds de 3-4 ans) dont nous disposions au laboratoire et sur des *N. alata* du jardin botanique du Montet de Villers-les-Nancy. Les protéines totales contenues dans les échantillons ont été dosées par fluorimétrie à l'aide du Qubit TM fluorometer (Invitrogen) (5.3. Matériels et Méthodes). Les résultats sont présentés en figure 66.

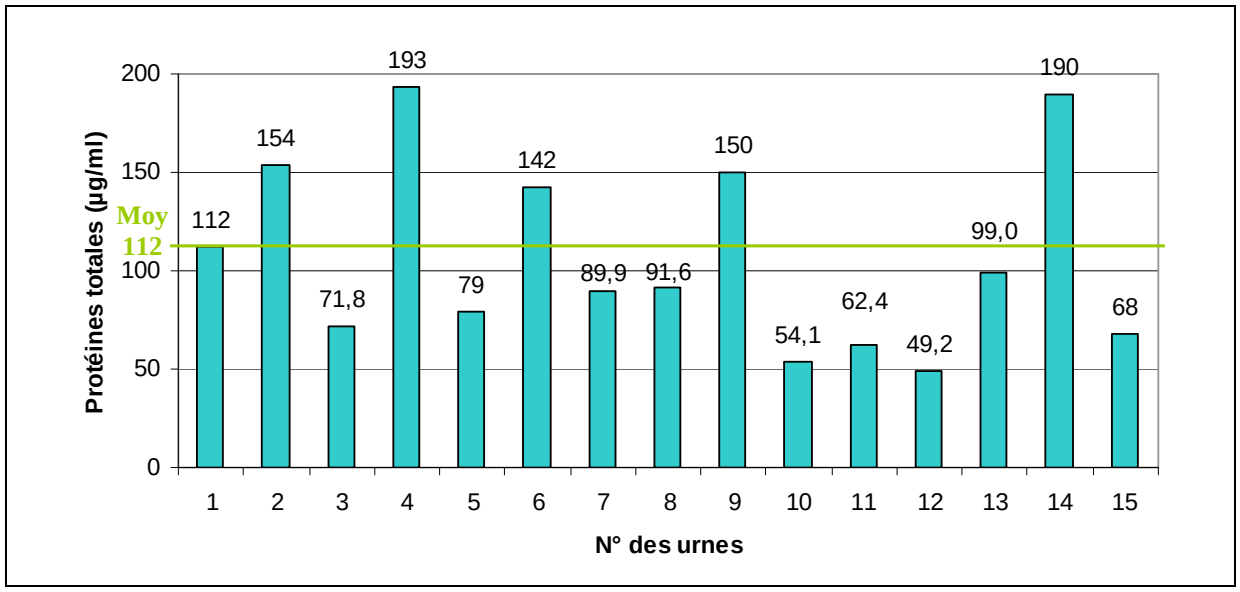


Figure 66 : Dosage des protéines totales (µg/ml) des fluides protéiques de différentes urnes de *N. alata* adultes.

La concentration en protéines totales des fluides digestifs collectés dans différentes urnes de *Nepenthes alata* s'élève en moyenne à **112 µg/ml** de sécrétion (soit 112 mg/L) et peut atteindre des concentrations proches de **200 µg/ml** pour les fluides les plus riches. Les concentrations les plus faibles mesurées sont d'environ **50 µg/ml**.

Au cours de cette expérience, des dosages ont également pu être réalisés sur des urnes fermées de *Nepenthes alata*. Des concentrations similaires ont pu être observées.

➢ Autres espèces adultes

D'autres échantillons de fluides digestifs ont été prélevés dans des urnes ouvertes d'autres espèces de *Nepenthes* afin de les comparer entre elles et de voir comment se situe la productivité protéique de *Nepenthes alata* au sein du genre.

Les espèces adultes disponibles au jardin botanique du Montet, qui présentaient des urnes ouvertes en bonne santé, ont pu être testées :

- *N. ventricosa* et *N. khasiana* de haute altitude,
- *N. merilliana* (grosses urnes rivalisant avec celles de *N. rajah*), *N. thorelii* et *N. northiana* (très grosses urnes jusqu'à 35cm de haut) de basse altitude,
- et les hybrides *N.* x *mixta* (*N. northiana* x *N. maxima*), *N.* x *hybrida* (*N. gracilis* x *N. khasiana*), *N.* x *wrigleyana* (*N. stewartii* = (*N. mirabilis* x (*N. rafflesiana* x *N. ampullaria*).

Un échantillon de fluide protéique (1 ml) a été prélevé pour chaque espèce. La concentration en protéines totales des différents échantillons a été dosée. Les résultats sont présentés sur la figure 67. A titre de comparaison, les résultats obtenus sur *N. alata* (moyenne et écart-type des 15 dosages de la figure 66) sont intégrés au graphique.

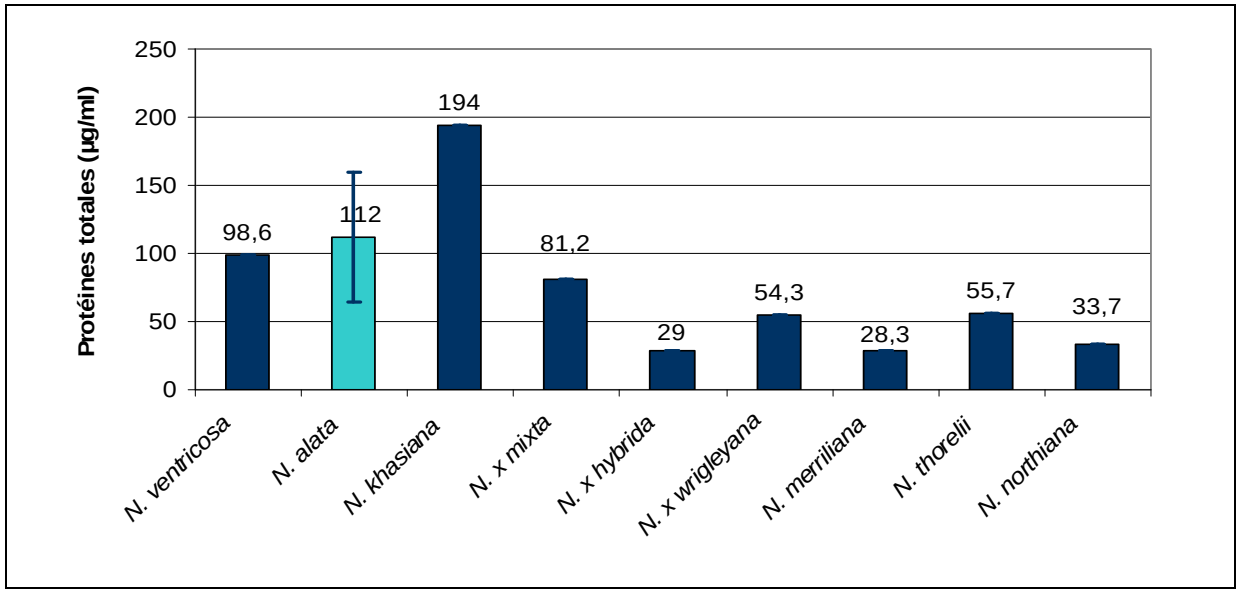


Figure 67 : Dosage des protéines totales (µg/ml) des fluides protéiques d'urnes de différentes espèces *de Nepenthes*. Pour *N. alata*, le dosage correspond à la moyenne des 15 relevés obtenus précédemment, avec l'écart type correspondant.

Les concentrations en protéines totales relevées sont comprises entre 28,4 µg/ml pour *N. merilliana* et 194 µg/ml pour *N. khasiana*, et sont le plus souvent inférieures à 100 µg/ml. Le fluide protéique de *N. alata* présente même une concentration assez élevée en protéines totales par rapport aux autres espèces. Elle atteint pour certaines urnes des valeurs proches de 200 µg/ml comme observées pour *N. khasiana*. Les deux plantes présentant les plus grosses urnes *N. merilliana* et *N. northiana*, et donc des volumes plus importants de sécrétions, ne

contiennent pas des quantités très élevées de protéines : 28,3 et 55,7 µg/ml. Ces dosages n'ont pas été répétés, il est donc difficile de conclure sur un éventuel effet dilution dû au grand volume de l'urne et de liquide. D'après le dosage précédent, ce sont les espèces d'altitudes (*N. ventricosa*, *N. alata*, *N. khasiana*) qui présentent les concentrations en protéines les plus élevées dans les urnes.

- Espèces *in vitro*

Enfin, des dosages sur des urnes de plantes cultivées *in vitro* ont été menés. Dans ces conditions, les pièges des plantes sont très petits (de l'ordre de 1 à 2 cm de haut), et le volume de fluide s'élève à seulement quelques microlitres par urne. Il est même très visqueux et collant par rapport aux sécrétions des pièges de plantes cultivées en serre. Nous disposions de 3 espèces différentes en conditions *in vitro* : *N. rafflesiana*, *N. ventricosa*, *N. alata*. 3 prélèvements par espèces dans 3 urnes distinctes ont pu être faits. Les moyennes et écart-types de ces dosages sont présentés figure 68.

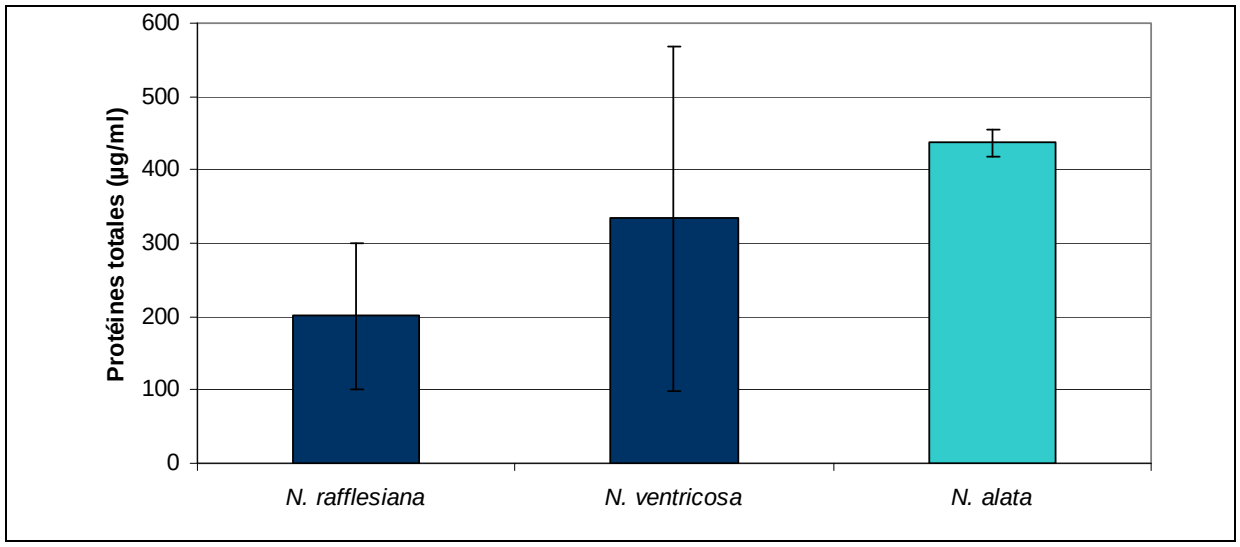


Figure 68 : Dosage des protéines totales (µg/ml) des fluides protéiques d'urnes de 3 espèces *de Nepenthes* cultivées en conditions *in vitro*.

En conditions *in vitro*, les fluides digestifs contenus dans les urnes sont 2 à 4 fois plus concentrés en protéines totales qu'en conditions *ex-vitro*. Le fluide étant visqueux et son volume étant très faible, une hypothèse pour expliquer ces fortes concentrations en protéines totales serait que le liquide est très peu dilué dans ces urnes miniatures. Le liquide des pièges de *N. alata* présente la concentration la plus élevée en protéines, avec une moyenne de 437 µg/ml.

Ces mesures ont donc révélé que le liquide digestif des urnes de plantes adultes du genre *Nepenthes* contenait entre 20 et 200 µg/ml de protéines totales. *N. alata* et *N. khasiana* présentent des taux protéiques dans leurs secrétions assez élevés par rapport à d'autres espèces. Mais le rendement en protéines totales d'une plante dépend non seulement de la concentration en protéines dans les secrétions digestives mais aussi du nombre d'urnes et du volume que celles-ci contiennent. Ces paramètres sont étudiés dans la partie suivante.

1.2. Evaluation du rendement en protéines totales de la technologie PAT Friday® appliquée au genre *Nepenthes*

1.2.1. Volume de fluides digestifs par urne

Afin d'évaluer le rendement d'un piège en protéines totales, le volume de secrétions digestives a été mesuré sur des urnes de différentes espèces au jardin Botanique du Montet. Ces valeurs sont à prendre avec précaution, car nous ne contrôlons pas toutes les conditions de culture au jardin botanique et nous ne sommes pas à l'abri d'un arrosage accidentel vers les urnes (même si l'opercule protège d'une dilution des sécrétions par l'eau de pluie). Huit ascidies ouvertes depuis 4 semaines ont été choisies sur différentes plantes : *N. ventricosa*, *N. alata*, *N.* x *mixta* (*N. northiana* x *N. maxima*), *N.* x *hybrida* (*N. gracilis* x *N. khasiana*), *N. x wrigleyana*, *N. merilliana*, *N. thorelii*, *N. northiana*. Elles présentent des pièges de tailles variables : *N. merilliana* et *N. northiana* étant des espèces qui présentent de très gros pièges. La croissance des urnes étant terminée à ce stade, elles présentent un volume maximal de sécrétions. Les valeurs mesurées sont présentées en figure 69.

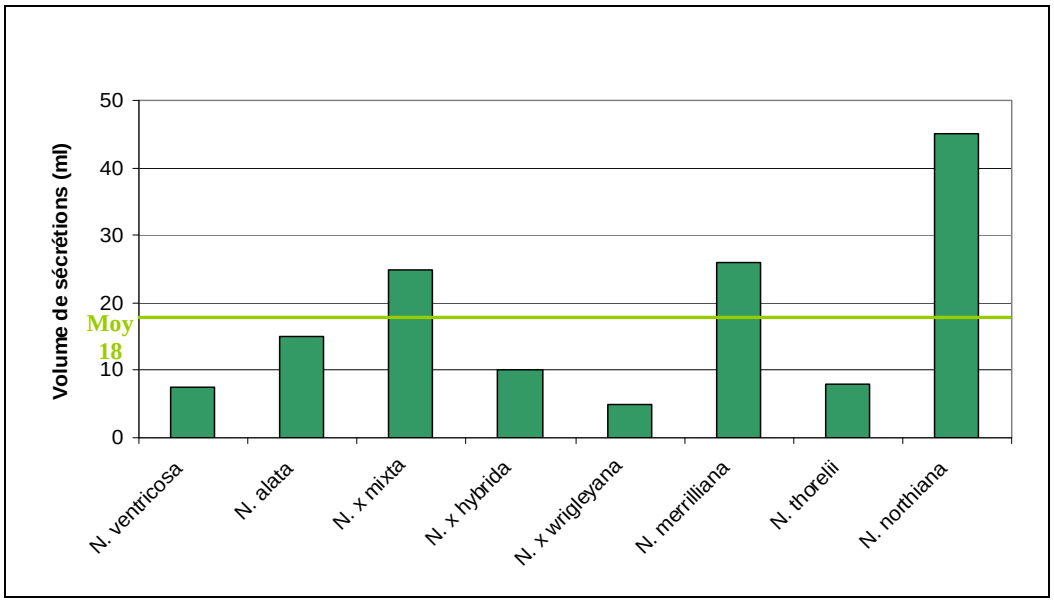


Figure 69 : Volume de sécrétions digestives contenues dans des pièges matures de différentes espèces de *Nepenthes* (en ml).

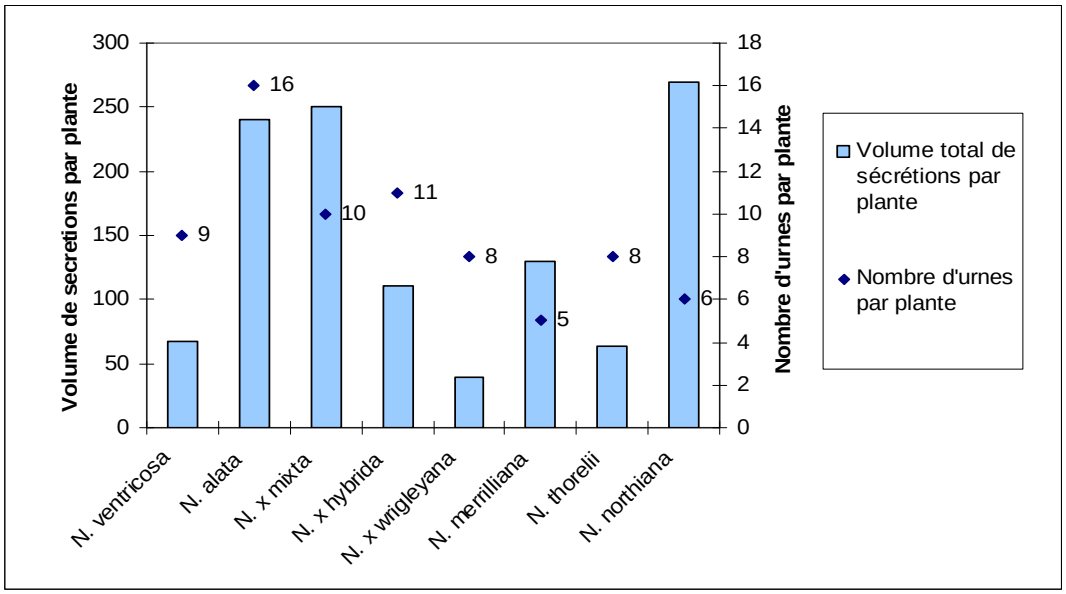
Le volume des secrétions mesuré dans les urnes est variable suivant les espèces et surtout suivant le volume des pièges. En effet, *N. merrilliana*, *N. mixta* et *N. northiana* présentent toutes trois des urnes de grandes tailles et atteignent les plus grands volumes observés : 26, 25 et 45 ml. Les plantes présentant de plus petites urnes contiennent de 5 à 16 ml de fluides digestifs par piège. Le volume moyen atteint sur ces 8 espèces est de 18 ml/urne. Cependant, le rendement estimé de protéines par plante dépend non seulement du volume de sécrétions par piège et de leur concentration, mais également du nombre de pièges par plante et du temps nécessaire à leur renouvellement.

1.2.2. Nombre d'urnes et volume total de sécrétions par plante

Sur les plantes de l'expérience précédente (paragraphe précédent 1.2.1.), le nombre de pièges viables a été relevé à un instant T. La production de sécrétion par plante a donc pu être évaluée.

Le volume de sécrétion par plante a été calculé en multipliant le nombre d'urnes viables par plante par le volume relevé dans l'urne de l'espèce en question. Cependant, ces données ne sont qu'une estimation de la productivité des plantes sur le temps nécessaire à renouveler tous les pièges. Celui-ci est variable suivant les espèces. De plus, toutes les urnes d'une même plante n'ont pas exactement le même volume. Mais ces valeurs nous donnent une

indication sur la capacité de production des différentes espèces. Les résultats sont présentés sur la figure 70.



<u>Figure 70</u> : Evaluation du volume de sécrétions (en ml) atteint par plante pour différentes espèces du genre *Nepenthes* sur le temps nécessaire au renouvellement de tous les pièges.

Nepenthes alata est la plante qui comportait le plus d'urnes viables au moment de l'observation : 16 pièges ayant la capacité de piéger et de digérer des insectes. Même si une urne de *N. alata* ne produit pas un très grand volume de sécrétions, le nombre élevé de pièges viables lui permet d'atteindre un rendement élevé par rapport aux autres espèces. Celles qui présentent des pièges de grandes tailles possèdent moins d'urnes viables : seulement 5 ou 6 simultanément pour *N. merrilliana* et *N. northiana*. Ces 2 plantes (ainsi que *Nepenthes mixta*), malgré le grand volume dont elle dispose par urne, ne sont pas forcément de plus grand producteur de sécrétions que *N. alata*.

Les plantes du genre *N. mixta* ou *N. northiana* présentent des volumes sécrétoires du même ordre de grandeur que *N. alata*. Mais le temps de renouvellement des pièges est beaucoup plus long chez ces espèces (seulement 1 piège par mois voire tous les 2 mois, soit un temps de renouvellement estimé entre 6 et 12 mois). Il leur faut donc beaucoup plus de temps pour produire les mêmes volumes de sécrétions que *N. alata*.

En effet, *Nepenthes alata* a un taux de renouvellement des pièges relativement élevé : cultivée dans des conditions optimales de température, de lumière et d'humidité, et d'après nos observations, la plante est capable de produire 3 à 4 nouveaux pièges par mois. Le temps de renouvellement des pièges peut donc être estimé entre 4 et 6 mois. Le volume de sécrétion

produit par un pied de *N. alata* sur cette période s'élèverait donc à 240 ml. Ce volume « récupérable » pour la production de protéines recombinantes pourrait être augmenté relativement facilement dans le cas ou plusieurs collectes de fluides digestifs par piège seraient possibles.

1.2.3. Suivi du remplissage des urnes de *Nepenthes* et du taux de protéines des nouvelles sécrétions après vidange.

Dans cette partie, nous avons étudié le remplissage des urnes, une fois vidées de leurs sécrétions. En effet, il n'est pas évident que le piège ait la faculté de se remplir à nouveau, et à ré-excréter un liquide digestif concentré. L'expérience a été réalisée sur des urnes vidangées à deux stades de leur développement : à l'ouverture de l'opercule, et 2 à 3 semaines après l'ouverture.

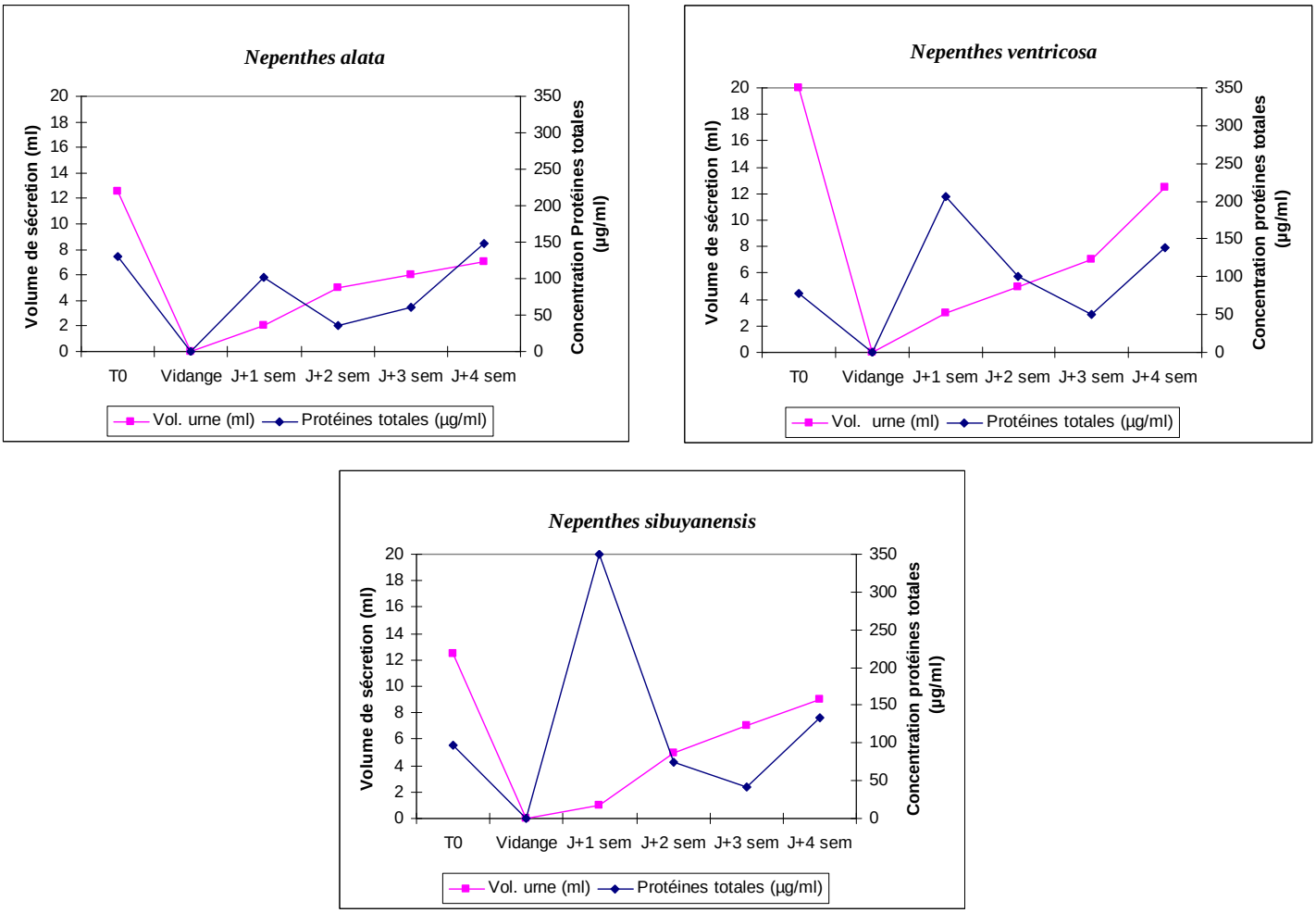
1.2.3.1. Suivi sur des urnes vidangées 2 à 3 semaines après ouverture

Dans le cadre de cette expérience, 3 urnes ouvertes depuis 2 à 3 semaines de 3 espèces de *Nepenthes* différentes ont été marquées, vidées et suivies pendant 4 semaines au jardin Botanique du Montet : *N. alata*, *N. ventricosa*, et *N. sibuyanensis*, espèce des Philippines présentant des urnes inférieures de taille comparable à celle de *N. rajah*. Avant d'être vidées, le volume de sécrétions a été mesuré et quelques microlitres ont été prélevés afin de doser les protéines totales. Au préalable, la taille des urnes a été mesurée et le nombre d'urnes par pied a été relevé (tableau 7).

Plante	Hauteur (cm)	Périmètre de la partie inférieure (cm)	Volume total de sécrétion après ouverture T0 (cm^3)	Nombre d'urnes par plante
N. alata	15	18	12,5	16
N. ventricosa	19	22	25	9
N. sibuyanensis	12	20	5	7

Tableau 7 : Caractéristiques des urnes utilisées pour le suivi du remplissage (après vidange) et de la concentration en protéines totales des nouvelles sécrétions.

Chaque semaine, ces mêmes paramètres ont été suivis : volume des nouvelles secrétions, et dosage des protéines dans l'éventuel fluide nouvellement excrété. Les résultats pour chacune des plantes sont présentés en figure 71.



<u>Figure 71</u> : Suivi sur 4 semaines du remplissage des urnes vidées 2 à 3 semaines après ouverture de 3 espèces de *Nepenthes* et de leur concentration en protéines totales : *N. alata*, *N. ventricosa* et *N. sibuyanensis*.

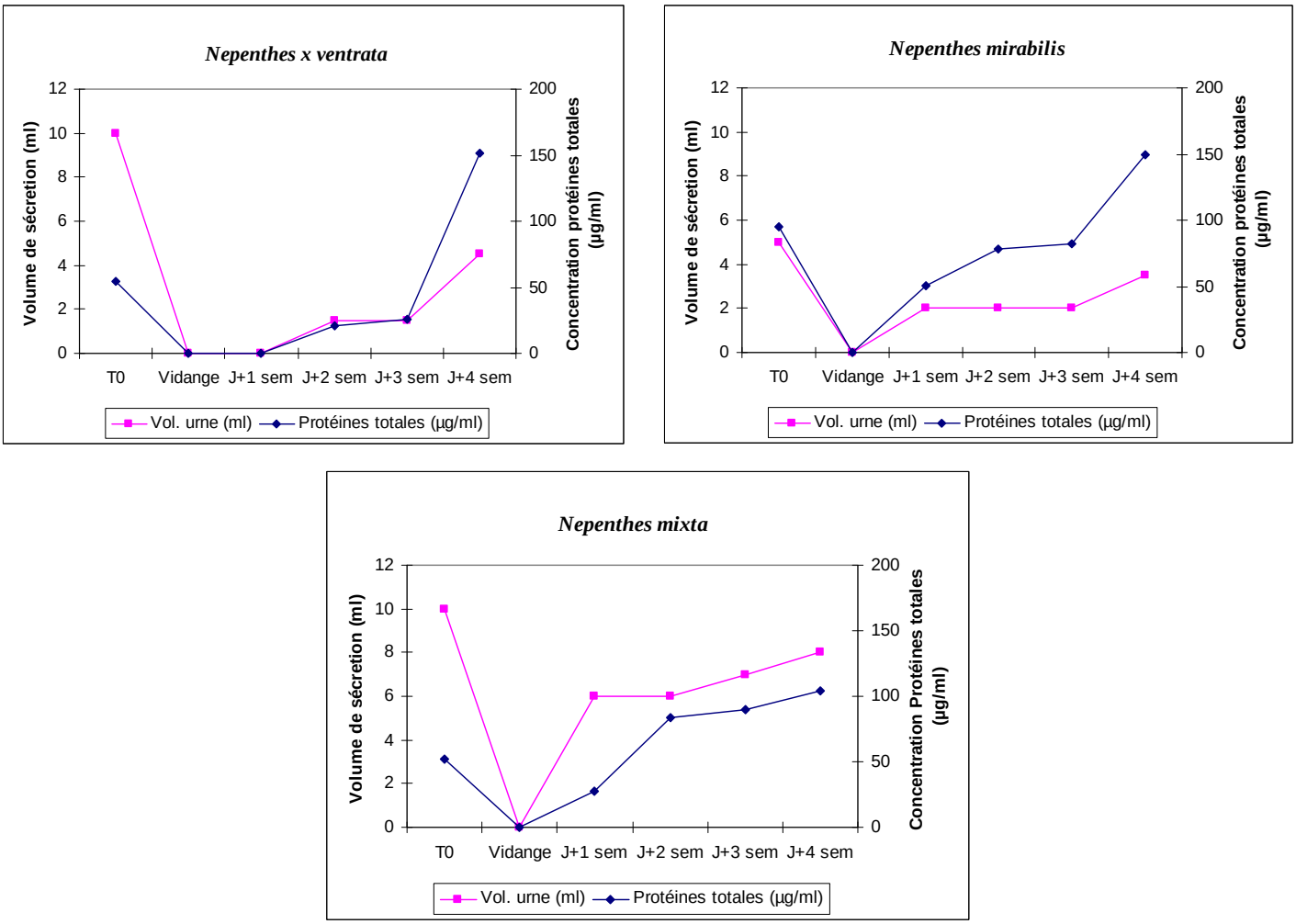
On observe que, suite à la vidange, les urnes suivies sécrètent toutes à nouveau et progressivement des fluides digestifs. Le volume atteint après 4 semaines représente de 0,56 à 0,72 fois le volume de sécrétion initial. On remarque que dans la première semaine qui suit la vidange, le fluide nouvellement sécrété est très concentré en protéines totales. On observe ensuite 2 à 3 semaines après la vidange une diminution de la concentration en protéines. La sécrétion continue de fluide semble diluer les protéines contenues dans l'urne. Puis la concentration en protéines augmente de nouveau après 3 semaines pour atteindre après 4 semaines une concentration en protéines de 1,15 à 1,77 fois plus élevée qu'au départ. Après 4

semaines de suivi, les urnes sont entrées en sénescence (absorption des nutriments digérés et mort du piège). Le suivi a donc été stoppé.

Le remplissage d'urnes ouvertes depuis 2 à 3 semaines après vidange est donc possible. On atteint après 4 semaines un volume de sécrétion inférieur à celui de départ mais il est plus concentré en protéines, ce qui donne des quantités de protéines produites très proches des quantités présentes initialement (de 0,64 - 0,99 et 1,1 fois les valeurs initiales pour *N. alata*, *N. sibuyanensis*, *N. ventricosa* respectivement). Après vidange, l'urne produit durant la première semaine des sécrétions très riches en protéines et donc très concentrées en enzymes digestives. Puis, cette concentration chute, suggérant que les sécrétions produites par la suite sont moins riches en protéines et diluent les premières sécrétions. Enfin, la concentration en protéines augmente de nouveau une à deux semaines plus tard : aucun insecte n'étant en décomposition dans les urnes, on en déduit que cette augmentation est due à une sécrétion d'enzymes plus intense. La production d'enzymes, après vidange de l'urne, semble de ce fait discontinue.

1.2.3.2. Suivi sur des urnes vidangées à l'ouverture

De même que précédemment, 3 urnes fraîchement ouvertes (depuis moins de 24h) de 3 espèces de *Nepenthes* différentes ont été marquées, vidées et suivies pendant 4 semaines au jardin Botanique du Montet : *N.* x *ventrata, N. mirabilis* et *N. mixta*. Le nombre d'urnes relevés est de 10 par pied pour *N.* x *ventrata* et *N. mirabilis* et de 9 pour *N. mixta.* Les résultats sont présentés en figure 72.



<u>Figure 72</u> : Suivi sur 4 semaines du remplissage des urnes vidées dans les 24h après ouverture de 3 espèces de *Nepenthes* et de leur concentration en protéines totales : *N. x ventrata*, *N. mirabilis*, et *N. mixta*.

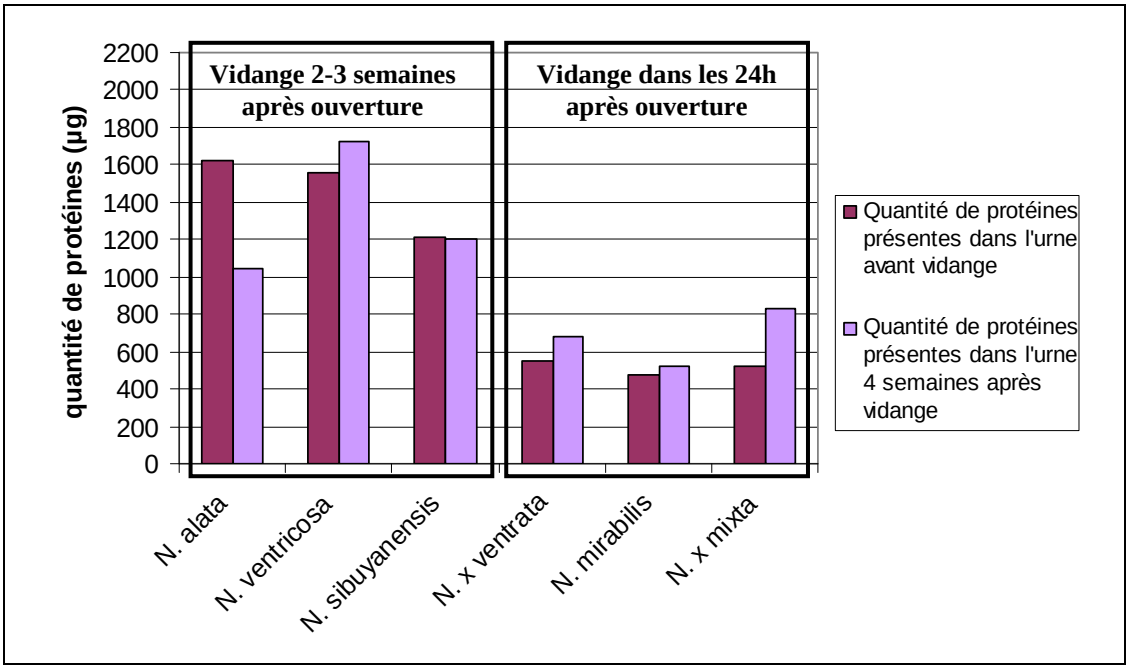
Après vidange, les glandes des urnes de *Nepenthes* secrètent de nouveau des fluides digestifs. Le volume atteint après 4 semaines de suivi représente 0,45 à 0,8 fois le volume présent initialement, valeurs relativement proches de celles atteintes dans l'expérience précédente. Pour *Nepenthes x ventrata*, le remplissage a été un peu plus long à s'amorcer que pour les 3 autres espèces. Le fait de vidanger les urnes à un stade plus précoce n'a pas d'effet particulier sur le volume des nouvelles secrétions.

Par contre, la concentration en protéines totales des nouveaux fluides sécrétés augmente continuellement sur les 4 semaines de suivi, pour atteindre des valeurs 1,6 à 2,75 fois plus élevées à la concentration initiale (avant vidange). Aucune fluctuation de la concentration des secrétions au cours du temps n'est observable. Il n'y a pas eu, comme précédemment, d'arrêt de la production d'enzymes. Au final, les quantités de protéines atteintes 4 semaines après vidange sur des urnes fraîchement ouvertes sont supérieures à celle

du départ : 1,1 - 1,24 et 1,6 fois plus élevées pour *N. mirabilis*, *N. x ventrata* et *N. mixta* respectivement.

Suite à ces 4 semaines de suivi, les urnes sont entrées en phase de sénescence. Elles n'auront été viables que 4 semaines, contre 6 à 7 semaines pour les urnes vidangées plus tardivement. Il se pourrait que la vidange à un stade précoce du développement de l'urne provoque un stress important et la mort prématurée du piège.

Suite à ces 2 suivis de remplissage, les quantités de protéines présentes avant et après vidange sur des urnes vidangées précocement ou à maturité ont été comparés. Les résultats sont présentés en figure 73.



<u>Figure 73</u> : Quantités de protéines présentes dans les urnes avant vidange et 4 semaines après vidange sur des urnes vidangées moins de 24h après ouverture ou 2 à 3 semaines après ouverture.

Finalement, la quantité de protéines obtenue 4 semaines après vidange sur des urnes vidangées dans les 24h après l'ouverture est plus élevée que la quantité présente avant vidange. Ce n'est pas toujours le cas pour les urnes vidangées 2 à 3 semaines après ouverture. Cependant, la figure 71 met bien en évidence, que les quantités finales obtenues dans le cas d'urnes vidangées à maturité sont bien supérieures à celle obtenues avec des urnes vidangées précocement. En effet, les urnes après l'ouverture continuent de se développer, et présentent un volume total plus grand qu'à l'ouverture et donc un volume de secrétions plus élevé. Dans les 2 cas, les pièges meurent 4 semaines après la première collecte. Seules 2 récoltes sur la

même urne semblent possibles. Etant donné les résultats obtenus lors des deux expériences précédentes, la première récolte doit être réalisée préférentiellement 2 à 3 semaines après ouverture du piège, et la deuxième lors de son entrée en sénescence.

Les résultats des expériences précédentes nous permettent de réaliser une estimation au plus proche de la réalité de la productivité annuelle de secrétions et de protéines par l'espèce *N. alata*. Il est possible de cultiver en serre 10 plantes par mètre carré. 2 collectes de 15 ml semblent possibles par urne, et la plante comporte environ 16 pièges viables en même temps. Un piège a une durée de vie de 1 mois et demi et le renouvellement des pièges est estimé entre 4 et 6 mois.

En conséquence, il semble possible de récolter entre **9 et 14 litres de sécrétions / m^2 / an** à condition que la plante produise de façon continue des pièges toute l'année. En se basant sur la concentration moyenne en protéines totales obtenue dans les secrétions en partie 1.1. (112 µg/ml), il serait possible d'obtenir entre **1 et 1,5g de protéines totales / m2 /an**, soit entre **10 et 15 kg de protéines totales / ha / an**. Ces résultats s'entendent sans optimisation particulière du processus de sécrétions des protéines chez *Nepenthes*.

2. Etude des enzymes natives des sécrétions des urnes de *Nepenthes*

Après avoir évalué quantitativement la production de protéines natives dans les sécrétions des urnes, nous avons cherché à étudier sa diversité protéique et son activité protéolytique. En effet, les inconvénients majeurs des systèmes d'expression végétaux pour la production de protéines recombinantes sont liés à la nécessité d'étapes lourdes d'extraction-purification de la protéine d'intérêt à partir d'un tissu végétal (feuilles, graines, chloroplastes…) où la protéolyse est possible (Benchabane *et al.*, 2008). Même si la protéine peut être adressée vers un organe particulier, facilitant les premières étapes de l'extraction, elle n'en reste pas moins emprisonnée au sein de la matrice du tissu végétal, riche en polyphénols, protéines, polysaccharides, rendant sa purification fastidieuse et pouvant altérer son intégrité structurale.

2.1. Etude des protéines sécrétées dans les urnes de *Nepenthes*

Afin d'évaluer la difficulté de ces étapes dans notre système PAT Friday®, 100µl de fluide digestif d'urnes fraichement ouvertes (sans insectes en décomposition, pour ne visualiser que les enzymes et non des peptides résultants de la digestion d'une proie) ont été prélevés sur trois espèces différentes : *N. rafflesiana*, *N. ventricosa*, *N. alata*. Le fluide a été concentré (dix fois) par précipitation à l'acétone (Matériels et méthodes, 5.2.) pour ensuite être analysé sur SDS-PAGE (environ 10 µg de protéines totales ont été déposés par puits) après dénaturation (Figure 74).

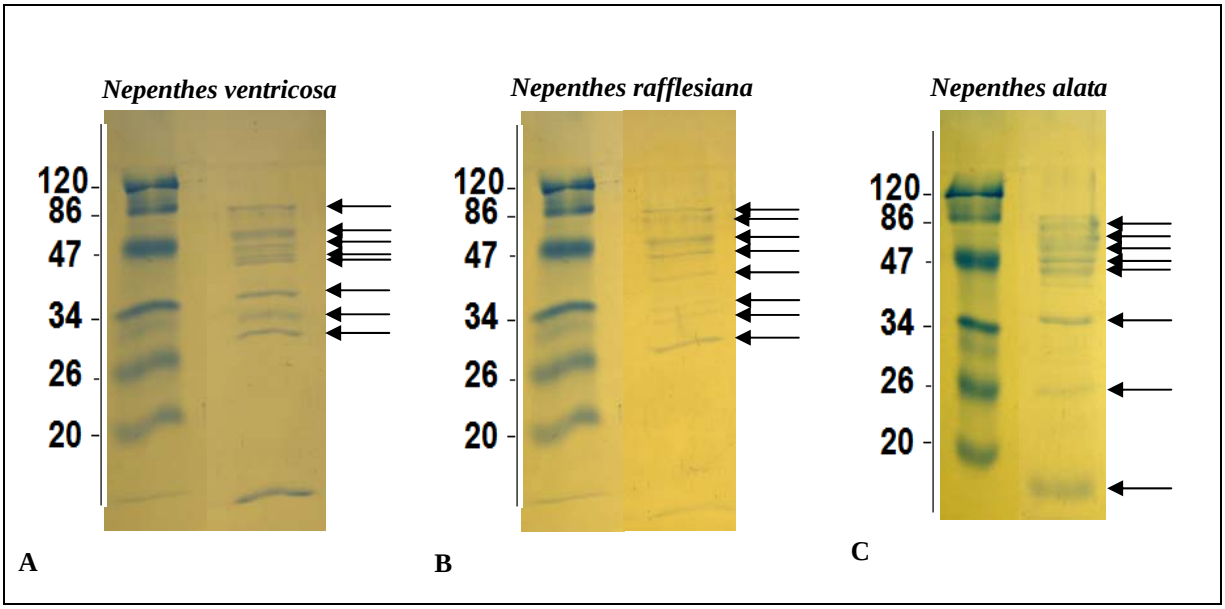


Figure 74 : Migration sur SDS-PAGE des secrétions préalablement concentrées (x10) d'urnes de *N. rafflesiana, N. ventricosa, N. alata*.

Après séparation et coloration, on obtient sur les gels de polyacrylamide de 8 à 9 protéines de tailles apparentes comprises entre 80 et 15 kDa. Suivant les espèces, on observe des profils légèrement différents, preuve que toutes les espèces du genre *Nepenthes* ne secrètent pas exactement les mêmes enzymes et que la plante s'adapte à la biodisponibilité de la faune endémique (Athauda *et al.*, 2004). Comme décrit dans la bibliographie, une équipe japonaise (Hatano and Hamada, 2008) a très récemment émis des hypothèses sur la fonction des protéines issues des sécrétions de *N. alata* en cherchant les pourcentages d'homologies de séquences avec des protéines déjà connues (Bibliographie, figure 23, p 88). 3 sont impliquées directement dans la digestion des proies, une dans le processus d'ouverture de l'urne, et les 3 autres dans le contrôle du développement de bactéries dans les sécrétions.

Dans tous les cas, pour les 3 espèces testées, la composition protéique du fluide digestif de *Nepenthes* est relativement simple : moins de dix protéines distinctes présentes.

Il est un peu tôt, à ce stade, pour évaluer la production de protéines recombinantes dans le système PAT Friday®, mais si la protéine d'intérêt est sécrétée en présence de 10 autres protéines naturelles, il serait raisonnable d'en attendre un taux de l'ordre de 1 à 10% (par rapport aux protéines totales) dans les sécrétions des urnes.

Cependant, l'avantage majeur de la technologie n'est pas la productivité en elle-même, mais bien le fait que les protéines sont naturellement excrétées dans des sécrétions liquides extracellulaires (plus d'étape d'extraction, collecte directe) de composition protéique relativement simple. Elles seront par conséquent plus faciles à purifier que des protéines accumulées dans un organe végétal (comme une graine, ou un fruit).

L'élimination de l'étape d'extraction dans le cas de PAT Friday® est loin d'être un élément négligeable. En effet, l'extraction de protéines est souvent considérée comme une étape préliminaire relativement simple par rapport à la procédure de purification. Mais elle a une influence considérable sur la stabilité et la nature des protéines extraites, et donc sur la qualité et l'abondance des protéines disponibles pour les étapes de purification ultérieures (Michaud and Asselin, 1995). Ce risque d'altération des protéines durant l'extraction est donc éliminé dans notre cas.

2.2. Mise en évidence de l'activité protéolytique du jus de *Nepenthes*

Outre la protéolyse *ex planta* pendant et après l'extraction de la protéine, un autre inconvénient majeur de la production de protéines recombinantes dans un système plante est la protéolyse *in planta* pendant l'expression (Benchabane *et al.*, 2008). En effet, dans notre cas, un autre risque est présent : les protéines d'intérêt seront produites dans les urnes de *Nepenthes* où sont sécrétées en même temps des protéases naturelles destinées à digérer des insectes. Nous avons, dans un premier temps, cherché à mettre en évidence cette activité protéolytique avant d'en étudier le contrôle.

100 µl de sécrétions d'urne ouverte de *Nepenthes* x *ventrata* ont été préalablement précipitées à l'acétone. Le culot de protéines obtenu a été remis en suspension dans 10 µl de tampon de migration. L'échantillon est additionné d'un tampon de charge non dénaturant et est mis à migrer sur zymogramme de gélatine à 0,1 %. Suite à l'électrophorèse, le gel est rincé

dans une solution de renaturation et est incubé 12h à 37°C (activité des enzymes à 70% à cette température (Athauda *et al.*, 2004)) dans un tampon à pH3 (acide citrique 8mM, phosphate disodique 4mM, voir Matériels et Méthodes, 6.3), pH optimal d'activité des enzymes (Athauda *et al.*, 2004). Enfin, la présence des protéines a été révélée par coloration du gel par la solution Page BlueTM Staining. Les résultats sont présentés en figure 75. La même expérience a été réalisée sur zymogramme de caséine à 0,1 % (gel non montré).

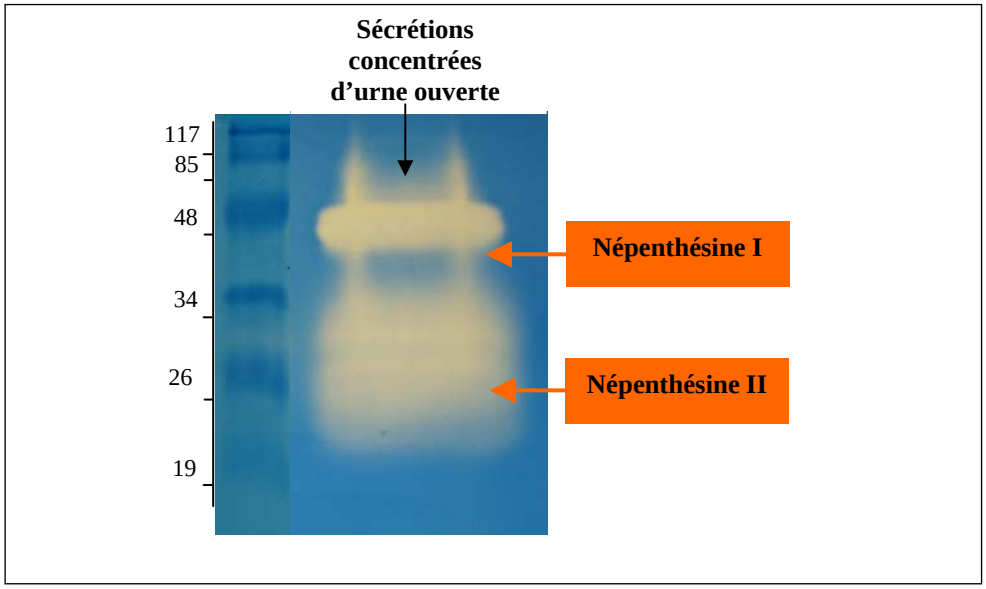


Figure 75 : Migration de sécrétions concentrées (5 fois) d'urne ouverte de *Nepenthes. x ventrata* sur zymogramme de gélatine bovine à 0,1% puis coloration au Page Blue™ Staining après incubation 12h dans un tampon pH 3 à 37°C.

Le zymogramme obtenu (figure 75) présente deux plages de lyse distinctes. Ceci montre qu'à pH 3 et à 37°C, une activité gélatinolytique est présente dans les sécrétions des urnes de *Nepenthes alata*. Des résultats identiques ont été obtenus pour le zymogramme de caséine, montrant une activité caséinolytique dans les sécrétions. Or, seules deux protéases ont été identifiées dans les secrétions de *Nepenthes* (Athauda *et al.*, 2004 ; Hatano and Hamada, 2008). Les masses moléculaires exactes des népenthésines I et II de *N.* x *ventrata* ne sont pas connues, mais en conditions non dénaturantes, celles de *N. distillatoria* ont déjà été estimées à 35 et 45 kDa respectivement (Athauda *et al.*, 2004). Si on se base sur ces données, la plage de lyse blanche très marquée située entre 40 et 48 kDa pourrait être due à l'activité protéolytique de la népenthésine I. La deuxième plage de lyse située entre 23 et 34 kDa pourrait être causée par l'activité protéolytique de la népenthésine II. En zymogramme, les enzymes n'ont pas été dénaturées avant l'électrophorèse (pas de chauffage, ni d'ajout d'agents réducteurs). Elles peuvent donc migrer différemment par rapport à une électrophorèse

classique en conditions dénaturantes. De plus, la quantité d'échantillon déposé est peut être trop élevée. Ces éléments pourraient expliquer que les plages de lyse ne se situent pas exactement aux tailles attendues.

Dans tous les cas, que les plages de lyse soient dues à l'une des 2 enzymes, les sécrétions des urnes de *Nepenthes alata* présentent une activité protéolytique, qui pourrait altérer voire dégrader les protéines recombinantes excrétées dans le liquide digestif. Cependant, ce risque n'est pas spécifique aux plantes carnivores, il est également présent dans les autres systèmes d'expression végétaux (Rivard *et al.*, 2006). Mais le nombre très limité de protéases présentes dans les sécrétions des urnes (Athauda *et al.*, 2004 ; Hatano and Hamada, 2008) représente un avantage majeur. Ceci est extrêmement favorable au développement d'une stratégie de knock-down par ARN interférence, suggérant la possibilité de contrôler complètement la protéolyse. Dans un premier temps, une approche moins lourde a été étudiée. Les népenthésines ayant une activité optimale à pH acide (An *et al.*, 2002a ; Athauda *et al.*, 2004 ; Takahashi *et al.*, 2005 ; Hatano and Hamada, 2008), un contrôle pH-dépendant de la protéolyse des fluides digestifs pourrait être envisagé.

3. Contrôle de l'activité des protéases

Comme décrit dans la partie bibliographie, le pH des secrétions des urnes de *Nepenthes* semble jouer un rôle prépondérant dans la digestion et l'absorption des proies. Nous nous sommes demandés si l'activité des protéases pourrait être enrayée par une alcalinisation des secrétions, ou par l'ajout d'inhibiteurs.

3.1. Contrôle de l'activité des protéases par le pH

Nous avons dans un premier temps mesuré le pH du fluide digestif d'urnes ouvertes et fermées avant d'évaluer l'activité protéolytique des enzymes par zymogramme en fonction du pH. La stabilité de 3 protéines (bovine et humaine) incubées dans des secrétions acides et proches de la neutralité a également été étudiée.

3.1.1. pH des urnes

Le pH des sécrétions d'urnes ouvertes et fermées de *Nepenthes* a été mesuré. Cette expérience a été effectuée sur 8 plantes du Jardin botanique du Montet pour les urnes ouvertes

(depuis 2 à 3 semaines, sans présence apparente d'insectes en décomposition à l'intérieur), et sur 2 *N.* x *ventrata* dont nous disposions pour les urnes fermées (Sur les plantes de la collection au jardin botanique, nous ne pouvions pas ouvrir les urnes encore fermées pour prélever des sécrétions). L'utilisation d'urnes ouvertes au jardin botanique pose toujours le problème d'une dilution accidentelle due à l'arrosage.

En fonction de leur pH, et en se basant sur les travaux de Athauda et de ses collaborateurs, nous avons estimé l'activité protéolytique relative des différentes urnes (en se référant à l'activité protéolytique relative des sécrétions mesurées en présence d'hémoglobine dénaturée, Partie Bibliographie, Figure 22, p 86 (Athauda *et al.*, 2004)). Les résultats sont présentés en figure 76.

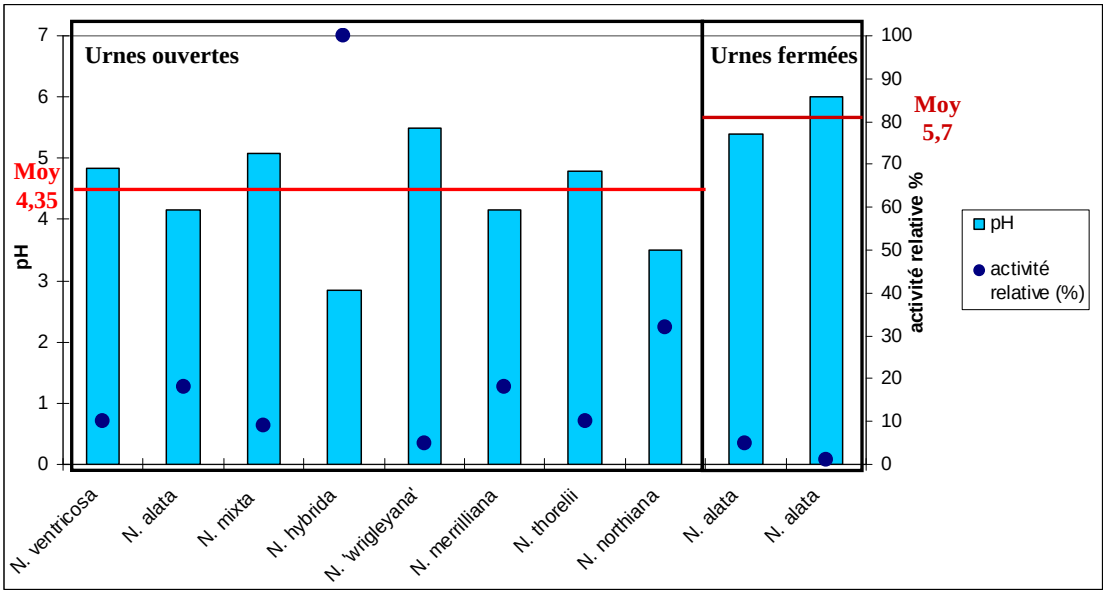


Figure 76 : Mesure du pH des sécrétions d'urnes fermées et ouvertes depuis 2 à 3 semaines, et estimation de l'activité protéolytique relative (%) du fluide au pH obtenu (en se basant sur l'activité protéolytique relative des secrétions mesurée en présence d'hémoglobine dénaturée (Athauda *et al.*, 2004))

Le pH moyen des urnes ouvertes est de 4,35, et varie entre 2,8 et 5,49. Nous ne disposions pas d'assez d'urnes fermées pour réaliser autant de mesures que pour les urnes déjà ouvertes. Sachant que l'ouverture forcée du piège provoque sa sénescence prématurée, nous n'avons pas voulu réitérer l'expérience à un autre moment, afin de disposer d'assez de pièges à maturité pour d'autres expérimentations. Nous avons observé un pH compris entre 5,4 et 6 pour les sécrétions d'urnes fermées. Leur activité protéolytique relative (basée sur la dégradation d'hémoglobine dénaturée) est inférieure à 5% à ces pH.

Ce résultat a également été observé par An et ses collaborateurs. Ils ont suivi le pH d'une urne au cours du temps, en présence ou en absence d'insectes : une urne fermée présente un pH aux alentours de 5, alors que celui d'une urne fraîchement ouverte (depuis 7 à 10 jours) chute à pH 2,5-3 en réponse à la présence d'insectes (An *et al.*, 2001). Sinon, en l'absence de capture de proies, le pH se maintiendrait autour de 5. L'acidification des urnes serait donc induit par l'ammonium (Higashi *et al.*, 1993), dérivant des insectes en décomposition (An *et al.*, 2001).

Dans la serre tropicale du jardin botanique, la présence d'insectes a déjà été observée. Même si nous avions choisi des urnes sans présence d'insectes apparents, il est possible que les pièges de *N. hybrida* et *N. northiana* aient déjà digéré des petits insectes avant notre mesure. Ceci expliquerait leurs pH plus acides que pour les autres urnes, et l'activité protéolytique *a priori* très élevée pour l'urne de *N. hybrida*. Pour les autres urnes ouvertes, le pH se maintient autour de 4-5, avec des activités relatives comprises entre 5 et 18%.

L'étude de l'activité protéolytique des sécrétions des urnes en fonction du pH a été approfondie par zymogramme.

3.1.2. Mise en évidence d'un contrôle pH-dépendant

Afin de contrôler complètement l'activité des enzymes protéolytiques des sécrétions et la protéolyse éventuelle de nos protéines d'intérêt, nous avons cherché à identifier des conditions de pH où elles seraient complètement inhibées.

3.1.2.1. Mise en évidence d'un contrôle pH-dépendant par zymogramme

Des sécrétions concentrées 5 fois à l'acétone d'urnes ouverte et fermée de *N.* x *ventrata* ont été analysées en zymogramme de gélatine 0,1% et de caséine 0,1%. Suite à l'électrophorèse, le gel a été rincé dans une solution de renaturation et a été incubé pendant 12h à 37°C dans des tampons à différents pH : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 (Matériels et Méthodes, partie 5.7, p 160). Deux substrats protéiques ont été choisis afin de vérifier si à un pH donné, les népenthésines agissent différemment ou non suivant la protéine présente. Les résultats pour les zymogrammes de gélatine sont présentés en figure 77.

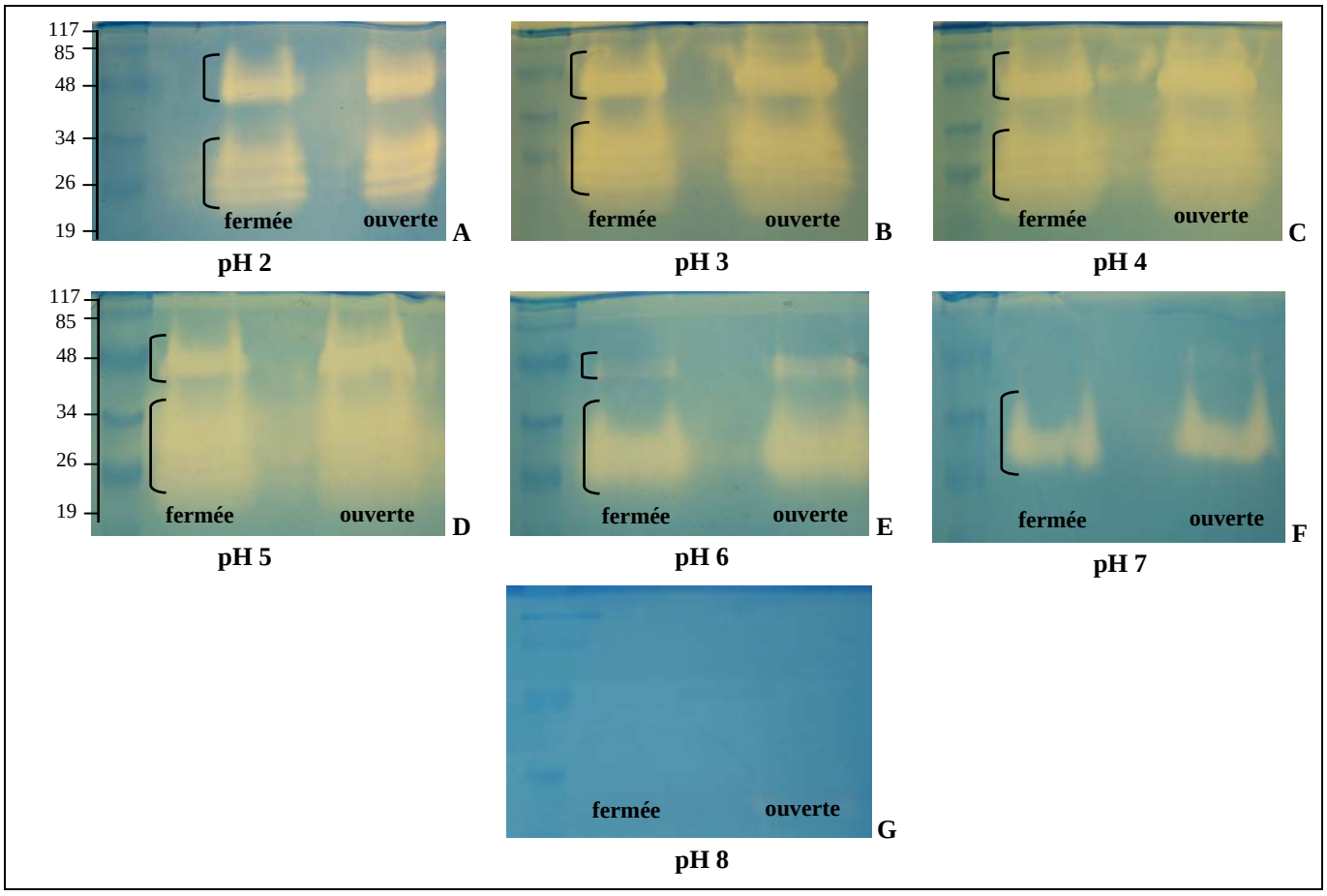


Figure 77 : Migration de sécrétions concentrées (5 fois) d'urne fermée (puit gauche) et ouverte (puit droite) de *Nepenthes.* x *ventrata* sur zymogramme de gélatine bovine à 0,1% puis coloration au Page Blue™ Staining après incubation 12h à 37°C dans un tampon à pH 2 (A), pH 3 (B), pH 4 (C), pH 5 (D), pH 6 (E), pH 7 (F), pH 8 (G).

Pour les gels incubés dans les tampons de pH 2 à 5, deux plages de lyse bien marquées sont présentes, et sont même plus importantes à pH 3 et 4 qu'à pH 2. Par contre à pH 6, la plage de lyse supérieure diminue en intensité pour disparaître totalement à pH 7. La plage de lyse inférieure quant à elle est toujours présente à pH 6 et 7. A pH 8, aucune plage de lyse n'est visible, les protéases sont complètement inhibées. Ces observations sont vraies pour les sécrétions d'urnes ouvertes comme pour celle d'urnes fermées. Ceci confirme que les urnes même avant ouverture, contiennent déjà toute la machinerie enzymatique nécessaire à la digestion des insectes. Si, comme supposé dans la partie 2.2 chapitre 2, la plage de lyse supérieure correspond à l'activité de la népenthésine I et la plage de lyse inférieure à l'activité de la népenthésine II, il s'avère que l'enzyme I serait inhibée à un pH plus faible (pH 6) que l'enzyme II (pH 8) pour la protéolyse de la gélatine. Mais peut-être en y avait il une plus grande quantité au départ. Comparons ces résultats avec ceux obtenus pour les zymogrammes de caséine (Figure 78).

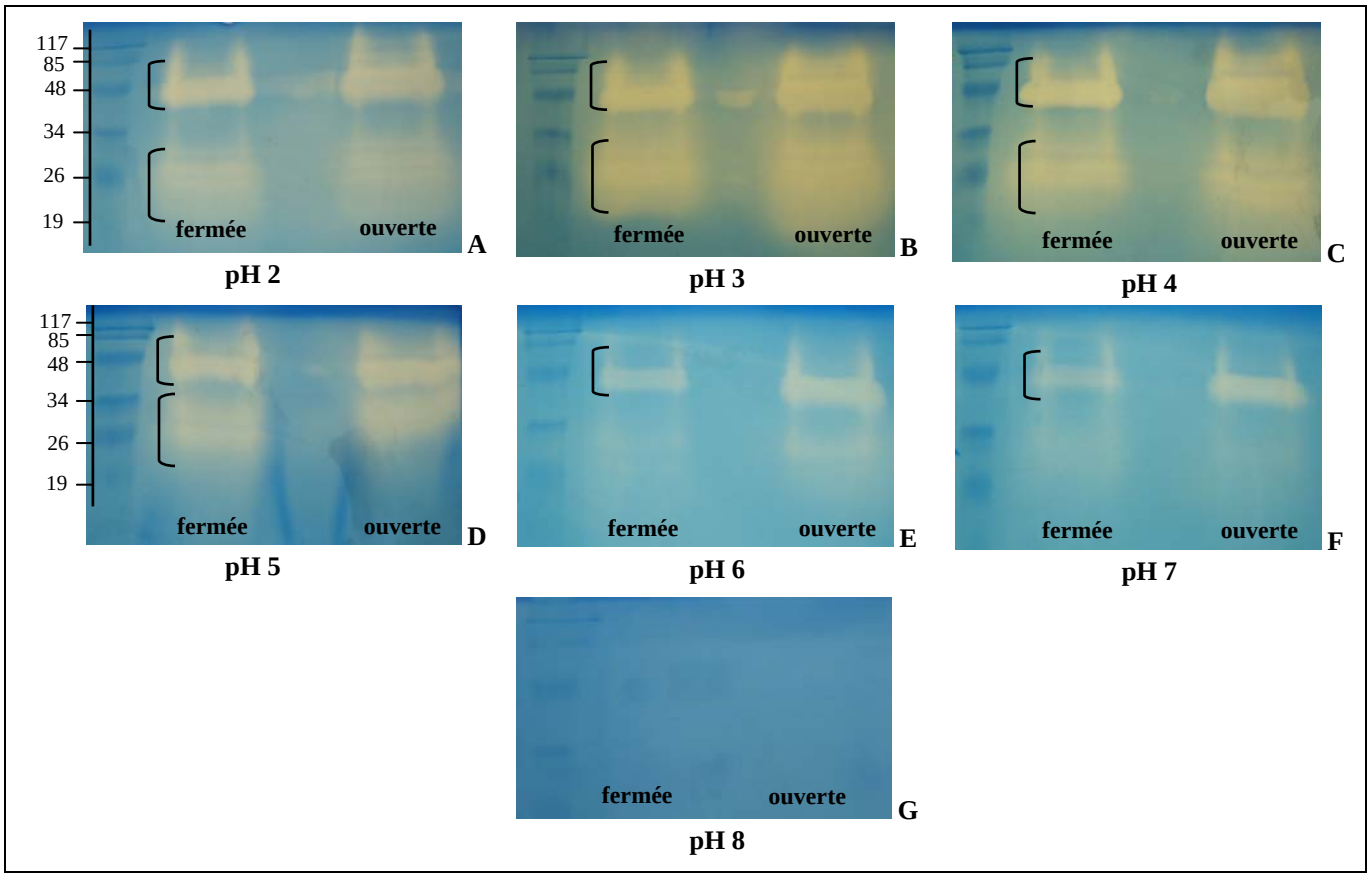


Figure 78 : Migration de sécrétions concentrées (5 fois) d'urne fermée (puit gauche) et ouverte (puit droite) de *Nepenthes.* x *ventrata* sur zymogramme de caséine à 0,1% puis coloration au Page Blue™ Staining après incubation 12h à 37°C dans un tampon à pH 2 (A), pH 3 (B), pH 4 (C), pH 5 (D), pH 6 (E), pH 7 (F), pH 8 (G).

De même, les plages de lyse sont bien présentes pour les zymogrammes incubés de pH 2 à 5. Cependant, elles sont moins marquées à pH 6, et cette fois c'est la plage de lyse inférieure qui diminue en intensité pour quasiment disparaître à pH 7. La plage de lyse supérieure reste présente. Enfin, à pH 8, les enzymes protéolytiques sont inhibées.

A un pH donné, l'activité des deux protéases semble varier suivant le substrat. En effet, pour la gélatine, à pH 6-7, la népenthésine II est encore apte à la dégrader. Alors que pour la caséine, aux mêmes pH, seule la népenthésine I est active. Une quantité d'enzymes différente dans l'échantillon déposé pourrait aussi être la cause de cette différence d'activité.

Dans tous les cas, pour un substrat comme pour l'autre, toute activité protéolytique est supprimée à pH 8. Ceci suggère qu'en alcalinisant le pH d'une urne, la protéolyse pourrait être maitrisée. Cependant, le pH des sécrétions d'une urne fermée est compris entre 5,4 et 6 d'après les observations précédentes (Figure 76). Pour les zymogrammes incubés à pH 6, une activité protéolytique pour la gélatine et la caséine est présente, même si elle est relativement

faible par rapport à celle observée à pH plus acide. Ceci suggère qu'avant l'ouverture de l'urne, une activité protéolytique est présente, et que la protéine d'intérêt produite pourrait déjà être altérée.

Or, les protéines recombinantes qui seront produites dans ces sécrétions (comme l'IFNγ ou le Facteur intrinsèque) présenteront des structures tridimensionnelles plus complexes (protéines ayant subi des maturations post traductionnelles complexes : glycosylation, assemblage en dimères, ponts disulfures…) que la gélatine ou la caséine, et pourraient, de ce fait, être plus stables et moins facilement dégradées (particulièrement à de faibles niveaux d'activité protéolytique). Cette hypothèse a été étudiée en réalisant des incubations de protéines plus complexes dans des sécrétions d'urnes de *Nepenthes* à différents pH.

3.1.2.2. Mise en évidence d'un contrôle pH-dépendant par incubation de protéines spécifiques dans du fluide digestif

3.1.2.2.1. incubation de BSA

La BSA (Albumine de sérum bovin) est une protéine non glycosylée de 66 kDa composée de 583 AA. A pH 5-7, elle contient 17 ponts disulfures. La structure secondaire est composée de 67 % d'hélices alpha, 10% de ponts et de 23 % de chaines étirées (Murayama and Tomida, 2004).

50 µg de BSA ont été incubés dans 200µl de sécrétions d'urne fermée et ouverte de *N.* x *ventrata* à pH initial, et à pH alcalinisé pour le fluide de la même urne ouverte. Des prélèvements de 10 µl ont été réalisés après 10 min, 20 min, et 30 min d'incubation. Ces échantillons ont été immédiatement dénaturés par chauffage à 95°C (après ajout de 10µl de tampon de charge : Tris HCl pH 6,8 125mM, SDS 5%, Glycérol 20%, β-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,05%) et séparés par SDS-PAGE. Après coloration, la présence éventuelle de la protéine incubée a été révélée. Les résultats sont présentés en figure 79.

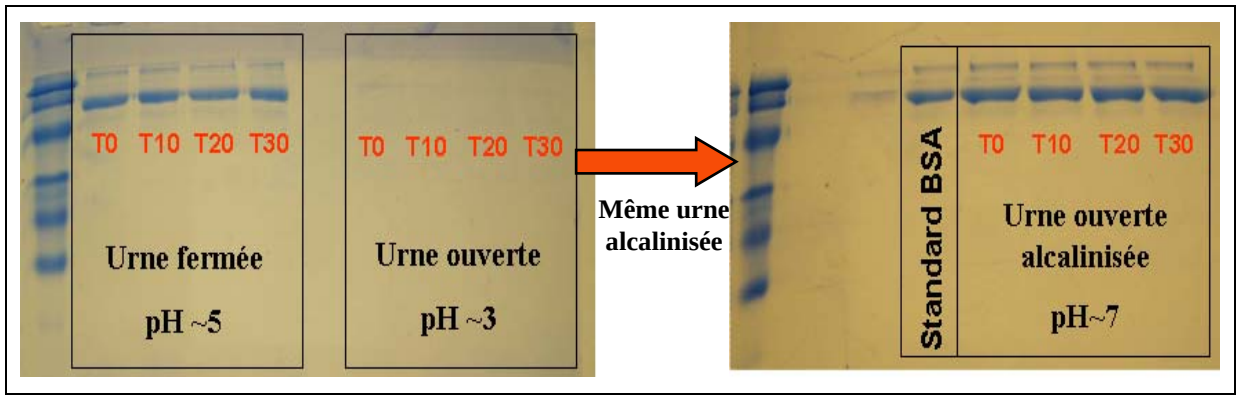


Figure 79 : Migration sur SDS-PAGE d'échantillons de BSA incubés dans des secrétions d'urne fermée et ouverte (à pH initial ou alcalinisé), pendant des temps différents puis, puis coloration au Page Blue™ Staining.

Pour les sécrétions d'urne fermée, le pH mesuré est d'environ 5. La BSA est toujours présente après 30 min d'incubation dans ce fluide digestif. Elle n'est pas dégradée par les enzymes.

Par contre, dans les sécrétions d'urne ouverte (pH mesuré 3), la BSA est rapidement dégradée, elle est décomposée en petits peptides (non visibles sur le gel) en à peine 10 min d'incubation.

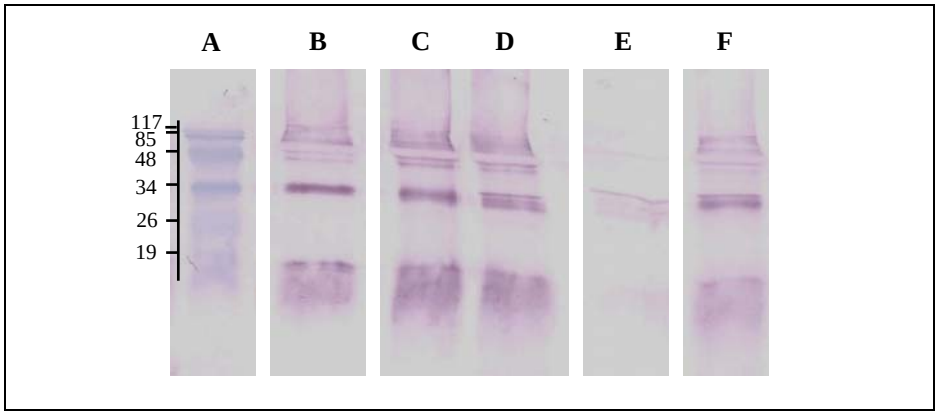
Ces mêmes sécrétions, qui présentaient initialement une activité protéolytique intense, ont été alcalinisées (à l'aide de NaOH) pour atteindre un pH proche de 7. Dans ce fluide digestif, la BSA reste intacte même après 30 min d'incubation.

Cette expérience montre, tout d'abord, que dans les sécrétions d'urnes fermées, la BSA n'est pas dégradée, malgré une activité protéolytique légère observée à ce pH en zymogramme de gélatine et caséine (§ précédent). L'incubation a ensuite été de nouveau réalisée sur 24h, et la BSA était toujours présente. Ensuite, l'expérience montre que, pour une urne ouverte active, une alcalinisation du pH des sécrétions permet de bloquer la protéolyse de la BSA.

3.1.2.2.2. Incubation d'Interféron gamma

L'expérience a été réalisée cette fois sur une protéine humaine : l'interféron gamma. De la même façon, 50 ng de standard IFNγ ont été incubés dans 10µl de sécrétions d'urne ouverte à pH initial (pH 2,6) et alcalinisé (pH 6) pendant 12 h à 37°C. Les mêmes incubations ont été réalisées dans des tampons aux mêmes pH, pour vérifier la stabilité de la protéine dans ces conditions d'acidité. Les échantillons ont ensuite été analysés par western blot (Matériels et Méthodes, 5.6.2). Pour le témoin positif, 50 ng de standard IFNγ est ajouté dans un des

puits et sert de référence (IFNγ non incubé) (50ng dilué dans 10 µl de tampon de migration additionné de 10µl de tampon de charge). Les résultats sont présentés sur la figure 80.



<u>Figure 80</u> : Détection de l'IFNγ en Western blot après incubation de la protéine dans des sécrétions d'urne ouverte de *Nepenthes.* x *ventrata* à pH initial (2,6) et à pH alcalinisé (6) pendant 12 h à 37°C. A : marqueur de taille. **B :** témoin positif IFNγ. **C** : incubation dans tampon pH 2,5. **D** : incubation dans tampon pH 6. **E** : incubation dans les sécrétions digestives pH 2,5. **F** : Incubation dans les sécrétions digestives pH 6.

Après incubation pendant 2h dans des tampons à pH 2,5 et 6 (puits C et D), l'IFNγ est détecté dans l'échantillon en western blot sous ses formes monomère et dimère (17 et 34 kDa). Les signaux obtenus sont comparables au témoin (puit B). Ceci indique, dans un premier temps, que la protéine est stable à ces pH.

Pour les incubations d'IFNγ dans les sécrétions d'urne ouverte, la protéine est détectée après incubation dans le fluide digestif à pH modifié 6 (puit F). Par contre, après 12 h d'incubation dans ce même fluide digestif à pH naturel 2,5, le signal obtenu sur la membrane est très faible (puit E), indiquant que l'IFNγ a été dégradé.

Ces résultats nous indiquent, que la protéine d'intérêt n'est pas altérée par les protéases digestives des urnes à pH 6. Mais dans les conditions d'acidité où les népenthésines sont actives, l'IFN gamma est rapidement dégradé en peptides. En vue de la production de cette protéine dans des urnes de *Nepenthes* transgéniques, il faudra cultiver les plantes dans des serres en totale absence d'insectes. En effet, la protéine ne sera pas dégradée dans les sécrétions d'une urne avant ouverture (pH 5,5-6). Après ouverture, si les pièges ne capturent pas d'insectes, leur pH ne chutera pas, et les enzymes ne seront pas actives. Ceci semble possible en serres S2 (présence de filets interdisant l'accès aux insectes pollinisateurs), et est de plus recommandé pour la production de protéines destinées au secteur pharmaceutique (absence de protéines animales / pathogènes). Dans ces conditions, si le pH du piège est

maintenu aux alentours de 5,5-6 tout au long de son activité sécrétoire, la protéine recombinante ne sera pas altérée par les enzymes protéolytiques du liquide extracellulaire dans lequel elle sera produite.

3.1.2.2.3. Incubation de Facteur Intrinsèque

L'expérience a été réalisée sur une deuxième glycoprotéine humaine : le facteur intrinsèque, en collaboration avec le laboratoire INSERM U724 de Pathologie Cellulaire et Moléculaire (Vandoeuvre-les-Nancy) de Jean-Louis Guéant.

2 µg de Facteur Intrinsèque recombinant standard (Cobento, phosphate sodium 0,2M, pH 7,4) ont été incubés pendant 2 h dans 500µl de secrétions digestives d'urne ouverte de *Nepenthes.* x *ventrata* à pH 3,5 et à pH alcalinisé 5,95. Un témoin positif a été préparé en incubant 2µg de Facteur Intrinsèque dans un tampon Tris 20mM, 0,15M NaCl à pH 7,4.

Puis l'activité de couplage du facteur intrinsèque à la cobalamine (Vitamine B12) a été testée. Elle a été déterminée en ajoutant préalablement, à chacun des échantillons FI-sécrétions, 0,52 pmol de CN [^{57}Co] Cbl préparé dans une solution d'alcool benzylique à 0,9 % (ICN Pharmaceuticals France 06B-430002).

Aprés filtration (0,22µ), l'échantillon a été appliqué sur une colonne Séphacryl^{TM} S300 éluée par un tampon Tris 20mM, 0,15M NaCl à pH 7,4 à un débit de 0,5 ml/min (chromatographie de filtration sur gel (Yerima *et al.*, 1996)). Après collecte de la fraction qui nous intéresse, la radioactivité de l'échantillon a été mesurée par un compteur gamma. Les résultats sont présentés en figure 81.

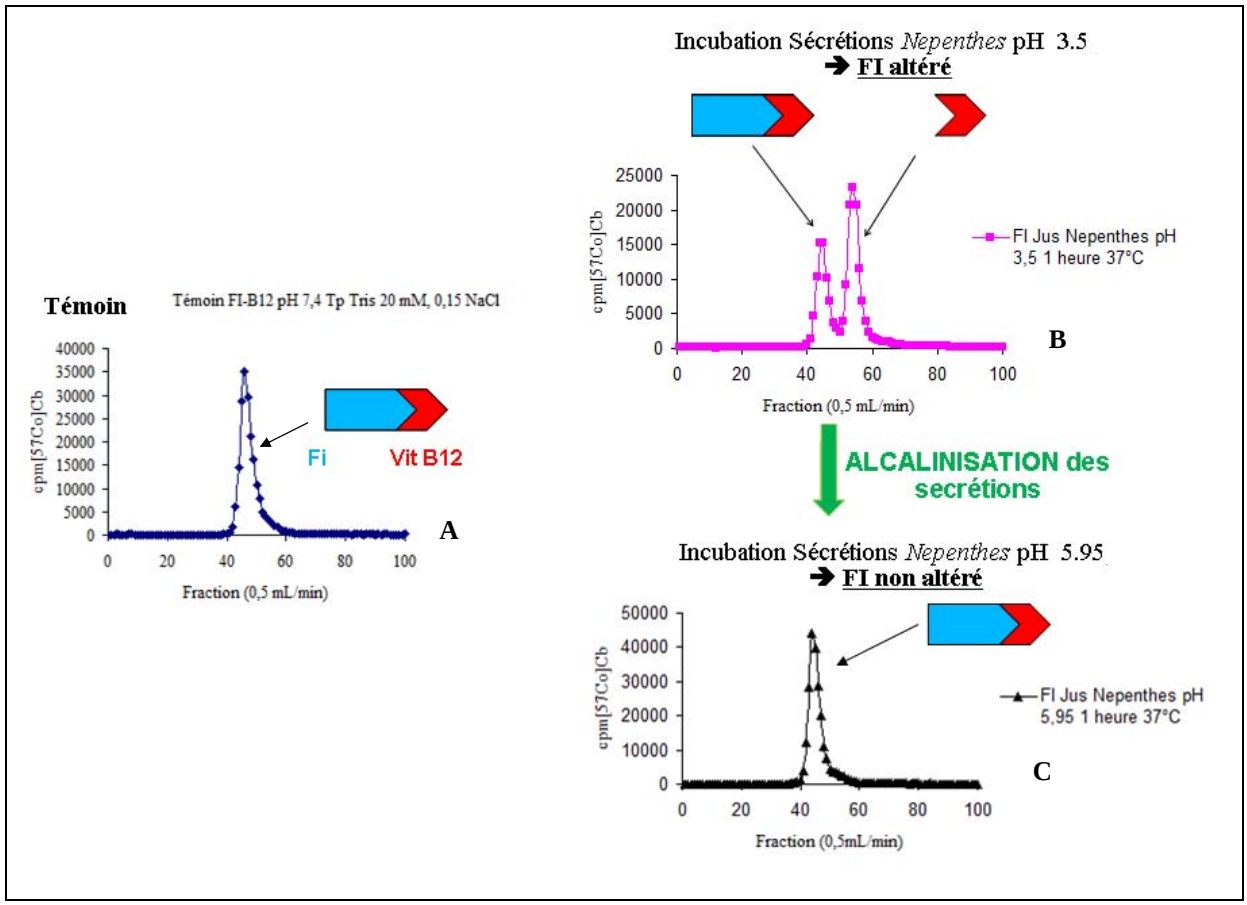


Figure 81 : Détermination de l'activité de couplage du Facteur intrinsèque à la cobalamine marquée (CN[^{57}Co]Cbl) après incubation du FI dans des sécrétions digestives d'urnes de *Nepenthes. x ventrata* à pH initial (3,5) et à pH alcalinisé (5,95) (par mesure de la radioactivité en coups par min émise par la cobalamine marquée). A : Témoin, FI incubé dans tampon Tris 20mM, 0,15M NaCl à pH 7,4, **B** : FI incubé dans sécrétions d'urnes pH 3,5, **C** : FI incubé dans sécrétions d'urnes pH 5,95.

Pour l'incubation témoin, le pic observable à 45 min correspond à la radioactivité émise par la cobalamine marquée complexée au FI (35 000 coups par minute). Aucun pic de viamine B12 non complexée n'est observable, ceci nous indique que le FI n'est pas totalement saturé.

Pour le FI préalablement incubé dans des sécrétions d'urnes de *Nepenthes* à pH 3,5, deux pics sont visibles : l'un correspond à la radioactivité émise par le complexe FI-B12, et l'autre par la vitamine B12 non complexée. Dans les mêmes conditions stœchiométriques que pour le témoin, le FI n'a pas pu, cette fois, fixer toute la cobalamine présente. Ceci nous indique, qu'au cours de son incubation dans les sécrétions digestives, une partie du FI a été altéré puisqu'il n'est plus à même à se lier à la cobalamine.

Cependant, pour le FI incubé dans les mêmes sécrétions d'urnes de *Nepenthes* à pH modifié (alcalinisé à 5,95), un seul pic apparaît : il correspond à la radioactivité émise par le complexe FI-B12 et l'émission est comparable à celle du témoin (40 000 cpm, même quantité

de complexe formé). Dans ce cas, le FI est toujours fonctionnel, il est capable de se lier à la vitamine B12. Les protéases acides des sécrétions alcalinisées à pH 5,95 n'ont pas altéré la protéine gastrique d'intérêt.

Comme pour l'incubation réalisée sur l'interféron gamma, les résultats obtenus pour le Facteur Intrinsèque indiquent que, si la protéine était produite au sein des sécrétions d'urnes de *Nepenthes* transgéniques, elle ne serait pas altérée par les enzymes protéolytiques d'une urne fermée (pH 5,5-6), ni d'une urne qui ne capturerait aucun insecte au cours de sa viabilité. En cas d'acidification des pièges, l'activité des protéases pourrait être contrôlée par une alcalinisation des sécrétions. De cette façon, la protéine pourrait être produite de façon fonctionnelle par la technologie PAT Friday®.

3.2. Par l'ajout d'inhibiteurs de protéases

L'activité protéolytique des sécrétions digestives pourrait également être contrôlée par l'ajout d'inhibiteurs de protéases dans l'urne. La pepstatine (3S, 4S-4-amino-3-hydroxy-6-methyl-heptanoic acide), par exemple, est un pentapeptide isolé d'actinomycètes, capable d'inhiber spécifiquement l'activité de protéases acides (Umezawa, 1977) comme la cathepsine D, la rénine, ou la pepsine (Overturf *et al.*, 1974 ; Workman and Burkitt, 1979 ; Starling and Hopps, 1980).

Nous l'avons testé en zymogramme : l'inhibiteur a été ajouté en excès par rapport aux données bibliographiques (Athauda *et al.*, 2004) à la concentration finale de 1 g/L dans du fluide digestif de *Nepenthes x ventrata* concentré 5 fois. Un témoin positif sans inhibiteur a également été préparé (sécrétions issues de la même urne ouverte concentrée 5 fois). L'activité protéolytique des deux échantillons a été analysée en zymogramme de gélatine 0,1%, après incubation du gel dans un tampon à pH 3 (forte activité protéolytique précédemment observée) à 37°C pendant 12 h. Les résultats sont présentés sur la figure 82.

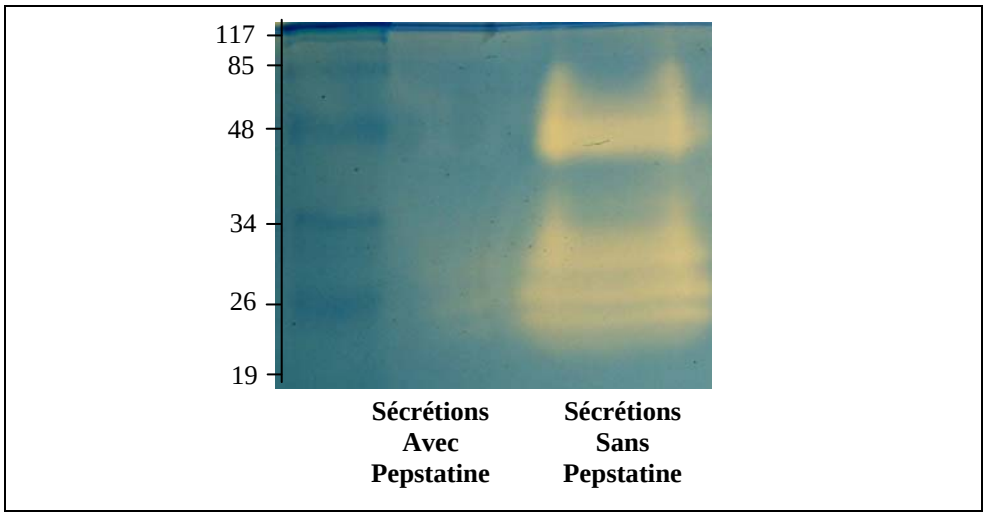


Figure 82 : Migrations de sécrétions concentrées d'urne ouverte de Nepenthes *x ventrata* sur zymogramme de gélatine bovine à 0.1% puis coloration au PageBlueTM stainig après incubation pendant 12h dans un tampon à pH 3 à 37°C.

Pour l'échantillon témoin, des plages de lyse sont bien présentes. Par contre, pour le même échantillon supplémenté en pepstatine, aucune plage de lyse n'est visible. La pepstatine inhibe bien l'activité protéolytique des népenthésines I et II. Ce résultat avait déjà été obtenu par Athauda et ses collaborateurs (Athauda *et al.*, 2004) sur les deux enzymes purifiées. Ils ont obtenu une complète inhibition des 2 enzymes en présence de 0,1mM de pepstatine (68 mg/L).

4. Discussion relative à l'étude du potentiel de la technologie appliquée la plante *Nepenthes*

Le potentiel des plantes carnivores du genre *Nepenthes* à produire des protéines recombinantes au sein des secrétions digestives a donc été évalué à travers cette étude quantitative et qualitative des protéines. La capacité des plantes à excréter des protéines dans le milieu extracellulaire a été évalué entre 10 et 15 kg de protéines totales / ha /an.

Bien sûr, ce rendement est faible par rapport au rendement protéique obtenu avec d'autres plantes : un hectare de maïs peut, par exemple, produire environ 900 kg de protéines dans les grains. Une amélioration possible du procédé PAT Friday appliqué au genre *Nepenthes*, pour augmenter ce rendement, consisterait à favoriser l'excrétion de la protéine recombinante dans les pièges par la présence dans la protéine d'un peptide signal permettant son transport dans le réticulum endoplasmique (RE).

Un tel peptide comprenant en général un motif hydrophobe (Hatsuzawa *et al.*, 1997) peut être soit présent naturellement dans la protéine, soit fusionné à une protéine ne possédant pas de peptide signal. Grace à la protéine SRP présente dans le cytosol (Signal recognition peptide), le peptide va être reconnu, et va assurer l'entrée de la protéine à l'intérieur du RE par translocation cotraductionnelle, où elle sera prise en charge par des chaperonnes ayant pour fonction d'assurer une conformation spatiale optimale de la protéine (Nicchitta, 2002).

Ainsi, pour une protéine d'intérêt donné, il est possible de favoriser son adressage vers le RE en ajoutant à la séquence primaire un peptide signal en position N-terminale présentant des propriétés hydrophobes.

L'excrétion des protéines vers les pièges pourrait également être améliorée en favorisant le transport de la protéine du RE vers l'appareil de Golgi, puis du golgi vers la membrane plasmique et les pièges par la voie transmembranaire, en sur-exprimant dans la plante un gène de la famille des protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein receptors).

En effet, il existe des motifs peptidiques attachés aux vésicules ou aux membranes, connus sous le nom de SNARE, qui sont impliqués dans les processus d'exocytose chez les végétaux, par le biais de mécanismes de fusions membranaires précédées d'interactions moléculaires de type SNARE-SNARE (Pratelli *et al.*, 2004). Notamment, de tels motifs peptidiques ciblant le transport de vésicules chargées en protéines, depuis le RE vers le Golgi, ont été décrits dans des protéines chez *Arabidopsis* (Pratelli *et al.*, 2004) : il s'agit des domaines SNARE des peptides Syntaxin-41, Syntaxin-42, Syntaxin-43 (AtSYP41 à 43, numéros d'accession Genbank respectivement : O65359, Q9SWH4, et Q9SUJ1). D'autres peptides de type SNARE sont également connus chez *Arabidopsis*. Ils sont présents à la surface de vésicules golgiennes et déterminent le transport depuis le Golgi vers la membrane plasmique (exocytose) ; ils correspondent aux Syntaxin-121 à 125 (AtSYP121 à 125, numéros d'accession Genbank : Q9ZSD4, Q9SVC2, Q9ZQZ8, O64791, et Q9SXB0).

Ainsi une plante carnivore génétiquement transformée sur-exprimant au moins une de ces deux familles de protéines SNARE, ou une protéine possédant un ou plusieurs domaines SNARE ou dérivés, devrait conduire à une excrétion majorée de ses protéines présentes au niveau du RE.

Enfin, ce système pourrait être induit dans la mesure où l'excrétion des sucs digestifs peut être augmentée par des signaux chimiques mimant la présence d'une proie (An *et al.*, 2001), comme la BSA, l'urée, l'acide urique. Cependant, cette induction provoquerait

également la chute du pH des sécrétions, et elle exposerait nos protéines d'intérêt à un risque de protéolyse important.

L'avantage majeur de la Technologie PAT Friday® est lié à la collecte aisée des protéines recombinantes produites dans un liquide extracellulaire. De plus, la diversité protéique de ses sécrétions enzymatiques est relativement simple : moins de dix protéines. Par rapport à une protéine produite dans un organe végétal, l'extraction sera donc une étape supprimée, et la purification sera facilitée. Lorsqu'on sait que ces étapes d'extraction-purification représentent environ 80% du coût de production d'une protéine d'intérêt dans des systèmes d'expression végétaux classiques (Hellwig *et al.*, 2004), on évalue de suite le potentiel de la plateforme PAT Friday® à produire des protéines recombinantes à moindre frais.

Cependant, un des problèmes potentiellement lié à l'excrétion de la protéine recombinante d'intérêt dans les fluides digestifs des pièges est lié à la présence enzymes naturelles, et notamment de protéases. Comme nous l'avons démontré dans ce chapitre, il semble possible de produire au sein des sécrétions digestives des pièges de *Nepenthes*, des protéines recombinantes, sans risque accru de protéolyse :

- Avant l'ouverture du piège : le pH est d'environ 5-6. L'activité des protéases à ces pH est minime et des protéines complexes comme le FI ou l'Interféron gamma ne semblent pas être altérées (notamment d'un point de vue fonctionnel).
- Après l'ouverture du piège, si aucune proie n'est capturée : le pH ne chute pas (An *et al.*, 2001). Pour palier au déficit en azote normalement comblé par la digestion d'insectes, un engrais peut être directement apporté à la plante au niveau de son système racinaire.

Malgré tout, pour éliminer tout risque de protéolyse provoqué par une chute accidentelle du pH des sécrétions, il est possible d'inhiber ces protéases, soit par un contrôle par le pH par l'ajout d'une solution basique par injection dans les urnes, soit par l'ajout d'inhibiteurs directement dans les pièges.

Différents types d'inhibiteurs de protéases peuvent être utilisés. Notamment, il a été montré que les activités des protéases de *Nepenthes* étaient inhibées par un inhibiteur de protéases acides d'animaux et de champignons : le DDE (Dichlorodiphenyldichloroethylene) (Lobareva *et al.*, 1973). Deux autres inhibiteurs de protéases acides, le DAN (Diazoacetyl-DL-norceuline méthyl ester) et la Pepstatine (3S, 4S-4-amino-3-hydroxy-6-methyl-heptanoic

acide) isolée de *Streptomyces testaceus* et d'autres actinomycètes qui forment un complexe avec des protéases à acides aspartiques, inhibent complètement l'activité digestive des urnes de *Nepenthes* (Takahashi *et al.*, 1974 ; Athauda *et al.*, 2004). Des mélanges de plusieurs inhibiteurs de protéases ayant des cibles de protéines différentes sont également commercialisés. Ces mélanges permettent d'inhiber un panel de protéases différentes (par exemple, protéases à cystéine, protéases à sérine, et métalloprotéases, pepstatine…), assurant une meilleure protection pour la préservation de notre protéine d'intérêt. Un ou plusieurs de ces inhibiteurs peuvent donc être ajoutés sous forme de solution injectée au niveau des pièges. Dans le cas d'inhibiteurs de nature protéique, leur ajout dans l'urne pourrait même induire une production accrue de sécrétions. La pepstatine qui est un pentapeptide, pourrait, *a priori*, jouer un double rôle d'activateur de sécrétions, et d'inhibiteur de la protéolyse. L'inconvénient est le prix de revient élevé : la pepstatine coûte environ 1000 € par gramme (Peptonova, 4397-1g). Ajoutée à la concentration de 0,1mM dans le fluide digestif, l'opération reviendrait à environ 1 à 2 €/ urne (pour 2 collectes). Le contrôle des protéases présentes dans les sécrétions des urnes de *Nepenthes via* des inhibiteurs spécifiques est donc beaucoup moins rentable qu'un simple contrôle *via* une alcalinisation du pH.

L'inhibition de l'activité des protéases par le pH, par l'ajout d'une solution basique dans les urnes, est la solution la plus économique, mais elle nécessite un contrôle régulier fastidieux du pH de chaque urne viable.

Une autre stratégie envisageable pour se prémunir de tout risque de protéolyse au sein des fluides digestifs des urnes est d'inhiber les enzymes en utilisant des approches génétiques.

Il est possible de cibler directement les gènes dont on souhaite inhiber l'expression, par l'extinction de la transcription de ces gènes appelée « gene silencing ».

Cette stratégie est basée sur un ensemble de techniques bien décrites chez les végétaux. Ainsi la technique de Virus Induced Gene silencing (VIGS) nécessite le clonage d'une courte séquence du gène de plante ciblé dans un virus végétal. Dans les quelques semaines qui suivent l'infection virale qui contient le fragment de gène en question, le mécanisme naturel de défense de la plante conduit à la dégradation spécifique des ARNm correspondant au gène endogène de la plante qui est ciblé. Cette technique permet d'obtenir rapidement, en 3 à 4 semaines après l'infection virale, l'extinction de l'expression du gène ciblé, à partir d'une plante normale, sans processus de régénération de transformants *in vitro*, en utilisant le principe de contamination systémique du virus dans la plante (Burch-Smith *et*

al., 2004). Mais aucune infection virale chez *Nepenthes* n'a pour le moment été décrite, et aucun virus pathogène n'a été identifié.

L'inactivation post-transcriptionnelle de gènes peut aussi s'obtenir par transformation génétique des végétaux en insérant dans la plante cible un fragment du gène dont on cherche à inhiber la transcription, suivant le principe des ARN interférents (RNAi) (Voinnet, 2005). On pourrait de cette façon inhiber l'expression des népenthésines en insérant une copie des gènes dans le génome de la plante (co-suppression sens), ou une copie antisens de ces gènes. Cependant, leurs séquences génétiques n'ont pas été identifiées pour le moment (même si des homologies de séquence d'acides aminés avec d'autres protéases aspartiques ont été décrites pour les 2 protéases (Athauda *et al.*, 2004)). Par contre, les gènes responsables de l'acidification des sécrétions en réponse à la présence d'insectes, déjà identifiés, (gènes putatifs de pompe à protons sur la membrane plasmique H+-ATPases, *NaPHA1-6*, DDBJ accession number AB033371, AB033372, AB033373, AB033374, AB033375, AB033376) pourrait être des gènes cibles intéressants (An *et al.*, 2001).

L'inhibition par voie génétique des gènes d'enzymes digestives ciblés peut également être réalisée indirectement par l'expression ectopique chez la plante carnivore d'un gène inhibiteur de protéase. Le gène de levure Protéase A inhibiteur 3 (locus IPA3_YEAST, accession P01094), qui code pour l'inhibiteur de la saccharopepsine, est par exemple connu pour coder pour un inhibiteur de protéase acide proche de celles des plantes du genre *Nepenthes*.

Nepenthes alata est une espèce très intéressante pour notre plateforme. C'est un bon producteur de sécrétions digestives et de protéines grâce à la présence de nombreux pièges viables en même temps, à leur taille assez importante, et à leur renouvellement rapide sur la plante. De plus, elle est relativement facile à cultiver par rapport à d'autres espèces de haute altitude qui nécessitent des écarts de température importants entre le jour et la nuit. Cependant, la production des pièges est soumise à régulation. On observe un arrêt de la production d'urnes dans le cas d'une faible humidité relative de l'air ambiant. Par ailleurs, un changement de situation, un déplacement, peut également affecter durablement la production de pièges. La ré-adaptation de la plante peut prendre plusieurs mois. C'est une plante très sensible aux changements de conditions de culture, mais facilement cultivable lorsque tous ces paramètres sont maîtrisés.

En conclusion, les problèmes liés à la dégradation des protéines par les enzymes digestives étant surmontables par contrôle chimique ou génétique, le système de production

PAT Friday® permet de combiner de nombreux avantages liés à l'utilisation des plantes comme systèmes d'expression, en contournant beaucoup de ses inconvénients :

- la plante n'est pas détruite ni même significativement amoindrie par la collecte et peut donc être conservée en culture pour d'autres collectes ultérieures ; 2 collectes par piège semblent possibles, et la sénescence prématurée des urnes suite au stress causé par ces collectes pourrait peut-être être évitée en ne vidant que partiellement les ascidies de leurs sécrétions.
- les pièges sont naturellement des organes facilement accessibles, permettant ainsi une collecte aisée des sucs digestifs de composition simple, supprimant l'étape fastidieuse d'extraction de la protéine des tissus et facilitant la purification.
- les fluides digestifs sont produits et excrétés dans des pièges fermés au milieu extérieur, le piège n'étant ouvert au milieu extérieur qu'une fois prêt pour la digestion de proies. Même si la plante est cultivée dans un environnement non stérile, et sous réserve de réaliser la collecte de sucs digestifs avant l'ouverture du piège et de quelques précautions, la collecte des protéines recombinantes peut donc être réalisée dans des conditions stériles.
- le fait que la protéine recombinante à purifier soit présente dans un milieu liquide extérieur à la plante, et non dans un tissu végétal solide (telle qu'une feuille ou une graine), simplifie énormément l'étape de purification de la protéine recombinante.
- Enfin, dans la mesure où la protéolyse aura été au préalable inhibée, il sera possible d'induire et d'augmenter l'excrétion de protéines ou ajoutant dans l'urne des substances mimant la présence d'un insecte (Augmentation de la sécrétion de certaines enzymes en présence de proies (An *et al.*, 2002a)).

La transformation génétique de cette plante n'est pas décrite dans la littérature. Le développement de la plateforme de production de protéines recombinantes par la technologie PAT Friday® est donc conditionné par la réussite de cette étape. Pour commencer, les conditions de régénération de la plante (par néoformation) doivent être étudiées.

CHAPITRE 3 : Développement de la technologie PAT Friday® sur le genre Nepenthes

Elaboration d'un protocole de régénération de *Nepenthes alata* en vue de sa transformation génétique

Nous avons montré dans le chapitre 2 que les plantes du genre *Nepenthes* représentaient d'excellents modèles pour la production de protéines recombinantes grâce à la présence de bioréacteurs naturels aux extrémités de chaque feuille. Ces plantes transformées génétiquement avec un gène d'intérêt, pourraient produire, à moindre coût, une quantité non négligeable de protéines thérapeutiques.

Cependant, contrairement à *Drosera rotundifolia*, la transformation génétique de *Nepenthes* n'est pas décrite dans la littérature, et aucun protocole de régénération directe ou indirecte n'a été mis au point. Seule la micropropagation à partir d'entrenœuds a été étudiée chez *Nepenthes mirabilis* (Khompat *et al.*, 2007), *N. macfarlanei* (Chua and Henshaw, 1999) *et N. khasiana* (Latha and Seeni, 1994).

Il est donc nécessaire, dans un premier temps, d'élaborer un protocole de régénération de la plante, en vue de sa transformation génétique *via Agrobacterium tumefaciens.*

Les essais de régénération *in vitro* ont été menés sur *Nepenthes alata*. En plus d'être une excellente productrice de sécrétions protéiques, cette espèce se cultive relativement bien en conditions *in vitro*. Un autre avantage est que l'approvisionnement de vitroplants de *N. alata* est relativement aisé. Ceci évite de devoir faire germer des graines en conditions stériles pour obtenir du matériel végétal axénique. En effet, les graines sont très peu disponibles et souvent difficiles à faire germer du fait de leur viabilité limitée dans le temps.

Plusieurs voies sont possibles pour régénérer une plante : la voie directe (organogenèse ou embryogenèse somatique directe) ou indirecte (organogenèse ou embryogenèse somatique indirecte) (Figure 83). La régénération directe correspond à la formation de la tige feuillée d'une plantule ou la formation d'embryons somatiques, à partir d'une ou plusieurs cellules reprogrammées de l'explant. La régénération indirecte, quant à elle, consiste en la formation de la tige feuillée d'une plantule ou en la formation d'embryons somatiques, à partir d'une ou plusieurs cellules de cal, amas de cellules indifférenciées issus de la prolifération de cellules d'un explant donné.

Ne disposant d'aucune donnée bibliographique nous indiquant la meilleure voie à suivre pour régénérer la plante, nous avons choisi de toutes les étudier. Ce chapitre retrace la

démarche suivie pour en arriver au développement d'une méthode de régénération de *Nepenthes alata*, ce qui explique que certaines expérimentations n'ont pas toujours été répétées : nous avons commencé par l'organogénèse directe, qui semblait la méthode la plus apte à nous donner des régénérants rapidement. Puis, nous avons exploré la voie indirecte, par organogenèse et plus particulièrement par embryogenèse somatique.

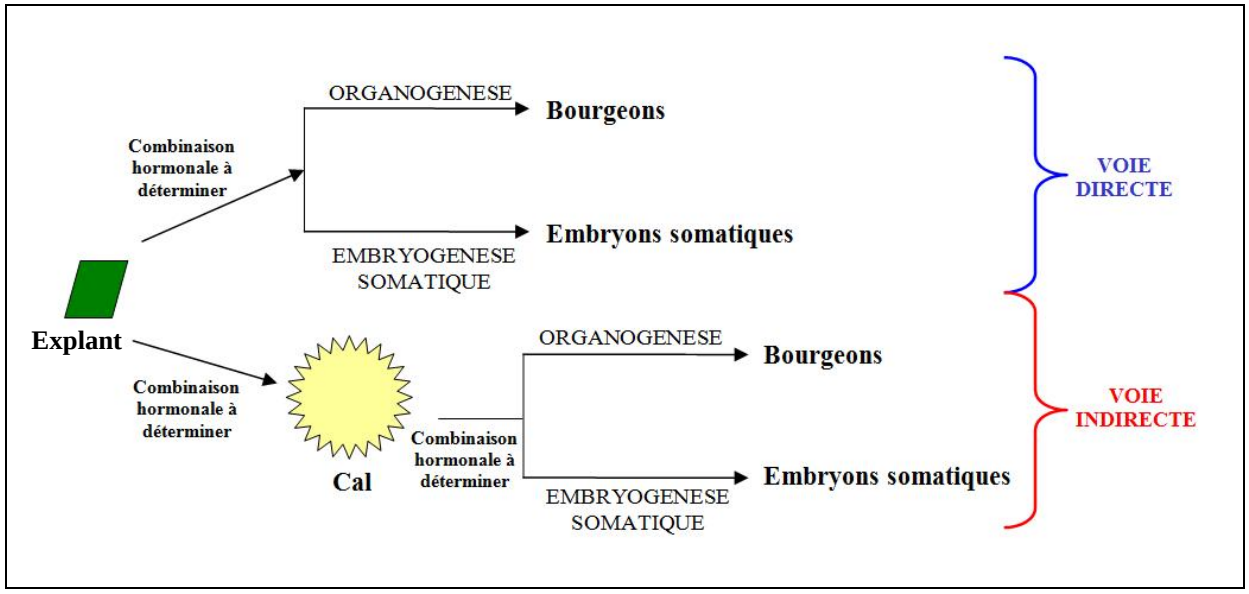


Figure 83 : Les différentes voies possibles de régénération.

1. Essai de régénération de *Nepenthes alata* par organogénèse directe

L'organogenèse directe s'établit en fonction de la capacité qu'a une cellule végétale différenciée (cellule de racine, de feuille…) à modifier son programme interne initiale pour donner une plante entière. Ce processus se fait grâce à l'interaction de la balance hormonale interne de l'explant avec la balance hormonale externe établie dans le milieu de culture. Il faut donc étudier différents paramètres : les hormones à utiliser, leur concentration et leur temps d'exposition pour induire la néoformation de bourgeon. D'autres modalités devront également être déterminées comme la nature de l'explant, la composition du milieu ou les conditions environnementales.

1.1. Essai de régénération de *Nepenthes alata* sous l'influence d'une combinaison hormonale NAA/BAP

Nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés aux conditions de régénération des plantes les plus proches de *Nepenthes* d'un point de vue phylogénétique, et dont la régénération directe a été décrite. Ce sont des plantes de la famille des Droseracées du genre *Drosera* (ordre des *Nepenthales*) : *D. rotundifolia, D. anglica, D. binata, D. cuneifolia* (Bobak *et al.*, 1995 ; Kawiak *et al.*, 2003). Elles ont toutes été régénérées à partir d'explants foliaires sous l'influence d'une combinaison hormonale BAP (6-Benzylaminopurine) et NAA (Acide Naphtalène Acétique), comme décrit dans le chapitre 1 pour *Drosera rotundifolia*.

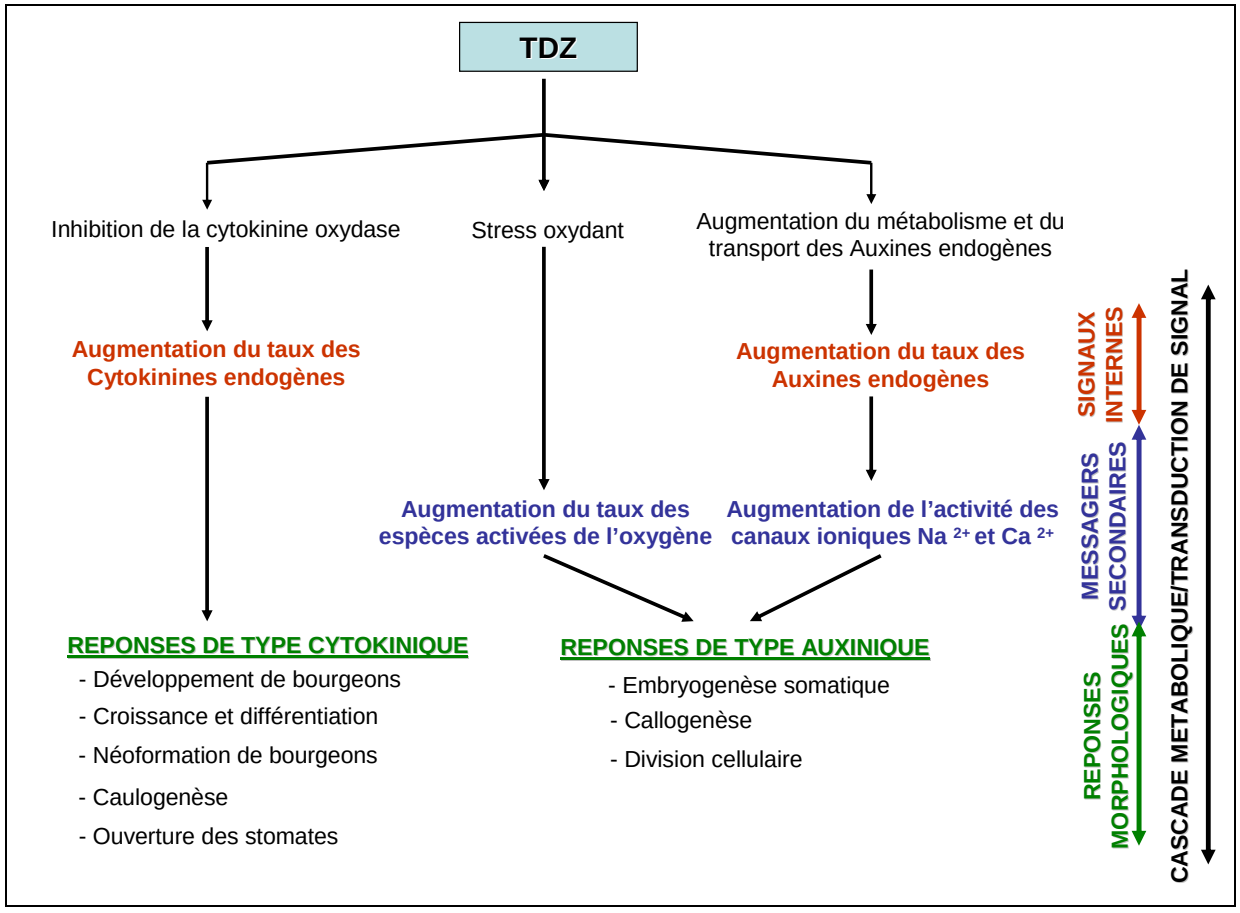
Nous avons testé cette balance cytokinine / auxine sur *N. alata*. Préalablement, les vitroplants sont cultivés sur un milieu MS(nep) : milieu Murashige et Skoog dilué 2 fois (MS, macro/microéléments et vitamines ; voir annexe 1) (Murashige and Skoog, 1962) supplémenté de 20 g/L de saccharose, 0,5 g/L d'hydrolysat de caséine, de 2 g/L de charbon actif (Thomas, 2008) et de 3 g/L de phytagel. Différents explants blessés de *Nepenthes alata* (limbes, nervures séparées du limbe, segments internodaux coupés transversalement ou longitudinalement, urnes, racines) ont été cultivés sur un milieu MS (nep) solide contenant les hormones NAA et BAP en combinaison (gamme de concentration croisée pour chacune des 2 hormones : 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1g/L, donnant 36 modalités hormonales). Après 10 semaines de culture, aucune régénération directe n'a été observée.

1.2. Essai de régénération de *Nepenthes alata* sous l'influence de Thidiazuron

Pour ne pas se limiter uniquement à une combinaison hormonale, nous avons également testé un autre régulateur de croissance, le thidiazuron, de plus en plus utilisé pour la régénération directe de différentes plantes comme la banane, la violette, la tomate, la paulownia, le chanvre, l'armoise… (Gubbuk and Pekmezci, 2004 ; Kannan *et al.*, 2007 ; Murlidhar Rao *et al.*, 2007 ; Corredoira *et al.*, 2008 ; Lata *et al.*, 2008 ; Lualon *et al.*, 2008).

Ce puissant désherbant (TDZ: N-phenyl-N'-((1, 2, 3-thidiazol-5-yl) urea)) est une substance de synthèse induisant à la fois des réponses cytokiniques traditionnelles et des réponses de type auxinique (Murthy *et al.*, 1998 ; Jones *et al.*, 2007a) (Figure 84). Il est également utilisé pour la régénération indirecte de plantes, comme par exemple pour le kigelia, le piment, la sauge, l'échinacée pourpre …(Thomas and Puthur, 2004 ; Khan *et al.*, 2006a ; Tawfik and Mohamed, 2006 ; Jones *et al.*, 2007b). L'action du TDZ est fonction de

son impact sur les concentrations des hormones endogènes. En effet, les réponses de type cytokinique comme la néoformation de bourgeons *via* la caulogénèse sont liées à l'inhibition de la cytokinine oxydase, enzyme régulant le taux de cytokinines endogènes par leur dégradation (Hare and Van Staden, 1994). L'inhibition de cette enzyme va provoquer l'augmentation du taux de cytokinines endogènes. Son action auxinique se traduit par une augmentation importante de la biosynthèse, du transport (Murch and Saxena, 2001) et de l'action des auxines endogènes par l'activation de canaux ioniques (Ca^{2+} et Na^{2+}) (Murch *et al.*, 2003 ; Jones *et al.*, 2007a) jouant le rôle de messagers secondaires. La réponse s'accompagne de la production d'espèces activées de l'oxygène (EAO), servant également de messagers dans la transduction de signal (Jones *et al.*, 2007a). Ces différents processus induisent des réponses auxiniques du type callogenèse (Tawfik and Mohamed, 2006) ou induction de l'embryogenèse somatique (Murch *et al.*, 2003).



<u>Figure 84</u> : Mode d'action du thidiazuron au sein des tissus végétaux (Hare and Van Staden, 1994 ; Murch *et al.*, 2003 ; Jones *et al.*, 2007a ; Miguel, 2007).

La multitude de réponses que cette hormone peut induire la rend difficile à utiliser et à maitriser. Elles peuvent varier selon sa concentration, le temps d'exposition (Yancheva *et al.*, 2003), le type d'explant utilisé ou encore son association à d'autres hormones. Dans notre cas, nous l'utiliserons sur des temps d'exposition de quelques jours afin de stresser brutalement les cellules de l'explant et d'induire la caulogénèse pendant la phase de repos hormonal.

Différents explants de *N. alata* blessés (limbes, nervures séparées du limbe, segments internodaux, urnes, racines) ont été cultivés sur des milieux MS(nep) solides et en milieux MS(nep) liquides (agités à 100 tours / min, table agitante 55 x 70 cm), contenant différentes concentrations de TDZ pendant différents temps d'exposition. Ils sont ensuite transférés sur un milieu MS(nep) solide sans hormone et cultivés à 23 °C avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité. Les concentrations de TDZ utilisées sont 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, et 2 mg/L pour des temps d'exposition de 1, 2, 3, 4, 6, et 9 jours. Pour chacune de ces modalités, 3 répétitions par type d'explant ont été réalisées.

En milieu solide, 3 bourgeons sont apparus sur des explants foliaires (pris à la base de feuilles, Figure 85) en une à deux semaines suite à des expositions de 4 jours et 6 jours à 0,025 mg/L de TDZ, et de 4 jours à 0,25 mg/L de TDZ. Ces plantules sont apparues à des faibles concentrations de TDZ et après des temps d'exposition relativement longs. Un résultat similaire a déjà été obtenu chez la violette africaine : de longues expositions au stress (optimum étant de 9 jours) à des faibles concentrations de TDZ (optimum étant de 0.3 mg/L) induit la néoformation de bourgeon (Mithila *et al.*, 2003).

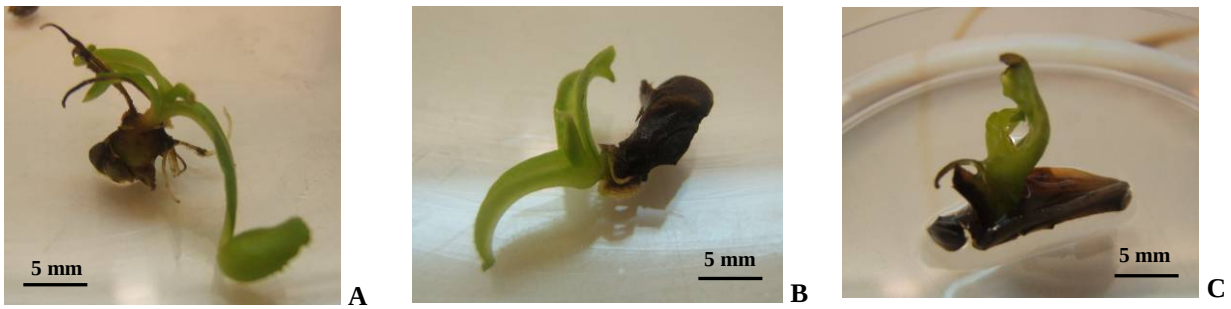


Figure 85 : Plantule et bourgeons issus de régénération directe de *N. alata* à partir de base de feuilles blessées. **A :** exposition de 4 jours à 0,025 mg/L de TDZ. **B :** exposition de 6 jours à 0,025 mg/L de TDZ. **C :** exposition de 4 jours à 0,25 mg/L de TDZ.

En milieu liquide, seul un bourgeon est apparu après 9 jours sur un explant foliaire au niveau d'une blessure suite à une exposition de 1 jour à 0,5 mg/L de TDZ. Le milieu

liquide permet d'augmenter le contact avec le TDZ et donc d'avoir un impact plus rapide qu'en milieu solide.

Néanmoins, la régénération est très limitée, elle correspond à 0,4 % des explants mis en culture en milieu solide. Cette expérimentation a été répétée plusieurs fois, mais les résultats n'ont pas été reproductibles. Ce faible taux de régénération est notamment dû à une nécrose précoce (brunissement) des explants (Figure 85, explant de départ) causée par une forte synthèse de polyphénols, en réponse au stress oxydant infligé par le TDZ, et ceci malgré la présence de charbon dans le milieu (Thomas, 2008). Les explants brunissent avant même que la régénération ne puisse s'amorcer.

1.3. Utilisation d'antioxydants en vue de limiter le brunissement des explants

Afin d'améliorer le protocole décrit précédemment et pour limiter la nécrose des explants, le charbon activé a été remplacé soit par une combinaison de 3 antioxydants dans les milieux de culture : Polyvinylpyrrolidone (1g/L), acide ascorbique (100 mg/L) et acide citrique (50 mg/L) soit par le glutathion (0,3 g/L) utilisé seul. Ce dernier est décrit comme étant un anti-oxydant très efficace (Meister, 1988 ; Nomura *et al.*, 1998), car il diminue l'activité de plusieurs enzymes intervenant dans le processus de brunissement comme la PolyPhénol Oxydase (PPO) ou la Phénylalanine Amonia Lyase (PAL) (Tabiyeh *et al.*, 2006). Une modalité d'exposition au TDZ à l'obscurité a également été testée, afin de limiter un éventuel stress supplémentaire dû à un trop fort éclairement. Mais l'utilisation de puissants antioxydants et de nouvelles conditions de culture n'ont pas suffi à limiter le brunissement des explants (nécrose plus lente à l'obscurité, mais néanmoins rapide), et le taux obtenu de régénérants lors de ces expérimentations n'a pas été amélioré.

Au vu de ces résultats, une forte synthèse de polyphénols, causant le brunissement précoce des explants, semble rendre cette plante récalcitrante à la régénération directe. La voie indirecte parait donc indiquée pour tenter de régénérer cette plante.

2. Régénération de *Nepenthes alata* par la voie indirecte

Les plantes considérées comme récalcitrantes en terme de régénération (Benson, 2000), peuvent, pour certaines, être régénérées par organogenèse indirecte et /ou par embryogenèse somatique. Ces deux voies ont donc été étudiées pour la régénération de *Nepenthes alata* (Figure 86).

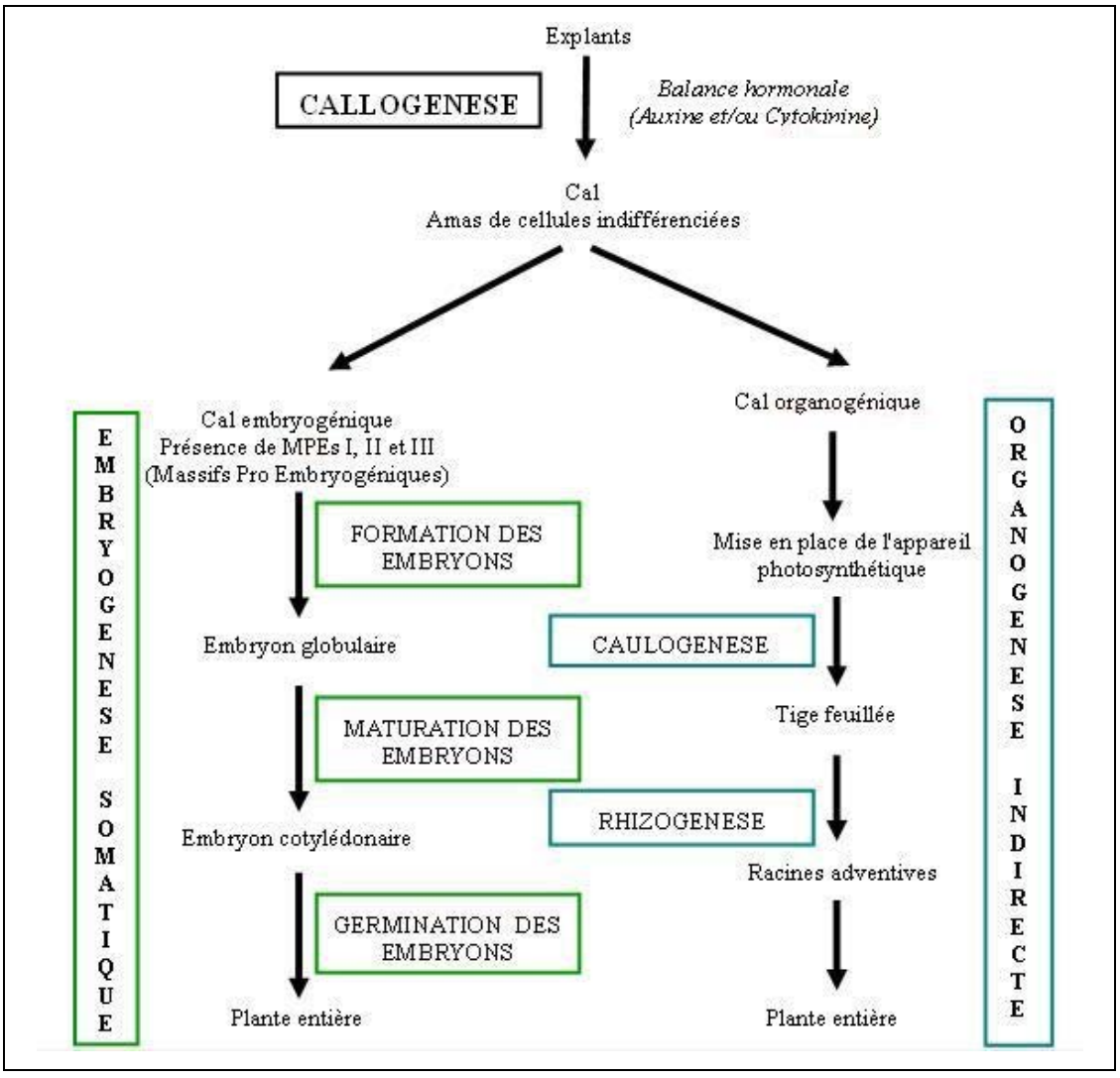


Figure 86 : Les différentes étapes de la régénération indirecte de *Nepenthes alata* par embryogénèse somatique ou organogénèse.

L'organogenèse indirecte est une voie utilisée pour la régénération de plantes récalcitrantes comme la rose (Rout *et al.*, 1998), la betterave sucrière (Zhang *et al.*, 2004) ou encore l'orge (Chauhan and Kothari, 2004). Malgré un risque de variabilité somaclonale (modifications aléatoires de l'ADN obtenues après un long cycle de culture des cellules à un stade indifférencié, pouvant donner des plantes régénérées avec des phénotypes anormaux :

hétérogénéité spatiale, instabilité temporelle…), cette technique est un excellent moyen d'obtenir assez rapidement un grand nombre de plantules viables.

La régénération par organogenèse indirecte nécessite 4 étapes :

- l'initiation de cals à partir d'explants à l'aide d'une balance hormonale adaptée, capable de dévier le programme de différenciation interne vers un simple programme de prolifération cellulaire.
- la prolifération des cals en milieu liquide ou solide
- la régénération de plantules à partir de cals *via* un processus de caulogenèse, accompagnée de la formation de la chlorophylle. Pour cette étape, il est nécessaire que ces cellules indifférenciées présentent un taux de cytokinines endogènes élevé.
- l'induction du système racinaire adventif, généralement sous l'influence d'auxines.

L'utilisation de l'embryogenèse somatique comme méthode de multiplication, de conservation ou comme une méthode de régénération dans un protocole de transformation génétique est courante chez des plantes récalcitrantes, comme le coton (Wang *et al.*, 2006b), la vigne (Perrin *et al.*, 2004), ou encore le tournesol (Saji and Sujatha, 1998).

C'est un processus permettant de générer des unités bipolaires à partir de cellules somatiques appelées embryons somatiques. Leur organisation est quasi similaire à celle d'un embryon zygotique (Dodeman *et al.*, 1997), exceptions faites de l'absence de suspenseur, de période de dormance et d'enveloppe protectrice présente dans une vraie graine. Leur développement suit un schéma en six étapes : globulaire, ovale, cordiforme, allongée, torpille et cotylédonaire (par ordre d'apparition, synthèse bibliographique, Figure 31, p 113) (Zimmerman, 1993 ; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

L'ensemble du processus de régénération par embryogenèse somatique nécessite 5 étapes (von Arnold *et al.*, 2002) :

- l'initiation, *via* des stimuli exogènes principalement auxiniques mais aussi cytokiniques, d'un cal de type embryogénique caractérisé par la présence de MPEs (Masses Pro Embryogéniques : ce sont des amas cellulaires présentant plusieurs stades de maturation achevés sous l'action d'auxine),
- la prolifération du cal en milieu liquide ou solide supplémenté de la balance hormonale d'induction,
- la transition MPEs – Embryons globulaires dans un milieu sans auxines (une faible concentration en cytokinines peut être nécessaire),

- la maturation des embryons dans un milieu enrichi en ABA et/ou ayant un potentiel osmotique réduit,
- la germination des embryons somatiques et le développement de plantes sur milieu sans hormones.

2.1. Induction de la callogénèse

La première étape de la régénération indirecte a consisté en l'induction de cals. Il a donc fallu déterminer les balances hormonales induisant cette dédifférenciation cellulaire, quelle qu'elle soit (donnant des cals organogéniques ou embryogéniques). Pour une plante donnée, différentes structures de cals peuvent être obtenues suivant la nature des explants, leur stade de développement et les combinaisons hormonales utilisées (et leurs concentrations).

Pour l'induction, différents explants de *N. alata* ((limbes, nervures séparées du limbe, segments internodaux, urnes, racines, plantes étiolées (préalablement cultivés à l'obscurité) ont été exposés pendant 2 mois à l'obscurité à 9 balances hormonales différentes (composées d'hormones végétales naturelles, ou de régulateurs de croissance synthétiques). Elles ont déjà été décrites et utilisées par ailleurs et ont permis d'induire une dédifférenciation cellulaire chez des plantes récalcitrantes :

A) **2,4-D seul** (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 mg/L) (Gopi and Ponmurugan, 2006 ; Thomas and Maseena, 2006)
B) **TDZ seul** (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/L) (Mng'Omba *et al.*, 2008)
C) **2,4-D** (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3.5, 5 mg/L) et **TDZ** (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 1, 2, 3.5, 5 mg/L) (Azad *et al.*, 2005 ; Jheng *et al.*, 2006)
D) **2,4-D** (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 mg/L) et **kinétine** (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/L) (Castillo *et al.*, 2000 ; Akbudak and Babaoglu, 2005 ; Lan *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2009)
E) **2,4-D** (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 mg/L) et **BAP** (0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/L) (Wang *et al.*, 2006a ; Wang and Bao, 2007 ; Escobar *et al.*, 2008)
F) **2,4-D** (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 mg/L) et **zéatine** (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/L) (Gomes da Cunha and Fernandes Ferreira, 1996)
G) **NAA** (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 mg/L) et **TDZ** (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 1, 2 mg/L) (Azad *et al.*, 2005)
H) **NAA** (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 mg/L) et **BAP** (0, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/L) (Roy and Banerjee, 2003 ; Wang *et al.*, 2006a)

I) **Picloram** (0, 1, 2, 5, 10 mg/L) et **Dicamba** (0, 1, 2, 3 mg/L) (Suzuki *et al.*, 2002 ; Titon *et al.*, 2007 ; Kiong *et al.*, 2008)

Ces combinaisons hormonales ont été additionnées au milieu de base contenant : les micro et macroéléments du milieu MS dilués 2 fois, les vitamines du milieu MS concentrées 2 fois, du saccharose 20 g/L, de l'hydrolysat de caséine 0,5 g/L, et du Phytagel 3 g/L supplémenté de 3 anti-oxydants : PVP 1 g/L, Acide ascorbique 100 mg/L, Acide citrique 50 mg/L, à pH 5,8 avant autoclavage. Les explants sont placés à l'obscurité à 23°C.

Plusieurs concentrations minérales ont été testées pour le milieu de base : les micro et macroélements du MS dilués 4 fois, 2 fois et non dilués. La dilution par 2 a donné les meilleurs résultats en terme de formation et de viabilité de cals, grâce à une pression osmotique appropriée du milieu.

Aucune callogénèse n'est observable pour les balances hormonales A, B, D, F, G et I. Pour les autres combinaisons hormonales, selon les concentrations utilisées, et la nature des explants, les résultats obtenus sont variables. En effet, pour certaines modalités, on observe une induction de cals ayant une structure globuleuse, et pour d'autres, des cals ayant une structure friable.

Ces cals de structures différentes doivent être étudiés plus précisément afin de déterminer leur potentiel : organogénique ou embryogénique. En fonction des structures cellulaires qui les composent (observations microscopiques), deux voies différentes de régénération ont été suivies. Les résultats détaillés présentés dans les parties suivantes concernent l'étude de la régénération par organogenèse sur les cals globuleux et par embryogenèse somatique sur les cals friables.

2.2. Régénération de *Nepenthes alata* par organogénèse indirecte

2.2.1. Induction de cals globuleux

2.2.1.1. Observations macroscopiques

Des cals jaune pâle, de structure globuleuse, ont été obtenus de façon répétable et reproductible à partir d'explants racinaires exposés pendant 2 mois à l'obscurité à une balance hormonale de 0,05 à 2 mg/L de TDZ en combinaison avec 0,1 à 1 mg/L de 2,4-D (combinaison C) ajoutée au milieu de base (Figure 87).

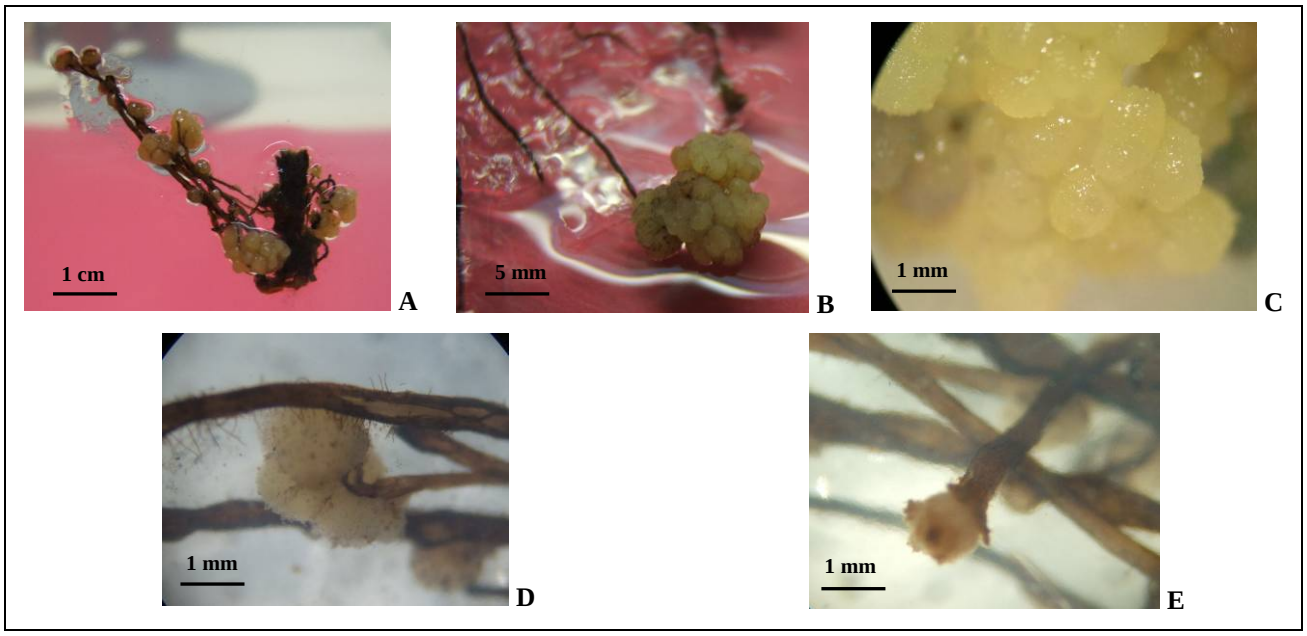


Figure 87 : Observations de cals globuleux de *N. alata* induits sur le milieu de base enrichi de 1 mg/L de TDZ et de 0,5 mg/L de 2,4-D (combinaison C). A et B : Induction de cals globuleux à partir d'explants racinaires. **C :** Observation à la loupe binoculaire de cals globuleux**. D et E :** Observations à la loupe binoculaire de cals globuleux aux extrémités des racines au niveau des apex.

Des observations faites à la loupe binoculaire nous montrent que ces cals sont apparus principalement au niveau des apex racinaires, zones méristématiques en division cellulaire intense (Figure 87, D et E). Les balances 2,4-D/TDZ donnant des cals, semblent interagir de façon indirecte avec les taux d'hormones endogènes, causant la déviation du programme de différenciation racinaire vers un programme de prolifération cellulaire, d'où la formation de cal. L'acquisition du caractère de totipotence est moins fastidieuse pour ces cellules grâce à une différentiation cellulaire initiale moins marquée. Ceci explique la difficulté à déprogrammer, par exemple, des cellules de nervures vers la callogenèse, car elles présentent une différenciation adaptée à leur fonction quasiment irréversible. Les entre-nœuds ont également donné de façon non répétable des cals globuleux : la base des feuilles présente un primodium de bourgeon axillaire, zone de division très active. La balance hormonale externe semble interagir avec la balance interne des primordia des bourgeons axillaires, d'où une déviation du programme de caulogénèse vers un simple programme de prolifération.

Pour ces mêmes balances hormonales (A à I), l'utilisation d'un milieu minéral de base MS non dilué ou dilué par 4 ou d'un milieu Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968) (annexe 1) non dilué ou dilué par 2 n'ont pas donné de meilleurs résultats en terme de callogénèse : des cals se sont formés mais moins rapidement et de façon moins répétable.

Par conséquent, le milieu de base avec les éléments du milieu MS dilués deux fois semble être le milieu minéral le plus propice à la formation de cals de *Nepenthes alata* à partir de racines.

2.2.1.2. Observations microscopiques

La structure cellulaire de ces cals globuleux a été observée au microscope. Des échantillons de cal ont été prélevés et des préparations ont été réalisées entre lames et lamelles. Les observations sont présentées sur la figure 88.

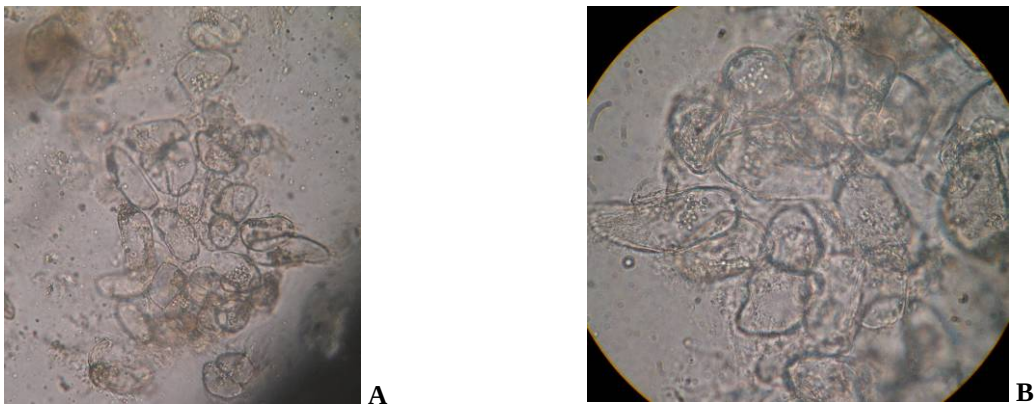


Figure 88 : Observations microscopiques de cellules de cals globuleux de *N. alata*. A : Grossissement x 100. **B :** Grossissement x 400.

Les cals globuleux sont composés de cellules de grande taille, rondes et ovales, fortement vacuolisées, à cytoplasme peu dense. Ces cals ne semblent pas présenter à première vue de structures cellulaires propres à l'embryogenèse somatique. Ils pourraient *a priori* présenter un potentiel organogène. De ce fait, les expérimentations présentées dans cette partie sur ces cals visent à régénérer une tige feuillée. Néanmoins, l'éventuel potentiel embryogénique de ces cals a également été expérimenté, mais aucun résultat satisfaisant n'a été obtenu (non présentés).

2.2.2. Prolifération des cals

Une des étapes intermédiaires de la régénération par organogenèse indirecte, est de maintenir ces cals en culture, et de les faire proliférer sous forme de suspension cellulaire ou en milieu solide afin de disposer en continu d'une biomasse importante.

2.2.2.1. En milieu liquide

De nombreux paramètres sont à prendre en compte pour réussir à mettre en place une culture cellulaire viable à partir de cals, comme notamment la source d'azote minéral et le pH. L'azote minéral existe sous deux formes dans les milieux de culture : les ions ammoniums (NH_4^+) et les ions nitrates (NO_3^-). De nombreuses études ont mis en évidence que les ions NO_3^- favorisent la croissance des suspensions cellulaires, comme par exemple chez l'if (Chen *et al.*, 2003), alors que les ions NH_4^+ auront tendance à l'inhiber. En effet, l'ammonium est facilement assimilable par les tissus mais peut devenir toxique s'il n'est pas immédiatement métabolisé, comme c'est le cas chez le riz (Chen and Kao, 1997). En effet, une accumulation d'ammonium peut perturber la nutrition hydrominérale et provoquer une répression de l'assimilation de nitrate (par rétro-inhibition de la nitrate réductase), résultant en une acidification du milieu (Crawford, 1995).

Dans un milieu donné, le ratio ions nitrates / ions ammoniums et la quantité totale d'azote ont donc un effet sur la prolifération cellulaire (Veliky and Rose, 1973 ; Zhang *et al.*, 1996 ; Pan *et al.*, 2004). Un ratio NO_3-N/NH_4-N supérieur à 1 est généralement favorable à la croissance de la suspension cellulaire (Panda *et al.*, 1992 ; Chen *et al.*, 2003 ; Pan *et al.*, 2004). Parallèlement, quand le taux d'azote total dans le milieu est supérieur à un certain seuil, il peut engendrer la mort cellulaire par une trop forte pression osmotique, comme c'est le cas chez le ginseng (Zhang *et al.*, 1996) ou encore chez le cyprès (Yamada *et al.*, 2003).

A noter également que d'autres éléments sont également indispensables dans le maintien et la croissance de la suspension, comme le phosphate et le calcium (Yamada *et al.*, 2003 ; Günter and Ovodov, 2005).

Pour l'étude de la prolifération de cals globuleux de *Nepenthes alata* en milieu liquide, deux milieux minéraux ont été testés : le milieu MS et le milieu Gamborg B5 (annexe 1) présentant des ratios NO_3^- /NH_4^+ respectivement de 2 : 1 et de 15 : 1. Le milieu Gamborg B5 contient six fois plus d'azote sous forme nitrate que le milieu MS. Il pourrait donc être plus favorable à la croissance d'une suspension cellulaire. Pour chaque milieu, différentes dilutions ont été testées (afin de limiter la pression osmotique) : MS/2, MS/4, MS/6, B5/2, B5/4, B5/6. Une éventuelle variation de pH du milieu (pH initial 5,8) est neutralisée par l'ajout d'un tampon MES à 700 mg/L (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid).

La prolifération a été testée en milieu liquide agité en totale immersion des cals (25 ml en erlenmeyers de capacité 100 ml) ou en semi-immersion (1,5 ml en cupules de 3 ml, VWR 737-1334), (40 tours /min sur un plaque agitante de 55 x 70 cm) à l'obscurité avec la

combinaison hormonale d'induction C (2,4-D / TDZ) ou sans hormones. Différents compléments nutritifs ont été ajoutés seuls ou en combinaisons aux milieux minéraux MS/2, MS/4, MS/6, B5/2, B5/4, B5/6 liquide : l'hydrolysat de caséine (0,5 mg/L), différentes concentrations en vitamines MS (x 1, x2, x 5), et d'autres vitamines (myo-inositol 100mg/L, thiamine 2mg/L), susceptibles de favoriser la croissance des cals et la mise en place de cultures cellulaires viables (Artunduaga *et al.*, 1989 ; Kintzios *et al.*, 2001 ; El-Shiaty *et al.*, 2004).

En milieu liquide, les cals mis en culture ont bruni en quelques semaines que ce soit pour la culture en milieu MS ou Gamborg B5, ceci un renouvellement fréquent (tous les 3 jours) du milieu de culture. Aucune prolifération n'a été observée. Le brunissement observé (nécrose) peut s'expliquer par un stress oxydant trop élevé en milieu liquide ou par une pression osmotique trop forte même pour les plus fortes dilutions. Ceci peut s'expliquer par une surface de contact milieu-cal plus élevée en milieu liquide qu'en milieu solide, augmentant le stress infligé aux cals. La nécrose cellulaire peut être également due à la séparation du cal de l'explant mère, provoquant un stress supplémentaire. Des dilutions supérieures et l'ajout d'anti-oxydants sont envisagés pour les expérimentations à venir. Afin de limiter au maximum le stress, les cals globuleux pourront être préalablement séparés de l'explant racinaire d'induction pour être cultivés indépendamment sur un milieu solide avant d'être mis en suspension.

2.2.2.2. En milieu solide

Le maintien et la prolifération des cals ont donc été testés sur des milieux de base solides (mêmes milieux que pour l'induction) sans hormones ou supplémentés avec la combinaison hormonale d'induction (combinaison C). Le cal a été séparé de l'explant sur lequel il a été induit. Les cals ont ensuite été cultivés à l'obscurité.

Après huit semaines de culture, la majorité des cals globuleux mis en culture ont proliféré sur le milieu de base solide sans hormones. Leur biomasse a quasiment doublé durant ce laps de temps. La présence d'antioxydants (PVP, acide ascorbique, acide citrique) a pu limiter le brunissement des cals par rapport à la culture en milieu liquide qui n'en contenait pas. Le sevrage explant – cal semble réussi en milieu solide, car l'établissement d'une nouvelle interface se fait petit à petit, sans stress provoquant la mort des cellules. Les cals

peuvent ensuite être maintenus en milieu solide, ou pourraient être mis à proliférer en milieu liquide (comme suggéré ci-dessus) afin d'obtenir plus rapidement une biomasse disponible suffisante pour la suite des expérimentations.

Ces résultats, et les observations microscopiques réalisées précédemment, nous indiquent que ces cals ne présentent *a priori* pas de potentiel embryogénique. Si tel était le cas, les cals auraient théoriquement donné lieu à la formation d'embryons sur un milieu sans hormones, au lieu de proliférer. Ils semblent présenter une mémoire hormonale due à une exposition prolongée au TDZ et au 2,4-D. Ces deux hormones causant l'augmentation du taux d'auxines et de cytokinines endogènes, ont permis la mise en place d'un programme interne de prolifération. Ce programme est maintenu même en absence de contact avec les deux hormones.

La stratégie à suivre, afin de régénérer des tiges feuillées à partir de ces cals, serait de les cultiver sur un milieu supplémenté en cytokinines afin de dévier le programme interne des cellules vers la caulogénèse.

2.2.3. Régénération de tiges feuillées

Deux mois et demi après la callogénèse, une plantule a été régénérée sur un cal globuleux induit sur le milieu de base supplémenté de 1 mg/L de 2,4-D et de 0,2 mg/L de TDZ (Figure 89). Ce cal a été maintenu sur son milieu d'induction à l'obscurité depuis sa formation. Ceci a déjà été observé, par exemple chez l'eucalyptus, où l'organogenèse se produit sur le milieu de formation du cal et à l'obscurité (Hajari *et al.*, 2006).

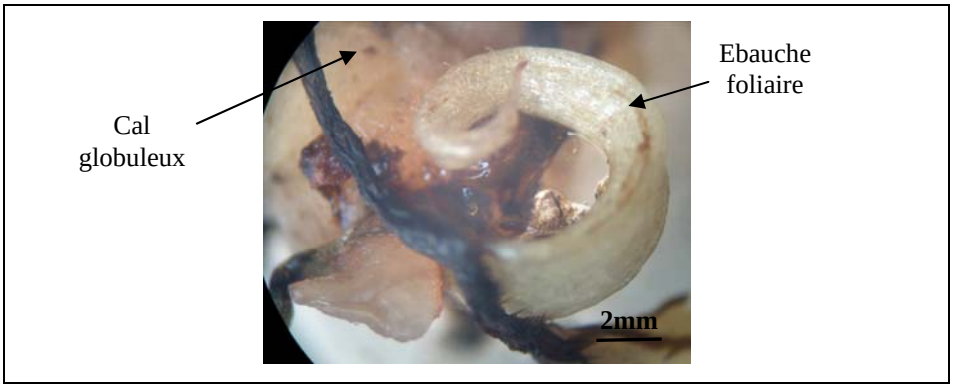


Figure 89 : Régénération d'une ébauche foliaire de *N. alata* sur un cal globuleux induit sur 1 mg/L de 2,4-D et de 0,2 mg/L de TDZ.

Dans notre cas, la plante est apparue au sommet du cal, dans une zone où les cellules ne sont plus directement en contact avec le milieu d'induction. La mémoire hormonale interne de cette partie du cal semble être cytokininique, favorisant la caulogenèse. Cependant, une seule plantule a été obtenue. Aucune régénération n'a été observée sur d'autres cals formés sur la même balance hormonale.

Néanmoins, ce résultat nous renseigne sur la nature *a priori* organogène de ce cal. Le processus de caulogénèse a donc été plus précisément étudié sur ces cals globuleux. La formation d'une tige feuillée peut être induite en exposant les cals à des cytokinines exogènes, et/ou en les plaçant à la lumière pour favoriser la formation de la chlorophylle.

Pour vérifier cette hypothèse, des cals globuleux ont été exposés à différentes concentrations en cytokinines, sous différentes conditions lumineuses.

2.2.3.1. Exposition des cals globuleux à des cytokinines à l'obscurité

Afin de dévier le programme interne des cellules vers la caulogénèse, les cals globuleux ont été soumis à différentes concentrations en cytokiniques : ils ont été exposés aux hormones BAP, Zéatine, Kinétine utilisées seules aux concentrations suivantes : 0.1, 0.5, 1 et 2 mg/L en milieu liquide pendant 10 jours à l'obscurité. Les cals ont ensuite été transférés sur un milieu de base solide sans hormones.

Aprés plusieurs semaines de culture à l'obscurité, aucune régénération n'a été observée. Suivant les plantes, l'organogenèse indirecte peut avoir lieu à l'obscurité comme par exemple chez l'oranger (Almeida *et al.*, 2003) ou au contraire à la lumière comme chez l'hybride citrange Troyer (Moreira-Dias *et al.*, 2000). N'étant pas observée à l'obscurité chez *Nepenthes alata*, la culture des cals à la lumière a été envisagée.

2.2.3.2. Exposition des cals globuleux à des cytokinines à la lumière

Des cals globuleux ont été mis en culture sur des milieux de base solides enrichis en BAP : 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 mg/L afin d'induire la caulogénèse. Pour chaque modalité hormonale, les cals ont été placés sous 3 conditions lumineuses différentes : obscurité, lumière faible (4,2 µmol/m^2/s), lumière moyenne (68 µmol/m^2/s).

En 7-9 jours, les cals globuleux cultivés sous une quantité moyenne de lumière (68 µmol/m^2/s) ont rosi puis bruni (Figure 90, B). Par contre, les cals placés sur un milieu enrichi de 2 mg/L de BAP et sous une quantité de lumière faible (4,2 µmol/m^2/s) sont devenus verts

en 4-5 jours (Figure 90, A). Sous l'influence de la cytokinine, ils ont mis en place leur appareil photosynthétique. Cependant, aucune plantule n'est apparue sur ces cals verts.

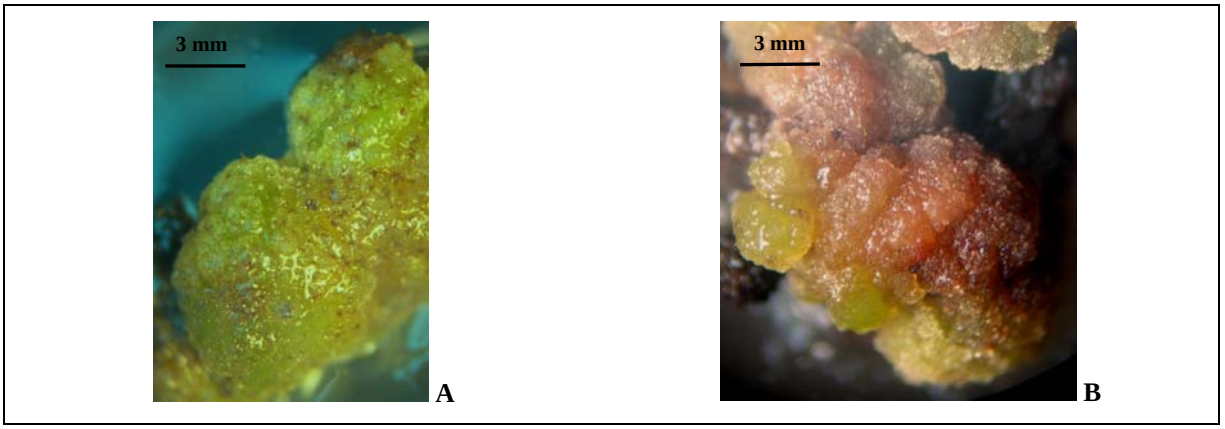


Figure 90 : Verdissement ou brunissement de cals globuleux exposés à une balance cytokinique de 2 mg/L de BAP sous différentes conditions lumineuses. A : Sous faible lumière (4,2 µmol/m^2/s). **B** : sous lumière moyenne (68 µmol/m^2/s).

Les cals globuleux sont donc sensibles à l'intensité lumineuse : une trop forte quantité de lumière provoque un stress oxydant trop important. Les cellules, dans un premier temps, produisent des anthocyanes (roses), molécules anti-oxydantes (Blando *et al.*, 2005), mais ceci ne suffit pas à stopper le processus d'oxydation : les cellules brunissent puis meurent. La mise en place de l'appareil photosynthétique d'un cal est un pas de plus vers la capacité à générer des tiges feuillées. En effet, elle atteste de la présence de cytokinines endogènes activant la synthèse de la chlorophylle (Genkov *et al.*, 1997 ; Chernyad'ev, 2000 ; Zubo *et al.*, 2005) et susceptibles de faire basculer le programme interne des cellules vers la caulogénèse. Elle indique également l'acquisition d'une indépendance métabolique du cal et des futures plantes régénérées, grâce à la capacité de réaliser la photosynthèse.

2.3. Régénération de *Nepenthes alata* par embryogénèse somatique

Comme décrit dans la partie 2.1., différents types de cals ont été obtenus sur les différentes combinaisons hormonales d'induction testées. Les résultats présentés dans cette partie concernent les cals de structure friable sur lesquels la régénération indirecte par embryogenèse somatique a été étudiée.

2.3.1. Induction de cals friables

Des cals de structure friable et compactes, blanc crème, ont été obtenus de façon répétable et reproductible à partir d'explants racinaires exposés pendant 2 mois à l'obscurité à une balance hormonale de 0,1 mg/L de 2,4-D en combinaison avec 0,35 à 2 mg/L de BAP établie sur le milieu de base (combinaison E, Figure 92, A et B).

Des cals de structure friables, mais cette fois blanc translucide ont également été obtenus de façon répétable et reproductible à partir d'explants foliaires étiolés (Figure 91) et au niveau du collet / base de tiges de plantules entières étiolées exposées pendant 2 mois à l'obscurité aux combinaisons hormonales respectives 0,5 mg/L de 2,4-D / 0,5 mg/L de BAP (combinaison E, Figure 92, C) et 0,75 mg/L de NAA / 0,5 mg/L de BAP (combinaison H, Figure 92, D). A la loupe binoculaire, ces cals ont une structure particulière, irrégulière avec des structures cellulaires très hétérogènes à la surface (Figure 92, E) par rapport aux autres cals induits à partir de racines.

L'utilisation de plantes préalablement cultivées à l'obscurité (pendant 3 à 4 semaines) permet de travailler avec des tissus non chlorophylliens. Ceci limite la production de polyphénols et le brunissement prématuré des explants, laissant aux cals le temps de s'induire (ce qui n'est pas le cas pour l'induction de cals sur des parties caulinaires chlorophylliennes). Les tissus sont plus tendres et moins différenciés. Les feuilles ne présentent plus de cuticule épaisse cireuse permettant un meilleur contact avec les hormones du milieu.



Figure 91 : *Nepenthes alata* étiolée après 3 semaines de culture à l'obscurité.

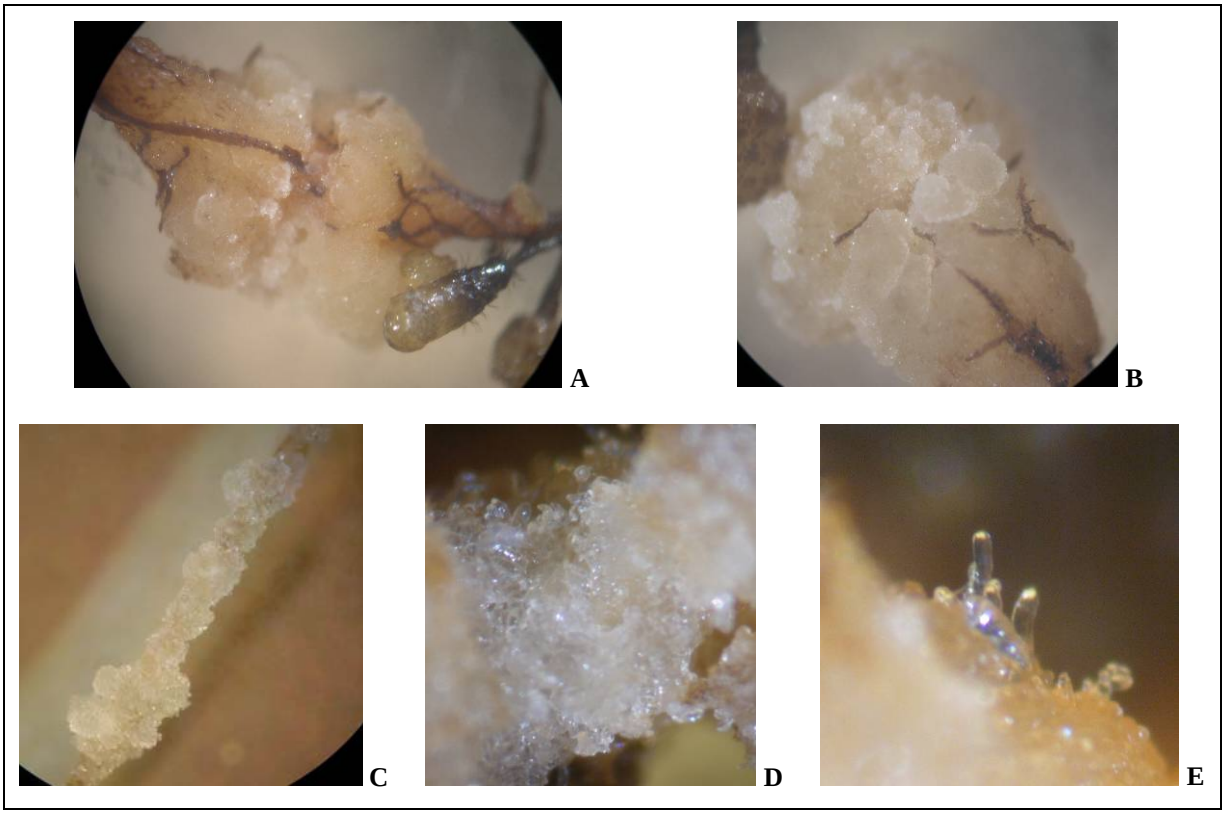


Figure 92 : Observations de cals friables de *N. alata* à la loupe binoculaire. A et B : cals friables obtenus à partir de racines sur la combinaison hormonale E 0,1 mg/L de 2,4-D / 0,35 mg/L de BAP. **C :** cal friable obtenu à partir de feuille étiolée sur la combinaison hormonale E 0,5 mg/L de 2,4-D / 0,5 mg/L de BAP. **D et E :** cal friable translucide obtenu à partir du collet / base de tige de plantule étiolée sur la combinaison hormonale H 0,75 mg/L de NAA / 0,5 mg/L de BAP.

D'autres expérimentations d'induction de cals ont été réalisées en utilisant la technique des Thin Cell Layer (TCL) ou couches cellulaires minces. Elle consiste en l'excision d'explants de petites tailles provenant de différents organes de la plante : feuilles, fleurs, primordia floraux, cotylédons, hypocotyle, épicotyle, tige, pétioles, partie apicale ou embryons (Teixeira da Silva, 2003). L'explant peut être coupé longitudinalement (TCLl) et ne comporte alors qu'un ou quelques types d'assises cellulaires suivant la manière dont la section est faite (par exemple une monocouche de cellules épidermiques). Il peut aussi être coupé transversalement (TCLt) et inclut alors un petit nombre de cellules provenant de différents types de tissus (en fonction de l'explant) : cellules épidermiques, corticales, cambiales, périvasculaires, médullaires, parenchymateuses (Tran Thanh Van, 1980). Pour les TCLt, l'architecture tissulaire n'est pas désorganisée, il n'y a pas d'altération des interactions entre les cellules, contrairement aux TCLl, qui permettent d'isoler plus spécifiquement des assises réactives.

Cette technique permet l'isolement de cellules spécifiques ou de couches cellulaires, qui en fonction de leur stade génétique et des facteurs épigénétiques (modifications réversibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant pas de changements des séquences nucléotidiques, en réponse à des conditions de l'environnement : lumière, Température, pH, hormones, milieux…) peuvent conduire à l'induction *in vitro* de programmes morphogénétiques spécifiques (Teixeira da Silva, 2003). C'est un système expérimental simplifié puisqu'il n'existe plus d'interactions entre les organes (Nhut *et al.*, 2001). De plus, la totalité de l'explant peut être en contact de façon uniforme avec le milieu de culture. L'origine, la taille et la position/orientation de l'explant peut être déterminante (Nhut *et al.*, 2003a ; Nhut *et al.*, 2007). Ce système peut être une solution pour la régénération de plantes récalcitrantes *via* organogenèse ou embryogenèse somatique : elle a été utilisée par exemple pour la régénération du bambou, de la rose, du pin, ou encore du manioc (Nhut *et al.*, 2003b ; Teixeira da Silva, 2003).

Des cals friables, blancs, durs (Figure 93, B et C), ont été obtenus de façon répétable par cette technique sur des TCL longitudinaux de jeunes tiges de *Nepenthes alata* (de 0,5 à 1 cm de long) (Figure 93, A) cultivés à l'obscurité durant un mois sur un milieu contenant 0,25 mg/L de TDZ en combinaison avec 0,25 ou 0,5 mg/L de 2,4-D (combinaison C), ou sur un milieu contenant 1 mg/L de 2,4-D en combinaison avec 0,25 ou 0,5 mg/L de TDZ (combinaison C).

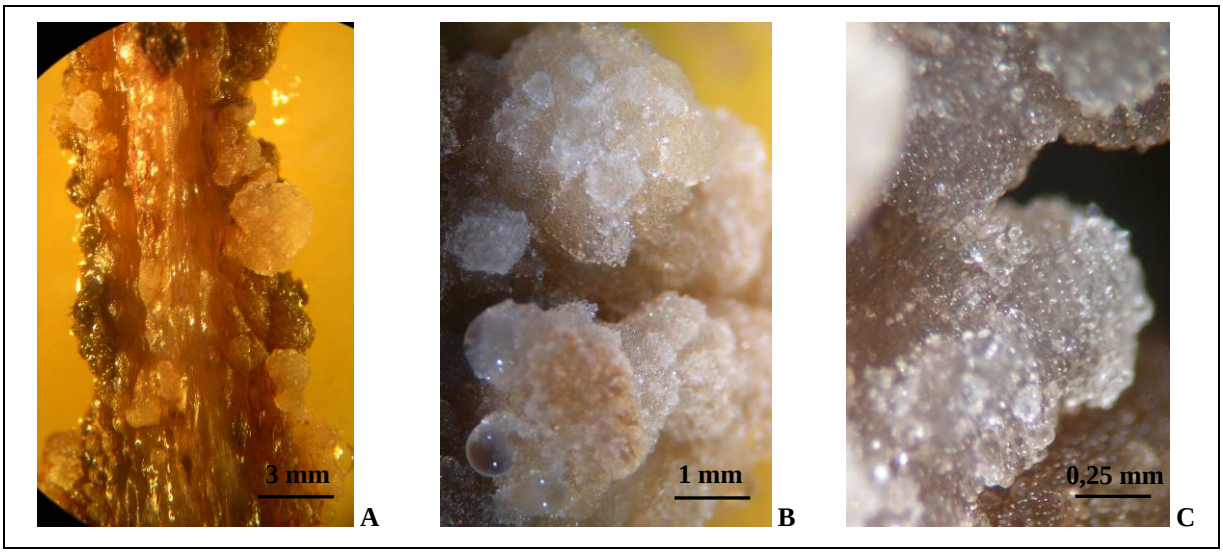


Figure 93 : Observations de cals friables obtenus à partir de TCL (Thin Cell Layer) de tige de *N. alata* sur la combinaison hormonale C 0,25 mg/L de TDZ / 0,5 mg/L de 2,4-D. A : Induction de cals sur un TCL longitudinal de tige au niveau d'assises sous-épidermiques. **B et C :** Observations de la structure des cals obtenu à partir de TCL transversaux de tiges.

L'induction du cal sur TCL est plus rapide que pour les inductions à partir d'autres explants : elle s'est faite au niveau d'assises sous épidermiques qui sont directement en contact avec le milieu de culture (Figure 93, A). Il est difficile de déterminer quelle assise est à l'origine des cals : ils sont induits entre l'épiderme et la moelle. Le cambium vasculaire (méristème secondaire) en division permanente, et présentant des cellules peu différenciées pourrait être l'assise à l'origine de cette induction. Des cals friables ont également été obtenus à partir de TLC transversaux d'entrenœuds de *Nepenthes alata*.

Cette combinaison hormonale déjà expérimentée sur des explants racinaires avait principalement généré des cals globuleux, mais aussi de façon non répétable quelques cals friables notamment sur les balances hormonales C : 0,75 mg/L de 2,4-D / 0,05 mg de TDZ et 0,5 mg/L de 2,4-D / 0,15 mg/L de TDZ. Comme pour les TCL, l'induction de cals friables avec cette combinaison hormonale s'effectue en présence d'une concentration en TDZ inférieure ou égale à celle de 2,4-D.

2.3.2. Observations microscopiques des cals friables

Suivant l'origine du cal, des structures cellulaires différentes ont été observées au microscope. Les résultats de ces observations sur des cals friables issus de racines et de collet de plantules étiolées sont présentés dans les deux paragraphes suivants. Les cals induits sur les

TCL n'ont pour le moment pas pu être observés au microscope, leur texture très dure rend la préparation difficile à réaliser.

2.3.2.1. Observations microscopiques de cals friables issus de racines

Des échantillons de cals friables induits à partir de racines ont été prélevés et des préparations ont été réalisées entre lames et lamelles. Les observations microscopiques sont présentées sur la figure 94.

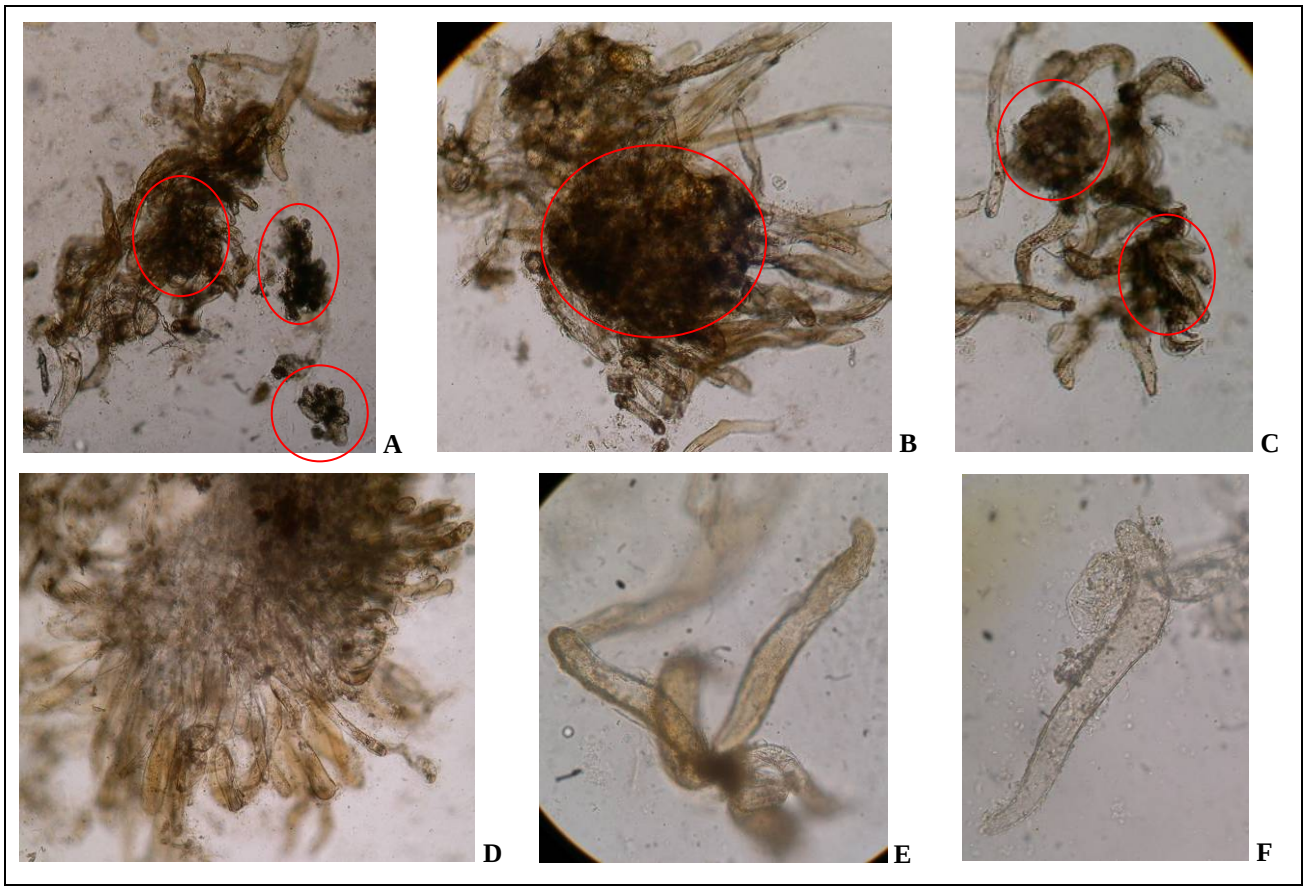


Figure 94 : Observations microscopiques de cals friables induits à partir de racines sur la combinaison E (0,1 mg/L 2,4-D et 1 mg/L de BAP). A, B et C : Observations de 2 types de cellules : allongées et vacuolisées, et petites et rondes à cytoplasme dense disposées en amas (x 400) (rond rouge). **D et E** : Groupement de cellules allongées et fortement vacuolisées, à cytoplasme (grossissement x 400 et x 1000). **F** : cellule allongée isolée (grossissement x 1000).

Les cals friables sont composés de deux types de cellules (Figure 94, A, B et C) : des cellules allongées, fortement vacuolisées, à cytoplasme peu dense, isolées (Figure 94, F) ou en groupes (Figure 94, D et E), et des cellules rondes, petites avec un cytoplasme dense, agrégées entre elles, formant des amas (Figure 94, A, B et C).

Ces cals friables induits à partir de racines (combinaison hormonale E : 2,4-D et BAP) présentent des structures cellulaires particulières caractéristiques des cals embryogéniques : des amas de petites cellules embryogéniques (masses pro-embryogéniques), accompagnés de cellules allongées non embryogéniques, comme décrit chez la carotte, le caféier, la pomme de terre ou le plantain (Emons *et al.*, 1992 ; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002 ; Vargas *et al.*, 2005 ; Morais-Lino *et al.*, 2008).

2.3.2.2. Observations microscopiques de cals friables issus de parties aériennes de plantes étiolées

Les cals ayant une structure friable et hétérogène induits au niveau de feuilles et de collet de plantules de *Nepenthes alata* étiolées sur la balance hormonale 2,4-D / BAP (combinaison E) et NAA / BAP (combinaison H) ont été observés plus précisément au microscope. Les résultats sont présentés sur la figure 95.

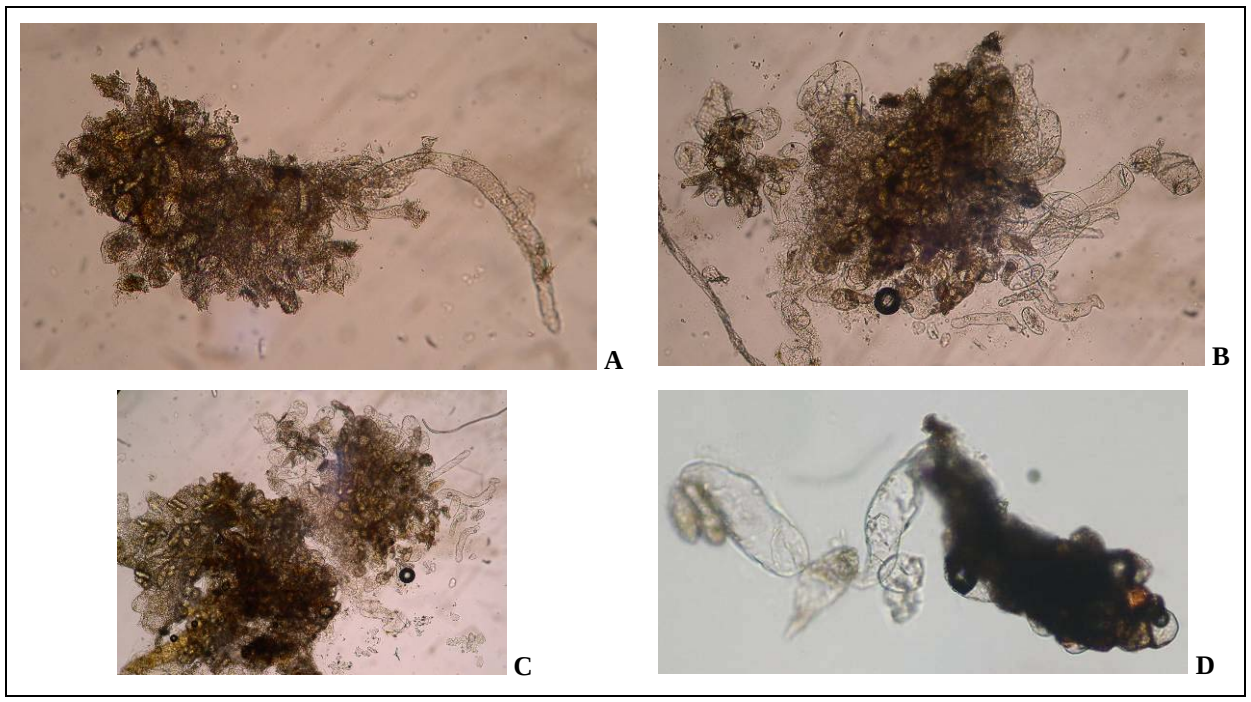


Figure 95 : Observations microscopiques de cals friables translucides induits à partir de collet de plantules étiolées de *N. alata* sur la combinaison hormonale H 0,75 mg/L de NAA / 0,5 mg/L de BAP. A, B et C : Observations d'amas opaques de petites cellules rondes à cytoplasme dense de couleur jaunâtre accompagnées de cellules allongées et vacuolisées (grossissement x 400, x 100 pour C). **D** : Observation d'un amas très opaque de cellules, accompagnées de quelques cellules allongés vacuolisées (grossissement x 1000).

Ces cals friables sont composés de cellules rondes, petites, ayant un cytoplasme très dense (jaunâtre) agrégées entre elles, pouvant former des amas opaques (Figure 95, A, B et C), donnant un aspect compact (Figure 95, D). Elles sont accompagnées de cellules allongées, fortement vacuolisées, à cytoplasme peu dense (Figure 95, A, B et C). Ces dernières sont présentes en quantités plus faibles par rapport aux cals racinaires. L'opacité des amas cellulaires peut également être due à un ratio nucléo-cytoplasmique élevé des cellules.

A l'image des travaux cités précédemment (Emons *et al.*, 1992 ; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002 ; Vargas *et al.*, 2005 ; Morais-Lino *et al.*, 2008), ces cals présentent de nombreux amas de cellules embryogéniques, et très peu de cellules non embryogéniques. Une étude réalisée sur des suspensions cellulaires embryogéniques de banane (*Musa* AAA, cv Grande Naine) a permis de déterminer 5 types d'agrégats cellulaires en fonction des stades de maturation des suspensions (Georget *et al.*, 2000).

- Le type I est défini par la présence de cellules isolées et de petits agrégats cellulaires. La majorité des cellules sont très vacuolisées.
- Le type II est défini par la présence d'agrégats cellulaires opaques et compacts, composés de cellules à cytoplasme dense, faiblement vacuolisées et avec un ratio nucléoplasmique élevé.
- Le type III présente des agrégats opaques avec des zones plus claires à la périphérie. Les cellules ont un cytoplasme très dense composé de protéines solubles, et un ratio nucléoplasmique élevé.

Si on se base sur les observations et les descriptions de Georget et de ses collaborateurs, il semblerait que nous soyons en présence d'agrégats de type I-II (Figure 95, A, B et C) et II voire II-III (Figure 95, D), alors que pour les cals racinaires, le type I semble approprié (Figure 94, A, B et C). Les cals induits sur le collet / bases de tige sur les feuilles de plantules étiolées présenteraient donc des masses pro-embryogéniques à un stade de maturation plus avancés que les cals friables racinaires (pour une balance hormonale d'induction composée des mêmes hormones 2,4-D / BAP, combinaison E). En effet, il existe un gradient de compétence embryogénique suivant l'organe d'induction. Il est plus élevé dans les tissus ayant une origine embryogénique et diminue progressivement pour les organes suivants : l'hypocotyle, le pétiole, la feuille et les racines (Fehér, 2006), ceci pouvant expliquer les stades différents de maturation obtenus suivant l'explant de départ.

Toujours chez la banane, il a été constaté qu'une pigmentation jaunâtre du cytoplasme (présence d'amidon) indique le caractère embryogénique des suspensions cellulaires (Ganapathi *et al.*, 2001 ; Jalil *et al.*, 2003 ; Morais-Lino *et al.*, 2008). Dans notre cas, même si

les observations n'ont pas été réalisées sur des suspensions, la figure 95 montre une coloration Jaune-marron au niveau d'agrégats cellulaires denses. Cette indication appuie l'hypothèse du caractère embryogénique de nos cals.

Afin de confirmer réellement la nature de nos cals, une double coloration au carmin acétique et au bleu Evans pourrait être réalisées (Jalil *et al.*, 2003 ; Gupta and Holmstrom, 2005) : les gros noyaux des cellules embryogéniques réagissent avec le carmin acétique et se colorent en un rouge intense. Quant aux cellules non embryogéniques, possèdant un petit noyau, elles ne sont donc pas colorées par le carmin acétique, et sont perméables au bleu Evans qui les colore en bleu (Gupta and Holmstrom, 2005). Cette coloration pourra être faite dès que le matériel biologique le permettra.

Cependant, pour n'écarter aucunes pistes, ces cals friables font également l'objet d'expérimentations de régénération par organogénèse, comme décrit pour les cals globuleux.

2.3.3. Etude de l'embryogénèse zygotique de *Nepenthes* en vue de l'identification des différents stades de l'embryogenèse somatique

2.3.3.1. Etude de l'embryogénèse zygotique de *Nepenthes mirabilis*

La morphologie des embryons somatiques peut être très variable d'une plante à l'autre, et même au sein d'une même espèce. Dans notre cas, ne sachant pas quelle structure embryonnaire attendre sur *Nepenthes alata*, l'étude de l'embryogenèse zygotique de la plante nous a semblé tout indiquée, afin de comparer les différents stades du développement des embryons zygotiques avec ceux des embryons somatiques, relativement comparables (Dodeman *et al.*, 1997 ; von Arnold *et al.*, 2002). L'embryogenèse somatique est en effet définie comme un procédé au cours duquel des structures bipolaires, ressemblant à des embryons zygotiques, se développent à partir de cellules non zygotiques sans connexion vasculaire avec le tissu original (von Arnold *et al.*, 2002).

Chez les plantes du genre *Nepenthes*, les stades de développement de la graine ne sont pas décrits. Ces dernières présentent une forme peu commune : elles sont très fines et allongées, très légères pour une dispersion facilitée par le vent, et n'ont que très peu de réserves (endosperme réduit) (synthèse bibliographique, partie 2.3.2, p 77). Elles ne sont viables que très peu de temps après l'ouverture du fruit. Leur fraîcheur est une condition *sine qua none* à leur germination.

Nous avons donc entrepris d'étudier plus précisément la germination des graines de *Nepenthes* en nous appuyant sur certains travaux décrivant des conditions favorables à la germination *in vitro* (Rasco and Maquilan, 2005 ; Khompat *et al.*, 2007). Toutes les espèces de graines de *Nepenthes* ne sont pas disponibles à la vente, nous nous sommes approvisionnées en graines de *N. mirabilis*, *N. gracilis*, *N. reinwardtiana*, et *N. ventricosa* (*Nepenthes alata* non disponible). En effet, les graines de *Nepenthes* sont relativement rares dans le commerce : la plante étant dioïque, et fleurissant assez rarement en serres, les producteurs de graines disposant de pieds males et femelles en fleurs à un même moment sont rares. Les premières graines provenant de différents fournisseurs de semences de plantes rares ou exotiques n'ont pas germé, le problème venant essentiellement de leur fraîcheur. Après de nombreux essais infructueux, nous sommes parvenus récemment à faire germer, à la lumière, des graines de *N. mirabilis et N. reinwardtiana* (importées de République Tchèque, CZ plants). Les différents stades observés de la germination sont présentés sur la figure 96.

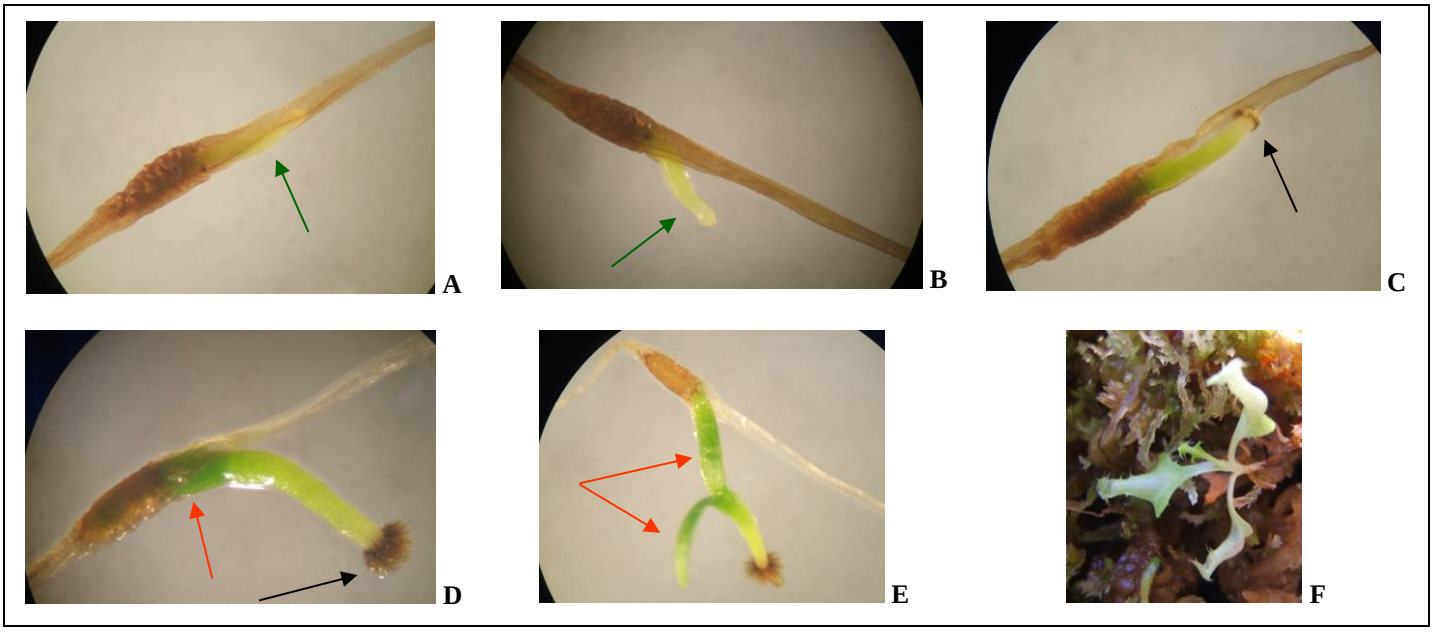


Figure 96 : Les différentes étapes de la germination de la graine de *Nepenthes*. A et B : Hypocotyle de graine de *N. reinwardtiana* (flèche verte, grossissement x 40). **C :** Hypocotyle de graine de *N. reinwardtiana* avec formation d'une ébauche racinaire (flèche noire, grossissement x 40). **D :** Germination de graine de *N. reinwardtiana* (ébauche racinaire (flèche noire, grossissement x 40), hypocotyle, et apparition des cotylédons (flèche orange, grossissement x 40). **E :** Stade cotylédonaire (*N. reinwardtiana*) : apparition des cotylédons en forme de V (flèche orange, grossissement x 40). **F :** Apparition des premières feuilles surmontées des premières urnes (*Nepenthes mirabilis*).

La figure 96 montre un développement progressif de l'hypocotyle surmonté des 2 cotylédons (Figure 96, E). A l'extrémité de cet hypocotyle, se forme très rapidement une ébauche racinaire (Figure 96, C et D). La graine possédant peu de réserves, le système

racinaire doit être mis en place rapidement afin que la jeune plantule puisse subvenir à ses besoins. La figure 96 F montre les 3 premières feuilles formées simultanément, et une ébauche de la 4ème feuille. Les limbes foliaires sont très réduits, ce sont des urnes qui apparaissent dès les premiers stades du développement de la plante.

Des germinations en cours nous permettront de déterminer les autres stades embryonnaires plus précoces (avant l'apparition de l'hypocotyle).

2.3.3.2. Obtention d'embryons somatiques de *Nepenthes alata*

Ces cals issus de feuilles et de collets / bases de tiges de plantules étiolées sont, d'après les observations microscopiques, des cals embryogèniques. Comme décrit auparavant, leur surface est hétérogène, et certaines structures particulières ont pu être observées à la loupe binoculaire (Figure 97).

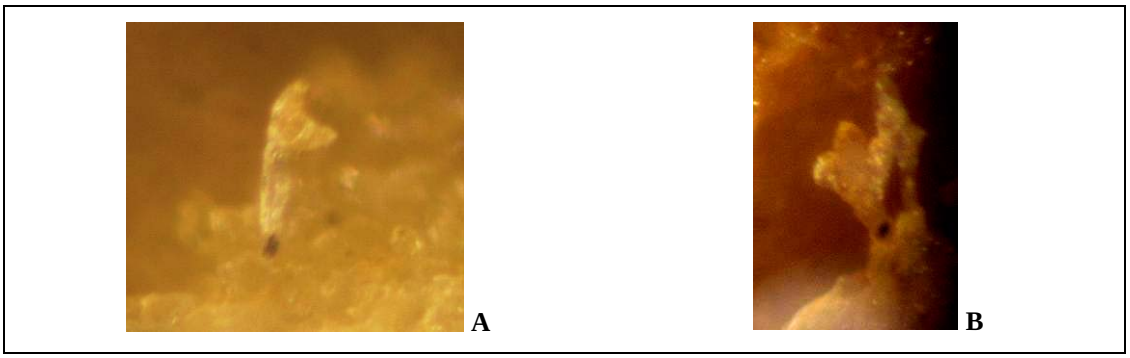


Figure 97 : Observations à la loupe binoculaire de structures dressées à la surface de cals friables translucides issus de feuilles et de collets de plantules étiolées (grossissement x 50**). A** : structure dressée terminée par deux lobes formant un V apparu sur un cal induit à partir du collet d'une plantule étiolée sur la combinaison H 0,75 mg/L NAA / 0,5 mg/L BAP. **B :** structure érigée surmontée par trois lobes apparus sur un cal induit à partir de feuille étiolée sur la combinaison E 0,5 mg/L 2,4-D / 0,5 mg/L BAP.

La figure 97 montre des structures organisées, se détachant nettement de la surface des cals en partant d'une zone noire. La figure 97 A montre une structure dressée, allongée, surmontée de 2 lobes formant un V. La figure 97 B présente une structure érigée terminée, par 3 lobes. Etant donné les amas embryogéniques observés au microscope sur ces cals friables issus de plante étiolées, il semble possible que des embryons somatiques aient pu se développer. Des embryons translucides ont déjà été observés notamment chez la banane (Navarro *et al.*, 1997 ; Khalil *et al.*, 2002 ; Jalil *et al.*, 2003). La zone noire à la base des 2

structures pourrait être l'apex racinaire. Nous avons déjà observé le développement très précoce des racines lors de la germination de la graine (figure 96). Il est possible, comme pour l'embryon zygotique, que l'apex racinaire des embryons somatiques se soit rapidement mis en place. Cependant, il est difficile de déterminer catégoriquement leurs éventuels stades de maturation. Au vue de la forme des cotylédons lors de la germination de la graine (figure 96, E), la structure présentée figure 97 A, pourrait être à un stade cordiforme voire torpédo. La structure présentée figure 97 B pourrait être à un stade embryonnaire plus avancé, comme cotylédonaire (avec développement de l'apex caulinaire).

Dans tous les cas, ces structures n'ont été observées qu'une seule fois sur deux cals différents cultivés sur leur milieu d'induction. Or, la présence d'auxines inhibe théoriquement la formation d'embryons (von Arnold *et al.*, 2002). Ces structures sont apparues sur la partie supérieure des cals n'étant pas en contact avec le milieu de culture. Le fait que cette zone ne soit pas sous l'influence directe de la balance hormonale (cals volumineux de surcroît), pourrait expliquer l'apparition d'embryons somatiques. Afin de confirmer ces résultats et d'obtenir de façon répétable ces structures, l'étape de maturation est en cours d'expérimentation : la culture de ces cals sur un milieu sans hormones devrait théoriquement permettre la maturation des amas embryogéniques vers les premiers stades embryonnaires (von Arnold *et al.*, 2002 ; Komamine *et al.*, 2005).

3. Discussion relative à l'élaboration d'un protocole de régénération de *Nepenthes alata* en vue de sa transformation génétique

L'induction de cals à partir de racines de *Nepenthes alata* sous l'influence d'une balance hormonale 2,4-D / TDZ a donné des cals globuleux de nature organogénique. Une plantule a été régénérée sur un de ces cals. Afin d'obtenir de façon répétable des tiges feuillées, certaines étapes de l'organogénèse indirecte doivent être optimisées, notamment l'étape d'acquisition de l'appareil chlorophyllien du cal favorisant la formation de bourgeons.

Afin d'accélérer la mise en place de cette autotrophie et de limiter au maximum le stress photo-oxydant, les cals pourraient être cultivés d'abord sous une lumière faible et être transférés progressivement (par exemple chaque semaine) sous une lumière légèrement plus forte. Outre le BAP, d'autres cytokinines pourront être testées en milieu solide comme la zéatine ou la kinétine pour induire le verdissement des cals et la régénération de tiges feuillées. Dans le cas ou elle ne serait pas observée sous l'influence de cytokinines, l'organogenèse à partir de cals chlorophylliens pourra être induite sous l'influence d'une

balance hormonale auxine-cytokinine (BAP, zéatine, ou kinétine, en combinaison avec des auxines comme l'AIA (Acide indole-acétique), le NAA, ou le 2,4-D) comme chez le concombre (NAA ou AIA ou 2,4-D en combinaison avec la zéatine et le BAP) (Selvaraj *et al.*, 2007) ou encore chez la gesse cultivée (BAP et AIA en combinaison) (Zambre *et al.*, 2002).

Enfin, l'induction de cals globuleux pourrait être réalisée à partir d'une autre combinaison hormonale, non encore testée sur *Nepenthes alata* : le TDZ en association avec l'AIA. Cette balance hormonale est utilisée pour l'induction de cals organogènes chez plusieurs plantes, et a donné des résultats prometteurs en terme de régénération, notamment chez le gardenia (Al-Juboory *et al.*, 1998), le haricot de Lima (Kanchiswamy and Maffei, 2008) ou encore la sauge grecque (Karam *et al.*, 2003).

D'autre part, des cals friables ont été obtenus de façon répétable à partir de combinaisons hormonales différentes (2,4-D / TDZ, 2,4-D / BAP et NAA / BAP) et d'explants différents (TCL longitudinaux et transversaux de tiges, racines, feuilles et hypocotyles de plantes étiolées). L'acquisition du potentiel embryogénique des cellules somatiques nécessite une reprogrammation du profil d'expression des gènes, qui s'accompagne de changements morphologiques, physiologiques et métaboliques au sein des cellules (Namasivayam, 2007).

Généralement, les cals embryogéniques sont formés sur un milieu contenant des auxines. Un mécanisme, par lequel ces hormones réguleraient l'embryogenèse, est l'acidification du cytoplasme des cellules (von Arnold *et al.*, 2002). Un indicateur de pH (bleu de bromocrésol) ajouté dans le milieu d'induction nous a d'ailleurs permis d'observer une acidification du milieu lors de l'induction de cal (changement de couleur du milieu autour des cals).

Un autre mécanisme intervenant dans la régulation de l'expression de ces gènes est la méthylation de l'ADN, influencé par les auxines, notamment le 2,4-D (Leljak-Levanić *et al.*, 2004 ; Yamamoto *et al.*, 2005). Nos milieux d'induction contiennent tous en effet des auxines, soit du 2,4-D soit du NAA. Le stress hormonal jouerait un rôle central dans la médiation du signal de transduction menant à la reprogrammation de l'expression de gènes (von Arnold *et al.*, 2002). Des stress d'un autre type (osmotique, environnementaux) peuvent, chez certaines plantes, induire des cals de nature embryogénique : la callogénèse chez *Nepenthes alata* a également été testée en l'absence d'hormones sous l'influence de fortes concentrations en NaCl dans le milieu, de fortes concentrations en saccharose ou de stress

thermique, mais aucun résultat n'a été obtenu. Seul un stress de type hormonal est efficace dans notre cas.

L'initiation de cals embryogéniques, est certes liée en partie aux stimuli hormonaux exogènes auxquels les explants sont soumis, mais également à la nature et au stade de développement du tissu de départ. En effet, au sein de l'explant, seules certaines cellules (plus réactives) ont la capacité d'acquérir un potentiel embryogénique par activation de gènes spécifiques (Namasivayam, 2007). Cette particularité est principalement liée à leur sensibilité aux auxines, qui est dépendante à la fois de leur génotype et de leur stade de développement. Dans notre cas, la callogénèse a également été étudiée chez *N. ventricosa* et *N. rafflesiana*, mais aucun résultat n'a été obtenu. *N. alata* semble présenter un génotype plus sensible aux auxines que les deux autres espèces.

L'embryogenèse somatique est en fait génétiquement déterminée : certaines plantes, comme la carotte ou la luzerne, sont capables de former des cals embryogéniques à partir de n'importe quel explant de départ, alors que pour d'autres plantes, seuls des tissus embryonnaires ou juvéniles sont utilisés (von Arnold *et al.*, 2002). Pour *Nepenthes alata*, nous sommes dans ce deuxième cas : seuls de jeunes tissus à un stade de différenciation légèrement moins avancé (hypocotyles de jeunes plantes étiolées, assise sous épidermique de jeunes feuilles étiolées), ou des zones en constante division comme les apex racinaires, sont capables de générer des cals embryogéniques.

Des expérimentations de prolifération de cals friables sont actuellement en cours afin de disposer de matériel biologique en quantité suffisante. Ceci permettrait notamment de réaliser la suite des expérimentations sur des amas indifférenciés provenant d'un même explant, et ainsi limiter la diversité génétique induisant parfois des réponses différentes à un stress.

Les cals ont été mis en culture à l'obscurité en milieu solide et liquide (milieu de base) supplémenté de la combinaison hormonale d'induction. Les auxines sont nécessaires pour la prolifération des masses pro-embryogéniques, mais elles inhibent le développement de ces masses en embryons somatiques, en inactivant les gènes activateurs de l'embryogenèse somatique (Filonova *et al.*, 2000 ; Komamine *et al.*, 2005).

En culture liquide, la surface de contact du cal avec le milieu est plus élevée qu'en milieu solide ; les concentrations hormonales ont également été divisées par 5 et par 10, afin d'éviter un stress hormonal trop important. Pour établir des suspensions cellulaires viables, il faut d'abord déterminer une densité cellulaire adéquate (Guo and Zhang, 2005 ; Ben Amar *et al.*, 2007). Une biomasse cellulaire de départ trop faible peut nuire à la croissance cellulaire à

cause d'une production trop faible d'arabinogalactanes (Günter and Ovodov, 2002) dans la culture. Au contraire, une trop grande biomasse de départ, peut causer une forte production de protéoglycannes (Günter and Ovodov, 2002) et une consommation rapide et excessive des nutriments (Ben Amar *et al.*, 2007). Que ce soit en culture solide ou liquide, la prolifération de cals de *N. alata* doit être effectuée à partir de cals présentant une biomasse comprise entre 0,5 et 2 g. De plus, la séparation du cal du tissu mère provoque un stress important, et les petits cals brunissent rapidement, alors que des cals plus volumineux, grâce à un effet de masse, ne brunissent pas.

Pour une propagation rapide et efficace, la prolifération en culture liquide est plus indiquée. En suspension, les cellules isolées et les agrégats peuvent aussi être facilement séparés par filtration ou centrifugation. Les amas de cellules embryogéniques peuvent alors être sélectionnés et une nouvelle culture liquide synchronisée peut être lancée (von Arnold *et al.*, 2002 ; Nomura, 2003). Des essais de prolifération en milieu semi-solide sont également envisagés (ajout de milieu liquide supplémenté en hormones sur un cal cultivé en milieu solide sans hormones).

Simultanément, l'étape de maturation des masses pro-embryogéniques vers les premiers stades embryonnaires est étudiée. C'est une étape très importante et déterminante : en effet, des perturbations durant cette transition peut stopper de façon irréversible le processus d'embryogenèse somatique (von Arnold *et al.*, 2002). Cette étape doit être réalisée en l'absence d'auxines dans le milieu de culture, afin de débloquer l'expression des gènes responsables de la transition MPE-embryons (Zimmerman, 1993). D'autres facteurs peuvent favoriser la maturation des MPE comme l'ajout dans le milieu de polyamines (Putrescine, spermine, spermidine) (Silveira *et al.*, 2006 ; De-la-Peña *et al.*, 2008). L'ajout d'arabinogalactanes (protéo-glycannes végétaux) peut également avoir un effet positif sur la formation d'embryons (Van Hengel *et al.*, 2002 ; Borderies *et al.*, 2004).

Les cals embryogéniques seront également soumis à différentes qualités de lumière : lumière rouge (670 ± 50 nm, rouge lointain (> 700 nm), bleue (450 ± 60 nm), verte (540 ± 50 nm), blanche (390-770 nm) sous une intensité comprise entre 5 et 50 µmol/m^2/s. Des études réalisées sur des suspensions cellulaires de carotte (Michler and Lineberger, 1987), des feuilles de cognassier (D'Onofrio *et al.*, 1998) , ou encore des cals de jacinthe (Bach and Krol, 2001) ont montré les effets de la qualité de la lumière sur la formation d'embryons somatiques, notamment un effet positif de la lumière rouge, et négatif de la lumière bleue. Des expositions à la lumière blanche de cals friables de *Nepenthes alata* sous différentes intensités ont d'ailleurs déjà été expérimentées. Sous une faible quantité de lumière (4,2

µmol/m^2/s, les cals ont verdi alors qu'ils ont rapidement bruni sous une plus forte quantité de lumière (68 µmol/m^2/s, quantité restant relativement faible). Ces tests préliminaires ont montré la capacité des cals à réagir à un stimulus lumineux, et leur capacité à mettre en place un appareil photosynthétique.

La dernière étape du processus, consistera en la maturation des embryons somatiques obtenus menant à la germination. Durant cette étape, l'embryon va subir de nombreux changements morphologiques mais aussi biochimiques parmi lesquelles l'acquisition de la tolérance à la déssication et l'accumulation des réserves (nécessaires à la germination)(von Arnold *et al.,* 2002). Une fois formés, les embryons ne doivent pas être soumis à des traitements de maturation avant d'avoir atteint un stade approprié. Leur formation et leur maturation peuvent être aidées par l'ajout dans le milieu de culture d'acide abscissique et/ou de polyamines (Santa-Catarina *et al.,* 2007). D'autres facteurs comme le taux d'éthylène, un stress osmotique (par le PolyEthylèneGlycol (Kong *et al.,* 1998) mimant une déshydratation), le pH, peuvent aussi avoir un rôle dans la maturation et la germination des embryons somatiques (von Arnold *et al.,* 2002). La lumière et la photopériode seront des facteurs à privilégier. En effet, les graines de *Nepenthes* ne germent qu'en présence de lumière (Rasco and Maquilan, 2005), il se pourrait qu'il en soit de même pour la germination des embryons somatiques.

Une autre approche est actuellement en cours d'expérimentation pour parvenir à régénérer notre plante. Il s'agit d'utiliser le gène *ipt* codant pour l'isopentényl transférase (intervenant dans la voie de biosynthèse des cytokinines), plus généralement utilisé comme gène marqueur (Bibliographie page 88), pour aider à la régénération de *Nepenthes alata* (Zuo *et al.,* 2002) et donc permettre de régénérer et de transformer la plante en une seule étape. Les paramètres de la transformation génétique de la plante *via Agrobacterium tumefaciens* sont en cours de détermination.

Les résultats obtenus, ont donné lieu à la demande d'un dépôt de brevet protégeant la régénération indirecte des plantes du genre *Nepenthes* (MIGUEL, S., BITEAU, F., LAINE, JM., BOURGAUD, F. 2008. N° d'enregistrement : FR 0803259. Procédé de régénération de plantes entières du genre Népenthès à partir de cals de cellules indifférenciées). Même si le protocole n'est pas encore développé dans son intégralité, et que certaines étapes sont en cours d'optimisation, il nous a semblé stratégique et prudent de nous positionner dans le

domaine. En effet, la technologie PAT Friday® appliquée au genre *Nepenthes* est d'ores et déjà protégée par le brevet W0/2008/040599A1 (Biteau *et al.*, 2008). Mais *Nepenthes* est une plante rare, et certains organismes ou laboratoires pourraient tenter de la régénérer afin de pouvoir la multiplier et la conserver. C'est dans le but de contrer un éventuel brevet déposé par ces tiers, pouvant entraver le développement de la technologie PAT Friday® sur notre modèle industriel, que cette demande de dépôt de brevet a été menée.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse avait pour but de réaliser la preuve de concept d'une nouvelle technologie de production de protéines recombinantes dans les fluides digestifs extracellulaires de plantes carnivores génétiquement modifiées : sur le modèle expérimental *Drosera rotundifolia*. La seconde partie du travail a consisté à développer la technologie, baptisée PAT Friday®, sur le modèle potentiellement industrialisable *Nepenthes alata*.

Un protocole de transformation génétique de la plante *Drosera rotundifolia* a tout d'abord été établi. Même si la technique avait déjà été étudiée par Hirsikorpi et ses collaborateurs (Hirsikorpi *et al.*, 2002), différents paramètres ont été optimisés afin de la rendre la plus efficace possible, comme les conditions de régénération, ou de sélection des transformants. La plante a été transformée dans un premier temps avec deux gènes rapporteurs codant pour les protéines GUS et GFP, et un taux de transformants élevé (12 et 8 % pour chacun des 2 gènes) a été obtenu. En 8 mois de travail, ces protéines ont été mises en évidence dans les limbes et dans la glu de plantes génétiquement transformées. Ces résultats ont permis à l'entreprise Plant Advanced Technologies SAS de soumettre rapidement une demande de dépôt de brevet protégeant la technologie sur l'ensemble des plantes carnivores productrices de sécrétions protéiques (Biteau *et al.*, 2008).

Dans un deuxième temps, les *Drosera rotundifolia* ont été transformées avec des gènes humains codant pour des protéines thérapeutiques : l'interféron gamma et le facteur intrinsèque. Les taux de transformants obtenus se sont avérés plus faibles (1,4 et 2,7 %) que pour les transformations génétiques avec les gènes marqueurs. Différentes techniques nécessaires à la caractérisation des transformants ont été développées, comme l'extraction de l'ADN génomique, l'extraction de protéines à partir de la biomasse végétale, ou les techniques de détection immunologique des protéines d'intérêt. Il a été démontré que les protéines recombinantes étaient exprimées dans les feuilles des plantes génétiquement transformées, et leur mise en évidence dans la glu est une étape en cours de réalisation. L'étude de la fonctionnalité de ces protéines humaines produites dans notre modèle végétal est également prévue, dès que la biomasse végétale disponible le permettra.

D'autres plantes carnivores présentent un potentiel de production extracellulaire de protéines recombinantes beaucoup plus important que *Drosera* : il s'agit des plantes du genre

Nepenthes, possèdant aux extrémités de chaque feuille de véritables bioréacteurs naturels de secrétions protéiques. Leur potentiel sécrétoire a été étudié et évalué à environ 10 litres de sécrétions par m^2 et par an pour *Nepenthes alata*, représentant une production d'environ 10 kg de protéines totales par hectare et par an, sans affecter la viabilité des plantes. Différentes perspectives sont envisagées pour améliorer la sécrétion, comme l'ajout de peptide signal adéquat aux gènes d'intérêt, la sur-expression de gènes de la famille des protéines SNARE, ou encore plus simplement par l'ajout de substances mimant la présence d'insecte dans les urnes dans la mesure ou la protéolyse sera totalement maîtrisée (risque de chute du pH par l'ajout de substances azotées et d'activation des protéases digestives). Mais l'avantage majeur de la technologie repose surtout sur la collecte facilitée de protéines recombinantes produites dans un liquide extracellulaire directement récupérable. Ces secrétions ont été étudiées, et nous avons montré la présence d'une dizaine de protéines seulement au sein de ces secrétions, laissant présager une purification aisée, par la suite, des protéines d'intérêt.

Cependant, la présence de protéases naturelles au sein de ces fluides pourrait se révéler très gênante, à cause d'un risque de protéolyse des protéines recombinantes produites. Une étude de l'activité de ces enzymes a été menée, et nous avons montré qu'un contrôle chimique par le pH des sécrétions ou par l'ajout d'inhibiteur de protéases dans les urnes était possible. Un contrôle génétique des protéases, par des techniques d'ARN interférence, peut également être envisagé.

Au vu de son fort potentiel pour la production de protéines recombinantes à un stade industriel, il a été envisagé de développer un protocole de transformation génétique de la plante *Nepenthes alata*. En effet, contrairement à *Drosera rotundifolia*, la transformation génétique, et la régénération n'avaient pas été étudiées et décrites chez cette plante. Il a donc fallu dans un premier temps déterminer ses conditions de régénération en vue de la transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens*. Différentes voies ont été étudiées pour obtenir des régénérants rapidement : tout d'abord l'organogenèse directe, mais la plante s'est avérée récalcitrante à ce mode de régénération, à cause d'une production accrue de polyphénols en réponse aux stress hormonaux infligés. La régénération indirecte par organogénèse ou embryogénèse somatique s'est donc avérée indiquée pour parvenir à régénérer la plante.

Nous sommes parvenus à induire des amas de cellules indifférenciés à partir de différents explants et sur différentes balances hormonales. Des cals de structure globuleuse, ayant *a priori* un potentiel organogénique, ont été obtenus à partir de racines sur une

combinaison 2,4-D / Thidiazuron. Une plantule a même été obtenue à partir d'un de ces cals. Des expérimentations sont en cours afin d'obtenir de façon répétable ce résultat. En parallèle, des cals de structure friable ont été obtenus à partir de racines et de feuilles étiolées exposées à une balance hormonale 2,4-D / BAP et à partir de collets de plantules étiolées sur une combinaison hormonale NAA / BAP. Au microscope, ces cals ont montré des structures cellulaires particulières propres aux cals de nature embryogénique (MPEs). De plus, des structures embryonnaires ont, semble t-il, été observées sur ces cals. Des expérimentions en cours visent à faire proliférer ces cals, et à obtenir de façon répétable des embryons somatiques. Une fois cette étape maitrisée, le travail consistera en la maturation et en la germination de ces embryons.

Ces premiers résultats ont fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet, protégeant la régénération par voie indirecte, afin de protéger doublement la technologie sur le modèle *Nepenthes.*

En parallèle, une autre approche, ayant permis de régénérer certaines plantes récalcitrantes, est actuellement étudiée : elle vise à transformer notre plante avec un gène marqueur (*ipt)* codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse des cytokinines et contribuant ainsi à la régénération de tige feuillée, après intégration chromosomique de ce gène par le vecteur *Agrobacterium tumefaciens*.

La régénération de *Nepenthes alata* est donc une étape déterminante pour la suite du développement du protocole de transformation génétique et du développement de la technologie PAT Friday® à un stade industriel. Cependant, la perspective de transposer la technologie sur une autre espèce de *Drosera,* produisant un volume de mucilage plus important, est actuellement très réfléchie : *Drosera regia* pourrait constituer un modèle expérimental très intéressant afin de caractériser plus facilement les protéines produites. Elle pourrait aussi devenir un modèle industriel intermédiaire (modèle de démonstration) permettant à l'entreprise Plant Advanced Technologies SAS de se positionner rapidement dans le domaine de la production de protéines recombinantes d'origine végétale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abu-Qarn, Mehtap, Eichler, Jerry and Sharon, Nathan (2008). "Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea." Current Opinion in Structural Biology **18**(5): 544-550.

Akbudak, M. A. and Babaoglu, M. (2005). "Callus induction in small flowered willow herb (Epilobium parviflorum Schreb)." Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology **14**(2): 189-191.

Al-Juboory, K. H., Skirvin, R. M. and Williams, D. J. (1998). "Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (Gardenia jasminoides Ellis) leaf explants." Scientia Horticulturae **72**(3-4): 171-178.

Allen, M. J., Boyce, J. P., Trentalange, M. T., Treiber, D. L., Rasmussen, B., Tillotson, B., Davis, R. and Reddy, P. (2008). "Identification of novel small molecule enhancers of protein production by cultured mammalian cells." Biotechnology and Bioengineering **100**(6): 1193-1204.

Almeida, Weliton A. B., Mourão Filho, Francisco A. A., Pino, Lilian E., Boscariol, Raquel L., Rodriguez, Adriana P. M. and Mendes, Beatriz M. J. (2003). "Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of Citrus sinensis L. Osbeck." Plant Science **164**(2): 203-211.

Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B. and Marz, L. (1999). "Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins." Glycoconj J **16**(2): 109-23.

Amagase, S. (1972). "Digestive enzymes in insectivorous plants. 3. Acid proteases in the genus *Nepenthes* and *Drosera peltata*." J Biochem **72**(1): 73-81.

Amagase, S., Mori, M. and Nakayama, S. (1972). "Digestive enzymes in insectivorous plants. IV. Enzymatic digestion of insects by *Nepenthes* secretion and *Drosera peltata* extract: proteolytic and chitinolytic activities." J Biochem **72**(3): 765-7.

An, C. I., Fukusaki, E. I. and Kobayashi, A. (2001). "Plasma-membrane H+-ATPases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco." Planta **212**(4): 547-555.

An, C. I., Fukusaki, E. I. and Kobayashi, A. (2002a). "Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco." Planta **214**(5): 661-667.

An, C. I., Takekawa, S., Okazawa, A., Fukusaki, E. I. and Kobayashi, A. (2002b). "Degradation of a peptide in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco." Planta **215**(3): 472-477.

Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr J.M, Jr., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V. B. (2000). "A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants." Science **290**(5489): 142-144.

Andres, E., Loukili, N. H., Noel, E., Kaltenbach, G., Abdelgheni, M. B., Perrin, A. E., Noblet-Dick, M., Maloisel, F., Schlienger, J. L. and Blickle, J. F. (2004). "Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients." Cmaj **171**(3): 251-9.

Antonis, Adriaan F. G., Bruschke, Christianne J. M., Rueda, Paloma, Maranga, Luis, Casal, J. Ignacio, Vela, Carmen, Hilgers, Luuk A. Th, Belt, Peter B. G. M., Weerdmeester, Klaas, Carrondo, Manuel J. T. and Langeveld, Jan P. M. (2006). "A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure." Vaccine **24**(26): 5481-5490.

AragaÌƒo, F. J. L. and Brasileiro, A. C. M. (2002). "Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection." Brasilian Journal of Plant Physiology **14**(1): 1-10.

Arakawa, T., Chong, D. K. X., Lawrence Merritt, J. and Langridge, W. H. R. (1997). "Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants." Transgenic Research **6**(6): 403-413.

Arakawa, T., Yu, J., Chong, D. K. X., Hough, J., Engen, P. C. and Langridge, W. H. R. (1998). "A plant-based cholera toxin B subunit insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes." Nature Biotechnology **16**(10): 934-938.

Arakawa, T., Yu, J. and Langridge, W. H. R. (1999). Food plant-delivered cholera toxin B subunit for vaccination and immunotolerization. Advances in Experimental Medicine and Biology. **464:** 161-178.

Arcalis, E., Marcel, S., Altmann, F., Kolarich, D., Drakakaki, G., Fischer, R., Christou, P. and Stoger, E. (2004). "Unexpected deposition patterns of recombinant proteins in post-endoplasmic reticulum compartments of wheat endosperm." Plant Physiol **136**(3): 3457-66.

Arden, N. and Betenbaugh, M. J. (2004). "Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition." Trends in Biotechnology **22**(4): 174-180.

Artunduaga, I.R., Taliaferro, C.M. and Johnson, B.B. (1989). "Induction and growth of callus from immature inflorescences of “Zebra” bermudagrass as affected by casein hydrolysate and 2,4-D concentration " In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant **25**(8): 753-756.

Athauda, S. B. P., Matsumoto, K., Rajapakshe, S., Kuribayashi, M., Kojima, M., Kubomura-Yoshida, N., Iwamatsu, A., Shibata, C., Inoue, H. and Takahashi, K. (2004). "Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases." Biochemical Journal **381**(1): 295-306.

Aumiller, J. J., Hollister, J. R. and Jarvis, D. L. (2003). "A transgenic insect cell line engineered to produce CMP-sialic acid and sialylated glycoproteins." Glycobiology **13**(6): 497-507.

Austin, S., Bingham, E. T., Koegel, R. G., Mathews, D. E., Shahan, M. N., Straub, R. J. and Burgess, R. R. (1994). "An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in transgenic *alfalfa*." Annals of the New York Academy of Sciences **721**: 234-244.

Azad, M. A. K., Yokota, S., Ohkubo, T., Andoh, Y., Yahara, S. and Yoshizawa, N. (2005). "In vitro regeneration of the medicinal woody plant Phellodendron amurense Rupr. through excised leaves." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **80**(1): 43-50.

Bach, A. and Krol, A. (2001). "Effect of light quality on somatic embryogenesis in *Hyacinthus orientalis* L. 'Delft's blue'." Biological Bulletin of Poznan **38**: 103-107.

Bai, Q., Kong, Y. and Geng, X. D. (2003). "Studies on renaturation with simultaneous purification of recombinant human proinsulin from *E. coli* with high performance hydrophobic interaction chromatography." Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies **26**(5): 683-695.

Bakker, H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Gomord, V. , Elbers, I. , Stevens, L.H., Jordi, W., Lommen, A., Faye, L. , Lerouge, P. and Bosch, D. (2001). "Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants " Proceedings of the National Academy of Science. **98**(5): 2899-2904.

Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*." Nat Biotechnol **22**(11): 1399-408.

Baulcombe, D.C., Chapman, S. and Cruz, S.S. (1998). "Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections." Plant Journal **7**: 1045-1053.

Baur, A., Reski, R. and Gorr, G. (2005). "Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens*." Plant Biotechnology Journal **3**(3): 331-340.

Baur, A., Reski, R. and Gorr, G. (2005). "Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens* " Plant Biotechnology Journal. **3**(3): 331-340.

Beachy, R. N., Fitchen, J. H. and Hein, M. B. (1996). Use of plant viruses for delivery of vaccine epitopes. Annals of the New York Academy of Sciences. **792:** 43-49.

Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993). "*In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants " C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci **316**(10): 1194-1199

Bekesiova, I. , Nap, J.P. and Mlynarova, P. (1999). "Isolation of High Quality DNA and RNA from Leaves of the Carnivorous Plant *Drosera rotundifolia*." Plant Molecular Biology Reporter **17**: 269–277.

Bellet, D. and Dangles-Marie, V. (2005). "Humanized antibodies as therapeutics." Anticorps humanises en therapeutique **21**(12): 1054-1062.

Ben Amar, A., Cobanov, P., Boonrod, K., Krczal, G., Bouzid, S., Ghorbel, A. and Reustle, G. (2007). "Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration: role of conditioned medium for cell proliferation " Plant Cell Reports **26**(9).

Benchabane, M., Goulet, C., Rivard, D., Faye, L., Gomord, V. and Michaud, D. (2008). "Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories." Plant Biotechnology Journal **6**(7): 633-648.

Benson, E. (2000). "In vitro plant recalcitrance In vitro plant recalcitrance: An introduction " In Vitro Cellular and Development Biology - Plant **36**(8): 141-148.

Bent, A. (2006). "*Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method." Methods Mol Biol **343**: 87-103.

Berg, R. Howard, Beachy, Roger N. and Kevin, F. Sullivan (2008). Fluorescent Protein Applications in Plants. Methods in Cell Biology, Academic Press. **Volume 85:** 153-177.

Bevan, M. (1984). "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation." Nucleic Acids Res **12**(22): 8711-21.

Bevan, M., Flavell, R. and Chilton, M.-D. (1983). "A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant transformation." Nature **304**: 184−187.

Birch, R. G. (1997). "PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **48**: 297-326.

Biteau, F., Bourgaud, F., Gontier, E. and Fèvre, J-P. (2008). "Process for the production of recombinant proteins using carnivorous plants." WO/2008/040599A1.

Blando, F., Scardino, A. P., De Bellis, L., Nicoletti, I. and Giovinazzo, G. (2005). "Characterization of *in vitro* anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures." Food Research International **38**(8-9): 937-942.

Blondeau, G. (2001). "Les plantes carnivores." Editions De Vecchi S.A., Paris: 151 p.

Bobak, M., Blehova, A., Kristin, J., Ovecka, M. and Samaj, J. (1995). "Direct plant regeneration from leaf explants of *Drosera rotundifolia* cultured in vitro." Plant Cell Tissue and Organ Culture **43**(1): 43-49.

Boehm, R. (2007). Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. Biology of Emerging Viruses: Sars, Avian and Human Influenza, Metapneumovirus, Nipah, West Nile, and Ross River Virus. **1102:** 121-134.

Bolton, G.W. , Nester, E.W. and Gordon, M.P. (1986). "Plant phenolic compounds induce expression of the Agrobacterium tumefaciens loci needed for virulence " Science **232**(4753): 983-985.

Bondili, Jayakumar Singh, Castilho, Alexandra, Mach, Lukas, Glössl, Josef, Steinkellner, Herta, Altmann, Friedrich and Strasser, Richard (2006). "Molecular cloning and heterologous expression of [beta]1,2-xylosyltransferase and core [alpha]1,3-fucosyltransferase from maize." Phytochemistry **67**(20): 2215-2224.

Boothe, J.G., Saponja, J.A. and Parmenter, D.L. (1998). "Molecular farming in plants: Oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins." Drug Development Research **42** (3-4): 172 - 181.

Bor, M.V., Fedosov, S.N., Laursen, N.B. and Nexo, E. (2003). "Recombinant Human Intrinsic Factor Expressed in Plants Is Suitable for Use in Measurement of Vitamin B12 " Technical chemistry **49**: 2081-2083.

Bordallo, P.N., Silva, D.H., Maria, J., Cruz, C.D. and Fontes, E.P. (2004). "Somaclonal variation on in vitro callus culture potato cultivars." Horticultura Brasileira **22**.

Borderies, Gisèle, le Béchec, Mickael, Rossignol, Michel, Lafitte, Claude, Le Deunff, Erwan, Beckert, Michel, Dumas, Christian and Matthys-Rochon, Elisabeth (2004). "Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development." European Journal of Cell Biology **83**(5): 205-212.

Borisjuk, N. V., Borisjuk, L. G., Logendra, S., Petersen, F., Gleba, Y. and Raskin, I. (1999). "Production of recombinant proteins in plant root exudates." Nat Biotechnol **17**(5): 466-9.

Boulay, J. (1997). "Les Nepenthes." Dionée **38**.

Brennan, F. R., Bellaby, T., Helliwell, S. M., Jones, T. D., Kamstrup, S., Dalsgaard, K., Flock, J. I. and Hamilton, W. D. O. (1999). "Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice." Journal of Virology **73**(2): 930-938.

Briggs, K., Zeitlin, L., Wang, F. , Chen, L., Fitchen, J. H., Glynn, J., Lee, V.D., Zhang, S. and Whaley, K.P. (2000). "Anti-HSV antibodies produced in rice plants protect mice from vaginal HSV infection." Plant Biol (Stuttg.) **Abstract 15.**

Bruyns, Anne-Marie, De Jaeger, Geert, De Neve, Myriam, De Wilde, Chris, Van Montagu, Marc and Depicker, Ann (1996). "Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties." FEBS Letters **386**(1): 5-10.

Budzianowski, J. (2000). "Naphthoquinone glucosides of Drosera gigantea from in vitro cultures." Planta Med **66**(7): 667-9.

Buratti, E., McLain, L., Tisminetzky, S., Cleveland, S. M., Dimmock, N. J. and Baralle, F. E. (1998). "The neutralizing antibody response against a conserved region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 (amino acid residues 731-752) is uniquely directed against a conformational epitope." Journal of General Virology **79**(11): 2709-2716.

Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B. and Dinesh-Kumar, S. P. (2004). "Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants." Plant Journal **39**: 734-746.

Butler, M. (2005). "Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals." Appl Microbiol Biotechnol **68**(3): 283-91.

Cadoret, J. P., Bardor, M., Lerouge, P., Cabigliera, M., Henriquez, V. and Carlier, A. (2008). "Microalgae as cell factories producing recombinant commercial proteins." Les microalgues: Usines cellulaires productrices de molecules commerciales recombinantes **24**(4): 375-382.

Cangelosi, G.A. , Hung, L., Puvanesarajah, V., Stacey, G., Ozga, D.A. , Leigh, J.A. and Nester, E.W. (1987). "Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions." J Bacteriol. **169**(5): 2086-2091.

Cangelosi, G.A. , Martinetti, G., Leigh, J.A. , Lee, C.C., Theines, C. and Nester, E.W. (1989). "Role for [corrected] *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of beta-1,2-glucan." J Bacteriol. **171**(3): 1609-1615.

Castillo, P., Márquez, J., Rubluo, A., Hernández, G. and Lara, M. (2000). "Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. procera via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis." Plant Science **151**(2): 115-119.

Cereghino, Geoff P. Lin, Cereghino, Joan Lin, Ilgen, Christine and Cregg, James M. (2002). "Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*." Current Opinion in Biotechnology **13**(4): 329-332.

Cereghino, J. L. and Cregg, J. M. (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris." FEMS Microbiol Rev **24**(1): 45-66.

Chanarin, I. (1987). "How to diagnose (and not misdiagnose) pernicious anaemia." Blood Rev **1**(4): 280-3.

Chanarin, I. (2000). "Historical review: a history of pernicious anaemia." Br J Haematol **111**(2): 407-15.

Chang, S.S., Park, S.K., Kim , B.C., Kang, B.J., Kim, D.U. and Nam, H.G. (2003). "Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation *in planta*." The Plant Journal **5**(4): 551 - 558.

Chattoraj, M., King, B.A. , Bublitz, G.U. and Boxer, S.G. (1996). " Ultra-fast excited state dynamicsin green fluorescent protein: multiple statesand proton transfer." Proc Natl Acad Sci USA **93**: 8362-7.

Chauhan, M. and Kothari, S. L. (2004). "Optimization of nutrient levels in the medium increases the efficiency of callus induction and plant regeneration in recalcitrant Indian barley (*Hordeum vulgare* L.) *in vitro*." In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant **40**(5): 520-527.

Chen, H., Xu, Z., Yin, X. and Cen, P. (2007). "Cloning and expression of the HIV protein in Escherichia coli cell-free system." Applied Microbiology and Biotechnology **77**(2): 347-354.

Chen, S., Gray, D., Ma, J. and Subramanian, S. (2001). "Production of recombinant proteins in mammalian cells." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 5**: Unit5 10.

Chen, S. J. and Kao, C. H. (1997). "Ammonium-inhibited growth of suspension-cultured rice cells as affected by medium pH." Plant Growth Regulation **21**(1): 1-6.

Chen, T. L., Lin, Y. L., Lee, Y. L., Yang, N. S. and Chan, M. T. (2004). "Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures." Transgenic Research **13**(5): 499-510.

Chen, Y-Q., Yi, F., Cai, M. and Luo, J-X. (2003). "Effects of amino acids, nitrate, and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*." Plant Growth Regulation **41**(3): 265-268.

Chernyad'ev, I. I. (2000). "Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins (review)." Applied Biochemistry and Microbiology **36**(6): 527-539.

Chiba, Yasunori and Jigami, Yoshifumi (2007). "Production of humanized glycoproteins in bacteria and yeasts." Current Opinion in Chemical Biology **11**(6): 670-676.

Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merio, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P. and Nester, E. W. (1977a). "Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis." Cell **11**(2): 263-71.

Chilton, Mary-Dell, Drummond, Martin H., Merlo, Donald J., Sciaky, Daniela, Montoya, Alice L., Gordon, Milton P. and Nester, Eugene W. (1977b). "Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis." Cell **11**(2): 263-271.

Chitra, D. S. Vijaya and Padmaja, G. (2005). "Shoot regeneration via direct organogenesis from in vitro derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine." Scientia Horticulturae **106**(4): 593-602.

Choi, J. H. and Lee, S. Y. (2004). "Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol **64**(5): 625-35.

Choi, N. W., Estes, M. K. and Langridge, W. H. R. (2005). "Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in transgenic potato." Molecular Biotechnology **31**(3): 193-202.

Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. ." BioTechniques **15**: 532-537.

Chomczynski, P., Bowser-Finn, R. and Sabatini, L. (1994). "A reagent for the single-step isolation of viral RNA from human serum and biopsy samples." J. NIH Res **6**: 83.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal. Biochem. **162**: 156-159.

Christie, P. J., Ward, J. E. , Winans, S. C. and Nester, E. W. (1988). "The *Agrobacterium tumefaciens* virE2 gene product is a single-stranded DNA-binding protein that associates with T-DNA." J. Bacteriol. **170**: 2659-2667.

Chua, L.S.L. and Henshaw, G. (1999). "In vitro propagation of *Nepenthes macfarlanei*." Journal of Tropical Forest Science **11**(3): 631-638.

Citovsky, V., Guralnick, B., Simon, M. N. and Wall, J. S. (1997). "The molecular structure of *agrobacterium* VirE2-single stranded DNA complexes involved in nuclear import." J Mol Biol **271**(5): 718-27.

Citovsky, V., Zupan, J. , Warnick, D. and Zambryski, P. (1992). " Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells. ." Science **256**: 1802-1805.

Clancy, F.G.A and Coffey, M.D. (1977). "Acid phosphatase and protease release by the insectivorous plant *Drosera rotundifolia*." Canadian Journal of Botany **56**(480-488).

Clarke, C. (1997). "Nepenthes of Borneo. ." Natural History Publications: 207p.

Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." Plant J **16**(6): 735-43.

Corker, B. (1986). "Germination and Viability of Seeds of the Pitcher Plant *Nepenthes Mirabilis*." Malayan Nature Journal **39**: 259-264.

Corredoira, E., Ballester, A. and Vieitez, A. M. (2008). "Thidiazuron-induced high-frequency plant regeneration from leaf explants of Paulownia tomentosa mature trees." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **95**(2): 197-208.

Coulombe, Bruce A., Foster, Joyce G., Van Scoyoc, Stephen W. and Veilleux, Richard E. (1990). "Flatpea organogenesis from callus cultures." Plant Science **71**(1): 99-104.

Cox, K. M., Sterling, J. D., Regan, J. T., Gasdaska, J. R., Frantz, K. K., Peele, C. G., Black, A., Passmore, D., Moldovan-Loomis, C., Srinivasan, M., Cuison, S., Cardarelli, P. M. and Dickey, L. F. (2006). "Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*." Nature Biotechnology **24**(12): 1591-1597.

Cramer, C. L., Boothe, J. G. and Oishi, K. K. (1999). Transgenic plants for therapeutic proteins: Linking upstream and downstream strategies. Current Topics in Microbiology and Immunology. **240:** 95-118.

Cramer, C. L., Weissenborn, D. L., Oishi, K. K., Grabau, E. A., Bennett, S., Ponce, E., Grabowski, G. A. and Radin, D. N. (1996). Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. Annals of the New York Academy of Sciences. **792:** 62-71.

Crawford, N.M. (1995). "Nitrate: nutrient and signal for plant growth." Plant Cell **7**: 859-868.

Crossway, A., Oakes, J.V., Irvine, J.M., Ward, B., Knauf, V.C. and Shewmaker, C.K. (1986). "Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts." Mol Gen Genet **202**: 179-185.

D'Onofrio, C., Morini, S. and Bellocchi, G. (1998). "Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves " Plant Cell, Tissue and Organ Culture **53**(2): 91-98.

Dafny-Yelin, Mery, Levy Avner and Tzfira Tzvi (2008). "The ongoing saga of Agrobacterium-host interactions." Trends in Plant Science **13**(3): 102-105.

Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart Jr, C. N. and Camargo, W. N. (2007). "Methods to produce marker-free transgenic plants." Biotechnology Journal **2**(1): 83-90.

Darwin, C. (1877). "Les plantes insectivores, Ouvrage traduit par Edmond Barbier." C. Reinwald et Cie, Libraires-Éditeurs,.

Das, Sudripta, Jha, Timir B. and Jha, Sumita (1996). "Organogenesis and regeneration from pigmented callus in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Nandadevi, an elite Darjeeling tea clone." Plant Science **121**(2): 207-212.

De-la-Peña, C., Galaz-Ávalos, R. and Loyola-Vargas, V. (2008). "Possible Role of Light and Polyamines in the Onset of Somatic Embryogenesis of *Coffea canephora* " Molecular Biotechnology **39**(3): 215-224.

De Block, M. , Botterman, J. , Vandewiele, M. , Dockx, J. , Thoen, C. , Gosselé, V. , Rao Movva, N. , Thompson, C. , Van Montagu, M. and Leemans, J. (1987). "Engineering of herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme." EMBO J. **6**: 2513-2518.

De Block, M. and Debrouwer, D. (1991). "Two T-DNA's co-transformed into brassica napus by a double Agrobacterium tumefaciens infection are mainly integratedat the same locus." Theoretical and Applied Genetics **82**: 257-263.

De la Pena, A., Lörz, H. and Schell, J. (1987). "Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers." Nature **325**: 274-276.

De La Riva, Gustav , Gonzalez-Cabrera Joel, Vazquez-Padron Roberto and Ayra-Pardo Camilo (1998). "Agrobacterium tumefaciens : a natural tool for plant trasformation." Electronic journal of Biotechnology **1**(3): 1-16.

De Wilde, C., De Neve, M., De Rycke, R., Bruyns, A.M., De Jaeger, G., Van Montagu, M., Depicker, A. and Engler, G. (1996). "Intact antigen-binding MAK33 antibody and Fab fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana*." Plant Science **114**(2): 233-241.

De Zoeten, G. A., Penswick, J. R., Horisberger, M. A., Ahl, P., Schultze, M. and Hohn, T. (1989). "The expression, localization, and effect of a human interferon in plants." Virology **172**(1): 213-222.

Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. and Leemans, J. (1985). "Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants." Nucleic Acids Res **13**(13): 4777-88.

Decker, Eva L. and Reski, Ralf (2007). "Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals." Current Opinion in Biotechnology **18**(5): 393-398.

Dehestani, A. and Kazemi Tabar, S. K. (2007). "A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites." Asian Journal of Plant Sciences **6**(6): 977-981.

Dessaux, Yves, Petit, Annik and Tempe, Jacques (1993). "Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism." Phytochemistry **34**(1): 31-38.

Devinoy, E. , Thepot, D., Stinnakre, M-G., Fontaine, M-L., Grabowski, H., Puissant, C., Pavirani, A. and Houdebine, L-M. (1994). "High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland " Transgenic Research **3**(2): 79-89.

Dezar, Carlos A., Fedrigo, Griselda V. and Chan, Raquel L. (2005). "The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene Hahb4 directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA." Plant Science **169**(2): 447-456.

Didry, N., Dubreuil, L., Trotin, F. and Pinkas, M. (1998). "Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria." J Ethnopharmacol **60**(1): 91-6.

Dieryck, W., Pagnier, J., Poyart, C., Marden, M. C., Gruber, V., Bournat, P., Baudino, S. and Merot, B. (1997). "Human haemoglobin from transgenic tobacco." Nature **386**(6620): 29-30.

Dingermann, Theo (2008). "Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges." Biotechnol. J. **3**: 90-97.

Dodeman, V. L. , Ducreux, G. and Kreis, M. (1997). "Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis " Journal of Experimental Botany **48**(8): 1493-1509

Dodet, B. (1990). "Production de protéines recombinantes : quel système choisir? ." Biofutur **90**: 20-29.

Doty, S.L. , Chang, M. and Nester, E.W. (1993). "The chromosomal virulence gene, chvE, of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by a LysR family member." J Bacteriol. **175**(24): 7880-7886.

Drake, P. M., Chargelegue, D. M., Vine, N. D., van Dolleweerd, C. J., Obregon, P. and Ma, J. K. (2003). "Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots." Plant Mol Biol **52**(1): 233-41.

Durrenberger, F., Crameri, A., Hohn, B. and Koukolikova-Nicola, Z. (1989). "Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9154-8.

Dus Santos, M. J., Wigdorovitz, A., Trono, K., Rios, R. D., Franzone, P. M., Gil, F., Moreno, J., Carrillo, C., Escribano, J. M. and Borca, M. V. (2002). "A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants." Vaccine **20**(7-8): 1141-7.

Ealick, S. E., Cook, W. J., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabhushan, T. L., Trotta, P. P. and Bugg, C. E. (1991). "Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma." Science **252**(5006): 698-702.

Ebinuma, H. and Komamine, A. (2001). "MAT (Multi-Auto-Transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants." In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant **37**(2): 103-113.

Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E. and Yamakado, M. (1997). "Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2117-21.

Eckart, M. R. and Bussineau, C. M. (1996). "Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast." Curr Opin Biotechnol **7**(5): 525-30.

Edelbaum, O., Stein, D., Holland, N., Gafni, Y., Livneh, O., Novick, D., Rubinstein, M. and Sela, I. (1992). "Expression of active human interferon-gamma in transgenic plants." Journal of Interferon Research **12**(6): 449-453.

Egrie, J. C., Dwyer, E., Browne, J. K., Hitz, A. and Lykos, M. A. (2003). "Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin." Exp Hematol **31**(4): 290-9.

Eilenberg, H., Pnini-Cohen, S., Schuster, S., Movtchan, A. and Zilberstein, A. (2006). "Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*." Journal of Experimental Botany **57**(11): 2775-2784.

El-Shiaty, O.H., El-Sharabasy, S.F. and Abd El-Kareim, A.H. (2004). "Effect of some amino acids and biotin on callus and proliferation of date palm (Phoenix dactylifera L.) Sewy cultiver." Arab J. Biotech **7**(2): 265-272.

Elbers, I.J., Stoopen, G.M. , Bakker, H., Stevens, L.H. , Bardor, M., Molthoff, J.W. , Jordi, W.J. , Bosch, D. and Lommen, A. (2001). "Influence of Growth Conditions and Developmental Stage on N-Glycan Heterogeneity of Transgenic Immunoglobulin G and Endogenous Proteins in Tobacco Leaves. ." Plant Physiol. **126**: 1314-1322.

Ellison, A. M., Gotelli, N. J., Brewer, J. S., Cochran-Stafira, D. L., Kneitel, J. M., Miller, T. E., Worley, A. C. and Zamora, R. (2003). The evolutionary ecology of carnivorous plants. Advances in Ecological Research. **33:** 1-74.

Elomaa, P., Honkanen, J., Puska, R., Seppanen, P., Helariutta, Y., Mehto, M., Kotilainen, M., Nevalainen, L. and Teeri, T. H. (1993). "Agrobacterium-Mediated Transfer of Antisense Chalcone Synthase Cdna to Gerbera-Hybrida Inhibits Flower Pigmentation." Bio-Technology **11**(4): 508-511.

Emons, Anne Mie C., Vos, Jan W. and Kieft, Henk (1992). "A freeze fracture analysis of the surface of embryonic and non-embryogenic suspension cells of *Daucus carota*." Plant Science **87**(1): 85-97.

Enriquez-Obregon, G.A., Vazquez-Padron R.I., Prietosansonov D.L., de la Riva G.A. and Selman-Houssein G. (1998). "Herbicide resitant sugarcane (Saccharum officinarum L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation." Planta **206**: 20-27.

Enriquez-Obregon, G.A., Vazquez-Padron R.I., Prietosansonov D.L., Pérez M. and Selman-Housein G. (1997). "Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds." Biotecnologia Applicada **14**: 169-174.

Escobar, L.H., Jordan, M., Olate, E., Barrales, L. and Gebauer, M. (2008). "Direct and indirect *in vitro* organogensis of *Leucocoryne purpurea* (alliaceae) a Chilean ornamental geophyte." Propagation of Ornamental Plants **8**(2): 59-64.

Ewa Sroga, G. (1987). "Plant regeneration of two *Lupinus* spp. from callus cultures *via* organogenesis." Plant Science **51**(2-3): 245-249.

Fanga, P. , Hwaa, V., Littlea, B.M. and Rosenfelda, R.G. (2008). "IGFBP-3 sensitizes prostate cancer cells to interferon-gamma-induced apoptosis " Growth Hormone & IGF Research **18**(1): 38-46.

Farges-Haddani, B., Tessier, B., Chenu, S., Chevalot, I., Harscoat, C., Marc, I., Goergen, J. L. and Marc, A. (2006). "Peptide fractions of rapeseed hydrolysates as an alternative to animal proteins in CHO cell culture media." Process Biochemistry **41**(11): 2297-2304.

Farges, B., Chenu, S., Marc, A. and Goergen, J. L. (2008). "Kinetics of IFN-gamma producing CHO cells and other industrially relevant cell lines in rapeseed-supplemented batch cultures." Process Biochemistry **43**(9): 945-953.

Farran, I., Sanchez-Serrano, J. J., Medina, J. F., Prieto, J. and Mingo-Castel, A. M. (2002). "Targeted expression of human serum albumin to potato tubers." Transgenic Research **11**(4): 337-346.

Faye, L., Boulaflous, A., Benchabane, M., Gomord, V. and 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. and Daniell, H. (2006). "Novel pathways for glycoprotein import into chloroplasts." Plant Biotechnol J **4**(3): 275-9.

Faye, L., Lerouge, P. and Gomord, V. (2002). "[GMOs and production of pharmaceutical molecules]." Bull Acad Natl Med **186**(8): 1411-25.

Fedosov, S.N. , Laursen, N.B., Nexo, E. , Moestrup, S.K., Petersen, T.E. , Jensen, E. and Berglund, L. (2003). "Human intrinsic factor expressed in the plant *Arabidopsis thaliana*." European journal of biochemistry **270**(16): 3362-3367

Fehér, A. (2006). "Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? ." Plant Cell Monographs : Somatic Embryogenesis **2**: 85-101.

Feldmann, K. A. and Marks, M. D. (1987). "*Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopisis thaliana* : a non-tissue culture approach." Molecular & General Genetics **208**: 1-9.

Felgner, L. and Lingold, G.M. (1989). "Cationic liposomemediated transfection." Nature **337**: 387–388.

Filipecki, M. and Malepszy, S. (2006). "Unintended consequences of plant transformation: A molecular insight." Journal of Applied Genetics **47**(4): 277-286.

Filonova, L.H., Bozhkov, P.V. and von Arnold, S. (2000). "Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking " Journal of Experimental Botany **51**(343): 249-264.

Fischer, B., Sumner, I. and Goodenough, P. (1993). "Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies." Biotechnology and Bioengineering **41**(1): 3-13.

Fischer, R. and Emans, N. (2000). "Molecular farming of pharmaceutical proteins." Transgenic Research **9**(4-5): 279-299.

Fischer, Rainer, Stoger, Eva, Schillberg, Stefan, Christou, Paul and Twyman, Richard M. (2004). "Plant-based production of biopharmaceuticals." Current Opinion in Plant Biology **7**(2): 152-158.

Fraley, R., Rogers, S., Horsch, R., Sanders, R., Flick, J., Adams, S., Bittner, M., Brand, L., Fink, C., Fry, J., Galluppi, G., Goldberg, S., Hoffman, N. and Woo, S. (1983). "Expression of bacterial genes in plant cells. ." Proc. Nad. Acad. Sci. USA **80**: 4803−4807.

Franklin, S. E. and Mayfield, S. P. (2004). "Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas*." Curr Opin Plant Biol **7**(2): 159-65.

Fraser, M. J. (1992). "The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system." Current Topics in Microbiology and Immunology **158**: 131-172.

Frazier, C.K. (2000). "The Enduring Controversies Concerning the Process of Protein Digestion in Nepenthes (Nepenthaceae)." International Carnivorous Plant society.

Fromm, M., Taylor, L.P. and Walbot, V. (1985). "Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation." PNAS **82**(17): 5824-5828.

Fullner, K. J., Lara, J. C. and Nester, E. W. (1996). "Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes." Science **273**(5278): 1107-9.

Fullner, K. J. and Nester, E. W. (1996). "Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*." J Bacteriol **178**(6): 1498-504.

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

Ganapathi, T.R., Higgs, N.S., Balint-Kurti, P., Arntzen, C., May, G.D. and Eck, J.M. van (2001). "*Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB)." Plant Cell Reports **20**(2): 157-162.

Gasdaska, J.R., Spencer, D. and Dickey, L. (2003). "Advantages of Therapeutic Protein Production in the Aquatic Plant *Lemna*." BioProcessing Journal **3**: 50-56.

Gatz, Christiane and Lenk, Ingo (1998). "Promoters that respond to chemical inducers." Trends in Plant Science **3**(9): 352-358.

Gaume, L. and Forterre, Y. (2007). "A viscoelastic deadly fluid in carnivorous pitcher plants." PLoS ONE **2**(11).

Gaume, L., Gorb, S. and Rowe, N. (2002). "Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers." New Phytologist **156**(3): 479-489.

Gelvin, S. B. (1998). "*Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm." J Bacteriol **180**(16): 4300-2.

Gelvin, S. B. (2006). "*Agrobacterium* virulence gene induction." Methods Mol Biol **343**: 77-84.

Gemmill, Trent R. and Trimble, Robert B. (1999). "Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1426**(2): 227-237.

Geng, Xindu and Wang, Chaozhan (2007). "Protein folding liquid chromatography and its recent developments." Journal of Chromatography B **849**(1-2): 69-80.

Genkov, T., Tsoneva, P. and Ivanova, I. (1997). "Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in in vitro cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L." Journal of Plant Growth Regulation **16**(3): 169-172.

Georget, F., Domergue, R., Ferrière, N. and Côte, F. (2000). "Morphohistological study of the different constituents of a banana (Musa 'AAA', cv. 'Grande Naine') embryogenic cell suspension." Plant cell reports **19**: 748-754.

Gervais, C. and Gauthier, R. (1999). "Cytotaxonomical study of the species and natural hybrids of genus Drosera (Droseracaea) in Quebec [*Drosera* x woodii, *Drosera linglica*;

amphidiploidy, polytopism]; Etude cytotaxonomique des especes et des hybrides naturels du genre *Drosera* (Droseraceae) au Quebec [*Drosera* x woodii, *Drosera linglica*; amphidiploidie, polytopisme]." Acta Botanica Gallica **146**(4): 387-401.

Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. and Carter, A. (2000). "Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals." Nat Biotechnol **18**(11): 1151-5.

Gil, G. C., Velander, W. H. and Van Cott, K. E. (2008). "Analysis of the N-glycans of recombinant human Factor IX purified from transgenic pig milk." Glycobiology **18**(7): 526-539.

Gleba, Y. , Klimyuk, V. and Marillonnet, S. (2007). "Viral vectors for the expression of proteins in plants." Current Opinion in Biotechnology **18**(2): 134-141.

Goddijn, O. J. M. and Pen, J. (1995). "Plants as bioreactors." Trends in Biotechnology **13**(9): 379-387.

Goldman, M. H. (2003). "Processing challenges for transgenic milk products." BioPross Int. : 60-63.

Goldman, M. H., James, D. C., Rendall, M., Ison, A. P., Hoare, M. and Bull, A. T. (1998). "Monitoring recombinant human interferon-gamma N-glycosylation during perfused fluidized-bed and stirred-tank batch culture of CHO cells." Biotechnol Bioeng **60**(5): 596-607.

Gomes da Cunha, A.C. and Fernandes Ferreira, M. (1996). "Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth kinetics of flax."

Plant Cell, Tissue and Organ Culture **47**(1): 1-8.

Gomord, V. , Denmat, L.A., Fitchette-Lainé, A.C., Satiat-Jeunemaitre, B., Hawes, Chris. and Faye, L. (1997). "The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER." The Plant Journal. **11,**(2): 313-325.

Gomord, V. and Faye, L. (2004). "Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants." Curr Opin Plant Biol **7**(2): 171-81.

Gopi, C. and Ponmurugan, P. (2006). "Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L." Journal of Biotechnology **126**(2): 260-264.

Gorb, E., Kastner, V., Peressadko, A., Arzt, E., Gaume, L., Rowe, N. and Gorb, S. (2004). "Structure and properties of the glandular surface in the digestive zone of the pitcher in the carnivorous plant Nepenthes ventrata and its role in insect trapping and retention." Journal of Experimental Biology **207**(17): 2947-2963.

Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. and Ruddle, F. H. (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7380-4.

Gordon, M., Chokshi, H. and Alpers, D. H. (1992). "In vitro expression and secretion of functional mammalian intrinsic factor using recombinant baculovirus." Biochim Biophys Acta **1132**(3): 276-83.

Gray, P. W. and Goeddel, D. V. (1982). "Structure of the human immune interferon gene." Nature **298**(5877): 859-63.

Gray, P. W., Leung, D. W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C. C., Derynck, R., Sherwood, P. J., Wallace, D. M., Berger, S. L., Levinson, A. D. and Goeddel, D. V. (1982). "Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells." Nature **295**(5849): 503-8.

Griffin, Timothy J., Seth, Gargi, Xie, Hongwei, Bandhakavi, Sricharan and Hu, Wei-Shou (2007). "Advancing mammalian cell culture engineering using genome-scale technologies." Trends in Biotechnology **25**(9): 401-408.

Gruber, V., Berna, P. P., Arnaud, T., Bournat, P., Clement, C., Mison, D., Olagnier, B., Philippe, L., Theisen, M., Baudino, S., Benicourt, C., Cudrey, C., Bloes, C., Duchateau, N., Dufour, S., Gueguen, C., Jacquet, S., Ollivo, C., Poncetta, C., Zorn, N., Ludevid, D., Van Dorsselaer, A., Verger, R., Doherty, A., Merot, B. and Danzin, C. (2001). "Large-scale production of a therapeutic protein in transgenic tobacco plants: Effect of subcellular targeting on quality of a recombinant dog gastric lipase." Molecular Breeding **7**(4): 329-340.

Gruber, V. and Spik, G. (2000). "Production of recombinant therapeutical protein in plants: Recombinant human lactoferrin from transgenic tobacco as an example." International Journal of Bio-Chromatography **5**(4): 245-254.

Gubbuk, H. and Pekmezci, M. (2004). "In vitro propagation of some new banana types (*Musa* spp.)." Turkish Journal of Agriculture and Forestry **28**(5): 355-361.

Guéant, J.L. , Adjalla, C , Lambert, D and Nicolas, J.P. (1993). "Physiologie et pathologie de l'assimilation des cobalamines (vitamine B12) " Immuno-analyse & Biologie Spécialisée **8**(2): 89-96.

Günter, E. A. and Ovodov, Y. S. (2005). "Effect of calcium, phosphate and nitrogen on cell growth and biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell culture." J Biotechnol **117**(4): 385-93.

Günter, Elena A. and Ovodov, Yury S. (2002). "Changes in cell wall polysaccharides of *Silene vulgaris* callus during culture." Phytochemistry **59**(7): 703-708.

Guo, L. A. (2001). "Simultaneous purification and renaturation of recombinant human interferon-alpha expreessed by *E. coli* by high-performance hydrophobic interaction chromatography." Chinese journal of chromatography / Zhongguo hua xue hui **19**(4): 301-303.

Guo, Yinghua and Zhang, Zhenxian (2005). "Establishment and plant regeneration of somatic embryogenic cell suspension cultures of the *Zingiber officinale* Rosc." Scientia Horticulturae **107**(1): 90-96.

Gupta, P.K. and Holmstrom, D. (2005). "Double Staining Technology for Distinguishing Embryogenic Cultures " Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Forestry Sciences **77**: 573-575.

Gutierrez-Ortega, A., Avila-Moreno, F., Saucedo-Arias, L. J., Sanchez-Torres, C. and Gomez-Lim, M. A. (2004). "Expression of a Single-Chain Human Interleukin-12 Gene in Transgenic Tobacco Plants and Functional Studies." Biotechnology and Bioengineering **85**(7): 734-740.

Haines, F. J., Possee, R. D., King, L. A., Mahy, B. W. J. and Regenmortel, M. H. V. van (2008). Baculoviruses: Expression Vector. Encyclopedia of Virology. Oxford, Academic Press**:** 237-246.

Hajari, E., Watt, M. P., Mycock, D. J. and McAlister, B. (2006). "Plant regeneration from induced callus of improved Eucalyptus clones." South African Journal of Botany **72**(2): 195-201.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P. (1994). "The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation." Plant Mol Biol **25**(6): 989-94.

Haldrup, A., Noerremark, M. and Thyge Okkels, F. (2001). "Plant selection principle based on xylose isomerase." In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant **37**(2): 114-119.

Haldrup, A., Petersen, S. G. and Okkels, F. T. (1998). "Positive selection: A plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry." Plant Cell Reports **18**(1-2): 76-81.

Hamada, A., Yamaguchi, K., Ohnishi, N., Harada, M., Nikumaru, S. and Honda, H. (2005). "High-level production of yeast (*Schwanniomyces occidentalis*) phytase in transgenic rice plants by a combination of signal sequence and codon modification of the phytase gene." Plant Biotechnology Journal **3**(1): 43-55.

Hamamoto, H., Sugiyama, Y., Nakagawa, N., Hashida, E., Matsunaga, Y., Takemoto, S., Watanabe, Y. and Okada, Y. (1993). "A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato." Nature Biotechnology **11**(8): 930-932.

Hamilton, Carol M., Frary Anne, Lewis Candice and Tanksley Steven D. (1996). "Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 9975-9979.

Hamilton, S. R. and Gerngross, T. U. (2007). "Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast." Current Opinion in Biotechnology **18**(5): 387-392.

Hansen, Geneviève, Shillito Raymond D. and Chilton Mary-Dell (1997). "T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 11726-11730.

Hare, P. D. and Van Staden, J. (1994). "Inhibitory effect of thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus." Plant and Cell Physiology **35**(8): 1121-1125.

Harper, B.K. and Neal Stewart, C. (2000). "Patterns of Green Fluorescent Protein Expression in Transgenic Plants." Plant Molecular Biology Reporter **18**: 141a-141i.

Harrison, R.L., Jarvis, D.L., Bonning, B.C., Maramorosch, K. and Shatkin, A.J. (2006). Protein N[hyphen (true graphic)]Glycosylation in the Baculovirus-Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce "Mammalianized" Recombinant Glycoproteins. Advances in Virus Research, Academic Press. **68:** 159-191.

Haseloff, J. , Siemering, K.R., Prasher, D.C. and Hodge, S. (1997). " Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly." Proc Natl Acad Sci USA **94**: 2122-2127.

Haseloff, J. and Amos, B. (1995). "GFP in plants." Trends in Genetics **11**: 328-329.

Hatano, N. and Hamada, T. (2008). "Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant Nepenthes alata." Journal of Proteome Research **7**(2): 809-816.

Hatsuzawa, K., Tagaya, M. and Mizushima, S. (1997). "The hydrophobic region of signal peptides is a determinant for SRP recognition and protein translocation across the ER membrane." Journal of Biochemistry **121**(2): 270-277.

Heim, R. and Tsien, R. Y. (1996). "Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer." Curr Biol **6**(2): 178-82.

Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. and Mullineaux, P. M. (2000a). "pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation." Plant Mol Biol **42**(6): 819-32.

Hellens, Roger, Mullineaux, Philip and Klee, Harry (2000b). "Technical Focus:A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors." Trends in Plant Science **5**(10): 446-451.

Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R. M. and Fischer, R. (2004). "Plant cell cultures for the production of recombinant proteins." Nat Biotechnol **22**(11): 1415-22.

Hennegan, K.P. and Danna, K.J. (1998). "pBIN20: An Improved Binary Vector for *Agrobacterium*-mediated Transformation." Plant Molecular Biology Reporter. **16**: 129-131.

Hernalsteens, J. P., Van Vliet, F., De Beuckeleer, M., Depicker, A., Engler, G., Lemmers, M., Holsters, M., Van Montagu, M. and Schell, J. (1980). "The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. 1980." Nature **287**: 654 - 656.

Herrera-Estrella, L., Block, M. D., Messens, E., Hernalsteens, J. P., Montagu, M. V. and Schell, J. (1983). "Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells." Embo J **2**(6): 987-995.

Heslop-Harrison, Y. (1975). "Enzyme release in carnivorous plants." Front Biol **43**(4): 525-78.

Heubl, G.R. and Wistuba, A. (1997). "A cytological study of the genus *Nepenthes* L. (Nepenthaceae). ." Sendtnera **4**: 169-174.

Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989). "Production of antibodies in transgenic plants." Nature **342**(6245): 76-8.

Higashi, S., Nakashima, A., Ozaki, H., Abe, M. and Uchiumi, T. (1993). "Analysis of feeding mechanism in a pitcher of *Nepenthes hybrida*." Journal of Plant Research **106**(1): 47-54.

Hirsikorpi, M., Kamarainen, T., Teeri, T. and Hohtola, A. (2002). "*Agrobacterium*-mediated transformation of round leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.)." Plant Science **162**(4): 537-542.

Ho, C. K., Chang, S. H., Tsay, J. Y., Tsai, C. J., Chiang, V. L. and Chen, Z. Z. (1998). "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants." Plant Cell Reports **17**(9): 675-680.

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

Hong, S. H., Kim, K. I., Chung, H. Y., Kim, Y. J., Sunter, G., Bisaro, D. M. and Chung, I. S. (2005). "Expression of recombinant endostatin in *Agrobacterium*-inoculated leaf-disks of *Nicotiana tabacum* var. xanthi." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **80**(3): 321-327.

Hood, E. E. , Witcher, D.R. , Maddock, S., Meyer, T., Baszczynski, C., Bailey, M., Flynn, P., Register, J., Marshall, L., Bond, D., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehigh, R.J., Hernan, R., Kappel, W.K., Ritland, D., Ping, C. and Howard, J.A. (1997). "Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification " Molecular Breeding **3**(4).

Hooykaas, P. J. and Schilperoort, R. A. (1992). "*Agrobacterium* and plant genetic engineering." Plant Mol Biol **19**(1): 15-38.

Hooykaas, P.J.J., P.M., Klapwijk, M.P., Nuti, R.A., Schilperoort and A., Rörsch (1977). "Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium ex planta*." Journal Of General Microbiology **98**: 477-484.

Houdebine, L. M. (2000). "Transgenic animal bioreactors." Transgenic Research **9**(4-5): 305-320.

Houdebine, L. M. (2005). "Use of transgenic animals to improve human health and animal production." Reprod Domest Anim **40**(4): 269-81.

Houdebine, L.M. (2008). "Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals." Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases **In Press, Corrected Proof**.

Howard, E. and Citovsky, V. (1990). "The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex." Bioessays **12**: 103-108.

Hu, W. and Cheng, C.L. (1995). " Expression of Aequorea green fluorescent protein in plant cells." FEBS Letters **369**: 331-334.

Hua, Y. J. and Li, H. Q. (2005). "Food web and fluid in pitchers of *Nepenthes mirabilis* in Zhuhai, China." Acta Botanica Gallica **152**(2): 165-175.

Huang, Ning, Wu, Liying, Nandi, Somen, Bowman, Eric, Huang, Jianmin, Sutliff, Tom and Rodriguez, Raymond L. (2001). "The tissue-specific activity of a rice beta-glucanase promoter (Gns9) is used to select rice transformants." Plant Science **161**(3): 589-595.

Huang, Z., Elkin, G., Maloney, B. J., Beuhner, N., Arntzen, C. J., Thanavala, Y. and Mason, H. S. (2005). "Virus-like particle expression and assembly in plants: Hepatitis B and Norwalk viruses." Vaccine **23**(15 SPEC. ISS.): 1851-1858.

Hummel, K. M., Penheiter, A. R., Gathman, A. C. and Lilly, W. W. (1996). "Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE." Analytical Biochemistry **233**(1): 140-142.

Ikeda, H., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." Cytokine Growth Factor Rev **13**(2): 95-109.

Jach, Guido, Winter, Jochen and Atta-ur, Rahman (2006). Focus on fluorescent proteins. Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier**:** 3-67.

Jalil, M., Khalid, N. and Othman, R.Y. (2003). "Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA)." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **75**: 209-214.

James, E. A., Wang, C., Wang, Z., Reeves, R., Shin, J. H., Magnuson, N. S. and Lee, J. M. (2000). "Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells." Protein Expression and Purification **19**(1): 131-138.

Jarvis, D. L. (2003). "Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production." Virology **310**(1): 1-7.

Jarvis, D. L., Aumiller, J. J., Hollister, J. R., Kawar, Z. S., Pilon, J. and Vadaie, N. (2004). "Analysis and manipulation of the protein N-glycosylation pathway in the baculovirus-insect cell system." Glycobiology **14**(11): 1059-1060.

Jayapal, K.P. , Wlaschin, K.F., Hu, W-S. and Yap, M.G. S. (2007). "Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells - 20 Years and Counting." Chemical Engineering Progress **Oct**.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987). "GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants." EMBO J **6**: 3901-3907.

Jentsch, J. (1972). "Enzymes from Carnivorous plants (*Nepenthes*). Isolation of the protease Nepenthacin." FEBS LETTERS **21**(3): 273-276.

Jheng, F. Y., Do, Y. Y., Liauh, Y. W., Chung, J. P. and Huang, P. L. (2006). "Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources." Plant Science **170**(6): 1133-1140.

Jin, S. , Prusti, R.K. , Roitsch, T. , Ankenbauer, R.G. and Nester, E.W. (1990). "Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG." J. Bacteriol. **172**: 4945-4950.

Joersbo, M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen Klaus, Brunstedt J. and Okkels F.T. (1998). "Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet." Molecular Breeding **4**: 111-117.

Johnson, T.M. and Das, A. (1998). Organization and regulation of expression of the *Agrobacterium* virulence genes. The Rhizobiaceae : molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaink, A. Kondorosi and P. J. J. Hooykaas, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands**:** 265-279.

Jones, J.D.G. , Shlumukov, L. , Carland, F. , English, J. , Scofield, S. R. , Bishop, G. J. and Harrison, K. (1992). "Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants." Transgenic Res. **1** ( ): 285-297.

Jones, M. P. A., Cao, J., O'Brien, R., Murch, S. J. and Saxena, P. K. (2007a). "The mode of action of thidiazuron: Auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L." Plant Cell Reports **26**(9): 1481-1490.

Jones, M. P. A., Yi, Z., Murch, S. J. and Saxena, P. K. (2007b). "Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Micropropagation in solid and liquid culture systems." Plant Cell Reports **26**(1): 13-19.

Juniper, B. E., Robins, R. J. and Joel, D. M. (1989). "The carnivorous plants." Academic Press, San Diego: 353p.

Kálai, K., Mészáros, A., Dénes, F. and Balázs, E. (2008). "Comparative study of constitutive and inducible promoters in tobacco." South African Journal of Botany **74**(2): 313-319.

Kallerhoff, J., Alibert, G. and Brian, Thomas (2003). TISSUE CULTURE | Somatic Embryogenesis. Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Oxford, Elsevier**:** 1372-1379.

Kalvakolanu, D. V. (2003). "Alternate interferon signaling pathways." Pharmacol Ther **100**(1): 1-29.

Kalvakolanu, D. V. and Roy, S. K. (2005). "CCAAT/enhancer binding proteins and interferon signaling pathways." J Interferon Cytokine Res **25**(12): 757-69.

Kanchiswamy, C.N. and Maffei, M. (2008). "Callus induction and shoot regeneration of *Phaseolus lunatus* L. cv. Wonder Bush and cv. Pole Sieva." Plant Cell Tiss Organ Cult **92**: 239-242.

Kannan, P., Premkumar, A. and Ignacimuthu, S. (2007). "Thidiazuron induced shoot regeneration in the endangered species, *Exacum travancoricum* Beedi." Indian Journal of Biotechnology **6**(4): 564-566.

Karam, N.S., Jawad, F.M., Arikat, N.A. and Shibli, R.A. (2003). "Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*." Plant cell, tissue and organ culture **73**(2): 117-121.

Kawiak, A., Krolicka, A. and Lojkowska, E. (2003). "Direct regeneration of *Drosera* from leaf explants and shoot tips." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **75**(2): 175-178.

Khalil, S.M. , Cheah, K.T. , Perez, E.A. , Gaskill, D.A. and Hu, J.S. (2002). "Regeneration of banana (*Musa* spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis." Plant Cell Reports **20**: 1128-1134.

Khan, H., Siddique, I. and Anis, M. (2006a). "Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*." Biologia Plantarum **50**(4): 789-792.

Khan, R.S., Chin, D.P., Nakamura, I. and Mii, M. (2006b). "Production of marker-free transgenic *Nierembergia caerulea* using MAT vector system." Plant Cell Rep **25**: 914-919.

Khompat, K., Tokhao, W. and Jantasilp, A. (2007). "Factors affecting in vitro seed germination and shoot multiplication of a pitcher plant (*Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce)." Songklanakarin Journal of Science and Technology **29**(2): 253-260.

Khoudi, H., Laberge, S., Ferullo, J. M., Bazin, R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lemieux, R. and Vezina, L. P. (1999). "Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants." Biotechnology and Bioengineering **64**(2): 135-143.

Khovidhunkita, W. and Epstein, S. (1997). "Cytokines and osteoporosis." Growth Factors and Cytokines in Health and Disease **3**(2): 459-497

Kim, T. G., Gruber, A. and Langridge, W. H. R. (2004). "HIV-1 gp120 V3 cholera toxin B subunit fusion gene expression in transgenic potato." Protein Expression and Purification **37**(1): 196-202.

Kintzios, S., Drossopoulos, J.B. and Lymperopoulos, C. (2001). "Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of Chilli pepper." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **67**(1): 55-62.

Kiong, A. L. P., Leong, S. W., Hussein, S. and Ibrahim, R. (2008). "Induction of somatic embryos from different explants of *Citrus sinensis*." Journal of Plant Sciences **3**(1): 18-32.

Klapwijk, P.M. , Scheulderman, T. and Schilperoort, R.A. (1978). "Coordinated regulation of octopine degradation and conjugative transfer of Ti plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*: evidence for a common regulatory gene and separate operons. ." J Bacteriol. **136**(2): 775-785.

Klein, R. M., Wolf, E. D., Wu, R. and Sanford, J. C. (1992). "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987." Biotechnology **24**: 384-6.

Ko, K. S., Tekoah, Y., Rudd, P. M., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Spitsin, S., Hanlon, C. A., Rupprecht, C., Dietzschold, B., Golovkin, M. and Koprowski, H. (2003). "Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(13): 8013-8018.

Kochanowski, N. (2005). "Influence des précurseurs de la glycosylation sur la macrohétérogénéité de l'IFN gamma produit en bioreacteur par des cellules CHO." INPL-Thèse.

Kochanowski, N. , Blanchard, F., Cacan, R, Chirat, F, Guedon, E. , Marc, A. and Goergen, J.L. (2008). "Influence of Intracellular Nucleotide and Nucleotide Sugar Contents on Recombinant Interferon-g Glycosylation During Batch and Fed-Batch Cultures of CHO Cells." Biotechnology and bioengineering **100**(4): 721-733.

Koles, K., van Berkel, P. H., Pieper, F. R., Nuijens, J. H., Mannesse, M. L., Vliegenthart, J. F. and Kamerling, J. P. (2004). "N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits." Glycobiology **14**(1): 51-64.

Komamine, A., Murata, N. and Nomura, K. (2005). "Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures - Morphology, Physiology, Biochemistry, and molecular Biology." In Vitro Cell Dev. Biol. Plant **41**: 6-10.

Komarnytsky, S., Borisjuk, N.V. , Borisjuk, L.G. , Alam, M.Z. and Raskin, I. (2000). "Production of Recombinant Proteins in Tobacco Guttation Fluid." Plant Physiol. **124**: 927-934

Kondo, K. (1969). "Chromosome Numbers of Carnivorous Plants." Bulletin of the Torrey Botanical Club. **96**(3): 322-328.

Kong, Lisheng, Attree, Stephen M. and Fowke, Larry C. (1998). "Effects of polyethylene glycol and methylglyoxal bis(guanylhydrazone) on endogenous polyamine levels and somatic embryo maturation in white spruce (*Picea glauca*)." Plant Science **133**(2): 211-220.

Kong, Q., Richter, L., Yang, Y. F., Arntzen, C. J., Mason, H. S. and Thanavala, Y. (2001). "Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(20): 11539-11544.

Koprivova, A., Stemmer, C., Altmann, F., Hoffmann, A., Kopriva, S., Gorr, G., Reski, R. and Decker, E. L. (2004). "Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans." Plant Biotechnol J **2**(6): 517-23.

Krebitz, M., Wiedermann, U., Essl, D., Steinkellner, H., Wagner, B., Turpen, T. H., Ebner, C., Scheiner, O. and Breiteneder, H. (2000). "Rapid production of the major birch pollen allergen bet v 1 in *Nicotiana benthamiana* plants and its immunological in vitro and in vivo characterization." FASEB Journal **14**(10): 1279-1288.

Krenn, L., Beyer, G., Pertz, H. H., Karall, E., Kremser, M., Galambosi, B. and Melzig, M. F. (2004). "In vitro antispasmodic and anti-inflammatory effects of *Drosera rotundifolia*." Arzneimittelforschung **54**(7): 402-5.

Krolicka, A., Szpitter, A., Maciag, M., Biskup, E., Gilgenast, E., Romanik, G., Kaminski, M., Wegrzyn, G. and Lojkowska, E. (2008). "Antibacterial and antioxidant activity of the secondary metabolites from in vitro cultures of *Drosera aliciae*." Biotechnol Appl Biochem.

Kumagai, M. H., Turpen, T. H., Weinzettl, N., della-Cioppa, G., Turpen, A. M., Donson, J., Hilf, M. E., Grantham, G. L., Dawson, W. O., Chow, T. P. and et al. (1993). "Rapid, high-level expression of biologically active alpha-trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 427-30.

Kumar, S. Vinod and Rajam, M. V. (2005). "Polyamines enhance *Agrobacterium tumefaciens vir* gene induction and T-DNA transfer." Plant Science **168**(2): 475-480.

Kumar, Vinod, Gururaj, H. B., Prasad, B. C. Narasimha, Giridhar, P. and Ravishankar, G. A. (2005). "Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L." Scientia Horticulturae **106**(2): 237-246.

Kunze, I., Ebneth, M., Heim, U., Geiger, M., Sonnewald, U. and Herbers, K. (2001). "2-Deoxyglucose resistance: A novel selection marker for plant transformation." Molecular Breeding **7**(3): 221-227.

Kuzminski, A. M., Del Giacco, E. J., Allen, R. H., Stabler, S. P. and Lindenbaum, J. (1998). "Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin." Blood **92**(4): 1191-8.

Lai, E. M. and Kado, C. (2002). "The *Agrobacterium tumefaciens* T pilus composed of cyclic T pilin is highly resilient to extreme environments." FEMS Microbiology Letters **210**(1): 111-114.

Lai, E. M. and Kado, C. I. (1998). "Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens*." J Bacteriol **180**(10): 2711-7.

Lan, T. H., Hong, P. I., Huang, C. C., Chang, W. C. and Lin, C. S. (2008). "High-frequency direct somatic embryogenesis from leaf tissues of *Drimiopsis kirkii* Baker (giant squill)." In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant: 1-4.

Lantz, M. S. and Ciborowski, P. (1994). "Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases." Methods in Enzymology **235**: 563-594.

Larrick, J. W., Yu, L., Naftzger, C., Jaiswal, S. and Wycoff, K. (2001). "Production of secretory IgA antibodies in plants." Biomolecular Engineering **18**(3): 87-94.

Lata, H., Chandra, S., Khan, I. and ElSohly, M. A. (2008). "Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L." In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant: 1-8.

Latha, P.G. and Seeni, S. (1994). "Multiplication of the endangered Indian pitcher plant (*Nepenthes khasiana*) through enhanced axillary branching *in vitro*." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **38**(1): 69-71.

Lecoufle, M. (1989). "Comment choisir et cultiver vos Plantes Carnivores." 78p.

Lee, J. S., Choi, S. J., Kang, H. S., Oh, W. G., Cho, K. H., Kwon, T. H., Kim, D. H., Jang, Y. S. and Yang, M. S. (1997). "Establishment of a Transgenic Tobacco Cell Suspension Culture System for Producing Murine Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor." Molecules and Cells **7**(6): 783-787.

Leljak-Levanić, D., Bauer, N. , Mihaljević, S. and Jelaska, S. (2004). "Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. ." Plant Cell Reports **23**(8): 120-127.

Leon-Banares, R., Gonzalez-Ballester, D., Galvan, A. and Fernandez, E. (2004). "Transgenic microalgae as green cell-factories." Trends Biotechnol **22**(1): 45-52.

Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A. C., Gomord, V. and Faye, L. (1998). "N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends." Plant Mol Biol **38**(1-2): 31-48.

Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B. L. and 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): 338-47.

Li, M., Su, Z. G. and Janson, J. C. (2004). "In vitro protein refolding by chromatographic procedures." Protein Expr Purif **33**(1): 1-10.

Li, X., Krasnyanski, S.F. and Korban, S.S. (2002). "Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*." Journal of Plant Physiology **159**(3): 313-319.

Li, Y., Gao, J. and Fei, S. z (2009). "High frequency in vitro embryogenic callus induction and plant regeneration from indiangrass mature caryposis." Scientia Horticulturae **119**(3): 306-309.

Libantova, J., Kamarainen, T., Moravcikova, J., Matusikova, I. and Salaj, J. (2008). "Detection of chitinolytic enzymes with different substrate specificity in tissues of intact sundew (*Drosera rotundifolia* L.) : Chitinases in sundew tissues." Mol Biol Rep.

Lienard, D., Sourrouille, C., Gomord, V. and Faye, L. (2007a). "Pharming and transgenic plants." Biotechnol Annu Rev **13**: 115-47.

Lienard, D., Tran Dinh, O., van Oort, E., Van Overtvelt, L., Bonneau, C., Wambre, E., Bardor, M., Cosette, P., Didier-Laurent, A., de Borne, F. D., Delon, R., van Ree, R., Moingeon, P., Faye, L. and Gomord, V. (2007b). "Suspension-cultured BY-2 tobacco cells produce and mature immunologically active house dust mite allergens." Plant Biotechnol J **5**(1): 93-108.

Lièvre, K., Hehn, A., Tran, T. L. M., Gravot, A., Thomasset, B., Bourgaud, F. and Gontier, E. (2005). "Genetic transformation of the medicinal plant *Ruta graveolens* L. by an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method." Plant Science **168**(4): 883-888.

Lili, W., Chaozhan, W. and Xindu, G. (2006). "Expression, renaturation and simultaneous purification of recombinant human stem cell factor in *Escherichia coli*." Biotechnology Letters **28**(13): 993-997.

Lillico, S. G., Sherman, A., McGrew, M. J., Robertson, C. D., Smith, J., Haslam, C., Barnard, P., Radcliffe, P. A., Mitrophanous, K. A., Elliot, E. A. and Sang, H. M. (2007). "Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(6): 1771-6.

Lim, A. and Prakash, N. (1973). "Life history ot *N. gracilis*." Malaysian Journal of Science **2**: 45-53.

Lin, W-J., Huang, S-W. and Chou, C. P. (2001). "DegP-coexpression minimizes inclusion-body formation upon overproduction of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*." Biotechnology and Bioengineering **73**(6): 484 - 492.

Littman, S. J., Devos, R. and Baglioni, C. (1985). "Binding of unglycosylated and glycosylated human recombinant interferon-gamma to cellular receptors." J Interferon Res **5**(3): 471-6.

Lobareva, L. S., Rudenskaia, G. N. and Stepanov, V. M. (1973). "The pepsin like proteinase of the insectivorous plant *Nepenthes*." Biokhimiia **38**(3): 640-3.

Lualon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H., Shoyama, Y. and Putalun, W. (2008). "Artemisinin production by shoot regeneration of *Artemisia annua* L. using thidiazuron." Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences **63**(1-2): 96-100.

Lucca, Paola, Ye Xudong and Potrykus Ingo (2001). "Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent." Molecular Breeding **7**: 43-49.

Ma, J. K. C., Lehner, T., Stabila, P., Fux, C. I. and Hiatt, A. (1994). "Assembly of Monoclonal-Antibodies with Igg1 and Iga Heavy-Chain Domains in Transgenic Tobacco Plants." European Journal of Immunology **24**(1): 131-138.

Ma, J. K., Drake, P. M. and Christou, P. (2003). "The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants." Nat Rev Genet **4**(10): 794-805.

Ma, J. K., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N. D., Wang, F., Stabila, P., van Dolleweerd, C., Mostov, K. and Lehner, T. (1995). "Generation and assembly of secretory antibodies in plants." Science **268**(5211): 716-9.

Ma, P., Liu, J., He, H., Yang, M., Li, M., Zhu, X. and Wang, X. (2008). "A Viral Suppressor P1/HC-Pro Increases the GFP Gene Expression in *Agrobacterium*-mediated Transient Assay." Applied Biochemistry and Biotechnology: 1-10.

Ma, S. W., Zhao, D. L., Yin, Z. Q., Mukherjee, R., Singh, B., Qin, H. Y., Stiller, C. R. and Jevnikar, A. M. (1997). "Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance." Nature Medicine **3**(7): 793-796.

Mafra, I., Silva, S. A., Moreira, E. J. M. O., da Silva, C. S. F., Beatriz, M. and Oliveira, P. P. (2008). "Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products." Food Control **19**(12): 1183-1190.

Magnuson, N. S., Linzmaier, P. M., Reeves, R., An, G., HayGlass, K. and Lee, J. M. (1998). "Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture." Protein Expression and Purification **13**(1): 45-52.

Majors, B. S., Betenbaugh, M. J., Pederson, N. F. and Chiang, G. G. (2008). "Enhancement of transient gene expression and culture viability using Chinese hamster ovary cells overexpressing Bcl-x(L)." Biotechnology and Bioengineering **101**(3): 567-578.

Maliga, Pal (2002). "Engineering the plastid genome of higher plants." Current Opinion in Plant Biology **5**(2): 164-172.

Mallory, A. C., Ely, L., Smith, T. H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V. B. (2001). "HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal." Plant Cell **13**(3): 571-83.

Marchal, I., Jarvis, D. L., Cacan, R. and Verbert, A. (2001). "Glycoproteins from insect cells: sialylated or not?" Biol Chem **382**(2): 151-9.

Marczak, Kawiak, A., ojkowska, E. and Stobiecki, M. (2005). "Secondary metabolites in in vitro cultured plants of the genus *Drosera*." Phytochemical Analysis **16**(3): 143-149.

Markaki, M., Drabek, D., Livadaras, I., Craig, R. K., Grosveld, F. and Savakis, C. (2007). "Stable expression of human growth hormone over 50 generations in transgenic insect larvae." Transgenic Res **16**(1): 99-107.

Marsoni, M., Bracale, M., Espen, L., Prinsi, B., Negri, A. S. and Vannini, C. (2008). "Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*." Plant Cell Rep **27**(2): 347-56.

Marton, L., Hrouda, M., Pecsvaradi, A. and Czako, M. (1994). "T-DNA-insert-independent mutations induced in transformed plant cells during *Agrobacterium* co-cultivation." Transgenic Res **3**(5): 317-25.

Masnou, H., Domenech, E., Navarro-Llavat, M., Zabana, Y., Manosa, M., Garcia-Planella, E. and Gassull, M. A. (2007). "Pernicious anaemia in triplets. A case report and literature review." Gastroenterol Hepatol **30**(10): 580-2.

Mason, H.S., Haq , T.A., Clements, J.D. and Arntzen, C.J. (1998). "Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene " Vaccine **16**(13): 1336-1343.

Massoud, M., Attal, J., Thepot, D., Pointu, H., Stinnakre, M-G., Theron, M-C., Lopez, C. and Houdebine, L-M. (1996). "The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits." Reprod-Nutr-Dev. **36**(5): 555-563

Mathews, F. S., Gordon, M. M., Chen, Z., Rajashankar, K. R., Ealick, S. E., Alpers, D. H. and Sukumar, N. (2007). "Crystal structure of human intrinsic factor: cobalamin complex at 2.6-A resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(44): 17311-6.

Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M. and Sasaki, R. (1995). "Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells." Plant Mol Biol **27**(6): 1163-72.

Matsumoto, S., Takebe, I. and Machida, Y. (1988). "*Escherichia coli lacZ* gene as a biochemical and histochemical marker in plant cells." Gene **66**(1): 19-29.

Matthysse, A. G. (1987). "Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*." J Bacteriol **169**(1): 313-23.

Matthysse, A. G. and Stump, A. J. (1976). "The presence of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid DNA in crown gall tumour cells." J Gen Microbiol **95**(1): 9-16.

Matthysse, A.G. (1983). "Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection." J Bacteriol. **154**(2): 906-915.

Matthysse, Ann G., Yarnall, Heather, Boles, Sandra B. and McMahan, Susan (2000). "A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **1490**(1-2): 208-212.

Matusikova, I., Salaj, J., Moravcıkova, J., Mlynarova, L., Nap, J.P. and Libantova, J. (2005). "Tentacles of in vitro-grown round-leaf sundew (*Drosera rotundifolia* L.) show induction of chitinase activity upon mimicking the presence of prey." Planta **222**: 1020–1027.

Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Crameri, A., Angelis, K., Redei, G. P., Schell, J., Hohn, B. and Koncz, C. (1991). "T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants." Embo J **10**(3): 697-704.

Mayfield, S. P. and Franklin, S. E. (2005). "Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae." Vaccine **23**(15): 1828-32.

Mayfield, S. P., Franklin, S. E. and Lerner, R. A. (2003). "Expression and assembly of a fully active antibody in algae." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(2): 438-442.

McBride, K. E. and Summerfelt, K. R. (1990). "Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation." Plant Mol Biol **14**(2): 269-76.

McCormick, A. A., Kumagai, M. H., Hanley, K., Turpen, T. H., Hakim, I., Grill, L. K., Tuse, D., Levy, S. and Levy, R. (1999). "Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(2): 703-708.

McDonald, K. A., Lo, M. H., Trombly, D. M., Xie, Q. and Jackman, A. P. (2005). "Production of human alpha-1-antitrypsin from transgenic rice cell culture in a membrane bioreactor." Biotechnology Progress **21**(3): 728-734.

McElroy, D. and Brettell, R. I. S. (1994). "Foreign gene expression in transgenic cereals." Trends in biotechnology **12**(2): 62-68

McGarvey, P. B., Hammond, J., Dienelt, M. M., Hooper, D. C., Zhen Fang, Fu, Dietzschold, B., Koprowski, H. and Michaels, F. H. (1995). "Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes." Bio/Technology **13**(13): 1484-1487.

McLaughlin, W. and Ahmad, M. H. (1984). "Intrinsic antibiotic resistance and streptomycin uptake in cowpea rhizobia." FEMS Microbiology Letters **21**(3): 299-303.

McPherson, C.E. (2008). "Development of a novel recombinant influenza vaccine in insect cells." Biologicals **In Press, Corrected Proof**.

Meager, A. and Leist, T. (1986). "Antigenic characteristics of glycosylated natural and unglycosylated recombinant human gamma-interferon." J Interferon Res **6**(3): 225-32.

Meister, A. (1988). "Glutathione metabolism and its selective modification." J Biol Chem **263**(33): 17205-8.

Melo, E. O., Canavessi, A. M., Franco, M. M. and Rumpf, R. (2007). "Animal transgenesis: state of the art and applications." J Appl Genet **48**(1): 47-61.

Melzig, M. F., Pertz, H. H. and Krenn, L. (2001). "Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from *Drosera herba*." Phytomedicine **8**(3): 225-9.

Menassa, R., Kennette, W., Nguyen, V., Rymerson, R., Jevnikar, A. and Brandle, J. (2004). "Subcellular targeting of human interleukin-10 in plants." Journal of Biotechnology **108**(2): 179-183.

Mergulhao, F. J. M., Summers, D. K. and Monteiro, G. A. (2005). "Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*." Biotechnology Advances **23**(3): 177-202.

Michaud, D. and Asselin, A. (1995). "Application to plant proteins of gel electrophoretic methods." Journal of Chromatography A **698**(1-2): 263-279.

Michaud, D., Vrain, T.C. , Gomord, V. and Faye, L. (1997). "Stability of Recombinant Proteins in Plants " Methods in Biotechnology **3**: 177-188.

Michler, C.H. and Lineberger, R.D. (1987). "Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures " Plant Cell, Tissue and Organ Culture(3): 189-207.

Miguel, S. (2007). "Production de protéines recombinantes *via* les plantes Carnivores : Application aux plantes du genre *Drosera* et *Nepenthes*." Rapport de stage de Master 2.

Millett, J., Jones, R.I. and Waldron, S. (2003). "The contribution of insect prey to the total nitrogen content of sundews (*Drosera* spp.) determined in situ by stable isotope analysis." New phytologist **158**(3): 527-534.

Miranda, A., Janssen, G., Hodges, L., Peralta, E. G. and Ream, W. (1992). "*Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism." J Bacteriol **174**(7): 2288-97.

Mithila, J. , Hall, J. , Victor, J.M.R. and Saxena, P. (2003). "Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) " Cell Biology and Morphogenesis **21**(5): 408-414.

Mng'Omba, S. A., Du Toit, E. S. and Akinnifesi, F. K. (2008). "Plant regeneration through somatic embryogenesis of jacket plum (*Pappea capensis*)." New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science **36**(2): 137-144.

Mochizuki, S., Hamato, N., Hirose, M., Miyano, K., Ohtani, W., Kameyama, S., Kuwae, S., Tokuyama, T. and Ohi, H. (2001). "Expression and Characterization of Recombinant Human Antithrombin III in *Pichia pastoris*." Protein Expression and Purification **23**(1): 55-65.

Mor, T. S., Sternfeld, M., Soreq, H., Arntzen, C. J. and Mason, H. S. (2001). "Expression of recombinant human acetylcholinesterase in transgenic tomato plants." Biotechnology and Bioengineering **75**(3): 259-266.

Morais-Lino, L.S., dos Santos-Serejo, J.A., de Oliveira e Silva, S., Ferreira de Santana, J.R. and Kobayashi, A.K. (2008). "Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra." Pesq. agropec. bras., Brasília. **43**(10): 1325-1330.

Moreira-Dias, J. M., Molina, R. V., BordÓN, Y., Guardiola, J. L. and GarcÍA-Luis, A. (2000). "Direct and Indirect Shoot Organogenic Pathways in Epicotyl Cuttings of Troyer Citrange Differ in Hormone Requirements and in their Response to Light." Annals of Botany **85**(1): 103-110.

Moyo, M., Amoo, S. O., Bairu, M. W., Finnie, J. F. and Van Staden, J. (2008). "Optimising DNA isolation for medicinal plants." South African Journal of Botany **74**(4): 771-775.

Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987). "Specific synthesis of DNA *in vitro via* a polymerase catalyzed chain reaction." Methods In Enzymology **155**: 335-350.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." Physiologia Plantarum **15**(3): 473 - 497.

Murayama, K. and Tomida, M. (2004). "Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy." Biochemistry **43**(36): 11526-11532.

Murch, S. J., R., Victor J. M. and K., Saxena P. (2003). "Auxin, calcium and sodium in somatic embryogenesis of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl. Cv. Benjamin)." Acta horticulturae **625**: 201-209.

Murch, S. J. and Saxena, P. K. (2001). "Molecular fate of Thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium* × *hortorum* Bailey." Plant Growth Regulation **35**(3): 269-275.

Murlidhar Rao, M., Maruthi Rao, A., Kavikishor, P. B. and Jain, A. (2007). "Thidiazuron enhanced shoot regeneration from different varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)." Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology **8**(3-4): 125-130.

Murthy, B.N.S. , Murch, S.J. and Saxena, P.K. (1998). "Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis." In Vitro Cell Dev. Biol. Plant **34** 267-275.

Nakayama, S. and Amagase, S. (1968). "Acid Protease in *Nepenthes* : partial purification and properties of the enzymes." Proc. Jpn. acad **44**: 358-362.

Namasivayam, P. (2007). "Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **90**(1): 1-8.

Nandi, S., Yalda, D., Lu, S., Nikolov, Z., Misaki, R., Fujiyama, K. and Huang, N. (2005). "Process development and economic evaluation of recombinant human lactoferrin expressed in rice grain." Transgenic Research **14**(3): 237-249.

Navarro, C., Escobedo, R.M. and Mayo, A. (1997). "In vitro plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, *Cavendish banana*." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **51**: 17-25.

Negrouk, V., Eisner, G., Lee, H. I., Han, K. P., Taylor, D. and Wong, H. C. (2005). "Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce." Plant Science **169**(2): 433-438.

Neve, M. de, Loose, M. de, Jacobs, A., Houdt, H. A. van, Kaluza, B., Weidle, U., Montagu, M. van and Depicker, A. (1993). "Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*." Transgenic Research **2**(4): 227-237.

Newport, M. (2003). "A schematic representation of the interferon-g receptor (IFN-gR) and its signalling pathway." Expert Reviews in Molecular Medicine **5**.

Nhut, D., Le, B. , Teixeira da Silva, J.A. and Aswath, C. (2001). "Thin cell layer culture system in *Lilium* : Regeneration and transformation perspectives." In Vitro Cellular and Development Biology - Plant **37**(5): 516-523.

Nhut, D., Teixeira da Silva, J.A. and Aswath, C. (2003a). "The importance of the explant on regeneration in thin cell layer technology " In Vitro Cellular and Development Biology - Plant **39**(3): 266-276.

Nhut, D.T. , Teixeira da Silva, J.A. , Bui, V.L. , Thorpe, T. and Tran Thanh Van, K. (2003b). "Woody plant micropropagation and morphogenesis by thin cell layers. In: Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications." Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 473-493.

Nhut, D.T., Ana, T.T.T., Huonga, N.T.D., Dona, N.T., Haia, N.T., Thiena, N.Q. and Vua, N.H. (2007). "Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot

generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture." Scientia Horticulturae **111**(2): 146-151

Nicchitta, C. V. (2002). "A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER." Current Opinion in Cell Biology **14**: 412-416.

Nomura, K. (2003). "Long-term conservation of embryogenic competence by induction and disorganization of somatic embryos in carrot." Plant Breeding **122**: 343-346.

Nomura, K. , Matsumoto, S. · , Masuda, ·K. and Inoue, M. (1998). "Reduced glutathione promotes callus growth and shoot development in a shoot tip culture of apple root stock M26." Plant Cell Reports **17**: 597-600.

Norberg, B. (1999). "Turn of tide for oral vitamin B12 treatment." J Intern Med **246**(3): 237-8.

Nyberg, G. B., Balcarcel, R. R., Follstad, B. D., Stephanopoulos, G. and Wang, D. I. (1999). "Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells." Biotechnol Bioeng **62**(3): 336-47.

Nykiforuk, C. L., Boothe, J. G., Murray, E. W., Keon, R. G., Goren, H. J., Markley, N. A. and Moloney, M. M. (2006). "Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds." Plant Biotechnol J **4**(1): 77-85.

Okabe, T., Iwakiri, Y., Mori, H., Ogawa, T. and Ohyama, T. (2005). "An S-like ribonuclease gene is used to generate a trap-leaf enzyme in the carnivorous plant *Drosera adelae*." FEBS Letters **579**(25): 5729-5733.

Okabe, T., Mori, H. and Ohyama, T. (1997). "Deoxyribonuclease secreted from an insectivorous plant *Drosera adelae*." Nucleic Acids Symp Ser(37): 127-8.

Okuda, K. (1999). "Discovery of vitamin B12 in the liver and its absorption factor in the stomach: a historical review." J Gastroenterol Hepatol **14**(4): 301-8.

Overturf, Merrill, Leonard, Michael and Kirkendall, Walter M. (1974). "Purification of human renin and inhibition of its activity by pepstatin." Biochemical Pharmacology **23**(3): 671-683.

Owen Jr, T. P. and Lennon, K. A. (1999). "Structure and development of the pitchers from the carnivorous plant *Nepenthes alata* (Nepenthaceae)." American Journal of Botany **86**(10): 1382-1390.

Owen Jr, T. P., Lennon, K. A., Santo, M. J. and Anderson, A. N. (1999). "Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*." Annals of Botany **84**(4): 459-466.

Pan, X-W., Xu, H-H., Liu, X., Gao, X. and Lu, Y-T. (2004). "Improvement of growth and camptothecin yield by altering nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Camptotheca acuminata*." Biotechnology Letters **26**(22): 1745-1748.

Panahi, M., Alli, Z., Cheng, X., Belbaraka, L., Belgoudi, J., Sardana, R., Phipps, J. and Altosaar, I. (2004). "Recombinant protein expression plasmids optimized for industrial *E. coli* fermentation and plant systems produce biologically active human insulin-like growth factor-1 in transgenic rice and tobacco plants." Transgenic Res **13**: 245-259.

Panda, A. K. (2003). "Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*." Advances in biochemical engineering/biotechnology **85**: 43-93.

Panda, A.K. , Mishra, S. and Bisaria, V.S. (1992). "Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena antidysenterica* : I. Effect of major nutrients. ." Biotechnol. Bioeng. **39**: 1043-1051.

Pansegrau, W., Schoumacher, F., Hohn, B. and Lanka, E. (1993). "Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: analogy to bacterial conjugation. ." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 11538-11542.

Paper, D. H., Karall, E., Kremser, M. and Krenn, L. (2005). "Comparison of the antiinflammatory effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM assay." Phytother Res **19**(4): 323-6.

Park, Y. and Cheong, H. (2002). "Expression and production of recombinant human interleukin-2 in potato plants." Protein Expression and Purification **25**(1): 160-165.

Parmenter, D. L., Boothe, J. G., Van Rooijen, G. J., Yeung, E. C. and Moloney, M. M. (1995a). "Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning." Plant Molecular Biology **29**(6): 1167-1180.

Parmenter, D. L., Boothe, J. G., vanRooijen, G. J. H., Yeung, E. C. and Moloney, M. M. (1995b). "Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning." Plant Molecular Biology **29**(6): 1167-1180.

Patrick, C., Ross S. and Wen H. (1999). "Polyethylene glycol enhances lipoplex-cell association and lipofection." Biochim. Biophys. Acta **1421**.

Pavlou, A. K. and Reichert, J. M. (2004). "Recombinant protein therapeutics - success rates, market trends and values to 2010." Nature Biotechnology **22**(12): 1513-1519.

Peeters, Koen, De Wilde, Chris, De Jaeger, Geert, Angenon, Geert and Depicker, Ann (2001). "Production of antibodies and antibody fragments in plants." Vaccine **19**(17-19): 2756-2761.

Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L. and Fischhoff, D.A. (1991). "Modification of the Coding Sequence Enhances Plant Expression of Insect Control Protein Genes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **88**(8): 3324-3328.

Perlman, S., van den Hazel, B., Christiansen, J., Gram-Nielsen, S., Jeppesen, C. B., Andersen, K. V., Halkier, T., Okkels, S. and Schambye, H. T. (2003). "Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in vivo activity of follicle stimulating hormone." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **88**(7): 3227-3235.

Perrin, M., Gertz, C. and Masson, J. E. (2004). "High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide." Plant Science **167**(6): 1343-1349.

Pfeffer, S., Richards, K. and Jonard, G. (2003). "L'extinction de gènes chez les plantes révèle un mécanisme de défense antiviral surmonté par les phytovirus = Gene silencing." Virologie **7** (5): 353-366.

PhRMA (2006). "Report : medecines in development Biotechnology." www.phrma.org.

PhRMA (2008). "Report : medecines in development Biotechnology." www.phrma.org.

Plachno, B. J., Adamec, L., Lichtscheidl, I. K., Peroutka, M., Adlassnig, W. and Vrba, J. (2006). "Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants." Plant Biol (Stuttg) **8**(6): 813-20.

Porta, C. and Lomonossoff, G.P. (2002). "Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants." Biotechnology & genetic engineering reviews **19**: 245-291.

Pratelli, R., Sutter, J.-U. and Blatt, M. R. (2004). "A new catch in the SNARE." Trends in Plant Science **9**: 187-195.

Primrose, S., Twyman, R. M. and Old, B. (2004). "Principes de génie génétique " ISBN 2-8041-4590-5

Qiu, W., Park, J. W. and Scholthof, H. B. (2002). "Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity." Molecular Plant-Microbe Interactions **15**(3): 269-280.

Quiroz-Figueroa, F.R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R.M. and Loyola-Vargas, V.M. (2006). "Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants." Plant Cell Tiss Organ Cult **86**: 285-301.

Quiroz-Figueroa, Francisco, Méndez-Zeel, Marcela, Sánchez-Teyer, Felipe, Rojas-Herrera, Rafael and Loyola-Vargas, Victor M. (2002). "Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica*." Journal of Plant Physiology **159**(11): 1267-1270.

Qun Zhou, Kyaziken, J., Echelard, Y., Meade, H.M., Higgins, E. , Cole, E.S. and Edmunds, T. (2005). "Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats." Journal of Biotechnology **117**(1): 57-72

Ramanayake, S. M. S. D. and Wanniarachchi, W. A. V. R. (2003). "Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro)." Scientia Horticulturae **98**(2): 195-200.

Ramirez, N., Ayala, M., Lorenzo, D., Palenzuela, D., Herrera, L., Doreste, V., Perez, M., Gavilondo, J. V. and Oramas, P. (2002). "Expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for the Hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco plants." Transgenic Research **11**(1): 61-64.

Rasco, E.T. and Maquilan, M A.D. (2005). "Initial studies on in vitro germination and early seedling growth of *Nepenthes truncata* MACF." Carnivorous plant Newsletter **34**: 51-55.

Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D. A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J. M., Cornwell, T., Pastor, I. and Fridlender, B. (2002). "Plants and human health in the twenty-first century." Trends in Biotechnology **20**(12): 522-531.

Rathus, C., Bower, R. and Birch, R. G. (1993). "Effects of promoter, intron and enhancer elements on transient gene expression in sugar-cane and carrot protoplasts." Plant Mol Biol **23**(3): 613-8.

Reggi, S., Marchetti, S., Patti, T., De Amicis, F., Cariati, R., Bembi, B. and Fogher, C. (2005). "Recombinant human acid beta-glucosidase stored in tobacco seed is stable, active and taken up by human fibroblasts." Plant Mol Biol **57**(1): 101-13.

Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Reiss, B., Koncz, C., Schell, J. and Maas, C. . (1996). "Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **93**: 5888-5893.

Rinderknecht, E., O'Connor, B. H. and Rodriguez, H. (1984). "Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation." J Biol Chem **259**(11): 6790-7.

Rivard, D., Anguenot, R., Brunelle, F., Le, V. Q., VeÌ zina, L. P., TreÌ panier, S. and Michaud, D. (2006). "An in-built proteinase inhibitor system for the protection of recombinant proteins recovered from transgenic plants." Plant Biotechnology Journal **4**(3): 359-368.

Rout, G. R., Samantaray, S., Mottley, J., Yokoya, K., Mandegaran, Z., Sarasan, V., Kandasamy, K., Roberts, A. V. and Das, P. (1998). "Histology of in vitro organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa*." Biologia **53**(1): 121-126.

Roy, J. and Banerjee, N. (2003). "Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. oculatum Hk. f." Scientia Horticulturae **97**(3-4): 333-340.

Royer, C., Jalabert, A., Da Rocha, M., Grenier, A. M., Mauchamp, B., Couble, P. and Chavancy, G. (2005). "Biosynthesis and cocoon-export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms." Transgenic Res **14**(4): 463-72.

Ruggiero, F., Exposito, J. Y., Bournat, P., Gruber, V., Perret, S., Comte, J., Olagnier, B., Garrone, R. and Theisen, M. (2000). "Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants." FEBS Letters **469**(1): 132-136.

Russell-Jones, G. J. and Alpers, D. H. (1999). "Vitamin B12 transporters." Pharm Biotechnol **12**: 493-520.

Saint-Jore-Dupas, C., Faye, L. and Gomord, V. (2007). "From planta to pharma with glycosylation in the toolbox." Trends Biotechnol **25**(7): 317-23.

Saji, K.V. and Sujatha, M. (1998). "Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.)." Euphytica **103**(1): 1-7.

Sala, F., Labra, M. and Brian, Thomas (2003a). TISSUE CULTURE AND PLANT BREEDING | Somaclonal Variation. Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Oxford, Elsevier**:** 1417-1422.

Sala, F., Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A.M. and Castiglione, S. (2003b). "Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives." Vaccine **21**(7-8): 803-808.

Salmon, V., Legrand, D., Slomianny, M. C., Yazidi, I. E., Spik, G., Gruber, V., Bournat, P., Olagnier, B., Mison, D., Theisen, M. and Merot, B. (1998). "Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants." Protein Expression and Purification **13**(1): 127-135.

Sandkvist, M. and Bagdasarian, M. (1996). "Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria." Curr Opin Biotechnol **7**(5): 505-11.

Sanford, J.C. (1988). "The biolistic process." Trends in biotechnology **6**(12): 299-302.

Sanford, J.C. (2006). "Biolistic plant transformation." Physiologia Plantarum **79**(1): 206-209.

Santa-Catarina, C., Silveira, V., Scherer, G. and Floh, E. (2007). "Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* " Plant Cell, Tissue and Organ Culture **90**(1): 93-101.

Sareneva, T., Cantell, K., Pyhala, L., Pirhonen, J. and Julkunen, I. (1993). "Effect of carbohydrates on the pharmacokinetics of human interferon-gamma." J Interferon Res **13**(4): 267-9.

Sareneva, T., Mortz, E., Tolo, H., Roepstorff, P. and Julkunen, I. (1996). "Biosynthesis and N-glycosylation of human interferon-gamma. Asn25 and Asn97 differ markedly in how efficiently they are glycosylated and in their oligosaccharide composition." Eur J Biochem **242**(2): 191-200.

Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K. and Julkunen, I. (1995). "N-glycosylation of human interferon-gamma: glycans at Asn-25 are critical for protease resistance." Biochem J **308 (Pt 1)**: 9-14.

Sareneva, T., Pirhonen, J., Cantell, K., Kalkkinen, N. and Julkunen, I. (1994). "Role of N-glycosylation in the synthesis, dimerization and secretion of human interferon-gamma." Biochem J **303 (Pt 3)**: 831-40.

Schaefer, D. G. and Zryd, J. P. (1997). "Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*." Plant J **11**(6): 1195-206.

Schaefer, D., Zryd, J. P., Knight, C. D. and Cove, D. J. (1991). "Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*." Mol Gen Genet **226**(3): 418-24.

Scheiffele, P., Pansegrau, W. and Lanka, E. (1995). "Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing. Purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site- and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA in vitro." J Biol Chem **270**(3): 1269-76.

Schiermeyer, A., Schinkel, H., Apel, S., Fischer, R. and Schillberg, S. (2005). "Production of Desmodus rotundas salivary plasminogen activator alpha 1 (DSPA alpha 1) in tobacco is hampered by proteolysis." Biotechnology and Bioengineering **89**(7): 848-858.

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. and Hume, D. A. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-89.

Schulze, W., Frommer, W. B. and Ward, J. M. (1999). "Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*." Plant Journal **17**(6): 637-646.

Schweikert, R. J., Beaudoin, S. E. and Owen, T. P. (2006). "Induced changes to the ultrastructure of the digestive glands from the carnivorous pitcher plant *Nepenthes alata*." In "Plant Biology 2006" (A. S. o. P. Biologists, ed.). unpublished, Boston, Massachusetts, USA.

Seki, E., Matsuda, N., Yokoyama, S. and Kigawa, T. (2008). "Cell-free protein synthesis system from Escherichia coli cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation." Analytical Biochemistry **377**(2): 156-161.

Selvaraj, N., Vasudevan, A., Manickavasagam, M., Kasthurirengan, S. and Ganapathi, A. (2007). "High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis." Scientia Horticulturae **112**(1): 2-8.

Seo, N. S., Hollister, J. R. and Jarvis, D. L. (2001). "Mammalian glycosyltransferase expression allows sialoglycoprotein production by baculovirus-infected insect cells." Protein Expr Purif **22**(2): 234-41.

Seth, Gargi, Charaniya, Salim, Wlaschin, Katie F. and Hu, Wei-Shou (2007). "In pursuit of a super producer alternative paths to high producing recombinant mammalian cells." Current Opinion in Biotechnology **18**(6): 557-564.

Séveno, M., Bardor, M., Paccalet, T., Gomord, V., Lerouge, P. and Faye, L. (2004). "Glycoprotein sialylation in plants?" Nature Biotechnology. **22**(1351 - 1352).

Shah, M. M., Fujiyama, K., Flynn, C. R. and Joshi, L. (2003). "Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells." Nat Biotechnol **21**(12): 1470-1.

Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H. and Galbraith, D. W. (1995). "Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells." Plant J **8**(5): 777-84.

Shen, Mohan, Wang, Quancai, Mu, Xupeng, Xu, Hao and Yan, Weiqun (2008). "Expression, purification and characterization of recombinant human [beta]-amyloid 1-42 in *Pichia pastoris*." Protein Expression and Purification **In Press, Uncorrected Proof**.

Shi, X. Z. and Jarvis, D. L. (2007). "Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system." Current Drug Targets **8**: 1116-1125.

Shi, Y.P., Das, P., Holloway, B., Udhayakumar, V., Tongren, J.E., Candal, F., Biswas, S., Ahmad, R., Hasnain, S.E. and Lal, A.A. (2000). "Development, expression, and murine testing of a multistage *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate." Vaccine **18**(25): 2902-2914.

Shoemaker, R. C. , Couche, L. J. and Galbraith, D. W. (1986). "Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) " Plant Cell Reports **5**(3): 178-181.

Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R. and Haseloff, J. (1996). "Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein." Curr Biol **6**(12): 1653-63.

Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J. N. and Kooter, J. M. (2001). "Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related." Curr Biol **11**(6): 436-40.

Sijmons, P. C., Dekker, B. M. M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T. C., Van Den Elzen, P. J. M. and Hoekema, A. (1990). "Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants." Bio/Technology **8**(3): 217-221.

Silveira, V., Santa-Catarina, C., Tun, N.N., Scherer, G.F. E., Handro, W., Guerra, M.P. and Floh, E. I. S. (2006). "Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze." Plant Science **171**(1): 91-98.

Singh, S. K., Meghwal, P. R., Sharma, H. C. and Singh, S. P. (2002). "Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from in vitro germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda." Scientia Horticulturae **95**(3): 213-221.

Slack, A. (2000). "Carnivorous plants." The MIT Press: 237p.

Smith, E. F. and Townsend, C. O. (1907). "A Plant-Tumor of Bacterial Origin." Science **25**(643): 671-673.

Sojikul, P., Buehner, N. and Mason, H. S. (2003). "A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2209-14.

Soler, E., Thepot, D., Rival-Gervier, S., Jolivet, G. and Houdebine, L. M. (2006). "Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health." Reprod Nutr Dev **46**(5): 579-88.

Sorrentino, A., Schillberg, S., Fischer, R., Rao, R., Porta, R. and Mariniello, L. (2005). "Recombinant human tissue transglutaminase produced into tobacco suspension cell cultures is active and recognizes autoantibodies in the serum of coeliac patients." International Journal of Biochemistry and Cell Biology **37**(4): 842-851.

Stachel, S.E. , Messens, E. , Van Montagu, M. and Zambryski, P. (1985). "Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*." Nature **318**: 624-629.

Stachel, S.E. and Zambryski, P.C. (1986). "virA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*." Cell **46**(3): 325-333.

Stagoj, M. N. and Podobnik, M. (2006). "Yeasts - Factories for recombinant proteins." Kvasovke - Tovarne rekombinantnih proteinov **57**(4): 235-240.

Starling, James R. and Hopps, Barbara A. (1980). "Inhibition of thyroid cathepsin D activity by pepstatin." Journal of Surgical Research **28**(1): 8-13.

Staub, J. M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P. T., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J. A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G. and Russell, D. A. (2000). "High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts." Nat Biotechnol **18**(3): 333-8.

Steckelberg, R., Luttge, U. and Weigl, J. (1967). "Reinigung der Proteinase aus Nepenthes-Kannensaft." Planta **76**: 238-241.

Stoeger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christou, P. and Fischer, R. (2000). "Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies." Plant Molecular Biology **42**(4): 583-590.

Strasser, R., Mucha, J., Schwihla, H., Altmann, F., Glossl, J. and Steinkellner, H. (1999). "Molecular cloning and characterization of cDNA coding for 1,2N-acetylglusaminyltransferase " Glycobiology. **9**(779-785).

Streatfield, S. J. (2007). "Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants." Plant Biotechnol J **5**(1): 2-15.

Stromqvist, M., Houdebine, M., Andersson, J. O., Edlund, A., Johansson, T., Viglietta, C., Puissant, C. and Hansson, L. (1997). "Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits." Transgenic Res **6**(4): 271-8.

Strosse, H., Domergue, R., Panis, B., Escalant, J.-V. and Côte, F. (2003). "Suspensions cellulaires embryogènes de bananiers et de bananiers plantain." Guides techniques INIBAP 8.

Sundberg, C., Meek, L. , Carroll, K. , Das, A. and Ream, W. (1996). "VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells." J. Bacteriol. **178**: 1207-1212.

Supartana, P., Shimizu, T., Shioiri, H., Nogawa, M., Nozue, M. and Kojima, M. (2005). "Development of simple and efficient in planta transformation method for rice (*Oryza sativa*

L.) using *Agrobacterium tumefaciens*." Journal of Bioscience and Bioengineering **100**(4): 391-397.

Suzuki, S., Oota, M. and Nakano, M. (2002). "Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton. Histological study and response to selective agents." Scientia Horticulturae **95**(1-2): 123-132.

Swartz, J. R. (2001). "Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins." Curr Opin Biotechnol **12**(2): 195-201.

Tabiyeh, D.T., Bernard, F. and Shacker, H. (2006). "Investigation of Glutathione, salicylic acid, and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. ." Acta Horticulturae **726**: 201-204.

Tackaberry, E. S., Dudani, A. K., Prior, F., Tocchi, M., Sardana, R., Altosaar, I. and Ganz, P. R. (1999). "Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: Cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco." Vaccine **17**(23-24): 3020-3029.

Tacket, C. O., Mason, H. S., Losonsky, G., Estes, M. K., Levine, M. M. and Arntzen, C. J. (2000). "Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes." Journal of Infectious Diseases **182**(1): 302-305.

Takahashi, K., Athauda, S. B. P., Matsumoto, K., Rajapakshe, S., Kuribayashi, M., Kojima, M., Kubomura-Yoshida, N., Iwamatsu, A., Shibata, C. and Inoue, H. (2005). "Nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases: Enzymatic and structural characteristics." Current Protein and Peptide Science **6**(6): 513-525.

Takahashi, K., Chang, W. and Ko, J. (1974). "Specific inhibition of acid proteases from brain, kidney, skeletal muscle, and insectivorous plants by diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester and by pepstatin." The Journal of Biochemistry **76**(4): 897-900.

Tawfik, A. A. and Mohamed, M. F. (2006). Shoot differentiation and plant regeneration from thidiazuron-induced callus of *Salvia officinalis*. Acta Horticulturae. **723:** 309-313.

Teixeira da Silva, J.A. (2003). "Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology." African Journal of Biotechnology **2**(12): 683-691.

Terashima, M., Murai, Y., Kawamura, M., Nakanishi, S., Stoltz, T., Chen, L., Drohan, W., Rodriguez, R. L. and Katoh, S. (1999). "Production of functional human alpha 1-antitrypsin by plant cell culture." Appl Microbiol Biotechnol **52**(4): 516-23.

Thomas, T. D. and Maseena, E. A. (2006). "Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important medicinal plant." Scientia Horticulturae **108**(3): 332-336.

Thomas, T. D. and Puthur, J. T. (2004). "Thidiazuron induced high frequency shoot organogenesis in callus from *Kigelia pinnata* L." Botanical Bulletin of Academia Sinica **45**(4): 307-313.

Thomas, T. Dennis (2008). "The role of activated charcoal in plant tissue culture." Biotechnology Advances **26**(6): 618-631.

Thompson, C.J., N.R., Movva, R., Tizard, R., Crameri, J.E., Davies, M., Lauwereys and J., Botterman (1987). "Characterization of herbicide resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*." EMBO Journal 6 **6**: 2519-2523.

Thornhill, A.H., Harper, I.S. and Hallamz, N.D. (2008). "The development of the digestive glands and enzymes in the pitchers of three Nepenthes species : *N. alata*, *N. tobaica* and *N. ventricosa* (Nepenthaceae)." Int. J. Plant Sci. **169**(5): 615-624.

Tinland, B. (1996). "The integration of T-DNA into plant genomes." Trends in Plant Science **1**(6): 178-184.

Tinland, B. , Hohn, B. and Puchta, H. (1994). "*Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus." PNAS **91**(17): 8000-8004

Titon, M., Xavier, A., Otoni, W. C. and Motoike, S. Y. (2007). "Somatic embryogenesis in Eucalyptus grandis: Effect of growth regulators dicamba and picloram." Rev. Árvore **31**(3): 417-426.

Tökes, Z.A., Woon, W.C. and Chambers, S.M. (1974). "Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei*." Planta **119**: 39-46.

Tran Thanh Van, K. (1980). "Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers." Intl. Rev. Cytol. **32**: 291-311.

Trieu, A. T., Burleigh, S. H., Kardailsky, I. V., Maldonado-Mendoza, I. E., Versaw, W. K., Blaylock, L. A., Shin, H., Chiou, T. J., Katagi, H., Dewbre, G. R., Weigel, D. and Harrison, M. J. (2000). "Transformation of Medicago truncatula via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*." Plant J **22**(6): 531-41.

Turpen, T. H., Reinl, S. J., Charoenvit, Y., Hoffman, S. L., Fallarme, V. and Grill, L. K. (1995). "Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus." Bio/Technology **13**(1): 53-57.

Tzfira, T., Vaidya, M. and Citovsky, V. (2001). "VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity." Embo J **20**(13): 3596-607.

Uchimiya, H., Fushimi, T., Hashimoto, H., Harada, H., Syono, K. and Sugawara, Y. (1986). "Expression of a Foreign Gene in Callus Derived from DNA-Treated Protoplasts of Rice (*Oryza Sativa*-L)." Molecular & General Genetics **204**(2): 204-207.

Umezawa, H. (1977). "Protease inhibitors produced by microorganisms." Acta Biol Med Ger **36**(11-12): 1899-915.

Vallejo, L. F. and Rinas, U. (2004). "Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins." Microb Cell Fact **3**(1): 11.

Van der Vyver, C., Schneidereit, J., Driscoll, S., Turner , J., Kunert, K. and Foyer, C.H. (2003). "Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance." Plant Biotechnology Journal **1**(2): 101 - 112.

Van Hengel, A.J., Van Kammen, A. and de Vries, S.C. (2002). "A relationship between seed development, Arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis." Physiologia Plantarum **114**(4): 637-644.

Van Walraven, C. , Austin, P. and Naylor, C. D. (2001). "Vitamin B12 injections versus oral supplements. How much money could be saved by switching from injections to pills?" Can Fam Physician **47**: 79-86.

Vanhaverbeke, C., Simorre, J. P., Sadir, R., Gans, P. and Lortat-Jacob, H. (2004). "NMR characterization of the interaction between the C-terminal domain of interferon-gamma and heparin-derived oligosaccharides." Biochem J **384**(Pt 1): 93-9.

Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S. and Fischer, R. (1999). "Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(20): 11128-11133.

Vaquero, C., Sack, M., Schuster, F., Finnern, R., Drossard, J., Schumann, D., Reimann, A. and Fischer, R. (2002). "A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco." Faseb Journal **16**(1): 408-+.

Vargas, Teresa E., De García, Eva and Oropeza, Maira (2005). "Somatic embryogenesis in Solanum tuberosum from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns." Journal of Plant Physiology **162**(4): 449-456.

Vaucheret, H. and Fagard, M. (2001). "Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators." Trends Genet **17**(1): 29-35.

Veliky, I.A. and Rose, D. (1973). "Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell culture." Can. J. Bot. **51**: 1834-1844.

Verch, T., Yusibov, V. and Koprowski, H. (1998). "Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector." Journal of Immunological Methods **220**(1-2): 69-75.

Villarejo, A., Buren, S., Larsson, S., Dejardin, A., Monne, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., von Heijne, G., Grebe, M., Bako, L. and Samuelsson, G. (2005). "Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast." Nat Cell Biol **7**(12): 1224-31.

Visal-Shah, S., Vrain, T. C., Yelle, S., Nguyen-Quoc, B. and Michaud, D. (2001). "An electroblotting, two-step procedure for the detection of proteinases and the study of proteinase/inhibitor complexes in gelatin-containing polyacrylamide gels." Electrophoresis **22**(13): 2646-2652.

Voinnet, O. (2005). "Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections." Nature Reviews Genetics **6**: 206-220.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003). "An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus." Plant J **33**(5): 949-56.

von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L. (2002). "Developmental pathways of somatic embryogenesis " Plant Cell, Tissue and Organ Culture. **69**(3): 233-249.

Von Schaewen, A., Sturm, A., O'Neill, J. and Chrispeels, M.J. (1993). "Isolation of a mutant Arabidopsis plant that lacks N-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans." Plant Physiol. **102**(4): 1109-1118.

Wagner, A., Moody, J., Grace, L. J. and Walter, C. (1997). "Transformation of *pinus radiata* based on selection with hygromycin B." New Zealand Journal of Forestry Science **27**(3): 280-288.

Waldron, C., Murphy, E. B., Roberts, J. L., Gustafson, G. D., Armour, S. L. and Malcolm, S. K. (1985). "Resistance to hygromycin B - A new marker for plant transformation studies." Plant Molecular Biology **5**(2): 103-108.

Wall, J.R. (1996). "Transgenic livestock : Progress and prospects in the future." Theriogenology **45**: 57-68.

Walsh, G. (2006). "Biopharmaceutical benchmarks 2006." NATURE BIOTECHNOLOGY **24**(7): 769-776.

Wandelt, C. I., Khan, M. R., Craig, S., Schroeder, H. E., Spencer, D. and Higgins, T. J. (1992). "Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants." Plant J **2**(2): 181-92.

Wang, C., Wang, L. and Geng, X. (2007a). "Renaturation with simultaneous purification of rhG-CSF from *Escherichia coli* by ion exchange chromatography." Biomedical Chromatography **21**(12): 1291-1296.

Wang, H. M., Zu, Y. G., Wang, W. J., Wu, S. X. and Dong, F. L. (2006a). "Establishment of *Camptotheca acuminata* regeneration from leaf explants." Biologia Plantarum **50**(4): 725-728.

Wang, H., Zhou, M., Brand, J. and Huang, L. (2007b). "Inflammation activates the interferon signaling pathways in taste bud cells." J Neurosci **27**(40): 10703-13.

Wang, J. and Bao, M. Z. (2007). "Plant regeneration of pansy (*Viola wittrockiana*) 'Caidie' via petiole-derived callus." Scientia Horticulturae **111**(3): 266-270.

Wang, M. L., Goldstein, C., Su, W., Moore, P. H. and Albert, H. H. (2005). "Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: A secure biofactory." Transgenic Research **14**(2): 167-178.

Wang, Y. x, Wang, X. f, Ma, Z. y, Zhang, G. y, Han, G. y and Zhang, Y. m (2006b). "Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Two Recalcitrant Genotypes of *Gossypium hirsutum* L." Agricultural Sciences in China **5**(5): 323-329.

Ward, Doyle V., Zupan John R. and Zambryski Patricia C. (2002). "Agrobacterium VirE2 gets the VIP1 treatment in plant nuclear import." Trends in Plant Science **7**(1): 1-3.

Warner, T. G. (1999). "Enhancing therapeutic glycoprotein production in Chinese hamster ovary cells by metabolic engineering endogenous gene control with antisense DNA and gene targeting." Glycobiology **9**(9): 841-850.

Webb, D. M. and Knapp, S. J. (1990). "DNA extraction from a previously recalcitrant plant genus." Plant Molecular Biology Reporter **8**(3): 180-185.

Wee, E. G., Sherrier, D. J., Prime, T. A. and Dupree, P. (1998). "Targeting of active sialyltransferase to the plant Golgi apparatus." Plant Cell **10**(10): 1759-68.

Weening, R. S., Leitz, G. J. and Seger, R. A. (1995). "Recombinant human interferon-gamma in patients with chronic granulomatous disease--European follow up study." Eur J Pediatr **154**(4): 295-8.

Wei, Y., Li, C., Huang, W., Li, B., Strome, S. and Wang, L. X. (2008). "Glycoengineering of human IgG1-Fc through combined yeast expression and *in vitro* chemoenzymatic glycosylation." Biochemistry **47**(39): 10294-10304.

Wen, J., Kinnear, M. B., Richardson, M. A., Willetts, N. S., Russell-Jones, G. J., Gordon, M. M. and Alpers, D. H. (2000). "Functional expression in *Pichia pastoris* of human and rat intrinsic factor." Biochim Biophys Acta **1490**(1-2): 43-53.

Wenck, A. and Hansen, G. (2005). "Positive selection." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **286**: 227-236.

Wenderoth, I. and von Schaewen, A. (2000). "Isolation and characterization of plant N-acetyl glucosaminyltransferase I (GntI) cDNA sequences. Functional analyses in the *Arabidopsis* cgl mutant and in antisense plants." Plant Physiol **123**(3): 1097-108.

Wigdorovitz, A., Mozgovoj, M., Dus Santos, M. J., Parreno, V., Gomez, C., Perez-Filgueira, D. M., Trono, K. G., Rios, R. D., Franzone, P. M., Fernandez, F., Carrillo, C., Babiuk, L. A., Escribano, J. M. and Borca, M. V. (2004). "Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants." Journal of General Virology **85**(7): 1825-1832.

Wigdorovitz, A., Perez Filgueira, D. M., Robertson, N., Carrillo, C., Sadir, A. M., Morris, T. J. and Borca, M. V. (1999). "Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1." Virology **264**(1): 85-91.

WO/1998/027115. Sembyosis Genetics Inc. Moloney, M., Boothe, J. G. and Van Rooijen, G. (1998). "OIL BODIES AND ASSOCIATED PROTEINS AS AFFINITY MATRICES."

WO/2003/006661 COBENTO BIOTECH APS Berglund, L., Petersen, T., Fedosov, S. N., Nexo, E., Laursen, N.B. and Jensen, E. (2002). "TRANSGENIC PLANTS EXPRESSING COBALAMIN BINDING PROTEINS."

Workman, Robert Jay and Burkitt, Donna W. (1979). "Pepsin inhibition by a high specific activity radioiodinated derivative of pepstatin." Archives of Biochemistry and Biophysics **194**(1): 157-164.

Wu, H., Singh, N. K., Locy, R. D., Scissum-Gunn, K. and Giambrone, J. J. (2004). "Expression of immunogenic VP2 protein of infectious bursal disease virus in *Arabidopsis thaliana*." Biotechnology Letters **26**(10): 787-792.

Wuerges, J., Geremia, S. and Randaccio, L. (2007). "Structural study on ligand specificity of human vitamin B12 transporters." Biochem J **403**(3): 431-40.

Wurm, F. M. (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." Nat Biotechnol **22**(11): 1393-8.

Xie, L. and Wang, D. I. (1997). "Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells." Trends Biotechnol **15**(3): 109-13.

Yamada, J., Fujita, K., Eto, K. and Sakai, K. (2003). "Cell growth and nutrient uptake by cell suspensions of *Cupressus lusitanica*." Journal of Wood Science **49**(1): 5-10.

Yamamoto, N., Kobayashi, H., Togashi, T., Mori, Y., Kikuchi, K., Kuriyama, K. and Tokuji, Y. (2005). "Formation of embryogenic cell clumps from carrot epidermal cells is suppressed by 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor." J Plant Physiol **162**(1): 47-54.

Yancheva, Svetla D., Golubowicz, Sara, Fisher, Ervin, Lev-Yadun, Simcha and Flaishman, Moshe A. (2003). "Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during in vitro organogenesis in apple." Plant Science **165**(2): 299-309.

Yanofsky, M. F., Porter, S. G., Young, C., Albright, L. M., Gordon, M. P. and Nester, E. W. (1986). "The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease." Cell **47**(3): 471-7.

Yerima, A., Safi, A., Gastin, I., Michalski, J.C., Saunier, M. and Guéant, J.L. (1996). "Purification by cobalamin-Sepharose affinity chromatography and intrinsic factor-binding activity of an extramembrane proteolytic product from pig ileal mucosa." Biochem. J. **313**: 675-681.

Young, N. M., Brisson, J. R., Kelly, J., Watson, D. C., Tessier, L., Lanthier, P. H., Jarrell, H. C., Cadotte, N., St Michael, F., Aberg, E. and Szymanski, C. M. (2002). "Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*." J Biol Chem **277**(45): 42530-9.

Yuan, Q. P., Hu, W. Q., Pestka, J. J., He, S. Y. and Hart, L. P. (2000). "Expression of a functional antizearalenone single-chain Fv antibody in transgenic *Arabidopsis* plants." Applied and Environmental Microbiology **66**(8): 3499-3505.

Yusibov, V. M., Steck, T. R., Gupta, V. and Gelvin, S. B. (1994). "Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 2994-8.

Yusibov, V. and Rabindran, S. (2008). "Recent progress in the development of plant derived vaccines." Expert Rev Vaccines **7**(8): 1173-83.

Zain Hasan, S. M., Shafie, M. S. B. and Shah, R. M. (2008). "Efficient method for the extraction of genomic DNA from wormwood (*Artemisia capillaris*)." African Journal of Biotechnology **7**(18): 3211-3216.

Zambre, M., Chowdhury, B., Kuo, Y.-H., Van Montagu, M., Angenon, G. and Lambein, F. (2002). "Prolific regeneration of fertile plants from green nodular callus induced from meristematic tissues in *Lathyrus sativus* L. (grass pea)." Plant Science **163**(6): 1107-1112.

Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983). "Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity." Embo J **2**(12): 2143-2150.

Zawada, J., Richter, B., Huang, E., Lodes, E., Shah, A. and Swartz, J. (2003). "High-density, defined media culture for the production of *Escherichia coli* cell extracts." *Fermentation Biotechnology*: 142-156.

Zeitlin, L., Olmsted, S. S., Moench, T. R., Co, M. S., Martinell, B. J., Paradkar, V. M., Russell, D. R., Queen, C., Cone, R. A. and Whaley, K. J. (1998). "A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes." Nat Biotechnol **16**(13): 1361-4.

Zhang, C-L., Chen, D-F., Elliott, M.C. and Slater, A. (2001). "Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) " In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant **37**(2): 305-310.

Zhang, C.-L., Chen, D.-F., Elliott, M.C. and Slater, A. (2004). "Efficient procedures for callus induction and adventitious shoot organogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines. ." In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant **40**(5): 475-481.

Zhang, W., Inan, M. and Meagher, M. M. (2000). "Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." Biotechnology and Bioprocess Engineering **5**(4): 275-287.

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W. and Chua, N. H. (2006). "*Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method." Nat Protoc **1**(2): 641-6.

Zhang, Y-H., Zhong, J-J. and Yu, J-T. (1996). "Effect of Nitrogen Source on Cell Growth and Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide in Suspension Cultures of *Panax notoginseng*. ." Biotechnology Progress **12**(4): 567 -571.

Zhen, Z., Baolin S., Chunming L., Guifang X. and Xianghui L. (1994). "Transformation of wheat protoplasts mediated by cationic liposome and regeneration of transgenic plantlets." Chin. J. Biotechnol. **9**: 258–261.

Zhengquan, He, Fu Yaping, Si Huamin, Hu Guocheng, Zhang Shihong, Yu Yonghong and Sun Zongxiu (2004). "Phosphomannose-isomerase (pmi) gene as a selectable marker for rice transformation via Agrobacterium." Plant Science **166**(1): 17-22.

Zhong, G. Y., Peterson, D., Delaney, D. E., Bailey, M., Witcher, D. R., Register Iii, J. C., Bond, D., Li, C. P., Marshall, L., Kulisek, E., Ritland, D., Meyer, T., Hood, E. E. and Howard, J. A. (1999). "Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds." Molecular Breeding **5**(4): 345-356.

Zhong, Q., Gu, Z. and Glatz, C. E. (2006). "Extraction of recombinant dog gastric lipase from transgenic corn seed." J Agric Food Chem **54**(21): 8086-92.

Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J., Farrand, S. K. and Winans, S. C. (2000). "The bases of crown gall tumorigenesis." J Bacteriol **182**(14): 3885-95.

Zhu, L., van de Lavoir, M. C., Albanese, J., Beenhouwer, D. O., Cardarelli, P. M., Cuison, S., Deng, D. F., Deshpande, S., Diamond, J. H., Green, L., Halk, E. L., Heyer, B. S., Kay, R. M., Kerchner, A., Leighton, P. A., Mather, C. M., Morrison, S. L., Nikolov, Z. L., Passmore, D. B., Pradas-Monne, A., Preston, B. T., Rangan, V. S., Shi, M., Srinivasan, M., White, S. G., Winters-Digiacinto, P., Wong, S., Zhou, W. and Etches, R. J. (2005). "Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens." Nat Biotechnol **23**(9): 1159-69.

Zhu, Z., Hughes, K.W. , Huang, L., Sun, B., Liu, C. and Li, Y. (1994). "Expression of human α-interferon cDNA in transgenic rice plants " Plant Cell, Tissue and Organ Culture **36**(2).

Zimmerman, J.L. (1993). "Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants." Plant Cell. **5**(10): 1411-1423.

Zubo, Ya O., Selivankina, S. Yu, Yamburenko, M. V., Zubkova, N. K., Kulaeva, O. N. and Kuznetsov, V. V. (2005). "Cytokinins activate chloroplast gene transcription." Doklady Akademii Nauk **400**(3): 396-399.

Zuo, J., Niu, Q. W., Ikeda, Y. and Chua, N. H. (2002). "Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes." Curr Opin Biotechnol **13**(2): 173-80.

Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O. and Zambryski, P. (2000). "The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights." Plant J **23**(1): 11-28.

Zupan, J.R. and Zambryski, P. (1995). "Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell." Plant Physiol. **107**: 1041-1 047.

LISTES DES FIGURES

ET DES TABLEAUX

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Processus de N-glycosylation dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi chez les plantes et chez les mammifères (Lienard *et al.*, 2007a). 45

Figure 2 : La lentille d'eau *Lemna minor* et la culture en bioréacteurs. 52

Figure 3 : La mousse *Physcomitrella patens* et la culture de protoplastes en photo-bioréacteurs.. 53

Figure 4 : Photographie (A) et schéma (B) de *Chlamydomonas reinhardtii*. 54

Figure 5 : Exemples de structures N-glycanniques caractéristiques des glycoprotéines en fonction du système d'expression considéré (Kochanowski, 2005). 56

Figure 6 : Structure tri-dimensionnelle de l'interféron-gamma 58

Figure 7 : Voie de signalisation de l'IFNγ adaptée de (Newport, 2003)..... 60

Figure 8 : Structure tridimensionnelle du complexe cobalamine - Facteur intrinsèque (Mathews *et al.*, 2007) (en vert)..... 61

Figure 9 : Rôle du Facteur Intrinsèque dans le transport de la vitamine B12 vers les cellules de l'organisme. 63

Figure 10 : Les *Drosera*. 68

Figure 11 : *Drosera rotundifolia* 69

Figure 12 : Les glandes digestives du genre *Drosera* 71

Figure 13 : Capture d'insecte par *D. capensis* 72

Figure 14 : Les *Nepenthes* dans leur milieu naturel. 76

Figure 15 : Inflorescences, fruits et graines de *Nepenthes* : 78

Figure 16 : *Nepenthes alata*, et l'hybride *N.* x *ventrata* 79

Figure 17 : Différentes urnes de *Nepenthes*). 81

Figure 18 : Evolution d'une urne de *Nepenthes* en formation. Du renflement de l'extrémité de la feuille, à l'ouverture de l'ascidie..... 81

Figure 19 : Coupe longitudinale d'une urne de *N. x ventrata*, description des différentes zone 82

Figure 20 : Coupe transversale de glande de *Nepenthes alata* (Owen Jr *et al.*, 1999)..... 84

Figure 21 : Les glandes de la partie digestive de l'urne. 85

Figure 22 : pH-dépendance de l'activité des nepenthesines de *N. distillatoria* envers l'hémoglobine dénaturée 86

Figure 23 : Analyse du protéome des urnes de *Nepenthes alata* (Hatano and Hamada, 2008) 88

Figure 24 : Principales régions du plasmide Ti *d'Agrobacterium tumefaciens*. 96

Figure 25 : Mécanismes et principaux gènes impliqués dans le transfert de l'ADN-T dans les cellules végétales 98

Figure 26 : Représentation schématique du système de co-intégration. 102

Figure 27 : Représentation schématique du système binaire après conjugaison triparentale. 104

Figure 28 : Structure 3D de la protéine GFP..... 107

Figure 29 : MAT system vector system utilisé chez le peuplier 109

Figure 30 : Représentation schématique de l'embryogénèse somatique directe et indirecte.112

Figure 31 : Les différents stades de l'embryon somatique chez la mangue. 113

Figure 32 : Les différentes étapes de la régénération de plantule par la voie de l'embryogénèse somatique indirecte, et les hormones végétales nécessaires aux différents stades (Zimmerman, 1993 ; Strosse *et al.*, 2003). 114

Figure 33 : Environnement de culture des plantes 129

Figure 34 : Carte physique du plasmide pCR8®/GW/TOPO® 131

Figure 35 : Carte physique du plasmide pBin-Gw. 132

Figure 36 : Carte physique du plasmide pTDE4. 133

Figure 37 : Carte physique du plasmide pBin *m-gfp5-ER*..... 134

Figure 38 : Schématisation du sens d'insertion de l'insert dans la plasmide pCR®8/GW/TOPO® 142

Figure 39 : Schéma représentant la LR recombinaison. 143

Figure 40 : Carte physique des plasmides pBin-*IFNγ* et pBin-*FI* 144

Figure 41 : schéma explicatif de la conjugaison triparentale 146

Figure 42 : blocage de la membrane 155

Figure 43 : fixation de l'anticorps primaire. 155

Figure 44 : fixation de l'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (PA)..... 156

Figure 45 : Détail du montage du transfert..... 158

Figure 46 : Réaction des substrats BCIP (A) et CDP-Star (B) avec l'enzyme Phosphatase Alcaline. 160

Figure 47 : Culture de *Drosera rotundifolia* sauvages sur un milieu enrichi en différentes doses de kanamycine. 167

Figure 48 : Taux de survie des explants et taux de régénération obtenu sur des feuilles de *Drosera rotundifolia* cultivées sur un milieu FlB enrichi en différentes concentrations de céfotaxime : 0, 100, 200, 300, 400 mg/L (calculés par rapport au nombre d'explants mis en culture). 169

Figure 49 : Principe de la transformation génétique de *D. rotundifolia via Agrobacterium tumefaciens* selon la technique de Hirsikorpi et de ses collaborateurs (2002) modifiée.. 171

Figure 50 : Détermination des événements de transformation genetique en fonction de la localisation des bourgeons néoformés..... 175

Figure 51 : Observations de limbe de feuille au microscope à fluorescence. 176

Figure 52 : Observations de poils de feuille de *Drosera rotundifolia* sauvage ou transformée avec le gène *m-gfp-5ER* au microscope à fluorescence (x400). 177

Figure 53 : Observations au microscope à fluorescence de papiers ayant absorbés des gouttelettes de glu de *Drosera rotundifolia* sauvage ou transformée avec le gène *m-gfp-5ER* (x40). 178

Figure 54 : Observations de limbes de feuille de plantes sauvage et transformées avec le gène *uidA* après révélation de l'activité GUS et élimination de la chlorophylle.. 179

Figure 55 : Observations à la loupe binoculaire de poils de feuille de plantes sauvage et transformée avec le gène *uidA* après révélation de l'activité GUS et élimination de la chlorophylle (x 50) 180

Figure 56 : Papiers ayant absorbé de la glu de feuilles de *Drosera rotundifolia* transformée avec le gène *uidA* et sauvage après révélation de l'activité GUS. 181

Figure 57 : Amplification par PCR d'un fragment de gène *nptII* pour une plante exprimant la protéine GUS. 183

Figure 58 : Vérification des plasmides PCR8-*IFNγ* et pCR8-*FI*. 186

Figure 59 : Vérification du sens d'insertion des inserts par PCR sur les plasmides pCR8-*IFNγ* et pCR8-*FI*. 187

Figure 60 : Vérification des plasmides pBin-*IFNγ* et pBin-*FI.* 189

Figure 61 : PCR de mise en évidence du transgène IFN dans la plante transformée IFN8B1.. 192

Figure 62 : Dot Blot sur des extraits de feuilles de *Drosera rotundifolia* sauvage et transformées avec le gène codant pour le FI. 194

Figure 63 : Dot Blot sur des extraits de feuilles de *Drosera rotundifolia* sauvage et transformées avec le gène codant pour l'IFN gamma 195

Figure 64 : Espèces de *Drosera* à grandes feuilles : *Drosera regia* et *Drosera adelae*. 201

Figure 65 : Urnes des différentes espèces de *Nepenthes* utilisées pour l'étude quantitative des protéines des fluides digestifs. 204

Figure 66 : Dosage des protéines totales (µg/ml) des fluides protéiques de différentes urnes de *N. alata* adultes. 205

Figure 67 : Dosage des protéines totales (µg/ml) des fluides protéiques d'urnes de différentes espèces *de Nepenthes*. 206

Figure 68 : Dosage des protéines totales (µg/ml) des fluides protéiques d'urnes de 3 espèces *de Nepenthes* cultivées en conditions *in vitro*. 207

Figure 69 : Volume de sécrétions digestives contenues dans des pièges matures de différentes espèces de *Nepenthes* (en ml). 209

Figure 70 : Evaluation du volume de sécrétions atteint par plante pour différentes espèces du genre *Nepenthes* sur le temps nécessaire au renouvellement de tous les pièges. 210

Figure 71 : Suivi sur 4 semaines du remplissage des urnes vidées 2 à 3 semaines après ouverture de 3 espèces de *Nepenthes* et de leur concentration en protéines totales : *N. alata, N. ventricosa* et *N. sibuyanensis.* 212

Figure 72 : Suivi sur 4 semaines du remplissage des urnes vidées dans les 24h après ouverture de 3 espèces de *Nepenthes* et de leur concentration en protéines totales : *N. x ventrata, N. mirabilis,* et *N. mixta.* 214

Figure 73 : Quantités de protéines présentes dans les urnes avant vidange et 4 semaines après vidange sur des urnes vidangées moins de 24h après ouverture ou 2 à 3 semaines après ouverture..... 215

Figure 74 : Migration sur SDS-PAGE des secrétions préalablement concentrées (x10) d'urnes de *N. rafflesiana*, *N. ventricosa*, *N. alata*. 217

Figure 75 : Migration de sécrétions concentrées (5 fois) d'urne ouverte de *Nepenthes. x ventrata* sur zymogramme de gélatine bovine à 0,1% puis coloration au Page Blue^{TM} Staining après incubation 12h dans un tampon pH 3 à 37°C. 219

Figure 76 : Mesure du pH des sécrétions d'urnes fermées et ouvertes depuis 2 à 3 semaines, et estimation de l'activité protéolytique relative (%) du fluide au pH obtenu (en se basant sur l'activité protéolytique relative des secrétions mesurée en présence d'hémoglobine dénaturée (Athauda *et al.*, 2004)) 221

Figure 77 : Migration de sécrétions concentrées (5 fois) d'urne fermée (puit gauche) et ouverte (puit droite) de *Nepenthes.* x *ventrata* sur zymogramme de gélatine bovine à 0,1% puis coloration au Page Blue^{TM} Staining après incubation 12h à 37°C dans un tampon à pH 2 (A), pH 3 (B), pH 4 (C), pH 5 (D), pH 6 (E), pH 7 (F), pH 8 (G). 223

Figure 78 : Migration de sécrétions concentrées (5 fois) d'urne fermée (puit gauche) et ouverte (puit droite) de *Nepenthes.* x *ventrata* sur zymogramme de caséine à 0,1% puis coloration au Page Blue^{TM} Staining après incubation 12h à 37°C dans un tampon à pH 2 (A), pH 3 (B), pH 4 (C), pH 5 (D), pH 6 (E), pH 7 (F), pH 8 (G). 224

Figure 79 : Migration sur SDS-PAGE d'échantillons de BSA incubés dans des secrétions d'urne fermée et ouverte (à pH initial ou alcalinisé), pendant des temps différents puis, puis coloration au Page Blue^{TM} Staining. 226

Figure 80 : Détection de l'IFNγ en Western blot après incubation de la protéine dans des sécrétions d'urne ouverte de *Nepenthes.* x *ventrata* à pH initial (2,6) et à pH alcalinisé (6) pendant 12 h à 37°C.. 227

Figure 81 : Détermination de l'activité de couplage du Facteur intrinsèque à la cobalamine marquée (CN[^{57}Co]Cbl) après incubation du FI dans des sécrétions digestives d'urnes de *Nepenthes. x ventrata* à pH initial (3,5) et à pH alcalinisé (5,95) (par mesure de la radioactivité en coups par min émise par la cobalamine marquée)..... 229

Figure 82 : Migrations de sécrétions concentrées d'urne ouverte de Nepenthes x betrata sur zymogramme de gélatine bovine à 0.1% puis coloration au PageBlueTM stainig après incubation pendant 12h dans un tampon à pH 3 à 37°C. 231

Figure 83 : Les différentes voies possibles de régénération..... 238

Figure 84 : Mode d'action du thidiazuron au sein des tissus végétaux (Hare and Van Staden, 1994 ; Murch *et al.*, 2003 ; Jones *et al.*, 2007a ; Miguel, 2007). 240

Figure 85 : Plantule et bourgeons issus de régénération directe de *N. alata* à partir de base de feuilles blessées.. 241

Figure 86 : Les différentes étapes de la régénération indirecte de *Nepenthes alata* par embryogénèse somatique ou organogénèse. 243

Figure 87 : Observations de cals globuleux de *N. alata* induits sur le milieu de base enrichi de 1 mg/L de TDZ et de 0,5 mg/L de 2,4-D (combinaison C)..... 247

Figure 88 : Observations microscopiques de cellules de cals globuleux de *N. alata*..... 248

Figure 89 : Régénération d'une ébauche foliaire de *N. alata* sur un cal globuleux induit sur 1 mg/L de 2,4-D et de 0,2 mg/L de TDZ. 251

Figure 90 : Verdissement ou brunissement de cals globuleux exposés à une balance cytokinique de 2 mg/L de BAP sous différentes conditions lumineuses.. 253

Figure 91 : *Nepenthes alata* étiolée après 3 semaines de culture à l'obscurité. 255

Figure 92 : Observations de cals friables de *N. alata* à la loupe binoculaire.. 255

Figure 93 : Observations de cals friables obtenus à partir de TCL (Thin Cell Layer) de tige de *N. alata* sur la combinaison hormonale C 0,25 mg/L de TDZ / 0,5 mg/L de 2,4-D.. 257

Figure 94 : Observations microscopiques de cals friables induits à partir de racines sur la combinaison E (0,1 mg/L 2,4-D et 1 mg/L de BAP). 258

Figure 95 : Observations microscopiques de cals friables translucides induits à partir de collet de plantules étiolées de *N. alata* sur la combinaison hormonale H 0,75 mg/L de NAA / 0,5 mg/L de BAP..... 259

Figure 96 : Les différentes étapes de la germination de la graine de *Nepenthes*.). 262

Figure 97 : Observations à la loupe binoculaire de structures dressées à la surface de cals friables translucides issus de feuilles et de collets de plantules étiolées (grossissement x 50) 263

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Protéines recombinantes produites dans des cellules CHO, dont la commercialisation a été approuvée par la FDA (Jayapal *et al.*, 2007). 35

Tableau 2 : Protéines recombinantes en phase cliniques produites par des animaux transgéniques. (Melo *et al.*, 2007). 39

Tableau 3 : Principales Protéines recombinantes et anticorps monoclonaux produits dans les plantes transgéniques..... 43

Tableau 4 : Comparaison des différents systèmes d'expression de protéines recombinantes (Fischer and Emans, 2000 ; Ma *et al.*, 2003 ; Dingermann, 2008) 56

Tableau 5 : Concentrations finales d'antibiotiques à ajouter au milieu nutritif en fonction de la souche bactérienne et du plasmide utilisé 130

Tableau 6 : Récapitulatif des taux de régénération, et des taux de transformation génétique obtenus pour la transformation génétique de *Drosera rotundifolia* avec les différents gènes utilisés..... 197

Tableau 7 : Caractéristiques des urnes utilisées pour le suivi du remplissage (après vidange) et de la concentration en protéines totales des nouvelles sécrétions. 211

ANNEXES

1. Composition des milieux de culture végétale MS et GAMBORG B5

(Murashige and Skoog, 1962 ; Gamborg *et al.*, 1968)

	Eléments	MS (en mg/L)	Gamborg B5 (en mg/L)
Macroéléments	NH_4NO_3	1650	-
	$(NH_4)_2SO_4$	-	134
	KNO_3	1900	2500
	NaH_2PO_4, H_2O	-	150
	$CaCl_2$, $2H_2O$	440	750
	$MgSO_4$, 7 H_2O	180,54	250
	KH_2PO_4	170	-
Microéléments	KI	0,83	0,75
	H_3BO_3	6,2	3
	$MnSO_4$, H_2O	16,9	10
	$ZnSO_4$, 7 H_2O	8,6	2
	Na_2MoO_4, 2 H_2O	0,25	0,25
	$CuSO_4$, 5 H_2O	0,025	0,025
	$CoCl_2$, 6 H_2O	0,025	0,025
Fer	$FeSO_4$, 7 H_2O	27,8	27,8
	NaEDTA	37,3	37,3
Vitamines	Inositol	100	100
	Ac nicotinique	0,5	1
	Pyridoxine HCl	0,5	1
	Thiamine HCl	0,1	10
	Glycine	2	-
	pH	5,8	5,8

2. Composition des milieux de culture bactérienne

2.1. **Composition du milieu LB** (Culture *E. coli*)

Composant	Quantité (g/L)
Tryptone	10
Yeast Extract	5
NaCl	10
pH	7,5

2.2. Composition du milieu YEB (Culture d'*Agrobacterium tumefaciens*)

Composant	**Quantité (g/L)**
Beef Extract	10
Yeast Extract	5
Peptone	10
Saccharose	15
MgSO4	0,5
pH	7,2

Les milieux solides sont obtenus par l'ajout de 20 g/L d'Agar avant autoclave.

Le milieu YEB Mg^{2+} est obtenu en ajoutant 0,5 g/L supplémentaire de MgSO4 au milieu YEB.

3. Concentrations des solutions mères d'antibiotiques et solvants utilisés

Antibiotiques	Concentrations	Solvant
Streptomycine	100 mg/ml	Eau
Carbénicilline	100 mg/mL	Eau
Chloramphénicol	25 mg/mL	Eau
Kanamycine	25 mg/mL	Eau
Rifampicine	100 mg/mL	DMSO+Eau
Spectinomycine	50 mg/mL	Eau

4. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose : MinElute™ Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN)

Ce protocole permet d'extraire et de purifier des fragments d'ADN de 70 pdb à 4 kb, à partir de gel d'agarose préparé dans des tampons TAE (Tris Acétate EDTA) ou TBE (Tris Borate EDTA).
Les centrifugations se font à 17900 g à température ambiante.

- **Exciser la bande d'ADN du gel d'agarose avec une lame de scalpel propre.**

  Minimiser la taille de la bande de gel en enlevant l'excès d'agarose. L'insérer dans un tube de centrifugation de 1,5 mL.

- **Ajouter 3 volumes de tampon QG pour 1 volume de gel (100 mg ou approximativement 100 µl.**

  Par exemple, ajouter 300 µl de tampon QG pour 100 mg de gel. Pour des gels d'agarose supérieur à 2%, ajouter 6 volumes de tampon QG. La masse maximum de gel traité par colonne est 400 mg.

- **Incuber à 50°C pendant 10 minutes pour solubiliser l'agarose complètement et libérer l'ADN. Mélanger en vortexant toutes les deux minutes. Faire attention que la couleur de la mixture reste jaune.**

  Si la couleur du mélange est orange ou pourpre, ajouter 10 µL d'acétate de sodium 3 M, pH 5.0 et mélanger. La couleur doit redevenir jaune. L'adsorption de l'ADN à la

membrane est seulement efficace à pH ≤ 7.5. Le tampon QG contient un indicateur de pH qui est jaune à pH ≤ 7.5, et orange ou violet à pH supérieur, permettant une détermination facile du pH optimal pour fixer l'ADN.

- **Ajouter un volume d'isopropanol à l'échantillon, et mélanger par inversion**

Par exemple, si le morceau d'agarose pèse 100 mg, ajouter 100 µl d'isopropanol. Ne pas centrifuger à ce stade.

- **Placer une colonne MinElute^{TM} dans un tube de 2 ml, appliquer l'échantillon sur la colonne, et centrifuger 1 min.**

Le volume maximal du réservoir de la colonne est 800 µl. Pour des volumes supérieurs, charger en 2 fois.

- **Jeter le filtrat, puis replacer la colonne dans la même collection de tube.**

- **Ajouter 500 µl de tampon QG à la colonne, et centrifuger 1 min.**

- **Rejer le filtrat puis replacer la colonne dans la même collection de tube.**

- **Pour laver la colonne, ajouter 750 µl de tampon PE à la colonne et centrifuger 1 min, jeter le filtrat et centrifuger à nouveau 1 min.**

L'éthanol résiduel du tampon PE n'est pas complètement éliminé si le filtrat n'est pas éliminé avant la 2ème centrifugation.

- **Placer la colonne dans un nouveau tube propre.**

- **Pour éluer l'ADN, ajouter 10 µl de tampon BE (10mM de Tris HCl, pH 8,5) ou d'eau ultrapure (pH 7-8,5) au centre de la membrane, laisser incuber 1 min, puis centrifuger 1 min.**

Le volume élué est de 9 µl pour un volume de tampon d'élution de 10 µL.
L'efficacité d'élution dépend du pH. L'efficacité maximale d'élution est obtenue entre pH 7.0 et 8.5. Quand de l'eau est utilisée pour l'élution, s'assurer que le pH est compris dans cet intervalle, et stocker l'ADN à -20°C car l'ADN peut être dégradé en absence d'agent tampon. L'ADN purifié peut aussi être élué dans du tampon TE (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), mais l'EDTA pourrait inhiber des réactions enzymatiques ultérieures.

5. Extraction d'ADN plasmidique de bactéries : GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)

- **Culture cellulaire.** Culotter 1 à 5 mL d'une culture d'*E. coli* (cultivée sur la nuit) par centrifugation pendant 1 minute à plus de 12000 g. Le volume optimal de la culture à utiliser dépend du plasmide et de la densité cellulaire. Pour de meilleurs résultats avec des *E. coli* transformées poussant dans du LB, utiliser 1-3 mL de culture pour les plasmides à fortes copies ou 1-5 mL de culture pour les plasmides à faibles copies.

- **Suspension des cellules.** Remettre en suspension complètement le culot de bactéries avec 200 µL de solution de suspension en vortexant ou en pipetant.

- **Lyse cellulaire.** Lyser les cellules par ajout de 200 µL de solution de lyse. Immédiatement, inverser le contenu par inversion (6 à 8 fois) jusqu'à ce que la mixture devienne claire et visqueuse. Ne pas vortexer. Un mélange brutal pourrait causer des cassures de l'ADN génomique, qui provoquerait une contamination de l'ADN plasmidique par de l'ADN génomique. La réaction de lyse ne doit pas excéder 5 minutes. Une lyse alcaline prolongée pourrait de manière permanente dénaturer la super hélice de l'ADN plasmidique, ce qui la rendrait inutilisable pour beaucoup d'autres applications en aval.

- **Neutralisation.** Précipiter les débris cellulaires en additionnant 350 µL de solution de neutralisation/fixation. Mélanger les tubes par inversion, 4 à 6 fois. Culotter les débris cellulaire par centrifugation de plus de 12000 g pendant 10 minutes. Si le surnageant contient une grande quantité de particules en suspension après centrifugation, centrifuger de nouveau avant de procéder à l'étape suivante.

- **Préparation de la colonne.** Insérer une colonne GenElute™ Miniprep dans un tube à centrifuger. Additionner 500 µL de solution de préparation de la colonne dans chacune d'elles, et centrifuger à 12000 g pendant 1 minute. Jeter le liquide.

- **Chargement du lysat nettoyé.** Transférer le lysat éclairci de l'étape 4 à la colonne préparée dans l'étape précédente, et centrifuger à plus de 12000 g pendant 1 minute.

- **Lavage de la colonne.** Lors de la première utilisation, s'assurer d'ajouter l'éthanol à la solution de lavage concentré. Additionner 750 µL de solution de lavage à la colonne.

Centrifuger à plus de 12000 g pendant 1 minute. L'étape de nettoyage de la colonne enlève les sels résiduels et les autres contaminants introduits précédemment. Enlever le liquide et centrifuger à nouveau à vitesse maximum pendant 2 minutes sans ajouter de solution de lavage pour enlever l'excès d'éthanol.

- **Elution de l'ADN.** Transférer la colonne dans un nouveau tube. Additionner 50 µL d'eau ultrapure purifiée ou 5 mM Tris-HCl, pH 8.0. Centrifuger à plus de 12000 g pendant 1 minute. Recommencer l'opération avec à nouveau 50 µL de solution. L'ADN est maintenant présent dans l'éluât, et est prêt pour une utilisation immédiate ou peut être stocké à -20°C.

6. Préparation des bactéries électrocompétentes

Sorties du milieu de culture, les bactéries deviennent très fragiles à la manipulation (lyse possible). De ce fait, il ne faut pas mettre de frein lors des centrifugations, et remettre délicatement le culot en suspension après chaque centrifugation (éviter le vortex, éviter l'aspiration de la suspension dans une pipette).

- Ensemencer 2 ml de LB avec 4 colonies indépendantes de bactéries fraîchement étalées sur boîte LB.
- Incuber à 37 °C, sous agitation, pendant une nuit
- Ensemencer 200 ml de LB avec la préculture.
- Incuber à 37 °C pendant 3 heures ($0,5<DO_{700nm}<0,9$, en phase exponentielle de croissance)
- Transférer les cultures dans des tubes falcon 50 ml et mettre à 4°C pendant 2 heures
- Centrifuger pendant 5 minutes à 4°C et 4000 g, sans frein et sans accélération (Jouan Br4i)
- Resuspendre le culot **délicatement**.
- Effectuer 2 lavages à l'eau ultrapure stérile froide (50 ml chaque fois)
- Après le second lavage reprendre le culot de bactérie dans 20 ml de glycérol 10% froid
- Centrifuger pendant 5 minutes à 4°C et 4000 g, sans frein et sans accélération.
- Réaliser 1 lavage avec 50 ml de glycérol 10% froid

- Reprendre culot final dans 1 ml de glycérol 10%
- Aliquoter par 45 µl et congeler dans le l'azote liquide avant de stocker les tubes à -80°C.

7. Préparation des bactéries chimiocompétentes (MC 1061)

Matériel : solution Tris HCl 10mM pH8 CaCl2 100mM stérile

- A partir d'une préculture en suspension, faire 2 falcons avec 20ml de LB et 10 ml de MC1061 en suspension. Culture de 2 à 4h à 37°C sous agitation jusqu'à DO(560) = 0,5.
- Mettre sur la glace 10min
- Centrifuger à 4000 g pendant 5 min à 4°C
- Jeter le surnageant
- Dissocier le culot en agitant très doucement les falcons, passage régulier dans la glace
- Ajouter 7,5 ml de CaCl2 100mM (1/2 vol depart)
- Laisser sur la glace 45 min
- Centrifuger à 4000 g pdt 5 min à 4°C
- Jeter le surnageant
- Reprendre et dissocier le culot avec 1ml de CaCl2
- Stockage à 4°C pdt 12 à 24h maxi

8. Transformation des *E. coli* MC1061 compétentes

- Sortir les plasmides, décongélation sur glace
- Dans un eppendorf, mettre 200µl de cellules compétentes + 2µl de plasmide (maxi prep)
- Laisser 30 min sur la glace
- Sécher les boites de petri LB+Kana 25, et mettre les bains-marie à 37°C, et à 42°C
- Plonger les eppendorfs 30s à 42°C
- Puis placer immédiatement sur la glace
- Ajouter 500µl de LB ou SOC medium
- Mettre 1h à 37°C au bain-marie
- Puis étaler au râteau sur la boite LB+kana
- Etuve à 37°C toute la nuit.

9. Génotype des bactéries utilisées

Escherichia coli TOP10

Génotype : F^- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.

Escherichia coli ccdB Survival™

Génotype : F^- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG tonA::Ptrc-ccdA.

Escherichia coli MC1061

Génotype : hsdR2, hsdM+, hsdS+, araD139 Δ(ara-leu)7697, Δ(lac)X74, galE15, galK16, rpsL (StrR) mcrA, mcrB1.

Escherichia coli HB101 (pRK2013)

Génotype : supE44, hsdS20 (rB- mB-), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1.

Escherichia coli GeneHogs®

Génotype : F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mrcBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK l rpsL nupG.

10. Composition des gels de polyacrylamide et des zymogrammes

Volumes pour 2 petits gels de 11,8 x 10,7 cm :

	Gel de résolution 10% SDS PAGE	Gel de résolation 10 % Zymogramme 0.1%	Gel de concentration 5%
Acryl 30 %	3.3 ml	3.3 ml	0.83 ml
Tris HCl pH 8.8 1M	3.75 ml	3.75 ml	-
Tris HCl pH 6.8 1M	-	-	0.63 ml
H_2O	2.8 ml	1.8 ml	3.46 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	8 µl	8 µl	5 µl
Persulfate 25%	40 µl	40 µl	20 µl
Gélatine ou caséine (10 g/L)	-	1 ml	-

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Madame Véronique GOMORD, Chargée de Recherche, Université de Rouen, Mont Saint Aignan

Monsieur Hubert SCHALLER, Chargé de Recherche, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame BITEAU Flore

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Production de protéines recombinantes par des plantes carnivores génétiquement transformées : application à *Drosera rotundifolia* et transfert de la technologie à *Nepenthes alata*"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Sciences agronomiques**»

Fait à Vandoeuvre, le 05 mai 2009
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT



TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Production de protéines recombinantes par des plantes carnivores génétiquement transformées : Application à *Drosera rotundifolia* et transfert de la technologie à *Nepenthes alata*.

Le travail présenté porte sur le développement d'une nouvelle technologie innovante, nommée PAT Friday®, visant à produire des protéines recombinantes au sein des sécrétions extracellulaires de plantes carnivores génétiquement modifiées.

Deux objectifs ont été fixés : Réaliser la preuve de concept de la technologie sur le modèle expérimental *Drosera rotundifolia*, en transformant la plante avec des gènes marqueurs et humains afin de mettre en évidence la présence des protéines recombinantes dans la glu ; et développer, après évaluation, la technologie sur un modèle potentiellement industrialisable, *Nepenthes alata*.

Les résultats ont indiqué la présence des deux protéines marqueurs GFP et GUS dans les tissus et dans la glu de *Drosera rotundifolia* transformées. Les plantes ont également été transformées génétiquement avec les gènes humains de l'interféron gamma et du facteur intrinsèque. Les protéines recombinantes humaines ont été mises en évidence au sein des tissus végétaux. Le potentiel industriel du modèle *Nepenthes alata* a ensuite été étudié : 10 à 15 kg de protéines totales par hectare et par an peuvent être produits, grâce notamment à des récoltes successives non destructrices, et la possibilité de contrôler l'activité des protéases digestives naturelles. L'élaboration d'un protocole de régénération de la plante a été entreprise par embryogénèse somatique et organogénèse indirecte, en vue de sa transformation génétique.

La technologie PAT Friday®, avec des étapes simplifiées d'extraction et de purification des protéines d'intérêt produites dans le liquide digestif, offre de nouvelles perspectives dans le domaine des protéines thérapeutiques produites à partir de plantes.

Mots clés : protéines recombinantes, plantes carnivores, *Drosera rotundifolia*, poils glanduleux, glu, *Nepenthes alata*, urnes, secrétions digestives, transformation génétique, GUS, GFP, interféron gamma, facteur intrinsèque, régénération, callogénèse, organogénèse indirecte, embryogénèse somatique.

Production of recombinant proteins by genetically modified carnivorous plants : Application to *Drosera rotundifolia* and technology transfer to *Nepenthes alata*.

The present work focuses on the development of a new innovating technology, called PAT Friday®, aiming at producing recombinant proteins into the extra-foliar fluid of modified carnivorous plants.

Two objectives were assigned to this work : 1- to realize a proof of concept of the technology on the experimental model *Drosera rotundifolia*, transformed with marker and human genes, to confirm the occurence of the recombinant proteins into glu ; and 2 - to evaluate and develop, the technology on the model *Nepenthes alata*, more adapted to industrial scaling-up.

The results indicate the presence of two marker proteins GUS and GFP inside the tissues and into the glu of modified *Drosera rotundifolia* plants. The same plant species has also been transformed with human gamma interferon and intrinsic factor genes. The corresponding human recombinant proteins have been detected into the plant tissues. Potential industrial scaling-up has been studied with the species *Nepenthes alata. The* results show a potential productivity of 10 to 15 kg of total proteins per hectare per year, thanks to non-destructive repeated harvests, and possibility to efficiently control the natural proteinase activity. The elaboration of a regeneration protocol has been undertaken through indirect organogenesis and somatic embryogenesis, with a view to transform genetically this plant.

PAT Friday® technology, with simplified extraction and purification methods of the proteins of interest targeted into the liquid secretions, opens new perspectives in the field of therapeutical proteins produced in plants.

Keywords : recombinant proteins, carnivorous plants, *Drosera rotundifolia*, glandulat tentacles, glu, *Nepenthes alata*, pitchers, digestive secretions, genetic transformation, GUS, GFP, gamma interferon, intrinsic factor, plant regeneration, callogenesis, indirect organogenesis, somatic embryogenesis.