

**UNIVERSITE BLAISE PASCAL – CLERMONT II**

Année 2002

N° D'ORDRE :

THESE  
pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE CLERMONT II**

Discipline :  
**Physiologie et Génétique Moléculaire**

présentée et soutenue publiquement

par

**Frédéric NORRE**

Le 25 Octobre 2002

Titre :

**REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU PROMOTEUR  
HMWG-DX5 DE BLE  
DANS L'ALBUMEN DE MAÏS  
ET CREATION DE PROMOTEURS CHIMERIQUES.**

**Directeur de thèse : Docteur Véronique GRUBER**

**JURY**

Professeur Joël DREVET, Université CLERMONT II  
Docteur Michel DELSENY, Directeur de Recherche CNRS PERPIGNAN  
Professeur Francis QUETIER, Directeur Général Adjoint du Génoscope  
Docteur Dolores LUDEVID, Directeur de Recherche CSIC BARCELONE  
Professeur Jean-Marc DERAGON, Université CLERMONT II

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinateur

A vous deux.

## **Remerciements**

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Bertrand MEROT (Président du directoire de MERISTEM Therapeutics), pour m'avoir accueilli dans son entreprise.*

*Je remercie Manfred THEISEN (Directeur scientifique) pour m'avoir intégré dans son équipe de recherche et pour l'intérêt qu'il a porté à l'égard de mon travail et de son bon déroulement.*

*Je remercie très sincèrement Véronique GRUBER (Directeur de thèse) pour ses précieux conseils et son entière disponibilité. Je te suis infiniment reconnaissant pour la confiance que tu m'as accordée et les nombreuses responsabilités que tu as su me faire partager.*

*Je remercie Joël DREVET pour avoir accepté d'être mon correspondant universitaire dans le cadre de la convention CIFRE et pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail malgré ses nombreuses occupations.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me font Mr Michel DELSENY et Mr Francis QUETIER de juger ce travail, ainsi que Mme Dolores LUDEVID, Mr Joël DREVET et Mr Jean-Marc DERAGON pour leur examen critique de ce travail.*

*Je remercie Dolores LUDEVID pour m'avoir accueilli périodiquement dans son laboratoire du CSIC de Barcelone et m'avoir fait partager les compétences scientifiques de son équipe.*

*Je remercie Pau MARZABAL pour son soutien moral que j'espère réciproque à l'aube de nos soutenances et pour son esprit critique au combien précieux à l'égard de mon travail.*

*J'exprime toute ma sympathie à mes collègues de l'équipe de biologie moléculaire qui m'ont aidé et soutenu dans ce travail. Je remercie Laurent BEUF que je n'arrive pourtant pas à convertir en supporter du Clermont Foot, Franck CHANTELOT pour les longues discussions que nous avons eu sur « les éléments cis et les facteurs trans » ; David COMEAU que j'ai souvent ennuyé avec mes questions « radioactives », Laurent PARRY notre auvergnat national, Iann RANCE et son Floc de Gascogne, Virginie JONVAL et Cécile MERLE pour leurs sourires au combien importants dans cette équipe de « mecs ». Je remercie Stéphane MAGROT pour sa collaboration et son « opposition » au Squash. Je remercie également très vivement Sancha SALGUEIRO et Daniel BURTIN.*

*Je remercie très sincèrement mes collègues des équipes de biologie cellulaire, de production végétale et de propriété intellectuelle qui se sont beaucoup investis dans le cadre du projet « promoteurs de sur-expression ».*

*Je remercie tous mes collègues des équipes de biochimie, d'extraction purification et des services généraux ainsi que ceux de l'ensemble des départements de MERISTEM qui, par leur aide ou leur amitié ont largement contribué à la réalisation de cette thèse.*

*Ma plus grande reconnaissance s'adresse à mes parents et à mes grands-parents qui m'ont encouragé et soutenu sans relâche tout au long de mes études.*

*Un grand merci à Sylvaine et à Gabriel pour tout le bonheur qu'ils m'apportent.*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Les unités de masse, de longueur, de volume, de concentration, de temps, de températures et de pression employées dans ce manuscrit sont celles du système international des mesures des grandeurs physiques. Les symboles des composés chimiques du tableau périodique des éléments ont également été utilisés. Enfin, il a été fait usage des abréviations suivantes.

**ABA** : acide abscissique

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**ADNds** : ADN double brin

**ADN-T** : ADN de transfert

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : ARN messagers

**ASF-1**: “activating sequence factor 1”

**bar** : bialaphos résistance

**bZIP** : leucine zipper basic

**BSA** : sérum albumine bovine

**CaMV** : « cauliflower mosaic virus » (virus de la mosaïque du chou-fleur)

**DAP** : « Day After Pollination » (jours après pollinisation)

**dNTP** : désoxyribonucléotides 5'-triphosphate

**DO** : densité optique

**DOF** : “DNA binding with One Finger”

**DTT** : dithiothréitol

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**EDTA** : acide éthylène diamine tétra-acétique

**EMSA** : « electrophoretic mobility shift assays » (retard de migration sur gel)

**E35S** : « enhanced 35S » (promoteur double 35S du CaMV)

**GARE** : élément de réponse à l'acide gibbérellique

**GLM** : GCN-4 « like » motif

**GUS** :  $\beta$ -glucuronidase

**GUS-INT** : GUS intron

**HMG** : « High Mobility Group »

**HMWG** : « High Molecular Weight Glutenin » (glutenine de haut poids moléculaire)

**kb** : kilobase  
**LB** : Luria-Bertani  
**LMW** : « Low Molecular Weight » (faible poids moléculaire)  
**LUC** : luciférase  
**MCP** : mort cellulaire programmée  
**MS** : Murashige et Skoog  
**O2** : opaque-2  
**O/N** : “over night”  
**pb** : paire de bases  
**PBF** : « P-box binding factor » (facteur de liaison à la boîte prolamine)  
**Pb** : « prolamine-box » (boîte prolamine)  
**PCR** : « polymerase chain reaction » (réaction de polymérisation en chaîne)  
**PNV** : volume nucléaire du culot  
**p/v** : poids/volume  
**RER** : réticulum endoplasmique rugueux  
**RLU** : unité relative de lumière  
**rpm** : rotation par minute  
**SA** : acide salicylique  
**SDS** : sodium dodécyl sulfate  
**SOE** : « splicing overlap extension » (extension PCR par chevauchement)  
**TBE** : tris borate EDTA  
**UP** : ultra pure  
**UV** : ultra violet  
**v/v** : volume/volume  
**wt** : « wild-type » (ligné sauvage)

## **REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU PROMOTEUR HMWG-DX5 DE BLE DANS L'ALBUMEN DE MAÏS ET CREATION DE PROMOTEURS CHIMERIQUES.**

### ***Résumé :***

La région promotrice proximale du gène *Glu-1D1* de gluténine de haut poids moléculaire de blé (PrHMWG-Dx5) porte une boîte albumen bifactorielle atypique qui comprend un motif G « like » (5'-TTACGTGG-3') situé en amont d'une boîte prolamine (Pb1, 5'-TGCAAAG-3'). Les tests d'expression transitoire dans l'albumen de maïs indiquent que le fragment promoteur minimal contenant au moins la boîte G « like » est nécessaire et suffisant pour une activité maximale de PrHMWG-Dx5. Dans le maïs transgénique, nous avons montré que la séquence de 89 pb qui contient la boîte albumen bifactorielle se comporte comme une unité *cis*-activatrice fonctionnelle. Sa répétition en tandem direct confère un effet activateur additif puissant spécifique de l'albumen. En contraste, l'association des séquences activatrices as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV avec des séquences promotrices dérivées de PrHMWG-Dx5 dérégule son activité dans les plants de maïs et de tabac. Par la technique de retard de migration, nous avons démontré que la boîte G « like » peut fixer deux groupes de protéines qui ont respectivement la même affinité de liaison à l'ADN que les facteurs de transcription de la famille Opaque-2 et de la famille ASF-1. Nos résultats nous conduisent à proposer un modèle hypothétique qui repose sur une dualité fonctionnelle de la boîte G « like » dans l'albumen des céréales, et suggère son implication potentielle alternativement dans la synthèse des protéines de réserve et dans la réponse de défense de la plante.

***Mots Clés :*** Albumen de maïs  
Promoteurs chimériques  
HMWG-Dx5  
Boîte albumen bifactorielle  
Facteurs de transcription  
Réponse de défense des plantes

## TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF WHEAT HMWG-Dx5 PROMOTER IN MAIZE ENDOSPERM AND CREATION OF CHIMERIC PROMOTERS.

### ***Abstract:***

The proximal region of the high molecular weight glutenin promoter of the *Glu-1D1* gene (PrHMWG-Dx5) carries an atypical bifactorial endosperm box containing a G-box like motif (5'-TTACGTGG-3') followed by a prolamin-box motif (Pb1, 5'-TGCAAAG-3'). Transient expression assays in maize endosperm indicate that a promoter fragment containing at least the G-box like element is necessary and sufficient for maximal expression of the HMWG-Dx5 promoter. In transformed maize, we have shown that a 89bp sequence bearing the bifactorial endosperm box behaves like a functional *cis*-acting unit. Its direct tandem repetition confers a strong specific additive effect in endosperm tissue. In contrast, the fusion of the activation sequences as-1 and as-2 of the CaMV 35S promoter with PrHMWG-Dx5 derived sequences deregulates its activity in transformed maize and tobacco. Using gel mobility shift assays we have demonstrated that the G-box like motif binds two protein groups, which respectively, have the same DNA binding affinities as transcription factors of either the O2 family or the ASF-1 family. Our results lead us to propose a hypothetical model which is based on a functional duality of the G-box like element in cereal endosperms, and suggests its potential alternative implication in storage protein synthesis and in plant defense response.

***Key words :*** Maize endosperm  
Chimeric promoters  
HMWG-Dx5  
Bifactorial endosperm box  
*Trans*-acting factors  
Plant defense response

# SOMMAIRE.

INTRODUCTION.....	9
<b>I. Le grain de maïs.....</b>	<b>11</b>
<b>II. Régulation de l'expression des gènes zéines.....</b>	<b>19</b>
<b>III. Projet de thèse.....</b>	<b>26</b>
MATERIEL BIOLOGIQUE.....	28
<b>I. Le matériel végétal.....</b>	<b>28</b>
<b>II. Les souches bactériennes.....</b>	<b>29</b>
<b>III. Les plasmides d'expression transitoire.....</b>	<b>30</b>
<b>IV. Les plasmides binaires.....</b>	<b>35</b>
<b>V. Le domaine de liaison à l'ADN natif et muté de la protéine PBF.....</b>	<b>36</b>
METHODES.....	37
<b>I. Analyses des acides désoxyribonucléiques.....</b>	<b>37</b>
<b>II. Transformation transitoire du matériel végétal.....</b>	<b>44</b>
<b>III. Transformation stable du matériel végétal.....</b>	<b>47</b>
<b>IV. Méthodes d'analyses relatives aux protéines.....</b>	<b>48</b>
<b>V. Expériences de retard de migration sur gel.....</b>	<b>50</b>
RESULTATS & DISCUSSION.....	53
<b>I. Description des séquences promotrices dérivées de PrHMWG-Dx5.....</b>	<b>53</b>
<b>II. Activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans le maïs.....</b>	<b>59</b>
<b>III. Activité des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans le tabac.....</b>	<b>69</b>
<b>IV. Identification des interactions ADN-protéines potentiellement responsables de l'activité du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs dérivés dans l'albumen de maïs.....</b>	<b>74</b>
DISCUSSION GENERALE.....	81
<b>I. Identification et caractérisation moléculaire d'éléments <i>cis</i>-régulateurs dans la séquence promotrice de PrHMWG-Dx5.....</b>	<b>81</b>
<b>II. Effet <i>cis</i>-régulateur conféré par les séquences as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV sur l'activité transcriptionnelle de PrHMWG-Dx5.....</b>	<b>90</b>
<b>III. Modèle de régulation transcriptionnelle du promoteur HMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs.....</b>	<b>92</b>
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	97
ANNEXE.	
TABLE DES MATIERES.	

# INTRODUCTION.

L'intérêt grandissant de l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines possédant des propriétés thérapeutiques et les progrès en matière de génie génétique ont fait naître dans les deux dernières décennies un nouveau système de production de protéines recombinantes, connu sous le nom de « Molecular Pharming », qui utilise les plantes en tant que « bioréacteur » (Whitelam *et al.*, 1993 ; Theisen, 1997 ; Deckers *et al.*, 1999 ; Gidding, 2001). Le schéma général qui conduit à la production d'une molécule active dans les plantes, de l'adaptation du gène étranger à un système d'expression spécifique jusqu'à l'élaboration du médicament, est présenté dans la Figure 1. Ce système offre une alternative aux systèmes de production de types procaryotes, levures, cellules d'insectes, cellules de mammifères ou animaux transgéniques, lesquels pour des raisons éthiques, de coût ou de maturations post-traductionnelles des protéines, ne sont pas toujours adaptés (Fischer *et al.*, 1999 ; Gruber et Theisen, 2000).

Dans le cadre d'une production de biomasse, les plantes transgéniques s'avèrent être une source de protéines recombinantes à faible coût et d'une grande sécurité pour l'homme vis à vis des contaminations virales et bactériennes (Mison et Curling, 2000). De nombreuses protéines recombinantes de mammifères ont été produites dans le tabac (Tableau 1), première espèce modèle qui a été transformée efficacement et régénérée (Horsch *et al.*, 1985). La maîtrise croissante des techniques de transfert de gènes dans les espèces monocotylédones a permis d'envisager l'utilisation des grains de céréales comme organe de stockage des protéines recombinantes *via* le tissu de l'albumen. Outre des facilités de récolte et de stockage, les grains des céréales offrent un tissu de réserve naturel isolé de la partie végétative, qui limite les risques liés à une toxicité éventuelle de la protéine exogène pour la plante mère.

L'albumen du grain de maïs, lequel s'avère être un tissu de choix en terme de production des quantités importantes de protéines recombinantes (Tableau 1), est l'un des tissus cibles de MERISTEM Therapeutics, pour produire des protéines recombinantes à intérêt thérapeutique. La réussite du projet « Molecular Pharming », *via* l'utilisation du grain de maïs comme « bioréacteur », passe par la connaissance du grain de maïs et par le développement d'outils et de techniques performantes et innovantes capables entre autres d'améliorer le taux d'expression des protéines recombinantes produites dans l'albumen. Cette issue peut être envisagée à travers l'étude et la création de promoteurs de sur-expression pour augmenter

l'activité transcriptionnelle, un des facteurs limitant qui influence le taux d'expression des protéines dans les plantes.

Bioréacteurs	Protéines et enzymes recombinantes	Taux d'expression *	Références
Feuilles et graines de tabac	Albumine humaine	0.02%	Sijmons <i>et al.</i> (1990)
	Facteur de croissance épidermique	0.001%	Higo <i>et al.</i> (1993)
	Erythropoïétine humaine	0.0026%	Matsumoto <i>et al.</i> (1995)
	Hémoglobine humaine	0.05%	Dieryck <i>et al.</i> (1997)
	Lactoferrine humaine	0,1-0,3%	Salmon <i>et al.</i> (1998) Gruber et Spik (2000)
	Collagène humain	100 mg/kg de tissu	Ruggiero <i>et al.</i> (2000) Perret <i>et al.</i> (2001)
	Lipase gastrique de chien	5% (rétention vacuolaire) et 7% (sécrétion)	Gruber <i>et al.</i> (2001)
Grains de maïs	Avidine	3%	Hood <i>et al.</i> (1997)
	$\beta$ -glucuronidase	0.5%	Witcher <i>et al.</i> (1998)
	Aprotinine	0.1%	Zhong <i>et al.</i> (1999)
	Lipase Gastrique et lipase pancréatique de chien	ND	Roussel <i>et al.</i> (2002)

**Tableau 1 :** Liste non exhaustive des protéines et enzymes recombinantes produites dans le tabac et le maïs. (\*) % de protéines extraites. ND, non déterminé.

# **I. Le grain de maïs.**

## **1. Morphologie du grain de maïs.**

Le caryopse de maïs est principalement constitué **(i)** des téguments de la graine (péricarpe et pédicelle) provenant du sporophyte maternel, **(ii)** de l'embryon ou nouveau sporophyte et **(iii)** de l'albumen (Figure 2).

Le péricarpe représente environ 5% de la matière sèche du grain de maïs mature et forme une enveloppe extérieure résistante qui protège la partie interne de la graine. La zone du péricarpe au contact de l'embryon constitue l'écusson et représente une zone de moindre résistance lors du gonflement de l'axe et de l'expansion de la racicule. Une fine membrane dérivée du mur épidermique extérieur de la nucelle persiste et forme une enveloppe continue entre l'aleurone et le péricarpe. A l'extrémité apicale du grain, le péricarpe porte la cicatrice d'attachement de la soie et à l'extrémité basale il fusionne avec les tissus du pédicelle.

L'albumen est plus ou moins hétérogène selon les variétés de maïs et occupe la plus grande partie du grain. Excepté pour les couches périphériques, il est constitué de cellules principalement remplies de grains d'amidon et de protéines de réserves. A sa base, les cellules de la couche externe sont différenciées en cellules de transfert et ont apparemment pour fonction la distribution de la nourriture en provenance de la plante mère vers l'albumen et indirectement vers l'embryon. Les autres cellules de cette surface externe de l'albumen forment une monocouche à aleurone, cellules à parois épaisses de petites tailles qui contiennent dans leur cytoplasme de nombreux petits corpuscules protéiques ronds, les grains aleurones, mais pas d'amidon.

L'embryon (ou germe) est séquestré sur l'un des côtés de l'albumen, proche de la base du grain. Il constitue un peu plus de 10% de la matière sèche du grain de maïs mature et est riche en lipides. Il présente un axe central qui se termine à l'extrémité basale par la racine primaire et à l'autre extrémité par la tige. Cette tige comprend 5 à 6 internœuds et porte une feuille sur chaque nœud. La feuille attachée au premier nœud ou nœud scutellaire est connue sous le nom de scutellum. Elle ne fonctionne jamais comme une vraie feuille du système foliaire. Modifiée en organe de réserve, elle permet de digérer et d'absorber l'albumen durant la croissance de l'embryon. La deuxième feuille, le coléoptile, est attachée au deuxième nœud

ou nœud coléoptilaire et est transformée en enveloppe de protection du premier bourgeon. Le premier internœud de la tige situé entre les nœuds scutellaire et coléoptilaire s'allonge rapidement durant la germination et permet d'élever le coléoptile à la surface de la terre. Enfin, la racine primaire est entourée par le coléorhize et habituellement, au moins deux racines séminales adventives se présentent à la base du premier internœud de la tige.

## **2. Développement de l'albumen de maïs.**

### **2.1. Son origine.**

La discussion concernant l'origine évolutive de l'albumen a été initiée en premier par Sargent (1900), et il subsiste encore actuellement deux points de vue distincts : (i) l'albumen est dérivé d'un embryon jumeau altruiste ou, (ii) l'albumen résulte d'un développement étendu du mégagamétophyte provoqué lorsque la cellule centrale est fertilisée par le second gamète mâle (Friedman, 1994 et 1998). La première hypothèse est supportée par la découverte que, la double fécondation chez *Ephedra*, une plante à graine qui représente le lien entre gymnospermes et angiospermes, conduit à la formation de deux embryons qui rivalisent pour les ressources du tissu nucellaire (Friedman, 1994). Ainsi l'albumen évoluerait à partir d'un deuxième embryon présent chez l'ancêtre des angiospermes.

### **2.2. La double fécondation.**

La formation de l'albumen est intrinsèquement lié à la double fécondation (Figure 3 et 4), un processus biologique unique, caractéristique des angiospermes (Guignard, 1901 ; Chaudhury *et al.*, 1998). Le tube pollinique délivre deux gamètes mâles haploïdes au mégagamétophyte ou sac embryonnaire, qui contient l'oosphère et la cellule centrale. L'un des deux gamètes mâles fusionne avec l'oosphère pour générer le zygote principal diploïde de la plante fille. L'autre gamète mâle fusionne avec les deux noyaux polaires de la cellule centrale pour générer un zygote accessoire triploïde à l'origine du tissu de l'albumen.

### **2.3. Les quatre phases du développement.**

L'albumen de maïs se forme selon un mode de développement de type nucléaire, marqué par quatre grandes phases (coenocytique, cellularisation, différenciation et maturation) étudiées

en détail pour diverses graines de céréales (Figure 5, Kowles et Phillips, 1988 ; Lopes et Larkins, 1993 ; Berger, 1999 ; Olsen *et al.*, 1998 et Olsen, 1998 et 2001).

### **2.3.1. Le stade coenocytique (1-3 DAP).**

Durant les stades précoces du développement, l'albumen constitue un syncytium, structure inhabituelle chez les plantes supérieures. En effet, juste après la fécondation, le zygote accessoire triploïde subit trois mitoses successives sans cloisonnement cellulaire. Au stade nucléaire huit noyaux, ces derniers migrent à la périphérie de la cellule centrale dans la fine couche de cytoplasme qui entoure la grande vacuole centrale. Des divisions synchrones des noyaux se mettent en place jusqu'à formation d'un grand nombre de noyaux libres distribués dans le cytoplasme périphérique de l'albumen coenocytique (Brink et Cooper, 1947 ; Vijayaraghavan et Prabhakar, 1984).

### **2.3.2. La cellularisation (3-5 DAP).**

Elle s'initie par de la formation de systèmes microtubulaires radiaux qui émanent de la membrane de chacun des noyaux de l'albumen durant un hiatus mitotique. Les cloisons cellulaires se mettent en place de part et d'autre de chacun des noyaux libres qui restent en contact avec la vacuole centrale, donnant forme à une structure alvéolée. Chaque noyau libre se divise selon une orientation périclinale avec mise en place d'un phragmoplaste. Les deux noyaux résultants sont ainsi séparés par un mur cellulaire, l'un se retrouvant entièrement cloisonné et l'autre restant libre du côté de la vacuole centrale pour donner forme à une nouvelle structure alvéolée. Ce processus progresse de manière centripète et est répété jusqu'à ce que la vacuole centrale soit complètement occupée par un tissu cellulaire uninucléé.

### **2.3.3. La différenciation.**

#### **2.3.3.1. Modifications spatio-temporelles de l'activité cellulaire.**

La taille de l'albumen s'accroît rapidement entre 8 et 12 DAP. Cette croissance rapide est due à une augmentation du nombre de cellules et à l'augmentation de leur taille. A partir du stade de développement 12 DAP, la caryokinèse et la cytokinèse cessent dans le tissu de la région basale puis dans celui de la région centrale, alors que l'activité mitotique persiste dans l'air périphérique. Les cellules de la région la plus externe se comportent comme un tissu méristématique et donnent naissance à des cellules filles additionnelles, qui se retrouvent à la périphérie du tissu de l'albumen et entourent les cellules les plus anciennes. Entre 20 et 25 DAP, cette activité mitotique cesse dans l'ensemble des cellules de l'albumen, excepté dans les cellules de l'aleurone. Ce schéma selon lequel l'activité mitotique progresse de la région basale vers la région centrale puis vers la région périphérique est similaire et se chevauche avec les profils spatio-temporels de l'accroissement de la taille des cellules, de l'augmentation du volume nucléaire, de la synthèse des grains d'amidon et de la formation des corps protéiques.

### **2.3.3.2. Les différents types cellulaires.**

A maturité, l'albumen constitue 80-90% du poids sec du grain de maïs et comporte 5 types cellulaires distincts (Figure 6).

#### **- L'albumen amylicé central et les cellules subaleurones.**

Les cellules de l'albumen amylicé occupent la majeure partie du grain de maïs. Dans la zone périphérique, juxtaposées aux cellules de la couche aleurone, se trouvent les cellules subaleurones. Ce sont des cellules de petite taille qui conservent une activité mitotique jusqu'à un stade avancé du développement (20-25 DAP). Les cellules filles issues de ces divisions mitotiques demeurent à la périphérie tandis que les cellules anciennes forment l'albumen central. L'arrêt précoce de l'activité mitotique dans les cellules de l'albumen central (10-12 DAP) coïncide avec le décompactage de l'ADN génomique et est associé à une augmentation de l'activité transcriptionnelle des produits de réserve du grain et à l'augmentation du contenu en ADN des noyaux. Cette augmentation du volume nucléaire est le résultat de cycles répétés de réplication de l'ADN sans division des cellules et conduit à une polyploïdisation de l'albumen (Kowles et Phillips, 1985 ; Larkins *et al.*, 2000). Le rôle physiologique de ce processus, connu sous le nom d'endoreduplication (Figure 5), n'a pas été démontré. Cependant, il offre aux cellules de l'albumen l'opportunité (i) de stocker des nucléotides pour une utilisation subséquente lors du développement de l'embryon et/ou (ii)

d'améliorer l'efficacité de synthèse des protéines de stockage et des carbohydrates *via* l'amplification des gènes codant pour les protéines et les enzymes impliqués dans les différentes voies de biosynthèse. A ce stade, les cellules de l'albumen se spécialisent et constituent un tissu de réserve où sont stockés l'amidon synthétisé à l'intérieur des amyloplastes (Smith, 1999), une grande variété de protéines et de nombreux composés minoritaires (lipides et caroténoïdes). L'amidon est un produit de réserve crucial, source d'énergie et de carbone, jusqu'à ce que l'embryon soit photosynthétiquement compétent. Les protéines les plus abondantes dans l'albumen de maïs sont les zéïnes. Elles appartiennent à la famille des prolamines (Shewry *et al.*, 1995 ; Muentz, 1998) et ont pour unique fonction le stockage de l'azote et du soufre. Parmi les autres protéines qui s'accumulent à des taux élevés dans l'albumen se trouvent des inhibiteurs de protéases et de l' $\alpha$ -amylase, des lectines, des thionines et certaines enzymes. Ce groupe diversifié de protéines peut agir secondairement au cours de la germination comme une source d'azote et de soufre, mais sa fonction essentielle est de protéger la graine des pathogènes ou des prédateurs et d'accomplir des fonctions biosynthétiques. Au terme de l'accumulation des composés de réserve entre 30 et 50 DAP, et contrairement aux cellules de l'aleurone qui survivent à la dessiccation de la graine, les cellules de l'albumen amyloplacé meurent. Le processus est similaire à celui de la mort cellulaire et coïncide avec une augmentation de la production d'éthylène. La dégradation progressive de l'ADN génomique jusqu'à disparition des noyaux est alors provoquée par l'action d'endonucléases (Young *et al.*, 1997 et 1999).

#### **- La couche de cellules aleurones.**

Les cellules de l'aleurone sont localisées à la périphérie de l'albumen, excepté au niveau de la région de transfert et constituent une couche monocellulaire (Walbot, 1994). De par la présence de nombreux grains d'aleurones et de petites vacuoles avec des corps d'inclusion, leur cytoplasme est dense et granulaire. Leur réticulum endoplasmique est bien développé et un grand nombre de mitochondries sont présentes. Elles contiennent les anthocyanines responsables de la couleur du grain de maïs (Neuffer *et al.*, 1997). Les cellules de l'aleurone sont dérivées des cellules filles périphériques issues de la première division pérclinale des noyaux alvéolaires et se différencient lors de l'achèvement de la phase de cellularisation. Le produit du gène *CI* a été identifié comme un marqueur moléculaire spécifique de l'aleurone du grain de maïs (Neuffer *et al.*, 1997). A maturité du grain, un programme de développement spécifique confère une tolérance à la dessiccation aux cellules de l'aleurone qui leur permet

de survivre au processus de maturation (Neill *et al.*, 1986 ; Robichaud et Sussex, 1986 ; Lane, 1991 ; Hoecker *et al.*, 1995 ; Kao *et al.*, 1996). Au moment de la germination, les cellules de l'aleurone produisent les enzymes de dégradation des parois cellulaires, les enzymes hydrolytiques et protéolytiques pour convertir les protéines de stockage et les granules d'amidon de l'albumen en acides aminés et en sucres afin d'assurer la croissance de l'embryon. La production de ces enzymes est initiée par une transcription *de novo* induite par l'acide gibbérellique libéré lors de l'imbibition de l'embryon (Jones et Jacobsen, 1991). En fin de germination, les cellules de l'aleurone sont contraintes à une mort cellulaire programmée (Bethke *et al.*, 1999).

#### **- La région environnant l'embryon.**

Les cellules de la région environnant l'embryon délimitent la cavité de l'albumen dans laquelle se développe l'embryon. Ces cellules peuvent être identifiées par la densité de leur contenu cytoplasmique (Schel *et al.*, 1984 ; Kowles et Phillips, 1988) et par l'expression tissu-spécifique de trois transcrits *esr* différents (Opsahl-Ferstad *et al.*, 1997). La fonction de cette région de l'albumen, juxtaposée à l'embryon, n'est pas connue mais pourrait s'inclure dans un rôle de nutrition de l'embryon ou dans l'établissement d'une barrière physique entre l'embryon et l'albumen durant le développement du grain. Les mécanismes qui spécifient le développement des cellules de cette région n'ont pas été identifiés.

#### **- Les cellules de transfert de l'albumen basal.**

Les cellules de transfert se développent au niveau du tissu vasculaire principal de la plante maternelle et facilitent le transport des nutriments vers l'albumen. Elles sont caractérisées par la présence de circonvolutions et possèdent un système endomembranaire vaste et complexe dans les stades précoces du développement de la graine. Parmi les marqueurs moléculaires spécifiques des cellules de transfert, un groupe de quatre gènes *bet* dont la fonction est inconnue, a été identifié (Hueros *et al.*, 1995 et 1999). Récemment, Gómez *et al.* (2002) ont identifié un activateur transcriptionnel appelé *ZmMRP-1*, spécifiquement exprimé dans les cellules de transfert et potentiellement impliqué dans la régulation de la différenciation de l'albumen, *via* un signal polaire diffusant des cellules maternelles.

### **2.3.4. La maturation.**

C'est l'étape ultime du développement qui conduit à l'arrêt de la synthèse et de l'accumulation des produits de stockage, et prépare l'entrée de la graine en phase de dormance. L'augmentation de la production d'acide abscissique (ABA) apparaît jouer un rôle central dans le contrôle de la dormance en réprimant la germination précoce de l'embryon immature (Neill *et al.*, 1986) et en favorisant la tolérance à la dessiccation de l'embryon et des cellules de l'aleurone (Thomas, 1993).

### **3. Les protéines de réserve du grain de maïs.**

Sur la base de leur structure et de leurs propriétés de solubilité, trois types majeurs de protéines de réserve sont actuellement reconnues : la famille des albumines 2S, les familles 7S et 11S des globulines de stockage et la famille des prolamines (Shewry and Casey, 1999). Ces protéines de réserve sont présentes dans l'ensemble des grains de maïs, le type prédominant de la protéine de réserve varie selon la famille de grains. Par exemple, les grains de céréales contiennent essentiellement des prolamines tandis que les grains des légumineuses renferment principalement des globulines de réserve. D'autres types de protéines telles que les lectines, les inhibiteurs de protéases, ou les thionines sont également souvent abondantes dans les grains, mais leur fonction présumée n'est pas le stockage des acides aminés et ainsi par convention, elles n'appartiennent pas à la classe des protéines de réserve (Shewry and Casey, 1999).

Dans le grain de maïs, deux types de protéines de réserve prédominent : les globulines 7S essentiellement présentes dans l'embryon, analogues à celles trouvées dans les embryons des dicotylédones (Kriz, 1989) et les prolamines, communément appelées fraction zéine et stockées dans l'albumen (Landry et Moureaux, 1970 ; Wilson, 1983). Les protéines de la fraction zéine sont structurellement distinctes mais partagent les mêmes propriétés de solubilité dans l'éthanol 70%. Un système de nomenclature basé sur les propriétés de solubilité et les caractéristiques structurales de ces protéines, permet d'identifier les zéines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  (Esen, 1987 ; Coleman et Larkins, 1998).

Les zéines s'accumulent entre 10 et 40 DAP à l'intérieur du lumen du réticulum endoplasmique rugueux (RER) dans des structures appelées corps protéiques (Figure 7, Larkins et Hurkman, 1978 ; Lending et Larkins, 1989) et constituent plus de 50% des

protéines totales du grain mature (Wilson, 1983). Les corps protéiques de petite taille observés dans les cellules subaleurones sont essentiellement constitués de  $\beta$  et  $\gamma$ -zéïnes alors que les corps protéiques de grande taille, trouvés dans les cellules de l'albumen amylicé, contiennent en plus des  $\beta$ - et  $\gamma$ -zéïnes, principalement les  $\alpha$ - et des  $\delta$ -zéïnes. Il s'avère qu'au cours de la progression de la synthèse des protéines de réserve, la pénétration des zéïnes  $\alpha$  et  $\delta$  dans la matrice de zéïnes  $\beta$  et  $\gamma$  provoquent l'expansion du corps protéique en une structure sphérique qui passe de 1 à 2 $\mu$ m. Certaines évidences suggèrent que les zéïnes  $\gamma$  et  $\beta$  jouent un rôle dans la rétention et stabilisation des zéïnes  $\alpha$  et  $\delta$  dans le RER (Coleman *et al.*, 1996 ; Bagga *et al.*, 1997).

Les  $\alpha$ -zéïnes sont codées par une grande famille multigénique dont la taille et la complexité ne sont pas clairement établies (Wilson et Larkins, 1984 ; Marks *et al.*, 1985a, 1985b ; Woo *et al.*, 2001). Néanmoins, il a été démontré que nombre des gènes  $\alpha$ -zéïnes contiennent des mutations qui pourraient affecter leur expression, suggérant que beaucoup d'entre eux sont des pseudogènes (Spena *et al.*, 1983 ; Kridl *et al.*, 1984). En contraste, les gènes codant pour la  $\beta$ -zéïne de 15-kD (Pedersen *et al.*, 1986), les  $\gamma$ -zéïnes de 50-, 27- et 16-kD (Woo *et al.*, 2001 ; Prat *et al.*, 1987) et les  $\delta$ -zéïnes de 10- et 18-kD (Kirihara *et al.*, 1988 ; Chui et Falco, 1985) sont seulement présents en un ou deux exemplaires dans le génome.

## II. Régulation de l'expression des gènes zéïnes.

Afin de comprendre les mécanismes de régulation de l'expression des gènes dans l'albumen de maïs, une étude détaillée a porté sur la régulation des gènes zéïnes avec pour objectifs d'identifier des éléments *cis*- et les facteurs *trans*-activateurs correspondants indispensables à une expression dans l'albumen de maïs.

### 1. Régulation transcriptionnelle des gènes zéïnes.

Les gènes zéïnes sont spécifiquement exprimés au cours du développement de l'albumen du grain de maïs. Chaque gène est soumis à un contrôle transcriptionnel qui apparaît être régulé par plusieurs éléments *cis*-régulateurs localisés dans la région proximale et distale du promoteur et les facteurs *trans*-activateurs correspondants. Ces facteurs agissent de manière combinatoire et/ou synergique pour conférer un profil d'expression temporel et spatial propre à chaque gène.

#### 1.1. Le facteur de transcription Opaque-2.

Le facteur de transcription le mieux caractérisé qui opère dans le contrôle de l'expression des gènes des protéines de réserve de maïs est défini par la mutation *Opaque-2* (*O2*). Cette mutation confère un phénotype opaque à l'albumen et un contenu riche en lysine (Motto *et al.*, 1989) qui apparaît être la conséquence d'une réduction de 50 à 70% du contenu de l'albumen en protéines de réserve de type zéïne (Tableau 2, Mertz *et al.*, 1964 ; Pedersen *et al.*, 1980). L'effet de cette mutation est due à l'inactivation transcriptionnelle des gènes zéïnes et plus particulièrement de ceux qui codent pour les zéïnes de 22 kDa (Figure 8, Kodrzycki *et al.*, 1989). Le gène *o2* a été cloné par transposon tagging (Motto *et al.*, 1988 ; Schmidt *et al.*, 1987) et la séquence ADNc (Hartings *et al.*, 1989) code un polypeptide qui contient un motif « leucine zipper basic » (bZIP) (Landschulz *et al.*, 1988). La capacité de la protéine Opaque-2 à lier la séquence *cis*-activatrice 5'-TCCACGTAGA-3' et à *trans*-activer le promoteur d'un gène de zéïne de 22 kDa a été démontrée *in vitro* et en expression transitoire (Schmidt *et al.*, 1990, 1992). L'identification de sites cibles variables dans différents promoteurs (Figure 9) indique clairement que la protéine O2 supporte un relativement haut degré de dégénérescence parmi les nucléotides qui entourent la séquence core 5'-ACGT-3' et que cette séquence core

peut être remplacée par la séquence 5'-CATG-3' (Lohmer *et al.*, 1991 ; Izawa *et al.*, 1993 ; Yunes *et al.*, 1994).

L'étude des effets phénotypiques de la mutation *o2* et la caractérisation moléculaire du facteur de transcription O2 associé, fournissent plusieurs indications sur le contrôle de l'expression des gènes zéïnes. (i) L'expression du gène *o2* est spécifique de l'albumen et coïncide avec la synthèse des zéïnes (Schmidt *et al.*, 1987). Ce résultat suggère que l'expression du gène *o2* est elle-même régulée et qu'un processus régulateur amont exerce un contrôle spatio-temporel sur la synthèse des zéïnes. (ii) La protéine O2 peut lier sa séquence cible sous forme homodimérique ou sous forme hétérodimérique avec une autre protéine de type bZIP telle que la protéine OHP1 qui apparaît être exprimée de manière ubiquitaire (Pysh *et al.*, 1993). Ainsi, l'activité O2 peut être contrôlée par son interaction avec d'autres protéines. (iii) La mutation *o2* n'affecte pas l'expression de l'ensemble des gènes zéïnes dans le maïs et suggère que la protéine O2 ne régule qu'une partie de ces gènes. Ce rôle régulateur sélectif du facteur de transcription O2 dans l'expression des gènes zéïnes suggère que d'autres facteurs régulateurs doivent être impliqués dans l'activation coordonnée des différentes classes de gènes zéïnes durant le développement de l'albumen de maïs. (iv) Enfin, le mutant O2 est également incapable de synthétiser un certain nombre d'autres polypeptides, le plus représentatif étant l'albumine de 32 kDa, appelée b-32, dont le profil d'accumulation est coordonné avec la synthèse des zéïnes dans un albumen *wt* (Soave *et al.*, 1981). Il a été montré que la protéine O2 peut interagir avec 5 sites cibles localisés dans un fragment de 200 pb, situé 60 nucléotides en amont de la boîte TATA du promoteur du gène *b-32*, et est suffisante pour sa *trans*-activation dans des protoplastes de feuilles de tabac (Lohmer *et al.*, 1991). En conséquence, l'implication de la protéine O2 dans la régulation transcriptionnelle des gènes au cours du développement de l'albumen de maïs n'est pas limitée aux gènes de la famille des zéïnes.

## 1.2. Le facteur de transcription PBF.

La comparaison des séquences promotrices des différents gènes zéïnes a permis d'identifier une séquence hautement conservée de 7 nucléotides, 5'-TGTAAG-3', localisée approximativement 300 pb en amont du site d'initiation de la transcription et communément appelé boîte prolamine (Pb, « P-box »), « élément -300 » ou « *Endosperm Motif* (EM) » (Borona *et al.*, 1986 ; Thompson et Larkins, 1989). Le rôle de Pb en tant qu'élément *cis*-activateur dans l'expression coordonnée des gènes zéïnes est supporté par (i) la présence

d'une boîte Pb dans l'ensemble des promoteurs des gènes zéïnes et dans de nombreux promoteurs de protéines de réserve telles que les glutenines de blé (Colot *et al.*, 1987) ou les hordéïnes de l'orge (Brown *et al.*, 1986 ; Müller et Knudsen, 1993) par exemple, par (ii) la liaison spécifique de facteurs nucléaires de l'albumen de maïs aux boîtes Pb présentes dans les promoteurs des gènes zéïnes de 19-, 22- et 27-kDa (Maier *et al.*, 1987 et 1990 ; Ueda *et al.*, 1994 ; Quayle et Feix, 1992) et par (iii) sa capacité à *cis*-activer des promoteurs viraux tronqués dans des suspension cellulaires d'albumen de maïs en expression transitoire (Ueda *et al.*, 1994 ; Quayle et Feix, 1992).

Vicente-Carbajosa *et al.* (1997) ont cloné une séquence d'ADNc spécifique de l'albumen de maïs qui code pour une protéine de liaison à Pb, appelée PBF (« prolamín-box binding factor »). Ce polypeptide appartient à la classe de protéines de liaison à l'ADN qui contiennent un motif en doigt de zinc Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>2</sub> hautement conservé, appelé domaine DOF (« DNA-binding with one finger ») et unique aux plantes (Yanagisawa, 1995 et 1996 ; Zang *et al.*, 1995). PBF lie la boîte Pb du promoteur du gène des zéïnes de 22-kDa (22Z-4) avec la même affinité que l'activité de liaison à Pb présente dans les extraits nucléaires de l'albumen de maïs. Vicente-Carbajosa *et al.* (1997) ont également montré que PBF interagit *in vitro* avec le facteur de transcription Opaque-2 dont le site cible est localisé seulement 22 pb en aval de la boîte Pb dans le promoteur 22Z-4 (Figure 10). Ces données suggèrent une fonction coordonnée entre les deux éléments *cis*-activateurs mais, la capacité de la protéine PBF à *trans*-activer le promoteur 22Z-4 n'a pas encore été rapportée dans ce cas. Des tests d'expression transitoire réalisés dans l'albumen d'orge ont cependant démontré que BPBF (« barley PBF »), la protéine homologue à PBF dans l'orge, *trans*-active la transcription à partir d'un élément Pb du promoteur d'un gène hordéïne B natif (*hor2*) et que la liaison direct de BPBF à son site cible est essentielle pour la *trans*-activation puisque les mutations du domaine DOF de liaison à l'ADN ou du motif Pb abolissent l'interaction et la *trans*-activation (Mena *et al.*, 1998).

### 1.3. La boîte « albumen bifactorielle ».

Dans les gènes qui codent pour les gluténines LMW (« low molecular weight », Hammond-Kosack *et al.*, 1993), les gliadines  $\alpha/\beta$  (Sumner-smith *et al.*, 1985), les hordéïnes B et C (Brandt *et al.*, 1985 ; Entwistle *et al.*, 1991 ; Fordes *et al.*, 1985) et les sécalines  $\omega$  (Hull *et al.*, 1991), la boîte Pb (5'-TGTAAG-3') est localisée immédiatement en amont d'un motif GCN4-like (GLM, aussi connu sous les abréviations GZM et GCN) de séquence consensus

5'-(G/A)TGA(G/C)TCA(T/C)-3' (revue de Müller *et al.*, 1995) et présentant des homologies avec les sites de liaison GCN4 de levure (Hill *et al.*, 1986) et AP1 de mammifères (Piette *et al.*, 1988). L'association de ces deux éléments *cis*-activateurs définit la boîte « albumen bifactorielle » (Figure 11), communément nommée « *Endosperm Box* (EB) » (Kreis *et al.*, 1985).

Dans la famille des gènes zéïnes, cette boîte albumen bifactorielle a seulement été identifiée dans la séquence promotrice du gène  $\gamma$ -zéïne de 27 kDa (Marzábal *et al.*, 1998). La boîte Pb impliquée, 5'-TGCAAAG-3' (Pb3), est distincte de la boîte Pb ou « élément -300 » précédemment identifiée dans ce promoteur par Ueda *et al.* (1994) et est séparée du motif GLM par seulement 7 nucléotides (Figure 11). Marzábal *et al.* (1998) ont démontré (i) que l'activité transcriptionnelle maximale du promoteur du gène  $\gamma$ -zéïne de 27 kDa est dépendante de chacun des deux motifs (Pb et GLM) qui constituent la boîte « albumen bifactorielle », (ii) que le facteur de transcription PBF interagit spécifiquement avec Pb3 et est capable de *trans*-activer l'expression du gène  $\gamma$ -zéïne de 27 kDa *via* Pb3 (Marzábal, communications personnelles), (iii) que GLM interagit spécifiquement avec des protéines nucléaires de l'albumen de maïs autres que le facteur de transcription O2 et contre toute attente (iv) que O2 est capable de *trans*-activer l'expression du gène  $\gamma$ -zéïne de 27 kDa *via* GZM (Marzábal, communications personnelles). Ce dernier résultat est surprenant au regard des effets phénotypiques de la mutation O2 qui n'affectent pas le contenu de l'albumen de maïs en  $\gamma$ -zéïne (Kodrzycki *et al.*, 1989) ; par contre, la *trans*-activation d'un gène de protéines de réserve par O2 *via* un motif GLM a déjà été documentée à travers l'étude des promoteurs *LMWG-1D1* de blé (Holdsworth *et al.*, 1995) et *GluB-1* de riz (Wu *et al.*, 1998). Ces informations suggèrent que si le facteur de transcription O2 est impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène  $\gamma$ -zéïne de 27 kDa, il n'est pas un facteur limitant et au moins un autre facteur *trans*-activateur de l'albumen de maïs interagit avec le motif GLM de la boîte « albumen bifactorielle » pour activer le promoteur  $\gamma$ -zéïne de 27 kDa, en combinaison avec le facteur *trans* PBF.

Plusieurs protéines bZIP qui partagent un degré d'homologie significatif avec O2 et activent la transcription des gènes de prolamines *via* un motif GLM ont déjà été identifiées dans le blé (SPA ; Albani *et al.*, 1997), dans l'orge (Blz1 et Blz2 ; Vicente-Carbajosa *et al.*, 1998 ; Onate *et al.*, 1999) ou dans le riz (RIZBZ1 ; Onodera *et al.*, 2001) et supporte l'importance fonctionnelle du motif GLM dans la régulation coordonnée des gènes de prolamine et des gènes spécifiquement exprimés dans l'albumen des céréales. La modulation de l'activité

transcriptionnelle du promoteur *LMWG-1D1* par WPBF (homologue de la protéine PBF dans le blé et responsable de l'activité de liaison ESBF-1) lors de la *trans*-activation par SPA suggère qu'une liaison coopérative des protéines à l'élément Pb et au motif GLM est nécessaire pour l'activation du gène. D'autre part, Müller *et al.* (1993) ont montré que le motif GLM de la boîte « albumen bifactorielle » du promoteur hordéine C de l'orge, est l'élément *cis*-activateur dominant en réponse à l'azote mais que l'induction nécessite une interaction synergique avec Pb.

L'ensemble de ces données soulève l'importance fonctionnelle de la boîte « albumen bifactorielle » dans la régulation des gènes de prolamines de céréales. L'identification du facteur de transcription de l'albumen de maïs qui interagit spécifiquement avec le motif GLM de la boîte « albumen bifactorielle » présente dans le promoteur  $\gamma$ -zéine de 27 kDa (Marzábal *et al.*, 1998) devrait permettre d'ouvrir de nouveaux horizons pour une meilleure compréhension de la régulation coordonnée des gènes zéine.

#### 1.4. Le motif AACA.

Une séquence AACA avec une forte homologie avec le motif AACA présent dans le promoteur de différents gènes de glutélines de riz (Takaiwa et Oono, 1990 ; Zheng *et al.*, 1993) et avec l'élément de réponse aux gibbérellines (GARE, 5'-TAACAAA-3', Huang *et al.*, 1990 ; Gubler et Jacobsen, 1992) a été identifié par footprinting *in vivo* dans le promoteur du gène  $\gamma$ -zéine de 27 kDa (Marzábal *et al.*, 1998) (Figure 12). Le rôle de cet élément dans la régulation transcriptionnelle des gènes zéine est peu documenté mais il apparaît être un élément *cis*-régulateur responsable de la spécificité tissulaire de l'expression du gène *gluA-3* dans l'albumen de riz (Yoshihara *et al.*, 1996) et intervient dans la régulation quantitative de l'expression du gène *gluB-1* dans l'albumen de riz (Takaiwa *et al.*, 1996 ; Wu *et al.*, 2000).

Récemment, Diaz *et al.* (2002) ont montré que HvGAMYB, un facteur de transcription MYB initialement identifié dans les cellules aleurones de l'orge où il s'exprime en réponse aux gibbérellines durant la germination (Gubler *et al.*, 1995 et 1999), est également exprimé dans les cellules de l'albumen. Les auteurs ont démontré (i) que HvGAMYB interagit spécifiquement avec les motifs 5'-TAACAAC-3' et 5'-CAACTAAC-3' dérivés des régions promotrices des gènes spécifiques de l'albumen d'orge, *hor2* et *Itr1* codant respectivement pour une hordéine B et un inhibiteur trypsique BTI-Cme, (ii) que HvGAMYB est capable de *trans*-activer les promoteurs *hor2* et *Itr1* via l'interaction avec les motifs AACA décrits ci-dessus, (iii) que la *trans*-activation du promoteur *hor2* implique la présence d'une boîte Pb

intacte et enfin, (iv) que HvGAMYB interagit *in vivo* avec le domaine C-terminal de BPBF dans le système double hybride de levure.

Ces indications classent le motif AACA parmi les éléments *cis*-régulateurs importants impliqués dans la régulation des gènes de prolamines des céréales, lequel devrait être analysé dans les années à venir pour conclure quant à son rôle potentiel dans la régulation coordonnée des gènes zéines.

## **2. Impact des facteurs environnementaux sur la régulation des gènes zéines.**

La régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes de prolamines de réserve des céréales est également indirectement soumise à certaines conditions environnementales telles que la nutrition minérale et la lumière.

### **2.1. La régulation métabolique.**

La synthèse des polypeptides zéines lors du développement de l'albumen de maïs subit un contrôle métabolique et dépend principalement de la disponibilité de l'azote (N) « remobilisée » à partir des protéines des feuilles et de la tige vers l'épis *via* le système vasculaire (Cliquet *et al.*, 1990). L'effet de la nutrition azotée sur la régulation des gènes a été rapporté à travers les études d'albumens de maïs sauvage et mutant *O2* homozygote en culture *in vitro* sur des milieux solides contenant différentes concentration d'azote (Müller *et al.*, 1997 ; Balconi *et al.*, 1993 ; Singletary *et al.*, 1990). Il a été montré que l'albumen *o2*, lequel synthétise très peu *in vivo* la zéine de 22 kDa et la protéine b-32, est capable d'initier leur synthèse *in vitro* sous de forte teneur en azote et, en absence d'azote par addition d'acide abscissique ou de méthyl jasmonate. Les travaux de Müller *et al.* (1997) soulignent l'importance fonctionnelle des sites de liaison *o2* dans la réponse à l'azote. L'élimination sélective des 3 sites de liaison *o2* du promoteur 22Z-4 diminue systématiquement la stimulation de l'activité de 22Z-4 en réponse à l'azote, avec un effet équivalent dans les albumens sauvage et mutant *o2*. Ces données suggèrent que la régulation du gène 22Z-4 par l'azote intervient au niveau transcriptionnelle, que des facteurs de transcription autres que *O2* sont responsables de ce contrôle métabolique et assurent une activité élevée des promoteurs 22Z-4, en interagissant avec les sites de liaison *o2*. En conséquence, l'implication de *O2* dans la régulation des niveaux d'expression de certaines enzymes de biosynthèse des acides aminés telles que la LKR (lysine-ketoglutarate réductase, Brochetto *et al.*, 1992) ou l'ASK1 (aspartate kinase 1, Azevedo *et al.*, 1995), et la mise en évidence dans les plantes supérieures

de l'existence d'un mécanisme dans lequel une privation de l'azote conduit à la synthèse des acides aminés alors qu'un excès entraîne la répression de leur biosynthèse (Guyer *et al.*, 1995), suggèrent que la protéine O2 pourrait être impliquée dans un contrôle général de la biosynthèse des acides aminés et être active sous des teneurs faibles en azote qui limitent leur biosynthèse. D'autres part, l'implication de O2 dans la régulation positive de certaines enzymes de biosynthèse des carbohydrates telles que la cyPPDK1 (« cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase 1 », Maddaloni *et al.*, 1996) lui octroie un rôle encore plus général où elle intervient dans le métabolisme carboné.

L'identification d'une altération du métabolisme des acides aminés et du carbone qui conduit à une sur-expression et à une accumulation d'acides aminés libres (FAA, « free amino acids ») dans l'albumen de maïs mature des mutants *o2* (Wang et Larkins, 2001) supporte ce model, lequel associe régulation métabolique et régulation transcriptionnelle et selon lequel, l'expression des gènes zéïnes est maintenue à un niveau élevé quelque soit la teneur en azote.

## **2.2. L'influence de la lumière.**

Ciceri *et al.* (1999) ont montré que l'expression des facteurs de transcription O2 et PBF subit des oscillations prononcées durant les cycles jour-nuit : « les taux les plus élevés des transcrits O2 et PBF sont détectés à midi alors que les plus faibles le sont à minuit ; en comparaison, le niveau du messenger de la protéine OHP1 (« O2-heterodimerizing protein 1 ») reste constant. Ces fluctuations journalières des niveaux de transcrits de certains facteurs de transcription, lesquelles sont également observées lorsque l'épis est spécifiquement protégé de la lumière, suggèrent que la graine n'est pas directement impliquée dans la perception d'un signal lumineux, mais répond probablement à des flux diurnes de métabolites qui diffusent dans l'albumen. L'impact des cycles jour-nuit sur l'activité du facteur de transcription O2, *via* une régulation du taux d'expression de son transcrit, se manifeste également à travers une hyperphosphorylation de la protéine O2 résiduelle de la nuit, qui conduit à une diminution de son activité de liaison à l'ADN en absence de lumière (Ciceri *et al.*, 1997).

La modulation du taux d'expression et de l'activité des facteurs de transcription O2 et PBF par des signaux diurnes en provenance de la plante indique que la régulation coordonnée des gènes zéïnes et des autres gènes spécifiquement exprimés dans l'albumen de maïs est probablement elle même soumise à l'influence de l'horloge circadienne.

### III. Projet de thèse.

Dans le passé, nombreux sont les efforts accomplis pour créer des promoteurs forts capables de diriger l'expression des gènes hétérologues dans les plantes transgéniques. Le promoteur le plus communément utilisé est le promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (*CaMV 35S*) (Odell *et al.*, 1985) qui agit comme un promoteur fort constitutif et permet une expression dans la plupart des organes de plantes (Jensen *et al.*, 1986). Kay *et al.* (1987) ont montré que la duplication de la séquence activatrice (enhancer) du promoteur 35S permet d'améliorer d'un facteur 10 l'activité transcriptionnelle du promoteur double 35S (E35S) résultant. Des promoteurs encore plus actifs ont été créés en combinant certains éléments du promoteur 35S à des séquences promotrices procaryotes et virales. Parmi les promoteurs résultants, le promoteur MAC (Comai *et al.*, 1990) et les promoteurs MPr1163 et MPr1165 (Rancé *et al.*, 2002) sont rapportés être de l'ordre de 3 à 5 fois plus actif que le promoteur E35S dans les feuilles de tabac. Ces promoteurs, bien que couramment utilisés en biotechnologie végétale, ne présentent pas d'intérêt en terme de production de protéines recombinantes dans l'albumen de maïs. De nombreux promoteurs susceptibles d'accomplir cette fonction ont déjà été identifiés, caractérisés et utilisés (Figure 13) ; ils ont tous pour points communs une activité intrinsèque relativement élevée et spécifique du tissu de l'albumen des grains de céréales.

Dans la perspective de construire des promoteurs forts, fonctionnels dans les plantes monocotylédones et en particulier dans l'albumen de maïs, nous avons choisi de focaliser nos efforts sur le promoteur du gène *glu-D1-1* des gluténines de haut poids moléculaire (HMWG, « High Molecular Weight Glutenin ») codant la sous-unité Dx5 et issu du génome D du blé hexaploïde *Triticum aestivum* L. cv Cheyenne (Anderson *et al.*, 1989). Les gluténines de haut poids moléculaire constituent un groupe de prolamines de 70 à 90 kDa qui représentent approximativement 10% des protéines de réserve totale du grain de blé (Kasarda *et al.*, 1976). Les gènes de gluténines-HMW sont cartographiés aux loci orthologues *Glu-1* de chacun des trois génomes (A, B et D) de *Triticum aestivum* L. et chaque locus *Glu-1* contient deux gènes similaires, un de type x et le second de type y, issus d'une duplication. Les promoteurs des gènes HMWG de blé (PrHMWG) sont spécifiquement actifs dans l'albumen durant le développement du grain et le produit de chaque gène actif peut représenter jusqu'à 2% des protéines totales du grain de blé mature (Seilmeier *et al.*, 1991 ; Halford *et al.*, 1992).

Nous avons créé des promoteurs HMWG-Dx5 (PrHMWG-Dx5) synthétiques (MPr) afin d'améliorer l'activité intrinsèque dirigée par PrHMWG-Dx5 dans les grains de maïs. Pour localiser et caractériser les séquences régulatrices, *cis*-activatrices, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle détaillée de PrHMWG-Dx5 utilisant différentes délétions proximales et la duplication ou la triplication d'un fragment proximal de PrHMWG-Dx5. Nous avons également associé PrHMWG-Dx5 aux séquences activatrices 1 (as-1) (Lam *et al.*, 1989) et 2 (as-2) (Lam et Chua, 1989) du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et/ou aux boîtes « céréales » (Anderson *et al.*, 1998) du promoteur du gène *glu-B1-1* qui code pour la sous-unité Bx7 de gluténine-HMW.

L'activité des promoteurs synthétiques obtenus a été évaluée en expression transitoire à l'aide du gène rapporteur *gus* dans l'albumen du grain de maïs et dans les feuilles de tabac afin de déterminer la force et la spécificité tissulaire de chaque promoteur. L'activité GUS sous contrôle des promoteurs sélectionnés, potentiellement intéressants en terme de production de protéines thérapeutiques dans les plantes, a été validée en expression stable dans des plants de maïs et de tabac transgéniques.

Enfin, nous avons identifié par des tests de retard de migration (EMSA, « Electrophoretic Mobility Shift Assays ») des interactions ADN/protéines potentiellement responsables de l'activité élevée des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs.

# MATERIEL BIOLOGIQUE

## I. Le matériel végétal.

Le matériel végétal placé en culture *in vitro* est manipulé en conditions stériles sous des hottes à flux laminaire. Les ustensiles et les milieux de culture sont autoclavés à 120°C (chaleur humide) sous une pression de 1 bar pendant 20min.

### 1 Le maïs *Zea mays* L.

#### 1.1. Lignées A188 et SN 87165.

Le maïs A188 (J1) est une lignée produite par l'Institut National des Ressources Agrobiologiques du Japon. Il est utilisé lors de la transformation stable par *Agrobacterium tumefaciens*.

Le maïs SN 87165 (L2) est une lignée élite produite par le groupe LIMAGRAIN. Il est utilisé pour réaliser des croisements avec le maïs J1 transgénique afin d'améliorer la valeur agronomique des plantes transformées. Les grains de maïs L2 sont également utilisés pour réaliser les tests de transformation transitoire par biolistique.

#### 1.2. Culture du maïs.

Le maïs est cultivé en phytotron à température constante de 25°C selon une photopériode de 16h « lumière » et 8h « obscurité », avec 60% d'hygrométrie. Les grains sont mis à germer sur un terreau composé de 25% de tourbe et 75% de pouzzolane (HumuStar, HUMUSTAR S.A.). Les jeunes plantules sont repotées sur le même terreau au stade de développement 4 à 5 feuilles. Les plants de maïs atteignent leur maturité (sortie des soies) environ 60 jours après l'initiation des semis. Les grains de maïs matures, récoltés 30 à 40 jours après pollinisation (DAP), sont séchés dans une étuve à 35°C pendant 48h et conservés dans une chambre de stockage à 11°C et 30% d'hygrométrie.

## **2. Le tabac *Nicotiana tabacum* L.**

### **2.1. Variété *PBD6*.**

Des graines de la variété de tabac *PBD6* d'intérêt agronomique (Schiltz, 1967), nous ont été gracieusement fournies par l'Institut du Tabac de Bergerac (Seita). Les feuilles de tabac *PBD6* sont utilisées lors de la transformation stable par *Agrobacterium tumefaciens* et pour effectuer des tests de transformation transitoire par biolistique.

### **2.2. Culture du tabac.**

Le tabac est cultivé en chambre de culture à température constante de 26°C, sous une intensité lumineuse de 160μmoles.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et selon une photopériode de 16h « lumière » et 8h « obscurité ». Les graines de tabac *PBD6* sont stérilisées par incubations successives dans de l'éthanol à 70% (1min.) puis dans de l'hypochlorite de calcium à 7% (20min.). Après 3 rinçages à l'eau stérile, elles sont mises à germer sur le milieu de multiplication végétative MS-20 (4,4g/L MS-0404 pH 5,7, 20g/L saccharose, 8g/L agar-agar). Les jeunes plantules au stade 2 feuilles sont repiquées dans des pots en verre sur le milieu MS-20 et les plants de tabac sont ensuite bouturés toutes les 6 semaines sur le même milieu. Après 3 bouturages, les plants de tabac sont éliminés.

## **II. Les souches bactériennes.**

La bactériologie est réalisée en conditions stériles sous des hottes à flux laminaire. Les milieux de culture sont autoclavés à 120°C (chaleur humide) sous une pression de 1 bar pendant 20min.

### **1. *Escherichia coli* DH5α.**

La souche DH5α d'*Escherichia coli* (*E. coli*, Sambrook *et al.*, 1989) est utilisée comme cellule hôte lors des différents clonages.

## **2. *Agrobacterium tumefaciens*.**

La souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* (Hoekema *et al.*, 1983), sélectionnée sur rifampicine, possède un plasmide Ti désarmé (pAL4404) porteur des gènes de virulence. L'ADN-T, portant la cassette d'expression d'intérêt est introduit sur un plasmide indépendant, appelé plasmide binaire. Les agrobactéries recombinantes A1177, A1178, A1180, A1181, A1182 et A1238 ont respectivement été obtenues par intégration des plasmides binaires pMRT1177, pMRT1178, pMRT1180, pMRT1181, pMRT1182 et pMRT1231 dans la souche LBA4404 et sont utilisées pour effectuer la transformation stable du tabac PBD6.

La souche *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404-pSB1 (Komari *et al.*, 1996), sélectionnée sur rifampicine et tétracycline, correspond à une souche LBA4404 renfermant le plasmide pSB1 porteur des gènes de virulence VirC, VirG et VirB. L'ADN-T, portant la cassette d'expression d'intérêt, est introduit sur un plasmide binaire indépendant. Les agrobactéries recombinantes A1207p, A1222p, A1266p, A1268p, A1231p et A1209p ont respectivement été obtenues par intégration des plasmides binaires pMRT1207, pMRT1222, pMRT1266, pMRT1268, pMRT1231 et pMRT1209 dans la souche LBA4404-pSB1 et sont utilisées pour la transformation stable du maïs A188.

## **III. Les plasmides d'expression transitoire.**

### **1. Les plasmides de référence.**

#### **1.1. Obtention de pMRT1144.**

Le plasmide pMRT1144 (Figure 14) dérive du vecteur de clonage universel pGEM-3Zf (+) (Promega). Il porte le gène de résistance à l'ampicilline et la séquence codante de la  $\beta$ -glucuronidase (*uidA*) d'*E. coli*, incluant l'intron IV2 (*uidA-IV2*) du gène de la patatine de pomme de terre (Vancanneyt *et al.*, 1990), sous le contrôle du terminateur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (*Tnos*).

L'obtention de pMRT1144 a nécessité deux clonages consécutifs. (i) La séquence *uidA* sous contrôle de *Tnos* a été isolée du plasmide pBI221 (Clontech) par les enzymes *EcoRI* et *BamHI*, et introduite dans les sites *EcoRI* et *BamHI* du plasmide pGEM-3Zf (+) pour générer le vecteur intermédiaire pGEM3Z-*uidA*-*Tnos*. (ii) Pour insérer l'intron IV2 (192pb) dans la séquence codante *uidA* du vecteur pGEM3Z-*uidA*-*Tnos*, une portion interne du gène *uidA* (fragment *SnaBI/BstBI*, 710pb) a été excisée et remplacée par la séquence équivalente contenant l'intron IV2 (fragment *SnaBI/BstBI*, 902 pb) isolée à partir du plasmide p35S-GUS-INT (Vancanneyt *et al.*, 1990).

Dépourvu de toute séquence promotrice, pMRT1144 a été utilisé en tant que témoin négatif au cours des tests d'expression transitoire. D'un point de vue pratique, il a été utilisé pour le clonage de la majorité des constructions promotrices placées en amont du gène *uidA*-IV2 et de ce fait, il constitue le squelette de l'ensemble des vecteurs d'expression transitoire.

### **1.2. Obtention de pMRT1276.**

Le plasmide *pMRT1276* (Figure 15) a été construit afin de disposer d'une séquence promotrice forte de référence dans l'albumen de maïs (*Zea mays* L.). Pour ce faire, le fragment *HindIII/BamHI* contenant le promoteur entier (1.7kpb) du gène ZC2 codant pour la  $\gamma$ -zéïne ( $\gamma Z$ , #X53514) a été isolé à partir du plasmide p63 décrit par Reina *et al.* (1990) et placé en amont de la séquence *uidA*-IV2 aux sites *HindIII/BamHI* de pMRT1144.

### **1.3. Obtention de pMRT1092.**

Le plasmide *pMRT1092* (Figure 15) a été construit afin de disposer d'une séquence promotrice forte de référence dans les tissus photosynthétiques du tabac (*Nicotiana tabacum* L., cultivar PBD6). Pour ce faire, le promoteur E35S (761pb) connu pour son activité élevée dans les tissus photosynthétiques de tabac (Kay *et al.*, 1987) a été isolé à partir du plasmide pJIT163 (Guérineau et Mullineaux, 1993) par *KpnI* traité à l'ADN Polymérase T4 / *BamHI* et fusionné en amont de la séquence *uidA*-IV2 aux sites *HindIII* traité à la Klenow / *BamHI* de pMRT1144.

#### **1.4. Description du plasmide pCaMV35Sluc.**

*Le plasmide pCaMV35Sluc* (Torrent *et al.*, 1997) a été utilisé en tant que plasmide de référence interne pour normaliser les variations de l'activité GUS contrôlée par les différents promoteurs étudiés en expression transitoire (Leckie *et al.*, 1994). Il contient la cassette d'expression du gène rapporteur luciférase (*Luc*) sous le contrôle du promoteur et du terminateur 35S du CaMV.

*Le plasmide pCaMV35Sluc* nous a été gracieusement fourni par le Docteur Dolors Ludevid (CSIC de Barcelone).

#### **2. Obtention du plasmide pMRT1125 contenant la séquence entière du promoteur HMWG-Dx5 de blé.**

*Le plasmide pMRT1125* (Figure 16) résulte du clonage du promoteur HMWG-Dx5 entier du gène de glutenine de haut poids moléculaire (PrHMWG-Dx5), correspondant à une séquence de 417 pb (#X12928) s'étendant entre les positions -378 et +39, en amont du gène *uidA-IV2* de pMRT1144. Le fragment promoteur a été isolé du plasmide pUC19-HMWG par *EcoRI* traité à la Klenow et *BamHI*. Il a été fusionné aux sites *SphI* traité à l'ADN Polymérase T4 et *BamHI* de pMRT1144.

#### **3. Obtention des plasmides d'expression transitoire contenant des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5.**

*Les plasmides d'expression transitoire* décrits ci-après présentent tous une organisation structurale identique à celle du plasmide d'expression transitoire modèle schématisé dans la Figure 16 ; la séquence promotrice (MPr) constituant la seule variable.

*Les plasmides pMRT1128, pMRT1183, pMRT1127 et pMRT1126* ont été obtenus par le clonage orienté des fragments promoteurs *EcoRI* traité à la Klenow et *BamHI* correspondants (MPr), dans les sites *SphI* traité à la T4 ADN Polymérase et *BamHI* du plasmide pMRT1144. Les fragments promoteurs MPr1128, MPr1183, MPr1127 et MPr1126, lesquels présentent des délétions progressives de l'extrémité 5' de PrHMWG-Dx5, ont respectivement été amplifiés par PCR à l'aide des couples

d'oligodésoxynucléotides P3/RP1, P5/RP1, P2/RP1 et P1/RP1 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1125.

*Le plasmide pMRT1197* a été obtenu par l'élimination du fragment promoteur *XbaI/NcoI* de pMRT1183. Le promoteur MPr1197 résultant, constitue la séquence minimale de PrHMWG-Dx5 étudiée dans ce travail.

*Le plasmide pMRT1198* a été obtenu par le remplacement du fragment promoteur *XbaI/NcoI* de pMRT1183 par un fragment amplifié par PCR à l'aide du couple d'oligodésoxynucléotides P5/RP8 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1128. Le promoteur MPr1198 résultant, comporte une délétion de la séquence interne de MPr1128 qui s'étend des positions -59 à -135.

*Le plasmide pMRT1216* a été obtenu par le clonage simultané au niveau des sites *SphI* traité à l'ADN Polymérase T4 et *BamHI* du plasmide pMRT1144, de deux fragments promoteurs : (i) le fragment 5' orienté *EcoRI* traité à la Klenow et *XbaI*, amplifié par PCR à l'aide du couple d'oligodésoxynucléotides P7/RP7 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1128 et (ii) le fragment 3', obtenu par l'hydrolyse du plasmide pMRT1183 avec les enzymes de restriction *XbaI* et *BamHI*. Le promoteur MPr1216 résultant présente une duplication en tandem direct du fragment de MPr1128 qui s'étend des nucléotides -225 à -136.

*Le plasmide pMRT1217* a été obtenu par l'insertion dans le site *XbaI* de pMRT1183, de deux fragments promoteurs identiques synthétisés par PCR à l'aide du couple d'oligodésoxynucléotides P5/RP7 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1128. Le promoteur MPr1217 résultant comporte une duplication en tandem direct du fragment de MPr1128 qui s'étend des nucléotides -225 à -136.

*Les plasmides pMRT1131, pMRT1130, pMRT1138, pMRT1137, pMRT1136 et pMRT1135* ont été obtenus par le clonage orienté *EcoRI* traité à la Klenow et *BamHI* des fragments promoteurs correspondants (MPr), aux sites *SphI* traité à l'ADN Polymérase T4 et *BamHI* du plasmide pMRT1144. Le fragment promoteur MPr1131 résulte de l'insertion à la position -65 de PrMWG-Dx5 d'une séquence de 38 pb comportant les motifs as-2 et as-1 du promoteur 35S du CaMV ; il a été synthétisée par

SOE (« splicing overlap extension ») à l'aide des d'oligodésoxynucléotides P4, RPs1, Ps1 et RP1 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1125. Le fragment promoteur MPr1130 résulte de l'insertion à la position -65 de PrMWG-Dx5 d'une séquence de 55 pb comportant une duplication du motif as-2 et le motif as-1 du promoteur 35S du CaMV ; il a été obtenu de la même manière que MPr1131 excepté que les amorces RPs2 et Ps2 (Tableau 3) ont été utilisées à la place des amorces RPs1 et Ps1. Les fragments promoteurs MPr1138, MPr1137 et MPr1136, lesquels présentent des délétions progressives de l'extrémité 5' de MPr1131, ont respectivement été amplifiés par PCR à l'aide des couples d'oligodésoxynucléotides P3/RP1, P2/RP1 et P1/RP1 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1131. Le fragment promoteur MPr1135, lequel présente une délétion de l'extrémité 5' de MPr1131, a été amplifié par PCR à l'aide du couple d'oligodésoxynucléotides P3/RP1 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1130.

*Les plasmides pMRT1139, pMRT1200 et pMRT1213* résultent de l'insertion d'une séquence de 61pb qui inclue les boîtes céréales du promoteur du gène de glutenine de haut poids moléculaire de blé codant pour la sous-unité Bx7 (PrHMWG-Bx7, #X13927), en amont de MPr1131, MPr1138 et MPr1128 respectivement. MPr1139 a été synthétisé par PCR à l'aide des oligodésoxynucléotides P6/RP1 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1131 ; le fragment résultant a été cloné dans les sites de restriction *SphI* traité à la T4 ADN Polymérase et *BamHI* du plasmide pMRT1144. MPr1200 a été obtenu par le clonage simultané dans les sites de restriction *SphI* traité à la T4 ADN Polymérase et *BamHI* du plasmide pMRT1144, d'un fragment promoteur 5' (*EcoRI* traité à la Klenow / *XbaI*) synthétisé par PCR à l'aide du couple d'oligodésoxynucléotides P11/RP11 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1139 et d'un fragment promoteur 3' (*XbaI* / *BamHI*) synthétisé par PCR à l'aide du couple d'oligodésoxynucléotides P5/RP1 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1138. MPr1213 a également été obtenu par le clonage simultané dans les sites de restriction de pMRT1144 décrits précédemment, d'un fragment promoteur 5' (*EcoRI*, traité à la Klenow / *XbaI*) synthétisé par PCR à l'aide du couple d'oligodésoxynucléotides P11/RP11 (Tableau 3) en présence de l'ADN matrice pMRT1139 et d'un fragment promoteur 3' hydrolysé par *XbaI* et *BamHI* à partir de pMRT1183.

## IV. Les plasmides binaires.

### 1. Plasmides binaires de référence.

Le plasmide *pMRT1195* (Comeau et Gruber, 2001 ; Figure 17), vecteur binaire dérivé de *pBIN19* (Bevan, 1984), est conçu pour la transformation stable du maïs J1. Il porte une cassette d'expression du gène *bar* (Wehrmann *et al.*, 1996) qui confère aux plants de maïs transgéniques la résistance à l'herbicide BASTA dont la molécule active est la L-phosphinothricine (L-PPT).

Le plasmide *pMRT1118* (Comeau et Gruber, 2001 ; Figure 17), vecteur binaire dérivé de *pBIN19* (Bevan, 1984 ; Fray *et al.*, 1994), est conçu pour la transformation stable du tabac *PBD6*. Il porte la cassette d'expression du gène néomycine phosphotransférase II (*nptII*) qui confère aux plants de tabac transgéniques la résistance à la kanamycine.

Les plasmides *pMRT1195* et *pMRT1118* portent à l'extérieur de l'ADN-T une cassette d'expression du gène néomycine phosphotransférase III (*nptIII*), qui confère aux cellules procaryotes hôtes la résistance à la kanamycine.

### 2. Obtention des plasmides binaires utilisés pour générer les plants de maïs transgéniques.

Les plasmides binaires *pMRT1207*, *pMRT1222*, *pMRT1266*, *pMRT1268*, *pMRT1231* et *MRT1209* (Figure 18) ont respectivement été obtenus par insertion au site *HpaI* du plasmide binaire *pMRT1195* (Comeau et Gruber, 2001; Figure 17) des cassettes d'expression « MPr1139/*uidA-IV2/Tnos* », « MPr1217/*uidA-IV2/Tnos* », « MPr1200/*uidA-IV2/Tnos* », « MPr1216/*uidA-IV2/Tnos* », « PrHMWG-Dx5/*uidA-IV2/Tnos* » et « 526γ-zein/*uidA/Tnos* » respectivement isolées des plasmides *pMRT1139*, *pMRT1217*, *pMRT1200*, *pMRT1216*, *pMRT1125* et du plasmide *p526γZ* (Marzábal *et al.*, 1998) par *EcoRI* traitées à la Klenow. Ils ont été vérifiés par restrictions enzymatiques et sélectionnés pour que les cassettes d'expression soient positionnées en tandem direct par rapport à la cassette de sélection.

Le plasmide *p526γ-zein* qui comporte la cassette d'expression « 526γZ/*uidA*/Tnos » nous a été gracieusement fourni par Dr Dolors Ludevid (CSIC de Barcelone).

### **3. Obtention des plasmides binaires utilisés pour générer les plants de tabac transgéniques.**

Les plasmides binaires *pMRT1177*, *pMRT1178*, *pMRT1180* et *pMRT1181* (Figure 19) ont respectivement été obtenus par insertion au site *EcoRI* du plasmide binaire *pMRT1118* (Comeau et Gruber, 2001; Figure 17) des cassettes d'expression « MPr1130/*uidA*-IV2/Tnos », « MPr1131/*uidA*-IV2/Tnos », « MPr1138/*uidA*-IV2/Tnos » et « MPr1139/*uidA*-IV2/Tnos », respectivement isolées des plasmides *pMRT1130*, *pMRT1131*, *pMRT1138* et *pMRT1139* par l'enzyme de restriction *EcoRI*. Ils ont été conçus de telle sorte que la cassette d'expression soit en tandem direct par rapport à la cassette de sélection.

Le plasmide binaire *pMRT1182* (Figure 19) a été obtenu par l'insertion simultanée aux sites *KpnI* et *EcoRI* de *pMRT1118* (Comeau et Gruber, 2001; Figure 17), du fragment promoteur E35S du CaMV (761pb) isolé par double digestion *KpnI/HindIII* du plasmide *pJIT163* (Guérineau et Mullineaux, 1993) et de la séquence « *uidA*-IV2/Tnos » isolée du plasmide *pMRT1092* à l'aide des enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRI*.

## **V. Le domaine de liaison à l'ADN natif et muté de la protéine PBF.**

Le domaine de liaison à l'ADN natif (aa 1-137) et muté (aa 1-137 ΔCystéine 62) de la protéine PBF (#AAB70119.1) nous a été gracieusement fourni par Pau Marzábal et Dr Dolors Ludevid (CSIC de Barcelone).

# METHODES

## I. Analyses des acides désoxyribonucléiques.

### 1. Préparation de l'ADN plasmidique.

#### 1.1. Extraction de l'ADN plasmidique à partir d'*Escherichia coli*.

L'ADN plasmidique est extrait selon le principe de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979) à partir de 1,5mL de culture bactérienne réalisée pendant une nuit (O/N). Après centrifugation pendant 5min. à 3000g, le culot bactérien est repris dans 100µL de tampon E1 (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA et 20mg/mL RnaseA, pH8,0) puis 200µL de tampon de lyse E2 [200mM NaOH et 1%SDS (p/v)] sont ajoutés. L'ensemble est incubé 5min. à température ambiante puis 150µL de tampon de neutralisation E3 (3M acétate de potassium, pH5,5) sont ajoutés et le mélange est centrifugé 10min. à 16000g. Le surnageant est complété avec 1mL d'éthanol absolu puis centrifugé 10min. à 16000g. Le culot d'ADN est rincé avec de l'éthanol 70% et repris dans 30µL d'eau ultra pure (UP) stérile.

Pour l'obtention d'ADN plasmidique hautement purifié, les kits « Concert High Purity Plasmid Miniprep System » et « Concert High Purity Plasmid Midiprep System » sont respectivement utilisés pour extraire de l'ordre de 20 et 100µg d'ADN plasmidique à partir de 5 et 100mL d'une culture bactérienne O/N, selon les indications du fournisseur (GIBCO BRL Life Technologies). Le principe de ces kits est basé sur la chromatographie échangeuse d'anions.

#### 1.2. Extraction de l'ADN plasmidique à partir d'*Agrobacterium tumefaciens*.

L'ADN plasmidique d'*Agrobacterium tumefaciens* est isolé à l'aide du kit « Concert High Purity Plasmid Midiprep System » à partir de 100mL d'une culture

d'agrobactéries O/N en suivant les recommandations du fournisseur (GIBCO BRL Life Technologies), excepté que le tampon E1 est supplémenté en lysosyme (1g/L).

## **2. Séparation et visualisation des molécules d'ADN.**

Les molécules d'ADN peuvent être séparées selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose [0,7 à 2% (p/v), TBE 1X (100mM Tris, 90mM acide borique et 1mM EDTA, pH8,4)]. De manière classique, les électrophorèses ont été réalisées dans le tampon de migration TBE (1X) à 100 Volts pendant 20 à 30min. Lors de la séparation de l'ADN végétal total, les électrophorèses ont été réalisées O/N dans le tampon de migration TBE (1X) à 30 Volts.

Les molécules d'ADN sont colorées avec un agent intercalant fluorescent, le bromure d'éthidium (BET), lequel est incorporé au gel d'agarose (0,4mg/L), puis visualisées par éclairage UV du gel à l'aide du Gel Doc 2000 (BIO RAD).

L'ADN marqueur utilisé pour évaluer la taille des molécules d'ADN séparées sur gel d'agarose est le « 1Kb Plus DNA Ladder™ » ( GIBCO BRL Life Technologies).

## **3. Dosage de l'ADN.**

### **3.1. En spectrophotométrie.**

La concentration en acides nucléiques (ADN, ARN) peut-être déterminée par une mesure de leur absorption à 260nm, dans des cuves en quartz de 1cm de large à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON<sub>XS</sub> (BIO-TEK Instruments). A cette longueur d'onde, une unité de DO correspond à 50µg/mL d'ADN double brin (ADNs). Le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  permet d'estimer la pureté de l'ADN, la DO à 280nm correspondant notamment à l'absorption des protéines.

### **3.2. En fluorimétrie.**

La concentration de l'ADN peut-être déterminé par une émission de fluorescence à l'aide du kit « PicoGreen dsDNA Quantification », selon les recommandations du fournisseur Interchim. L'échantillon d'ADN, marqué avec un réactif fluorescent spécifique des ADNs, est excité à une longueur d'onde de 480nm et la mesure de l'émission de fluorescence est effectuée à 520nm grâce à l'appareil « Labsystems

Fluoroskan II » et au logiciel « Genesis II, Windows<sup>TM</sup> based microplate software » [Labsystems and Life Sciences International (UK) LTD]. La réalisation d'une droite étalon à partir d'une gamme de concentration connue d'ADN permet de déterminer la concentration de l'ADN à doser.

Ce type de dosage a essentiellement été utilisé pour quantifier l'ADN végétal total lors des analyses moléculaires.

### **3.3. En gel d'agarose.**

La concentration de l'ADN peut-être estimée sur gel d'agarose à l'aide des ADN étalons commercialisés par GIBCO BRL Life Technologies « High DNA Mass Ladder » utilisé pour quantifier les fragments d'ADN de grande taille sur gel d'agarose à 0.8% et « Low DNA Mass Ladder » utilisé pour quantifier les fragments d'ADN de petite taille sur gel d'agarose à 2%. Cette méthode permet notamment de quantifier les fragments d'ADN « vecteur » et « insert » lors d'un clonage.

## **4. Clonage dans un vecteur plasmidique.**

Suite à un traitement enzymatique, excepté dans le cas d'une digestion analytique, l'ADN plasmidique a systématiquement été purifié à l'aide du kit « Concert Rapid PCR Purification System » ou a été extrait sur gel d'agarose à l'aide du kit « Concert Rapid Gel Extraction System », selon les indications du fournisseur (GIBCO BRL Life Technologies).

Après chaque réaction d'amplification par PCR, excepté lorsqu'il s'agit d'une PCR analytique, l'ADN synthétisé a également été séparé sur gel d'agarose et extrait à l'aide du kit « Concert Rapid Gel Extraction System ».

Ces kits permettent d'isoler des fragments d'ADN de 80pb à 20kb selon un principe basé sur la chromatographie échangeuse d'anions.

### **4.1. Digestions enzymatiques de l'ADN.**

L'ADN peut-être fragmenté par l'action de nombreuses endonucléases de restriction, qui agissent à des sites spécifiques, de séquences connues. Les différentes enzymes de restriction ont été utilisées selon les recommandations des fournisseurs (New England Biolabs ou GIBCO BRL Life Technologies).

De manière classique, l'ADN plasmidique est digéré pendant 1h à la température préconisée, en présence du tampon de l'enzyme (1X) et de 2,5U de(s) l'enzyme(s) de restriction pour 1µg d'ADN. Avec les enzymes de restriction de type New England Biolabs, la réaction est supplémentée avec de la spermidine (4mM) et, selon les enzymes, avec de la BSA (0,1µg/µL). Dans le cas d'ADN plasmidique extrait d'*Agrobacterium tumefaciens*, la digestion s'effectue O/N dans les mêmes conditions.

#### **4.2. Modifications enzymatiques de l'ADN.**

Les enzymes de modification de l'ADN ont été utilisées selon les recommandations du fournisseur (New England Biolabs).

Les extrémités cohésives de l'ADN peuvent être converties en extrémités franches par l'action du fragment de Klenow ou de l'ADN polymérase T4 :

- l'enzyme de Klenow permet le remplissage des extrémités 5' sortantes (activité polymérase ADN dépendante) en présence de 50mM Tris-HCl (pH7,5), 50mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, 50µM dNTP et 20U de Klenow, pendant 30min. à 37°C.
- la T4 ADN polymérase permet simultanément le remplissage des extrémités 5' sortantes (activité polymérase ADN dépendante) et/ou la dégradation des extrémités 3' sortantes (activité exonucléasiques 3'-5') en présence du tampon de l'ADN polymérase T4 (1X), 0,3µg/µL BSA, 33µM dNTP et 6U d'ADN polymérase T4, pendant 30min. à 37°C.

Les extrémités de l'ADN plasmidique peuvent être déphosphorylées par l'action de 40U de phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP) en présence du tampon 3 de restriction (1X, New England Biolabs) pendant 1h à 37°C.

#### **4.3. Réaction de polymérisation en chaîne.**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR), permet l'amplification exponentielle *in vitro* de séquences nucléiques localisées entre deux séquences reconnues par deux oligodésoxynucéotides spécifiques (amorces ADN). Elle est réalisée dans des microtubes de 0,5mL, à l'aide du thermocycleur « GeneAmp PCR System 9700 » (Perkin-Elmer), sous l'action d'une ADN polymérase. Les amorces ADN utilisées dans ce travail sont présentées dans le tableau 3.

#### 4.3.1. PCR classique.

L'amplification par PCR a été utilisée pour amplifier les différents fragments des promoteurs synthétiques dérivés du promoteur HMWG-Dx5 (Anderson *et al.*, 1989 ; #X12928) afin de générer divers types de délétion de la région promotrice. Elle a également été utilisée pour créer des promoteurs chimériques par intégration de séquences *cis*-régulatrices en 5' des promoteurs synthétiques dérivés du promoteur HMWG-Dx5.

Les réactions d'amplification ont été réalisées avec la Vent ADN Polymérase selon les recommandations du fournisseur (New England Biolabs). Une réaction type comporte 50ng d'ADN matrice et 100pmoles de chacune des deux amorces ADN en présence du tampon de la Vent ADN Polymérase (1X), de 1mM de chacun des dNTP (GIBCO BRL Life Technologies) et de 2U de Vent ADN Polymérase.

La synthèse de l'ADN comprend une étape de dénaturation initiale (94°C, 5min.) et 30 cycles d'amplification composés chacun des étapes de dénaturation (94°C, 1min.), d'hybridation (45°C-55°C en fonction de la température d'hybridation des oligodésoxynucléotides, 1min.) et d'élongation (72°C, 1min.30). Lors du dernier cycle d'amplification, la polymérisation de l'ADN est prolongée à 72°C, 5min.

#### 4.3.2. SOE.

La SOE (Figure 20, « splicing overlap extension »), extension PCR par chevauchement (Horton *et al.*, 1989; Wurch *et al.*, 1998) a été utilisée pour intégrer des séquences *cis*-régulatrices exogènes dans la séquence du promoteur HMWG-Dx5 de blé. Deux couples d'amorces ADN ont été désignés de part et d'autre du site de fusion de la séquence exogène. Les amorces A2 et B1, complémentaires au niveau de la séquence exogène, permettent son intégration à la position souhaitée et les sites de restriction intégrés en 5' des amorces A1 et B2 assurent le clonage dirigé du fragment chimériques résultant.

La première étape de la technique SOE consiste à réaliser deux amplifications PCR indépendantes catalysée par 2U de Vent ADN Polymérase avec respectivement les couples d'amorces (A1 et A2, 20pmoles chacune) et (B1 et B2, 20pmoles chacune), 5ng d'ADN matrice en présence du tampon de la Vent ADN Polymérase (1X) et de 200µM de chacun des dNTP. La synthèse de l'ADN comprend une étape de dénaturation initiale (94°C, 5min.) et 15 cycles d'amplification composés chacun des étapes de

dénaturation (94°C, 1min.), d'hybridation (55°C, 1min.) et d'élongation (72°C, 1min.30). Lors du dernier cycle d'amplification, la polymérisation de l'ADN est prolongée à 72°C, 5min.

Le produit de chacune des deux réactions PCR est soumis à l'action de 25U du fragment de Klenow en présence de 450µM de chacun des dNTP afin d'éliminer les bases supplémentaires éventuellement présentes. Les deux fragments PCR ainsi traités sont alors isolés sur un gel d'agarose, purifiés à l'aide du kit « Concert Rapid Gel Extraction System », (GIBCO BRL Life Technologies) et repris dans 30µL d'eau UP.

Finalement, les fragments A et B sont fusionnés lors d'une extension PCR par chevauchement. Pour ce faire, une amplification PCR « classique », catalysée par 2U de Vent ADN Polymérase, est réalisée avec 7,5µL de chacun des deux produits PCR ainsi traités (« ADN matrice ») et 20pmoles de chacune des amorces A1 et B2, en présence du tampon de la Vent ADN Polymérase (1X) et de 200µM de chacun des dNTP. Les cycles de l'amplification PCR sont identiques à ceux de la première PCR.

#### **4.3.3. PCR sur colonie.**

La PCR sur colonie a été utilisée à des fins analytiques, essentiellement pour confirmer la présence de l'ADN plasmidique après transformation des cellules bactériennes.

Les réactions d'amplification sont réalisées avec la *Taq* ADN Polymérase selon les recommandations du fournisseur (MBI Fermentas). Les cellules, prélevées sur une colonie isolée à l'aide d'un pic en bois stérile, subissent une lyse osmotique au contact du mélange réactionnel. L'ADN matrice ainsi libéré est amplifié sous l'action de 0,625U de *Taq* ADN Polymérase en présence de 20pmoles de chacune des deux amorces ADN, de 0,2mM de chacun des dNTP, du tampon de la *Taq* ADN Polymérase (1X) et de 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>.

La synthèse de l'ADN comprend une étape de dénaturation initiale (94°C, 5min.) et 30 cycles d'amplification composés chacun des étapes de dénaturation (94°C, 30sec.), d'hybridation (45°C-55°C en fonction de la température d'hybridation des oligonucléotides, 1min.30) et d'élongation (72°C, 2min.). Lors du dernier cycle d'amplification, la polymérisation de l'ADN est prolongée à 72°C, 5min.

#### **4.4. Ligation de l'ADN plasmidique.**

La ligation de l'ADN plasmidique est catalysée par l'action de 40U de T4 ADN ligase (New England Biolabs) en présence du tampon de l'enzyme (1X), des fragments d'ADN vecteur et d'ADN insert, dans un volume final de 10 $\mu$ L. Le fragment d'ADN vecteur obtenu après digestion enzymatique est déphosphorylé pour éviter sa « recircularisation » lorsque les extrémités sont compatibles. La proportion des fragments d'ADN vecteur et d'ADN insert mis en présence pour réaliser la réaction de ligation est fonction de la nature de leurs extrémités, qui peuvent être cohésives et/ou franches (Tableau 4). La réaction de ligation est effectuée à l'aide du thermocycleur « GeneAmp PCR System 9700 » (Perkin-Elmer) selon les cycles suivants : un cycle de 30sec. à 10°C et 200 cycles identiques composés des 3 étapes : 30sec. à 30°C, 30sec. à 10°C et 30sec. à 30°C.

#### **4.5. Transformation bactérienne.**

##### **4.5.1. *Escherichia coli*.**

L'ADN plasmidique est introduit dans des cellules d'*Escherichia coli* préalablement rendues compétentes comme décrit par Inoue *et al.* (1990).

Le produit de la réaction de ligation ou 1pg d'ADN plasmidique natif est ajouté à 100 $\mu$ L de bactéries compétentes. Le mélange est placé 30min. dans la glace avant de subir un choc thermique (1min.30 à 42°C puis 2min. dans la glace fondante). Après ajout de 500 $\mu$ L de milieu LB liquide (Tableau 5), la suspension bactérienne est incubée 1h à 37°C sous une agitation de 225rpm. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées sur un milieu LB solide (Tableau 5) supplémenté à 50 $\mu$ g/mL d'ampicilline (Sigma) ou de kanamycine (Sigma), O/N à 37°C. La présence du vecteur recombinant est vérifiée par restriction(s) enzymatique(s) et/ou par amplification PCR sur colonie. Lors du clonage d'un fragment d'ADN amplifié par PCR, l'intégrité de la séquence est vérifiée par séquençage (Genome Express SA, Grenoble, France).

##### **4.5.2. *Agrobacterium tumefaciens*.**

Les vecteurs binaires utilisés dans ce travail portent le gène de résistance à la kanamycine. Ils sont introduits dans les souches d'*Agrobacterium tumefaciens*

LBA4404 ou LBA4404-pSB1 selon une méthode adaptée du protocole décrit par Holsters *et al.* (1978).

Une culture d'agrobactéries est initiée dans 250mL de milieu 2YT liquide (Tableau 5) supplémenté en rifampicine (Sigma) à 50µg/mL (LBA4404) ou rifampicine à 50µg/mL et tétracycline (Sigma) à 5µg/mL (LBA4404-pSB1). Après incubation O/N à 28°C sous une agitation de 225rpm, les cellules sont récoltées par centrifugation (3000g, 4°C pendant 10min.) lorsque la densité de la culture atteint 1 unité de DO à 660nm et le culot bactérien est repris dans 100mL de 10mM Tris-HCl, pH 7,4. Les bactéries sont récupérées par centrifugation (3000g, 4°C pendant 10min.) et resuspendues dans 5mL de 2YT. Après congélation à l'azote liquide, les agrobactéries compétentes peuvent être conservées à -80°C.

Un à dix microgrammes d'ADN plasmidique sont ajoutés à 50µL d'agrobactéries compétentes en présence de 100µL de milieu 2YT liquide. Le mélange est soumis à 3 chocs thermiques consécutifs comprenant chacun les étapes de congélation à l'azote liquide pendant 5min. et de décongélation à 37°C pendant 5min. Après ajout de 1mL de milieu 2YT liquide, la suspension bactérienne est mise en culture pendant 4h à 28°C à faible agitation. Les agrobactéries recombinantes sont sélectionnées sur un milieu 2YT solide (Tableau 5) supplémenté à 50µg/mL de rifampicine et 50µg/mL de kanamycine (LBA4404) ou à 50µg/mL de rifampicine, 50µg/mL de kanamycine et 5µg/mL de tétracycline (LBA4404-pSB1), après une incubation de 48h à 28°C. La présence du vecteur binaire dans l'agrobactérie recombinante est vérifiée par restriction(s) enzymatique(s) et/ou par amplification PCR sur colonie.

## **II. Transformation transitoire du matériel végétal.**

### **1. Préparation des extraits végétaux.**

#### **1.1. Obtention et préparation des grains de maïs SN 87165 (L2).**

Douze jours après pollinisation (DAP), les épis de maïs sont prélevés et stérilisés pendant 5min. sous agitation dans un bain d'eau de javel à 20%. Suite à l'élimination de

l'eau de javel par des rinçages successifs à l'eau UP stérile, le péricarpe et la couche de cellules aleurones sont soigneusement éliminés en conditions stériles. Des coupes tangentielles de l'albumen ainsi extrait sont réalisées et placées sur du papier filtre imbibé de milieu minimum de Murashige et Skoog (4,33g/L M-5524, pH5,7, Sigma).

### **1.2. Préparation des feuilles de tabac *PBD6*.**

Afin de minimiser la destruction des cellules du mésophylle foliaire lors de la transformation par biolistique, les 2 feuilles principales des plants de tabac PBD6 âgés de 6 semaines sont prélevées 24 h avant transformation, déposées face ad-ligneuse vers le haut sur le milieu de plasmolyse douce BY3 (Tableau 6), et placées en chambre de culture (température constante de 26°C, sous une intensité lumineuse de 160 $\mu$ moles.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et une photopériode 16h « lumière » et 8h « obscurité »).

### **2. Adsorption de l'ADN plasmidique sur les microparticules.**

La transformation par biolistique nécessite l'adsorption de l'ADN (plasmide d'expression transitoire) sur des microparticules sphériques en tungsten ( $\varnothing$ 0.6 $\mu$ m) ou en or ( $\varnothing$ 1 $\mu$ m), stérilisées 10min. dans de l'éthanol absolu (Prolabo), lavées quatre fois dans l'eau UP stérile, et conservées à -20°C dans une solution de glycérol à 50% pendant 4 semaines maximum. La concentration de l'ensemble des plasmides contrôles et tests, utilisés durant la transformation est ajustée à 1mg/ml.

L'enrobage de l'ADN sur les particules ainsi préparées est réalisé en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Une fraction aliquote de 1,8mg de suspension de particules stériles dans 30 $\mu$ l de glycérol 50%, est mélangée vigoureusement au vortex pendant 1min., et pendant 10sec. avec 20 $\mu$ l de la suspension d'ADN contenant 5 $\mu$ g du plasmide d'expression transitoire et 2 $\mu$ g du plasmide de référence pCaMV35Sluc. Puis, 20 $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> (2,5M) sont ajoutés et mélangés vigoureusement pendant 10sec. Ensuite, 20 $\mu$ l de spermidine (0,1M) sont additionnés au mélange et l'ensemble est agité au vortex pendant 30sec. supplémentaires. L'enrobage des billes par l'ADN est poursuivi en incubant le mélange dans la glace pendant 15min. Les billes sont récupérées par centrifugation à 5000rpm pendant 1sec. et lavées deux fois dans l'éthanol absolu. Les particules ainsi enrobées sont remises en suspension dans 32 $\mu$ l d'éthanol absolu, mélangées vigoureusement au vortex pendant 15sec., puis immédiatement réparties en 4 fractions aliquotes identiques sur les disques « macrocarriers » stériles du système

« Biolistic PDS-1000/He », préparés selon les recommandations du fournisseur (Bio-Rad, Hercules, USA). L'ensemble « support du macroporteur / macroporteur portant le dépôt de particules », est séché stérilement sous la hotte à flux laminaire pendant 5 min.

### **3. Transformation transitoire des extraits végétaux par biolistique.**

#### **3.1. Bombardement des albumens de maïs et expression transitoire.**

Le bombardement des albumens de maïs est effectué à l'aide du système « Biolistic PDS-1000/He » selon les recommandations générales du fournisseur (Bio-Rad, Hercules, USA) concernant les manipulations et montages des différents éléments de l'appareil. Chaque albumen est bombardé successivement deux fois par des particules de tungstène de 0.6µm de diamètre, selon les caractéristiques de tir suivantes :

- la pression d'hélium choisie pour accélérer les particules est de 6200kPa (900 PSI),
- l'échantillon végétal est placé à 6 cm de la zone d'accélération des particules,
- le tir est effectué sous une atmosphère en dépression de 27mm de mercure.

Suite au bombardement, les albumens sont incubés 24 h à l'obscurité dans une chambre de culture à 26°C, afin de permettre l'expression transitoire des transgènes introduits dans les cellules.

#### **3.2. Bombardement des feuilles de tabac et expression transitoire.**

Le bombardement des feuilles de tabac est effectué de la même manière que le bombardement des albumens de maïs, à deux exceptions près :

- les échantillons sont bombardés par des particules d'or de 1 µm de diamètre,
- les échantillons sont placés à 9 cm de la zone d'accélération des particules.

Après bombardement les feuilles sont incubées 48h en chambre de culture (température constante de 26°C, sous une intensité lumineuse de 160µmoles.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et une photopériode 16h « lumière » et 8h « obscurité ») afin de permettre l'expression transitoire des transgènes introduits dans les cellules.

### **III. Transformation stable du matériel végétal.**

#### **1. Transformation stable du maïs J1 par *Agrobacterium tumefaciens*.**

La technique utilisée a été décrite par Ishida *et al.* (1996) et les milieux utilisés sont décrits dans le tableau 7.

Des embryons immatures de 1,0 à 1,2mm de long (9 à 14 jours après pollinisation) sont lavés dans le milieu LSinf, puis immergés dans une suspension d'agrobactéries LBA4404-pSB1 ayant intégré le plasmide binaire d'intérêt ( $1.10^9$  bactéries en suspension dans 1mL de milieu LSinf supplémenté à 100 $\mu$ M en acétosyringone). L'ensemble est agité pendant 30sec. à l'aide d'un vortex et incubé à température ambiante pendant 5min. Les embryons immatures ainsi traités sont cultivés pendant 3 jours sur milieu 1,5LSAs dans une chambre de culture obscure à une température constante de 26°C. Ils sont transférés sur milieu LSD5, et incubés dans les mêmes conditions pendant 2 semaines. Ensuite, ils sont placés sur milieu LSD10, et incubés dans les mêmes conditions 3 semaines supplémentaires. Les cals de type I ainsi générés sont isolés, fragmentés et transférés sur milieu LSD5, dans la même chambre de culture pendant 3 semaines. A ce stade, les cals de type I qui ont proliféré, sont isolés et placés sur milieu LSZ dans une chambre de culture à une température constante de 26°C, sous une intensité lumineuse de 120 $\mu$ moles.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et une photopériode de 16h « lumière » et 8h « obscurité », pendant 2 à 3 semaines. Les plantules régénérées sont transférées et cultivées pendant 1 à 2 semaines supplémentaires dans les mêmes conditions sur un milieu LSZ neuf et acclimatées en phytotron pendant 1 semaine avant d'être cultivées en serre.

#### **2. Transformation stable du tabac PBD6 par *Agrobacterium tumefaciens***

La transformation du tabac est réalisée en infectant des disques foliaires, isolés à partir de plantules de tabac *in vitro* âgées de 6 semaines, par des agrobactéries recombinantes selon la méthode décrite par Horsch *et al.* (1985). Toutes les cultures *in vitro* sont réalisées dans une enceinte climatisée à température constante de 26°C, sous une intensité lumineuse de 160 $\mu$ moles.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et une photopériode de 16h « lumière » et 8h

« obscurité ». Hormis pour l'étape initiale de co-culture, les étapes de régénération, de développement et d'enracinement sont réalisées en présence de bactériostatique, l'augmentin et d'agent sélectif, la kanamycine. La composition des milieux de culture est donnée dans le tableau 8 et les différentes étapes de la transformation sont les suivants:

- Après une préculture des agrobactéries (28°C, 225rpm, 48h) dans 5mL de milieu 2YT liquide supplémenté en rifampicine (50µg/mL) et kanamycine (50µg/mL), une culture de 10mL est réalisée O/N (28°C, 225rpm). Les bactéries sont récoltées par centrifugation (3000g, 10min.) et resuspendues dans 10mL de milieu MS-30 liquide.

- La co-culture est réalisée en plaçant les explants foliaires découpés à partir des feuilles des plantules *in vitro* d'environ 1cm<sup>2</sup> au contact de la suspension d'agrobactéries diluée au 1/10<sup>e</sup> dans le milieu MS-30 liquide, pendant 20min. Les explants ainsi traités sont séchés rapidement sur papier filtre et placés sur le milieu de co-culture, MC-solide pendant 48h dans l'enceinte climatisée.

- Les explants sont ensuite placés sur le milieu de régénération pendant 2 semaines et repiqués sur le même milieu pendant 2 semaines supplémentaires.

- Les bourgeons sont alors repiqués sur le milieu de développement.

- Après 2 semaines de développement, les plantules transformées sont bouturées sur le milieu de développement et cultivées pendant 2 à 3 semaines. A ce stade, les plantules sont placées en Giffy, acclimatées 10 jours en phytotron et cultivées en serre.

## **IV. Méthodes d'analyses relatives aux protéines.**

### **1. Dosage luminométrique des activités enzymatiques dans les tissus végétaux.**

#### **1.1. Préparation de l'extrait brut clarifié.**

Les échantillons transgéniques sont congelés à l'azote liquide et broyés à l'aide d'une tige de verre adaptée sur une perceuse. La poudre est resuspendue dans le tampon d'extraction CDTA (25mM Tris-Phosphate, pH7,8, 2mM DTT, 2mM acide 1,2-

diaminocyclohexane, N,N,N',N'-tétracétique, 10% glycérol, 1% Triton X100) à raison de 1 ml de tampon pour 250 mg de tissu. Le mélange est homogénéisé puis incubé pendant 1h à 4°C avant d'être clarifié par centrifugation pendant 5min. à 16000g.

### **1.2. Dosage luminométrique de l'activité $\beta$ -glucuronidase.**

L'activité GUS est mesurée sur 10 $\mu$ l d'extrait brut clarifié à l'aide du kit de détection "GUS-Light chemiluminescent reporter gene assay" (Tropix Inc., Bedford, USA) selon les recommandations du fournisseur. Cent microlitres de réactif « GUS Reaction Buffer » sont ajoutés à 10 $\mu$ L d'extrait brut clarifié, le mélange est incubé 55min. à température ambiante et 5min. à 4°C. La mesure de l'émission de lumière est effectuée à 4°C à l'aide d'un luminomètre « Lumat LB 9507 » (EGG-Berthold, Bad Wildbad, Allemagne). Après injection automatique de 100 $\mu$ L de réactif « Light Emission Accelerator », un délai de 2sec. est respecté et le nombre de photons émis est mesuré pendant 10sec. La valeur calculée correspond à des unités relatives de lumière (RLU).

### **1.3. Dosage luminométrique de l'activité luciférase.**

L'activité LUC est mesurée à l'aide du kit de détection « Luciferase Assay System » (Promega Corp., Madison, USA) selon les recommandations du fournisseur à partir 10 $\mu$ l d'extrait brut clarifié préalablement incubés 5min. à 4°C. La mesure de l'émission de lumière est effectuée à 4°C à l'aide du luminomètre « Lumat LB 9507 ». Après injection automatique de 50 $\mu$ L de réactif « Luciferase Assay Reagent », un délai de 2sec. est respecté et le nombre de photons émis est mesuré pendant 10sec. La valeur calculée correspond à des unités relatives de lumière (RLU).

## **2. Dosage des protéines solubles.**

La quantité de protéines solubles présentes dans l'extrait brut est déterminée selon la technique de Bradford (1976). Deux cent microlitres de réactif « Bio-Rad Protein Assay » (Bio-Rad, München, Allemagne) sont ajoutés à 10 $\mu$ L d'extrait brut clarifié préalablement dilué au 1/10<sup>e</sup> avec de l'eau UP. Une gamme étalon de concentrations connues de BSA (Biolabs) est réalisée en parallèle. Deux dosages simultanés sont effectués pour chaque échantillon à l'aide de l'appareil « iEMS Reader MF »

(Labsystems) et les mesures sont analysées grâce au logiciel « BIOLISE » pour Windows (Version 2.0 Rev 15<sup>©</sup> Biolise 1994).

### **3. Révélation histochimique de l'activité de la $\beta$ -glucuronidase.**

L'activité de la  $\beta$ -glucuronidase peut-être révélée par coloration histochimique comme décrit par Jeffersson *et al.* (1987). Les tissus végétaux sont incubés de 2 à 24h à 37°C dans le tampon X-Gluc (Tableau 9).

Après coloration, les albumens de maïs sont directement analysés ou conservés stérilement à 4°C plusieurs semaines. Les feuilles de tabac sont dépigmentées par deux passages successifs dans des bains d'éthanol (95%) pendant respectivement 3 et 12 h, rincées dans l'eau UP et séchées à plat entre deux feuilles de cellophane.

## **V. Expériences de retard de migration sur gel.**

### **1. Préparation des protéines nucléaires d'albumens de maïs L2.**

L'extrait nucléaire d'albumens de maïs à été obtenu à partir de 100 grains récoltés au stade de développement 13DAP et soigneusement disséqués afin d'éliminer le péricarpe, l'embryon, les cellules de l'aleurone et le tissu inerte de l'albumen. L'ensemble de la procédure a été réalisée à 4°C et la composition des tampons utilisés est données dans le Tableau 10.

Après congélation à l'azote liquide et broyage à l'aide d'un mortier, la fine poudre est homogénéisée dans 20mL de tampon A. Le mélange est centrifugé (3000g, 4°C, 20min.) et le culot est lavé dans 8mL de tampon A (2000g, 4°C, 15min.). Le culot est alors délicatement repris dans ½ volume du PNV (volume nucléaire du culot) estimé avec le tampon LSB « Low Salt Buffer » et le tampon HSB « high salt buffer » est additionné pour enrichir la conductivité jusqu'à 35mS (une solution de KCl à 350mM a été utilisée comme standard pour mesurer la conductivité à l'aide d'un conductimètre « CyberScan 100 »). Le lysat nucléaire est incubé 30min. à 4°C sous agitation et centrifugé (16000g, 4°C, 20min.). Le surnagent est dialysé contre 1L de tampon B jusqu'à ce que la conductivité de l'extrait soit égale à celle du tampon de dialyse

(environ 1h). L'extrait est centrifugé (16000g, 4°C, 30min.) et les protéines nucléaires sont quantifiées par le test de Bradford, comme décrit précédemment. Les aliquotes de l'extrait nucléaire sont congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C.

## **2. Préparation des protéines nucléaires de feuilles de tabac.**

L'extrait nucléaire de feuilles de tabac a été obtenu à partir de 15g de feuilles récoltés sur des plants de tabac âgés de 3 mois après acclimatation en serre. L'ensemble de la procédure a été réalisée à 4°C. La composition des tampons utilisés est donnée dans le Tableau 10.

Après congélation à l'azote liquide et broyage à l'aide d'un mortier, la fine poudre est homogénéisée dans 80mL de tampon A. Après filtration sur toile de nylon, le mélange est centrifugé (1800g, 4°C, 20min.) et le culot est lavé dans 60mL de tampon A (1800g, 4°C, 15min.). Le culot est alors délicatement repris avec 750µL de tampon LSB et le tampon HSB est additionné pour enrichir la conductivité jusqu'à 35mS. Le lysat nucléaire est incubé 30min. à 4°C sous agitation et centrifugé (16000g, 4°C, 25min.). Le surnageant est dialysé contre 1L de tampon B jusqu'à ce que la conductivité de l'extrait soit égale à celle du tampon de dialyse (environ 1h). Le dialysat est centrifugé (16000g, 4°C, 30min.) et les protéines nucléaires sont quantifiées par le test de Bradford, comme décrit précédemment. Les aliquotes de l'extrait nucléaire sont congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C.

## **3. Retard de migration (EMSA).**

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est obtenu par hybridation de 2 oligodésoxynucléotides complémentaires chevauchants (OLIGO EXPRESS, Paris; 2µg chacun) en présence de tampon d'hybridation 1X (Tableau 11) dans un volume final de 40µL, après incubation 5min. à 85°C et refroidissement lent jusqu'à température ambiante.

Cent nanogrammes du fragment d'ADN ainsi reconstitué sont marqués par incorporation de 10µCi de  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci mmol<sup>-1</sup>, Amersham Pharmacia Biotech), au niveau des extrémités 5' sortantes sous l'action de 20U du fragment de Klenow en présence de 50mM Tris-HCl (pH7,5), 50mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT et 50µM de chacun des dNTP (excepté le dCTP), pendant 30min. à 37°C.

Un nanogramme théorique de l'ADN marqué, préalablement purifié sur colonne Microspin™ G-25 (Amersham Pharmacia Biotech), est incubé avec 3 à 6µg d'extraits nucléaires dans un tampon de liaison 1X (Tableau 12), en présence de 1µg de Poly(dI-dC).(dI-dC) (Amersham Pharmacia Biotech), 25µg de BSA (New England Biolabs) et 0.1% de Triton X100, dans un volume final de 20µL pendant 20min. à température ambiante.

Lors des tests de compétition, les extraits nucléaires sont pré-incubés avec un excès molaire d'ADN compétiteur non radioactif pendant 20min. sur la glace.

#### **4. « Proteolytic Clipping Bandshift Assay » (PCBA).**

Le test PCBA est adapté de la technique décrite par Skeiky et Iatrou, 1991. Les complexes « ADN-protéines » obtenus par la technique de retard sur gel, sont préalablement protéolysés sous l'action de quantité croissante de trypsine en solution dans l'eau pendant 10min. à 4°C.

#### **5. Méthodes d'analyse des complexes « ADN-protéines »**

Les complexes « ADN-protéines » sont analysés sur gel de polyacrylamide non dénaturant à 5% (Tableau 13), dans du TBE 0.5X. Après électrophorèse (10V.cm<sup>-1</sup>, 3h30min. à 4°C), les gels sont séchés à l'aide d'un « Gel Dryer » (BIO-RAD) et autoradiographiés à -80°C à l'aide d'écrans amplificateurs. Les films « BIOMAX™ MS » (Kodak Scientific Imaging Film, 20.3 x 25.4cm) sont ensuite développés à l'aide de l'appareil « Hyperprocessor » (Amersham Pharmacia Biotech).

# RESULTATS & DISCUSSION

## I. Description des séquences promotrices dérivées de PrHMWG-Dx5.

Les promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 décrits dans ce travail ont été fusionnés en amont de la séquence codante *uidA-IV2* du gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase d'*Escherichia coli* contenant la séquence de l'intron IV2 du gène *st-lsi* de la patatine de pomme de terre (Vancanneyt *et al.*, 1990) (*uidA-IV2*) et du terminateur du gène de la nopaline synthase (*Tnos*) d'*Agrobacterium tumefaciens* afin d'évaluer leur capacité à diriger l'activité GUS dans les plantes.

Les promoteurs  $\gamma Z$  (1,7kb) et 526 $\gamma Z$  (Marzábal *et al.*, 1998) du gène  $\gamma$ -zéïne ZC2 (#53514) ont été utilisés en tant que promoteurs forts de référence dans l'albumen de maïs (*Zea mays* L.) et le promoteur double 35S (E35S) du CaMV constitue le promoteur fort de référence dans les feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum* L., cultivar PBD6).

### 1. Analyse structurale détaillée du promoteur HMWG-Dx5 original.

#### 1.1. Caractérisation théorique de la séquence promotrice du gène HMWG-Dx5 de blé, données bibliographiques.

Le promoteur entier du gène de glutenine de haut poids moléculaire codant pour la sous-unité Dx5 (PrHMWG-Dx5) du blé hexaploïde *Triticum aestivum* L. cv *Cheyenne* (Anderson *et al.*, 1989) correspond à une séquence de 417pb (#X12928) allant de la position -378 à la position +39, sur laquelle diverses séquences potentiellement régulatrices sont identifiées et listées de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', par rapport au point +1 d'initiation de la transcription (Figure 21) :

- Deux boîtes prolamines « like » localisées respectivement aux positions -357 à -350 (Pb2, 5'-TGCAAAG-3') et -182 à -176pb (Pb1, 5'-TGCAAAG-3') lesquelles sont potentiellement la cible du facteur de transcription PBF dans l'albumen de maïs.

- Deux boîtes GATA s'étendant respectivement des positions -309 à -306 et -292 à -289. Le motif GATA a été rapporté comme étant un élément important, nécessaire pour l'activité de nombreux promoteurs régulés par la lumière (Terzaghi et Cashmore, 1995).
- Une boîte G « like » (G-box, 5'-TTACGTGG-3'), s'étendant des positions -218 à -211. Le motif core 5'-ACGT-3' qui la caractérise a été identifié dans de nombreux promoteurs de plantes mais sa contribution fonctionnelle dans la régulation transcriptionnelle est définie dans peu de cas. La plupart des expériences ont corrélé la perte de l'activité transcriptionnelle avec la délétion ou la mutation des séquences d'ADN qui comportent un motif 5'-ACGT-3'. De cette manière, les boîtes G « like » ont été montrées comme étant nécessaires pour une expression maximale de nombreux promoteurs (Foster *et al.*, 1994).
- Un élément enhancer de 38pb, fortement homologue à l'élément enhancer identifié par Thomas et Flavell (1990) dans le promoteur du gène HMWG codant pour la sous-unité Dy10 (*glu-1D2*), s'étendant des positions -186 à -149 et composé d'une mosaïque de motifs *cis*-activateurs putatifs :
  - . La boîte prolamine (Pb1) cité ci-dessus,
  - . Une répétition directe des pentadésoxynucléotides 5'-GCTCC-3' et 5'-TTGCT-3', respectivement entre les positions -176 et -163 et les positions -169 et -158,
  - . Une boîte E (5'-CANNTG-3'), s'étendant des positions -172 à -167, laquelle est décrite conférer une expression spécifique des gènes  $\beta$ -phaséolines dans les grains de haricot, en synergie avec une G-box (Kawagoe *et al.*, 1994)
- Un motif AACA (5'-CTAAACAAACCTC-3'), s'étendant des positions -82 à -76, qui présente une forte homologie avec l'élément de réponse aux gibbérellines (GARE, 5'-TAACAAA-3', Gubler et Jacobsen, 1992) et avec le motif AACA présent dans le promoteur de différents gènes de glutélines de riz (Takaiwa et Oono, 1990 ; Zheng *et al.*, 1993).
- Une boîte TATA (5'-TATAAAA-3') des positions -30 à -24.
- Le point +1 d'initiation de la transcription (position 1).
- Une région 5' non traduite allant des positions +1 à +39.

A l'exception de l'élément enhancer initialement décrit et caractérisé par Thomas et Flavell (1990) dans la séquence promotrice du gène *glu-1D2*, lequel est un élément régulateur majeur commun à tous les promoteurs de gluténines-HMW, le rôle fonctionnel des éléments *cis*-activateurs putatifs identifiés ci-dessus n'a pas été établi.

Les travaux de Halford *et al.* (1989) ont permis de montrer que la séquence de PrHMWG-Dx5 qui s'étend des nucléotides -277 à + 39 est adéquate pour diriger le contrôle spatio-temporel de l'expression du gène rapporteur *gus* dans les graines de tabac. Plus récemment, l'activité albumen-spécifique de la séquence de Pr-HMWG-Dx5 qui s'étend des positions -1191 à +58 a été rapportée dans le blé transgénique (Lamacchia *et al.*, 2001).

## 1.2. Création de promoteurs HMWG-Dx5 modifiés.

Pour identifier et caractériser les éléments *cis*-régulateurs du promoteur HMWG-Dx5 fonctionnellement importants, une série de promoteurs synthétiques présentant soit des délétions progressives de la régions 5', soit une délétion interne ou soit des duplications d'une portion interne a été créée (Figure 22).

Les promoteurs MPr1128, MPr1127, MPr1126 et MPr1197 présentent des délétions progressives de l'extrémité 5' de PrHMWG-Dx5 qui éliminent de manière séquentielle les éléments *cis*-régulateurs putatifs précédemment décrits :

- MPr1128 dérive de PrHMWG-Dx5 par délétion de la séquence située en amont du nucléotide -238, laquelle comporte la boîte prolamine « like » Pb2 et deux motifs GATA.
- MPr1127 se différencie de MPr1128 par délétion de la séquence située en amont du nucléotide -205, laquelle comporte la boîte « G » like.
- MPr1126 se différencie de MPr1127 par délétion de la séquence située en amont du nucléotide -142, laquelle comporte l'élément enhancer identifié par Thomas et Flavell (1990).
- MPr1197 se différencie de MPr1126 par délétion de la séquence promotrice située en amont du nucléotide -57, laquelle comporte essentiellement le motif AACA. Il constitue le promoteur HMWG-Dx5 minimal étudié dans ce projet.

Le promoteur MPr1198 dérive du promoteur MPr1128 par délétion de la région promotrice interne qui s'étend des positions -135 à -59 et comporte essentiellement le motif *cis*-régulateur putatif AACA.

Les promoteurs MPr1216 et MPr1217 présentent une répétition en tandem direct de un et de deux exemplaires de la région promotrice de MPr1128 qui s'étend des nucléotides -225 à -136. Cette séquence unitaire de 38pb comporte la boîte « G » like et l'élément activateur décrit par Thomas et Flavell (1990).

## 2. Promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5.

### 2.1. Description des séquences promotrices exogènes.

#### 2.1.1. Les séquences activatrices 1 et 2 du promoteur 35S du CaMV.

Les séquences activatrices 1 (as-1) et 2 (as-2) du promoteur 35S du CaMV sont les éléments *cis*-activateurs les plus puissants actifs dans les plantes, décrits à ce jour. Ils sont en partie responsables de l'activité élevée du promoteur 35S du CaMV dans la plupart des tissus végétaux testés (Jensen *et al.*, 1986).

##### - L'élément as-1.

Historiquement, l'élément as-1 appartient à une famille d'éléments régulateurs utilisés par les bactéries et les virus pour exprimer certains de leurs gènes dans les plantes (Bouchez *et al.*, 1989 ; Lam *et al.*, 1989). Ce type de séquences *cis*-activatrices a initialement été découvert dans la séquence promotrice du gène de l'octopine synthase (*ocs*) d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'où son nom le plus courant, « ocs-element » (Ellis *et al.*, 1987). Chez les plantes, des éléments as-1 « like » ont également été identifiés dans le promoteur du gène *Gmhsp26-A* de soja (Ellis *et al.*, 1993) et d'autres gènes qui sont identifiés comme étant inductibles par l'auxine [*Nicotiana tabacum* (*Nt*) *ParA* (Sakai *et al.*, 1998 ; Takahashi *et al.*, 1991) ; *Nt103* (Droog *et al.*, 1995 ; Van der Zaal *et al.*, 1991) ; *Arabidopsis thaliana* (*At*) *GST6* (Chen *et al.*, 1996)] ou par l'acide salicylique [*NtIEGT* (Horvath et Chua, 1996) ; *AtPR-1* (Zhang *et al.*, 1999) ; *NtPR-1a* (Strompen *et al.*, 1998)] (Figure 23).

L'élément as-1 du promoteur 35S du CaMV est une séquence de 21 pb qui s'étend des nucléotides -83 à -63 (Lam *et al.*, 1989), caractérisée par la présence de deux copies en tandem direct du motif core 5'-TGACG(T/C)-3'. Il est responsable de l'expression du promoteur 35S minimal (90 pb) dans les racines et joue un rôle plus complexe *via* des interactions synergiques et combinées avec d'autres éléments *cis*-activateurs dans le promoteur 35S entier (Fang *et al.*, 1989 ; Benfey *et al.*, 1989, 1990a et 1990b). L'élément as-1 est la cible d'un facteur de transcription de type bZIP appelé TGA1a, lequel est exprimé dans les feuilles de tabac à un niveau 5 à 10 fois plus faible que dans

les racines (Katagiri *et al.*, 1989). Enfin, Qin *et al.* (1994) ont montré que l'élément as-1 confère une expression rapide et transitoire en réponse à l'acide salicylique.

#### **- L'élément as-2.**

L'élément as-2 du promoteur 35S du CaMV (5'-GATGTGATA-3' positionné entre les nucléotides -98 et -90) est caractérisé par la présence d'un motif core GATA, lequel est un élément important et nécessaire pour l'activité de nombreux promoteurs régulés par la lumière (Luan et Bogorad, 1992 ; Terzaghi et Cashmore, 1995). Il se comporte comme un activateur transcriptionnel et agit en synergie avec l'élément as-1 pour conférer une expression élevée dans les tissus photosynthétiques (Lam et Chua, 1989). La séquence as-2 est la cible du facteur de transcription GATA1 trouvé dans les extraits nucléaires des feuilles de tabac mais absent des extraits nucléaires de racines (Benfey et Chua, 1990).

#### **2.1.2. Les boîtes céréales du promoteur HMWG-Bx7 de blé.**

La boîte céréale est une séquence de 23 nucléotides conservée dans les séquences promotrices des gènes de gluténines-HMW, impliquée dans l'expression graine-spécifique (Forde *et al.*, 1985). Dans la séquence promotrice du gène *glu-1B1* du cultivar Cheyenne de blé, l'expression élevée du polypeptide Bx7 qui s'accumule à un niveau plus élevé que les autres gluténines-HMW, avec des variations parmi les cultivars, a été attribuée à la duplication d'un fragment de 54 pb qui contient la boîte céréale au cours de l'évolution (Anderson et Greene, 1989 ; Marchylo *et al.*, 1992 ; Kolster *et al.*, 1993). L'identification et l'analyse des séquences promotrices Bx de deux autres cultivars de blé et d'un blé tétraploïde sauvage ont révélé que la duplication de la boîte céréale est antérieure à l'origine du blé hexaploïde et par conséquent, ne fournit aucune preuve pour expliquer les variations des niveaux de synthèse de la sous-unité Bx d'un cultivar à l'autre (Anderson *et al.*, 1998). Cette dernière observation remet fortement en cause l'importance fonctionnelle des boîtes céréales dans la régulation transcriptionnelle des gènes de gluténines-HMW. Cependant, il n'est pas exclu que les variations des niveaux de synthèse de la sous-unité Bx d'un cultivar à l'autre ne puissent être liées à un facteur *cis* et/ou *trans*, qui ne dépendrait pas des boîtes céréales.

## 2.2. Création de promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5.

Dans la perspective de créer des promoteurs forts, nous avons construit des promoteurs chimériques combinant la séquence promotrice de PrHMWG-Dx5 aux séquences activatrices 1 (as-1, Lam *et al.*, 1989) et 2 (as-2, Lam et Chua, 1989) du promoteur 35S du CaMV et/ou aux boîtes céréales (Forde *et al.*, 1985) du promoteur du gène *glu-B1-1* de gluténine de haut poids moléculaire de blé qui code pour la sous-unité Bx7 (PrHMWG-Bx7).

Les promoteurs MPr1131 et MPr1130 (Figure 24), résultent respectivement de l'insertion à la position -65 du promoteur HMWG-Dx5 d'une séquence de 38pb comportant les motifs as-2 et as-1 du promoteur 35S du CaMV (« as-2/as-1 ») et d'une séquence de 55pb comportant une duplication du motif as-2 et le motif as-1 du promoteur 35S du CaMV (« as-2/as-2/as-1 »).

Des délétions progressives de l'extrémité 5' de MPr1131 et de MPr1130 ont été réalisées afin d'identifier (i) un mode d'action combinatoire ou des interactions synergiques potentielles entre les motifs *cis*-régulateurs du promoteur HMWG-Dx5 et les séquences as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV et, (ii) la séquence minimale nécessaire et suffisante pour diriger une activité GUS maximale. Les promoteurs MPr1138, MPr1137 et MPr1136 résultants (Figure 24) correspondent respectivement aux promoteurs MPr1128, MPr1127 et MPr1126 précédemment décrits, excepté qu'ils présentent à la position -65 la séquence de 38pb (« as-2/as-1 ») qui comporte les séquences activatrices 1 et 2 du promoteur 35S du CaMV. Le promoteur MPr1135 (Figure 24) correspond au promoteur MPr1128 précédemment décrit, excepté qu'il présente à la position -65 la séquence de 55pb (« as-2/as-2/as-1 ») qui comporte deux motifs as-2 et un motif as-1 du promoteur 35S du CaMV.

Enfin, les promoteurs MPr1139, MPr1200 et MPr1213 (Figure 25) résultent de l'insertion d'une séquence nucléotidique qui inclut la duplication de la boîte céréale de PrHMWG-Bx7, respectivement aux positions -405 de MPr1131, -263 de MPr1138 et -225 de MPr1128. Ils ont été conçus pour évaluer l'influence transcriptionnelle des boîtes céréales sur l'activité des éléments *cis*-régulateurs de PrHMWG-Dx5 et/ou des séquences as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV.

## **II. Activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans le maïs.**

### **1. Expression transitoire dans l'albumen de maïs.**

La capacité du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs dérivés à diriger l'expression  $\beta$ -glucuronidase a été évaluée dans des albumens de maïs transformés par biolistique au stade de développement 12 jours après pollinisation (DAP).

#### **1.1. Coloration histochimique des albumens de maïs.**

La révélation histochimique de l'activité de la  $\beta$ -glucuronidase a été réalisée sur des coupes tangentielles d'albumens de maïs préalablement transformés par biolistique avec un plasmide d'expression transitoire, essentiellement afin de vérifier la fonctionnalité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5. Les promoteurs ont été regroupés dans trois catégories en fonction du nombre de spots bleus observés, en tenant compte de leur aspect, ronds et réguliers ou diffus (Figure 26) :

- L'activité des promoteurs MPr1197, MPr1126 et MPrT1127 dans les albumens correspond systématiquement à un nombre de points bleus inférieur à 50. La présence de spots bleus sur les albumens transformés avec la construction pMRT1197, indique que la séquence de 96pb de MPr1197 (seulement 57pb en amont du site d'initiation de la transcription) constitue la séquence promotrice minimale du promoteur HMWG-Dx5, capable de diriger une activité transcriptionnelle de base dans l'albumen de maïs. L'absence de spots bleus sur les albumens bombardés par la construction pMRT1144, laquelle est dépourvue de séquence promotrice (témoin négatif), témoigne de la fonctionnalité des promoteurs regroupés dans cette catégorie.

- L'activité des promoteurs MPr1128, MPr1213, MPr1216, MPr1217, MPr1136, MPr1137, MPr1138 et MPr1135 dans les albumens correspond en moyenne à un nombre de points bleus équivalent à celui des albumens transformés par les constructions pMRT1125 (PrHMWG-Dx5, promoteur de référence) et pMRT1276 (promoteur  $\gamma$ Z, témoin positif).

- Enfin, l'activité des promoteurs MPr1130, MPr1131, MPr1139 et MPr1200 dans les albumens correspond à une coloration bleue intense et diffuse qui rend difficile le dénombrement des points bleus, mais suggère que les promoteurs MPr1130, MPr1131, MPr1139 et MPr1200 sont très fortement actifs dans l'albumen de maïs au stade de développement 12 DAP.

## **1.2. Dosage luminométrique de l'activité $\beta$ -glucuronidase dans l'albumen de maïs.**

Dans les expériences de transformation transitoire où l'activité du promoteur étudié a été évaluée par un dosage luminométrique, le plasmide pCaMV35Sluc (Torrent *et al.*, 1997) qui contient la cassette d'expression du gène rapporteur luciférase (*luc*) sous contrôle du promoteur et du terminateur 35S du CaMV, a été utilisé en tant que contrôle interne de référence afin de normaliser les variations de l'activité GUS entre les différents tests (Leckie *et al.*, 1994).

Les activités  $\beta$ -glucuronidase et luciférase ont été mesurées par dosage luminométrique d'un extrait brut clarifié préparés à partir de 3 sections tangentielles d'albumens de maïs, préalablement co-transformées par biolistique avec un plasmide d'expression transitoire et pCaMV35Sluc. Les activités rapportées dans les figures 27 et 28 sous forme de barre d'histogramme correspondent au rapport entre l'activité GUS et l'activité LUC mesurées. Ces valeurs représentent la moyenne de 5 à 10 essais indépendants et l'erreur standard à la moyenne est indiquée.

Pour analyser l'effet des différentes modifications apportées à chacune des séquences promotrices décrites dans ce travail, les promoteurs ont été répartis en deux groupes distincts pour réaliser d'une part une dissection fonctionnelle détaillée du promoteur HMWG-Dx5 et, déterminer d'autre part l'influence des éléments *cis*-activateurs exogènes fusionnés au promoteur HMWG-Dx5.

### **1.2.1. Dissection fonctionnelle détaillée de PrHMWG-Dx5.**

Les activités GUS dirigées par les promoteurs MPr1128, MPr1127, MPr1126, MPr1197, MPr1198, MPr1216, MPr1217 ont été comparées entre elles et avec celles obtenues sous le contrôle du promoteur de référence HMWG-Dx5 original et du promoteur fort  $\gamma$ Z. La construction pMRT1144, laquelle est dépourvue de séquence

promotrice, constitue le contrôle négatif. Les résultats des dosages luminométriques (Figure 27) permettent de dégager plusieurs informations :

- Le promoteur HMWG-Dx5 de blé est capable de diriger une activité GUS à un niveau équivalent à celui obtenu avec le promoteur fort de référence  $\gamma$ Z en expression transitoire dans des albumens de maïs immatures au stade de développement 12 DAP.
- Les délétions progressives de la région 5' du promoteur HMWG-Dx5 entraînent une diminution progressive de l'activité  $\beta$ -glucuronidase conférée par les promoteurs résultants. La séquence promotrice entière de PrHMWG-Dx5 de 417pb semble donc nécessaire pour permettre une activité maximale du promoteur HMWG-Dx5.
- La faible différence d'activité enregistrée entre les promoteur MPr1128 et PrHMWG-Dx5 montre que la séquence située en amont du nucléotide -238 ne contient pas les éléments *cis*-activateurs majeurs, responsables de l'activité du promoteur HMWG-Dx5. En particulier, la boîte prolamine Pb2 ne semble pas avoir un rôle fonctionnel essentiel.
- La diminution significative d'activité entre les promoteurs MPr1128 et MPr1127 laisse suggérer que la séquence située en amont du nucléotide -205, laquelle renferme la boîte G « like », joue un rôle capital pour l'activité du promoteur HMWG-Dx5.
- La faible différence d'activité enregistrée entre les promoteur MPr1127 et MPr1126 ne permet pas de conclure quant au rôle réel de l'élément activateur décrit par Thomas et Flavell (1990). A lui seul, il ne semble pas avoir d'impact sur l'activité de MPr1127.
- L'activité très faible du promoteur MPr1197, néanmoins supérieure à celle obtenue avec la construction pMRT1144 qui ne contient pas de promoteur, confirme que la séquence minimale de 96pb de PrHMWG-Dx5 (seulement 57pb en amont du site d'initiation de la transcription) est suffisante pour conférer un niveau de transcription basal.
- La faible activité de MPr1198, comparée à celle de MPr1128 indique que la séquence de PrHMWG-Dx5 s'étendant des nucléotides -59 à -135 joue un rôle prépondérant dans l'activité du promoteur HMWG-Dx5. Ce résultat laisse supposer que l'accessibilité et par conséquent, la fonctionnalité de la boîte G « like » et de l'élément activateur pour les facteurs *trans*-activateurs, dépend de la distance qui les sépare de la boîte TATA. Cependant, il ne peut être exclu que le motif AACA

présent dans cette portion de séquence soit un élément *cis*-régulateur fonctionnellement important pour l'activité de PrHMWG-Dx5. L'homologie de sa séquence 5'-TAAACAAACCT-3' avec celle du motif consensus AACCA (Figure 12) supporte cette possibilité (Royo *et al.*, 1996 ; Takaiwa *et al.*, 1996 ; Marzabábal *et al.*, 1998 ; Diaz *et al.*, 2002). Pour tester cette hypothèse, il aurait notamment été intéressant de comparer l'activité des promoteurs MPr1128, MPr1127 ou MPr1126 à celle des promoteurs correspondants spécifiquement mutés au niveau du motif AACCA.

- La répétition en tandem direct respectivement de un ou de deux exemplaires de la séquence de MPr1128 qui s'étend des nucléotides -136 à -225, laquelle abrite la boîte G « like » et l'élément activateur, ne confère pas aux promoteurs MPr1216 et MPr1217 d'effet *cis*-activateur additif supplémentaire en expression transitoire dans l'albumen de maïs. L'activité  $\beta$ -glucuronidase qu'ils dirigent n'est pas significativement différente de celle de MPr1128.

### 1.2.2. Effets *cis*-activateurs des séquences exogènes associées.

Les activités GUS dirigées par les promoteurs MPr1131, MPr1136, MPr1137, MPr1138, MPr1130, MPr1139, MPr1200 et MPr1213 ont été comparées entre elles et avec celles obtenues sous le contrôle du promoteur de référence HMWG-Dx5 original et du promoteur MPr1128. Les résultats des dosages luminométriques (Figure 28 et Tableau 14) permettent de dégager plusieurs informations :

- La fusion des séquences activatrices as-2 (Lam et Chua, 1989) et as-1 (Lam *et al.*, 1989) du promoteur 35S du CaMV à la position -65 de PrHMWG-Dx5 et des promoteurs dérivés de PrHMWG-Dx5 (MPr1128, MPr1127 et MPr1126), potentialise très fortement l'activité des promoteurs MPr1130, MPr1131, MPr1136, MPr1137 et MPr1138 résultants. L'effet enregistré est un effet additif qui semble s'exercer indépendamment de chacun des éléments *cis*-régulateurs de PrHMWG-Dx5. La diminution progressive de l'activité des promoteurs MPr1131, MPr1138, MPr1137 et MPr1136, qui coïncide respectivement avec les délétions 5' progressives de PrHMWG-Dx5 et l'élimination séquentielle des différents éléments *cis*-régulateurs, en témoigne. De manière globale, la présence des séquences activatrices as-2 et as-1 du promoteur 35S du CaMV améliore d'un facteur  $4,5 \pm 1$  l'activité des promoteurs résultants. La comparaison des facteurs d'activation suggère qu'en

présence de la boîte G « like », l'effet activateur additif conféré par la séquence « as-2/as-1 » est dilué.

- La comparaison de l'activité des promoteurs MPr1130 et MPr1131 indique que la duplication de la séquence activatrice as-2 du promoteur 35S du CaMV n'engendre pas un effet activateur additif significatif. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où le motif as-2 est rapporté être un élément de réponse à la lumière de beaucoup de promoteurs exprimés dans les tissus photosynthétiques (Luan et Bogorad, 1992 ; Terzaghi et Cashmore, 1995).

- La fusion des boîtes céréales du promoteur du gène de gluténine de haut poids moléculaire codant pour la sous-unité Bx7 du blé hexaploïde (*Triticum aestivum*) cv. Cheyenne (Forde *et al.*, 1985) en amont des promoteurs MPr1131 et MPr1138 améliore très fortement, respectivement d'un facteur 1,7 et 2,3 l'activité des promoteurs MPr1139 et MPr1200 résultants.

- L'activité des promoteurs MPr1139 et MPr1200, laquelle est respectivement 6,2 et 8,2 fois plus élevée que celle des promoteurs HMWG-Dx5 et MPr1128, indique que les séquences as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV agissent en synergie avec les boîtes céréales de PrHMWG-Bx7 pour conférer un effet cis-activateur puissant en expression transitoire dans l'albumen de maïs.

- Enfin, l'activité faible du promoteur MPr1213, lequel correspond à la fusion des boîtes « céréales » en amont du promoteur MPr1128, laisse suggérer qu'elles n'ont aucun effet activateur significatif en combinaison avec les éléments *cis*-régulateurs potentiels de PrHMWG-Dx5, incluant entre autres la boîte G « like », l'élément activateur et le motif AACAA. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la fonction des boîtes céréales soit liée à leur position au sein de la séquence promotrice ; dans le contexte du promoteur MPr1213, elles sont placées entre les nucléotides -244 et -301 alors que dans le promoteur HMWG-Bx7 elles sont localisées entre les positions -365 et -444. Pour vérifier cette hypothèse, il aurait été intéressant de les fusionner en amont du promoteur HMWG-Dx5 entier dans leur position d'origine. D'autre part, nous pouvons également supposer que leur fonction est dépendante de l'environnement chromosomique. La comparaison de l'expression de MPr1213 avec celle de MPr1128 dans les plants de maïs transgéniques pourrait éventuellement nous permettre de répondre à cette question.

En résumé, ces données indiquent que les éléments as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV potentialisent, en expression transitoire dans l'albumen de maïs, l'effet *cis*-

activateur des éléments régulateurs des promoteurs dérivés de PrHMWG-Dx5. La boîte G « like », l'élément activateur et le motif AACA de PrHMWG-Dx5 ainsi que les boîtes céréales de PrHMWG-Bx7 sont vraisemblablement les éléments clés du contrôle combinatoire responsable de l'activité élevée des promoteurs chimériques. Les promoteurs MPr1139 et MPr1200 résultants sont en moyenne de l'ordre de 4 à 6 fois plus actifs que les promoteurs HMWG-Dx5 et  $\gamma Z$ , lesquels sont communément utilisés en biotechnologie végétale pour diriger l'expression des protéines à des taux élevés.

MPr1139 et MPr1200 sont donc des candidats sérieux susceptibles d'améliorer le taux d'expression des protéines hétérologues en expression transitoire dans l'albumen de maïs. Leur avenir en biotechnologie végétale dépend cependant de leur comportement dans les plants de maïs transgéniques ; force et spécificité tissulaire étant les critères clés.

## **2. Expression stable dans le maïs transgénique.**

L'activité des promoteurs synthétiques MPr1139, MPr1131, MPr1200, MPr1216 et MPr1217 a été comparée à celle des promoteurs de référence PrHMWG-Dx5 et 526 $\gamma Z$  en expression stable dans le maïs. Les plants de maïs transgéniques exprimant les cassettes d'expression « MPr1139/*uidA-IV2/Tnos* », « MPr1200/*uidA-IV2/Tnos* », « MPr1216/*uidA-IV2/Tnos* », « MPr1217/*uidA-IV2/Tnos* », « PrHMWG-Dx5/*uidA-IV2/Tnos* » et « 526 $\gamma Z$ /*uidA/Tnos* » ont respectivement été obtenus par transformation du maïs A188 à l'aide des agrobactéries recombinantes A1207p, A1266p, A1268p, A1222p, A1231p et A1209p selon la technique décrite par Ishida *et al.* (1996). L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été déterminée dans les grains T1 (issus du croisement des transformants primaires avec le pollen de la lignée élite L2) récoltés à différents stades du développement et dans les jeunes feuilles des transformants primaires. Une coloration histochimique de l'activité  $\beta$ -glucuronidase a également été effectuée sur différents tissus pour déterminer la spécificité tissulaire des promoteurs étudiés.

### **2.1. Activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans les grains de maïs transgéniques.**

L'activité  $\beta$ -glucuronidase dirigée par les promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 en expression stable dans les grains de maïs, a été mesurée et comparée à celle

dirigée par le promoteur HMWG-Dx5 original. Pour chacune des constructions étudiées, une population de 8 à 16 plantes a été analysée. Six grains par épis ont été prélevés du sommet vers la base de l'épis aux différents stades de développement analysés et les dosages luminométriques de l'activité  $\beta$ -glucuronidase ont été effectués grains par grains. Les activités présentées dans la figure 29 sous forme de barres d'histogramme correspondent à l'activité GUS rapportée à la quantité totale de protéines solubles. Les valeurs sont exprimées en RLU/mg et l'erreur standard par rapport à la moyenne représente les variations de l'activité GUS enregistrées entre les différents grains transformés, qui ont hérité du transgène.

L'activité  $\beta$ -glucuronidase dirigée par les promoteurs MPr1139, MPr1200, MPr1216, MPr1217 et PrHMWG-Dx5 en expression stable dans les grains de maïs récoltés au stade de développement 13 DAP varie considérablement au sein de chacune des populations de plantes. Ce phénomène, lequel a déjà été observé pour la majorité des gènes introduits dans les plantes, peut notamment s'expliquer par les effets de position du transgène. La comparaison des rangs d'activité de chaque population de plantes fournit néanmoins une bonne indication quant à la force respective des différents promoteurs. Il en résulte que le promoteur MPr1217 est en moyenne au moins 2 fois plus actif que MPr1216 et de l'ordre de 4 à 6 fois plus actif que les promoteurs MPr1139, MPr1200 et PrHMWG-Dx5 original dans l'albumen de maïs au stade de développement 13 DAP. La classification des promoteurs chimériques préalablement établie selon leur force en expression transitoire dans l'albumen de maïs n'est pas corrélée à celle des grains transgéniques. Les promoteurs MPr1139 et MPr1200, lesquels étaient très fortement actifs en expression transitoire, dirigent « seulement » une activité GUS similaire à celle de PrHMWG-Dx5 en expression stable dans l'albumen de maïs. Ainsi, l'association des éléments as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV ne confère aucun effet *cis*-régulateur significatif (activateur ou inhibiteur) aux promoteurs MPr1139 et MPr1200 en expression stable dans les grains de maïs. Il en est de même de l'association des boîtes céréales de PrHMWG-Bx7 aux séquences promotrices dérivés de PrHMWG-Dx5 ; le promoteur MPr1131 est capable de diriger une activité GUS au moins aussi élevée que son homologue MPr1139, lequel ne diffère que par la présence des boîtes céréales en 5' de sa séquence (Résultats non montrés). Ce dernier résultat supportent les réserves émises par Anderson *et al.* (1998) quant à l'implication des boîtes céréales dans l'expression élevée du polypeptide Bx7 de blé et remet fortement en cause leur fonction régulatrice supputée dans le contrôle

transcriptionnel des gènes de protéines de réserve. L'effet *cis*-activateur conférée par les boîtes céréales en expression transitoire au sein de MPr1139 et de MPr1200 est surprenant et énigmatique. En contraste, la répétition de la séquence unitaire de PrHMWG-Dx5 (38pb) qui comporte la boîte « G » like et l'élément activateur, confère dans l'environnement chromosomique un effet *cis*-activateur puissant au sein des séquences promotrices MPr1217 et MPr1216. Des dosages luminométriques effectués aux stades de développement 18 et 30 DAP (Figure 30a) indiquent que cet effet *cis*-activateur est maintenu au cours du temps. La force respective de MPr1217 et MPr1216 reste constante (facteur 1,8 à 2.1 en faveur de MPr1217 comparativement à MPr1216) quelque soit le stade de développement du grain analysé malgré des variations considérables de l'activité  $\beta$ -glucuronidase.

Les fluctuations temporelles de l'activité GUS sous le contrôle de MPr1139, de MPr1217 et de MPr1216 ont été comparées à celles observées sous le contrôle du promoteur 526 $\gamma$ Z. Les résultats indiquent que l'activité GUS dirigée par MPr1139 (Figure 30b) est décelable à partir de 10 DAP, atteint un plateau entre 14 et 26 DAP et décline jusqu'à 30 DAP. Ce profil d'expression temporelle de MPr1139 est globalement similaire à celui du promoteur 526 $\gamma$ Z (Figure 30c). Les dosages de l'activité GUS sous contrôle de MPr1217 et de MPr1216 indiquent que leur activité augmente significativement entre 13 à 18 DAP et qu'elle diminue d'environ un facteur 2 entre 18 et 30 DAP (Figure 30a). Par conséquent, les promoteurs chimériques MPr1217, MPr1216 et MPr1139 sont soumis à un contrôle d'expression temporelle similaire à celui du promoteur 526 $\gamma$ Z dans l'albumen de maïs. Ces données indiquent que la régulation temporelle de PrHMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs est guidé par un élément *cis*-régulateur localisé à l'intérieur de la séquence qui s'étend des nucléotides -238 à +39, les séquences en amont du nucléotides -238 n'étant pas présentes dans la séquence promotrice de MPr1217 ou de MPr1216. Le ou les éléments *cis* impliqués ne sont pas perturbés par la fusion des séquences *cis* exogènes (éléments as-1 et as-2, boîtes céréales) au sein de la séquence promotrice de MPr1139. Dans la perspective d'identifier la séquence impliquée dans ce contrôle temporelle, il aurait été intéressant d'étudier en expression stable dans l'albumen de maïs le comportement au cours du temps des promoteurs MPr1127, MPr1126 et MPr1197, lesquels présentent des délétions progressives de l'extrémité 5' qui éliminent respectivement la boîte G « like », l'élément activateur et le motif AACA.

La présence de fluctuations temporelles de l'activité  $\beta$ -glucuronidase, lesquelles sont liées au stade de développement du grain de maïs et donc aux conditions environnementales telles que la lumière et la température, laissent supposer que l'activité GUS sous le contrôle d'un promoteur donné et à un stade de développement donné peut varier considérablement en fonction de la période de récolte des grains en serre, été ou hiver par exemple. En conséquence, l'activité de deux promoteurs distincts ne peut être comparée que si les plants de maïs sont cultivés dans le même laps de temps ; pour contourner cette contrainte, il est toutefois envisageable d'inclure systématiquement une population de plantes témoin afin d'étalonner l'activité du promoteur étudié.

## **2.2. Spécificité tissulaire des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5.**

La spécificité tissulaire des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 a été évaluée par coloration histochimique des différents tissus et organes des plants de maïs transgéniques. Les résultats indiquent que les promoteurs MPr1139, MPr1200, MPr1216 et MPr1217 sont spécifiquement actifs dans le tissu de l'albumen au niveau des grains de maïs (Figure 31a-c) ; aucune coloration bleue n'a été détectée dans l'embryon, les cellules de l'aleurone ou le péricarpe. Par contre, des disparités d'expression ont été révélées dans les parties végétatives des plants de maïs. Alors que le promoteur HMWG-Dx5 original et les promoteurs MPr1216 et MPr1217 sont spécifiquement et strictement actifs dans l'albumen, une coloration bleue a systématiquement été visualisée dans les feuilles (Figure 31d) et les racines (résultats non montrés) de maïs lorsque le gène *gus* était sous le contrôle des promoteurs MPr1139 et MPr1200.

Pour évaluer la force de MPr1139 et MPr1200 dans les tissus photosynthétiques, l'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée dans les feuilles de maïs âgées de 3 semaines après acclimatation en serre (Figure 32). Les données des dosages luminométriques exprimées en RLU/mg de protéines solubles indiquent que les promoteurs MPr1139 et MPr1200 ne sont que faiblement actifs dans les tissus photosynthétiques de maïs. Les valeurs obtenues sont significativement supérieures à celles mesurées dans les plantes non transgéniques ou dans les plantes exprimant la protéine GUS sous le contrôle des promoteurs 526 $\gamma$ Z, MPr1216 ou MPr1217, lesquels sont spécifiquement actifs dans l'albumen.

Ces informations indiquent que la répétition du fragment de PrHMWG-Dx5 qui s'étend des nucléotides -225 à -136, ne modifie pas la régulation spatiale spécifique de la séquence originale de PrHMWG-Dx5. Par contre, les séquences as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV, lesquelles sont absentes de MPr1216 et MPr1217, dérèglent l'activité des promoteurs MPr1139 et MPr1200 dans les feuilles et les racines de maïs. A défaut d'apporter un effet *cis*-activateur puissant, les éléments as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV conservent et confèrent leurs caractéristiques propres aux promoteurs MPr1139 et MPr1200 dans les plants de maïs transgéniques.

### **2.3. Bilan d'activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5.**

Les promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 qui présentent un intérêt en terme de sur-expression de protéines recombinantes dans l'albumen de maïs peuvent être classés dans deux catégories selon leur spécificité tissulaire (Tableau 15) :

- D'une part, les promoteurs MPr1216 et MPr1217 sont spécifiquement et fortement actifs en expression stable dans l'albumen de maïs. La duplication et la « triplification » de la séquence de PrHMWG-Dx5 qui contient la boîte G « like » et l'élément activateur n'a pas modifié la régulation spatio-temporelle propre à leur séquence *cis*-régulatrice d'origine. Le promoteur MPr1217 qui est en moyenne de l'ordre de 4 à 6 fois plus actif que les promoteurs de référence HMWG-Dx5 et 526γZ, est incontestablement un outil puissant capable d'améliorer spécifiquement le taux d'expression des protéines hétérologues dans l'albumen de maïs et probablement dans l'albumen de nombreux grains de céréales telles que le blé ou l'orge par exemple.

- D'autre part, les promoteurs MPr1139 et MPr1200 partagent les caractéristiques des éléments *cis*-régulateurs qui les composent : (i) la séquence promotrice de HMWG-Dx5 leur confère une activité dans le tissu de l'albumen qui n'est pas perturbée par la présence des éléments as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV ou les boîtes céréales de PrHMWG-Bx7 et, (ii) les séquences activatrices as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV sont respectivement responsables de leur activité dans les racines et les feuilles des plants de maïs transgéniques. Les promoteurs MPr1139 et MPr1200, lesquels sont au moins aussi actifs dans l'albumen de maïs que les promoteurs de référence HMWG-Dx5 et 526γZ, autorisent *via* l'analyse des feuilles ou des racines une détection précoce de la ou des protéines exprimées dans les plants de maïs transgéniques.

### **III. Activité des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans le tabac.**

Les promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 (MPr1130, MPr1135, MPr1131, MPr1136, MPr1137, MPr1138 et MPr1139) ont été testés dans le tabac pour évaluer le pouvoir *cis*-régulateur conféré par la fusion des séquences activatrices as-1 et as-2, lesquelles sont responsables de l'activité élevée du promoteur 35S du CaMV dans les feuilles et les racines des plants de tabac.

#### **1. Expression transitoire dans les feuilles de tabac.**

La force des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 a été évaluée par coloration histochimique de l'activité  $\beta$ -glucuronidase exprimée dans des feuilles de tabac transformées par biolistique à l'aide des constructions pMRT1130, pMRT1135, pMRT1131, pMRT1136, pMRT1137, pMRT1138, pMRT1125 (PrHMWG-Dx5, témoin négatif) et pMRT1092 (E35S du CaMV, témoin positif). Les résultats présentés dans la Figure 33 ont permis de classer les promoteurs dans quatre catégories en fonction du nombre et de l'intensité des spots bleus : (i) Sur les feuilles exprimant la protéine GUS sous le contrôle de PrHMWG-Dx5, aucun spot bleu n'a été observé. (ii) Les feuilles bombardées avec les constructions pMRT1136 et pMRT1137 présentent en moyenne un nombre de points bleus compris entre 50 et 100. (iii) Les feuilles transformées par les constructions pMRT1138 et pMRT1135 présentent un nombre important de points bleus, équivalent à celui observé sur les feuilles bombardées avec la construction de référence pMRT1092 (E35S du CaMV). Enfin, (iv) Les feuilles bombardées par les constructions pMRT1130 et pMRT1131, présentent un nombre de spots bleus diffus et intenses, beaucoup plus élevé que celui observé dans les feuilles bombardées par la construction de référence pMRT1092 (E35S du CaMV).

A la lumière de ces résultats, plusieurs informations essentielles peuvent être dégagées :

- Les séquences activatrices as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV dérégulent l'activité du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs dérivés dans les feuilles de tabac.

- Les séquences activatrices as-1 et as-2 agissent en combinaison avec des motifs *cis*-régulateurs présents dans les promoteurs dérivés de PrHMWG-Dx5. Les boîtes GATA, lesquelles sont présentes dans beaucoup de promoteurs régulés par la lumière (Terzaghi et Cashmore, 1995), pourraient être les éléments clés du contrôle combinatoire potentiellement responsables de l'activité élevée de MPr1130 et MPr1131 en expression transitoire dans les feuilles de tabac. La différence d'activité entre MPr1138 et MPr1137 laisse également envisager que la boîte G « like » joue un rôle *cis*-activateur important dans ce contrôle combinatoire.
- La duplication de la séquence activatrice as-2 ne confère pas d'effet additif positif notable en dépit de son implication dans l'activité du promoteur 35S du CaMV dans les tissus photosynthétiques du tabac (Lam et Chua, 1989).

En comparaison avec le promoteur E35S du CaMV, lequel est communément rapporté dans la littérature comme étant l'un des promoteurs les plus forts dans les tissus photosynthétiques de tabac, de l'ordre de 8 à 12 fois plus actif que le promoteur 35S du CaMV (Kay *et al.*, 1987), les promoteurs MPr1138, MPr1135, MPr1130 et MPr1131 sont certainement les promoteurs chimériques les plus actifs décrits à ce jour en expression transitoire dans les feuilles de tabac.

## **2. Expression stable dans le tabac transgénique.**

L'activité  $\beta$ -glucuronidase dirigée par les promoteurs MPr1130, MPr1131, MPr1138, MPr1135 et MPr1139 a été comparée à celle dirigée par les promoteurs de référence PrHMWG-Dx5 et E35S du CaMV en expression stable dans le tabac. Les plants de tabac transgéniques exprimant les cassettes d'expression « MPr1130/*uidA*-IV2/*Tnos* », « MPr1131/*uidA*-IV2/*Tnos* », « MPr1138/*uidA*-IV2/*Tnos* », « MPr1135/*uidA*-IV2/*Tnos* », « MPr1139/*uidA*-IV2/*Tnos* », « PrHMWG-Dx5/*uidA*-IV2/*Tnos* » et « E35S/*uidA*-IV2/*Tnos* » ont respectivement été obtenus par transformation du tabac PBD6 à l'aide des agrobactéries recombinantes A1130, A1131, A1138, A11135, A1139, A1238 et A1092 selon la technique décrite par Horsch *et al.* (1985). L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été déterminée dans les feuilles des transformants primaires à différents stade du développement après acclimatation en serre et dans les graines T1 matures issues d'une autofécondation.

## **2.1. Activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans les feuilles de tabac transgéniques.**

Les dosages luminométriques de l'activité  $\beta$ -glucuronidase ont été effectués à partir de deux disques foliaires de deux centimètres de diamètre, prélevés sur deux feuilles différentes situées à la base du tiers supérieur des transformants primaires, aux stades de développement 2, 5, 8 et 11 semaines après acclimatation en serre. Pour limiter les variations du taux d'expression du gène rapporteur, essentiellement introduites par l'intégration aléatoire et le nombre de copies de la cassette d'expression, 10 à 30 transformants indépendants ont été étudiés pour chaque construction.

Les résultats rapportés dans la Figure 34 reflètent l'activité  $\beta$ -glucuronidase dirigée par les promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 et les promoteurs de référence HMWG-Dx5 et E35S en expression stable dans les feuilles de tabac, 11 semaines après acclimatation en serre. Les variations de l'activité  $\beta$ -glucuronidase enregistrées au sein d'une même population de plants de tabac peuvent s'expliquer par les effets de position du transgène dans le génome. La comparaison des rangs d'activité de chaque population de plantes fournit une bonne indication quant à la force respective des différents promoteurs.

L'activité  $\beta$ -glucuronidase dirigée par les promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 est très significativement supérieure à l'activité  $\beta$ -glucuronidase endogène mesurée dans les tabacs PBD6 sauvages ou exprimant la protéine GUS sous contrôle du promoteur HMWG-Dx5 (Témoin négatif), mais de l'ordre de 5 à 10 fois inférieure à l'activité  $\beta$ -glucuronidase dirigée par le promoteur E35S du CaMV. Au sein des différents promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5, aucune différence d'activité significative n'a été observée. Les dosages luminométriques effectués au stade de développement 2, 5 et 8 semaines après acclimatation en serre indiquent que l'activité  $\beta$ -glucuronidase augmente au cours du temps dans une plante donnée, quelque soit le promoteur utilisé. Cependant, les promoteurs conférant l'activité  $\beta$ -glucuronidase la plus forte au stade 11 semaines confèrent également l'activité  $\beta$ -glucuronidase la plus élevée dans les stades de développement plus précoces (2, 5 et 8 semaines après acclimatation en serre). Ainsi, la classification des promoteurs au stade 11 semaines est vraie quelque soit le stade de développement des tabacs.

De ces données, il en résulte que les promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 sont fonctionnels mais modérément actifs en expression stable dans les feuilles de tabac. Nous en concluons et confirmons que les séquences activatrices as-1 et as-2 dérèglent l'activité du promoteur HMWG-Dx5 dans les feuilles de tabac mais ne confèrent pas un effet activateur puissant en association avec les éléments *cis*-régulateurs présents dans la séquence du promoteur HMWG-Dx5. Ainsi, les promoteurs chimériques MPr1130, MPr1131, MPr1138, MPr1135 et MPr1139, bien que faiblement actifs dans les tissus photosynthétiques des plants de tabac transgéniques, pourraient être suffisamment actifs pour diriger l'expression d'une enzyme impliquée dans une voie de biosynthèse du métabolisme de la plante. Ils pourraient également être une alternative pour permettre le contrôle de l'expression de gènes conférant une résistance à la plante.

### **2.1. Activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans les graines de tabac transgéniques.**

L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été dosée par luminométrie dans des graines de tabac T1 matures (100 mg par transformant) provenant de 8 à 30 transformants primaires indépendants obtenus pour chacune des constructions. Les variations de l'activité  $\beta$ -glucuronidase enregistrées au sein d'une même population de plants de tabac peuvent une fois encore être expliquées par les effets de position du transgène dans le génome et la comparaison des rangs d'activité de chaque population de plantes fournit une bonne indication quant à la force respective des différents promoteurs.

Les résultats montrent que l'activité  $\beta$ -glucuronidase dirigée par les promoteurs HMWG-Dx5 dans les graines de tabac est au moins aussi élevée que celle obtenue avec le promoteur E35S du CaMV (Figure 35). Les promoteurs peuvent être regroupés selon leur force dans deux catégories : (i) les promoteurs MPr1130, MPr1131 et MPr1139, lesquels dirigent une activité  $\beta$ -glucuronidase du même ordre de grandeur que celle obtenue avec le promoteur E35S du CaMV et, (ii) les promoteurs MPr1138 et MPr1135 qui sont environ 2 fois plus actifs dans les graines de tabac que le promoteur E35S du CaMV.

De ces données, plusieurs informations importantes peuvent être dressées :

- La séquence du promoteur HMWG-Dx5 localisée en amont de la boîte « G » like, s'étendant des nucléotides -378 à -238, confèrent aux promoteurs MPr1130, MPr1131 et MPr1139 un effet *cis*-régulateur négatif dans les graines de tabac.

- La duplication de la séquence activatrice as-2 du promoteur 35S du CaMV ne confère pas d'effet additif positif notable dans les graines de tabac. Aucune différence d'activité n'est obtenue pour MPr1130 et MPr1131 ou entre MPr1135 et MPr1138. Encore une fois, ce résultat n'est pas surprenant puisque le motif as-2 est essentiellement fonctionnel dans les tissus photosynthétiques (Lam et Chua, 1989).
- Les boîtes céréales n'apportent pas d'effet *cis*-activateur additif dans les graines de tabac. Les résultats obtenus avec le promoteur MPr1131 sont similaires à ceux obtenus avec MPr1139. De la même manière que dans l'albumen de maïs transgénique, les boîtes céréales semblent n'avoir aucun effet *cis*-régulateur dans les graines de tabac. Ce résultat fournit des données supplémentaires qui remettent fortement en cause la fonction régulatrice des boîtes céréales dans le contrôle transcriptionnel des gènes de gluténines de haut poids moléculaire de blé.

Les promoteurs MPr1138 et MPr1135, pourraient s'avérer être des promoteurs intéressants pour diriger l'expression de protéines hétérologues dans les graines de plantes dicotylédones, par exemple, celles présentant un intérêt agronomique. Pour réellement valider leur intérêt en terme de production de protéines recombinantes, il serait néanmoins nécessaire et intéressant de comparer leur activité à celle dirigée par le promoteur HMWG-Dx5 original ou par MPr1217 dans les graines de tabac transgéniques.

#### **IV. Identification des interactions ADN-protéines potentiellement responsables de l'activité du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs dérivés dans l'albumen de maïs.**

Pour identifier les protéines nucléaires potentiellement responsables de l'activité du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs synthétiques dérivés de HMWG-Dx5, en particulier MPr1217 et MPr1139 dans l'albumen de maïs, nous avons réalisé des expériences de retard sur gel (EMSA) à l'aide d'oligodésoxynucléotides synthétiques comportant les motifs *cis*-régulateurs fonctionnellement identifiés précédemment.

##### **1. Liaison *in vitro* du facteur de transcription PBF à la boîte prolamine Pb1 du promoteur HMWG-Dx5.**

Un complexe majeur « oPb1-protéine » spécifique a été obtenu en utilisant l'oligodésoxynucléotide oPb1 (Figure 36a), lequel comporte la boîte Pb1 du promoteur HMWG-Dx5, comme sonde radioactive (Figure 36b, Piste 2). Ce complexe disparaît quand un excès molaire (X50) de l'oligodésoxynucléotide oPb1 non marqué est pré-incubé avec les extraits nucléaires de l'albumen de maïs (Figure 36b, Piste 3). Par contre, les expériences de compétition réalisées avec le vecteur pGL3 basic (ADN non spécifique) n'ont pas permis de supprimer l'interaction des protéines nucléaires de l'albumen de maïs à la boîte prolamine Pb1 (Figure 36b, Piste 4).

Afin de déterminer si le facteur de transcription PBF (#AAB70119.1) précédemment identifié dans l'albumen de maïs (Vicente-Carbajosa *et al.*, 1997) est potentiellement impliqué dans la formation du complexe « oPb1-protéine », nous avons étudié l'affinité du domaine de liaison à l'ADN de PBF vis à vis de la séquence 5'-TGCAAAG-3' du motif Pb1. Les résultats indiquent qu'en présence du domaine de liaison à l'ADN sauvage de la protéine PBF (aa 1-137), un complexe retard est généré à l'aide de la sonde oPb1 (Figure 36c, Piste 1). Par contre, l'utilisation du domaine de liaison à l'ADN muté de la protéine PBF (aa 1-137  $\Delta$ Cystéine 62) n'a pas permis de créer un complexe avec la sonde oPb1 (Figure 36c, Piste 2).

A défaut de fournir une preuve inéluctable de l'interaction réelle de la protéine PBF sur la boîte prolamine Pb1 du promoteur HMWG-Dx5, ces informations suggèrent que le

facteur de transcription PBF est un intervenant potentiel dans la régulation de l'expression du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs dérivés dans l'albumen de maïs.

## **2. Liaison *in vitro* d'au moins deux protéines nucléaires d'albumen de maïs sur la boîte G « like » du promoteur HMWG-Dx5.**

### **2.1. Identification et spécificité des interactions moléculaires.**

Deux complexes majeurs « oG-protéines » spécifiques ont été obtenus en utilisant l'oligodésoxynucléotide oG (figure 37a), lequel comporte la boîte G « like » 5'-TTACGTGG-3' du promoteur HMWG-Dx5, comme sonde radioactive. Le complexe de migration rapide ou complexe inférieur a été appelé complexe « a » et le complexe de migration lente ou complexe supérieur a été appelé complexe « b » (figure 37b, piste 2). La visualisation de plusieurs bandes retard au niveau du complexe « b » laisse supposer que plusieurs protéines sont impliquées dans sa formation. En présence d'un excès molaire (X50) de l'oligodésoxynucléotide oG non marqué, les deux complexes « oG-protéine » disparaissent (Figure 37b, Piste 3) alors qu'en présence d'un excès molaire identique du vecteur pGL3 basic (ADN non spécifique, Figure 37b Piste 7), les interactions *in vitro* « oG-protéine » n'ont pas été supprimées.

Dans la perspective de caractériser et/ou d'identifier les protéines impliquées dans la formation de ces complexes *in vitro*, nous avons réalisé des expériences de compétition à l'aide d'oligodésoxynucléotides comportant une séquence core 5'-ACGT-3' caractéristique des éléments *cis*-régulateurs de type boîte G :

- Le complexe « a » disparaît sélectivement lorsque les extraits nucléaires sont pré-incubés avec un excès molaire (X50) de l'oligodésoxynucléotide oA1 non radioactif (Figure 37b, Piste 4), lequel comporte la séquence activatrice 1 (as-1) du promoteur 35S du CaMV (Lam *et al.*, 1989).

- Le complexe « b », composé d'au moins deux bandes retard distinctes, disparaît sélectivement lorsque les extraits nucléaires sont pré-incubés avec un excès molaire (X50) de l'oligodésoxynucléotide oO2 non radioactif (Figure 37b, Piste 5), lequel comporte l'élément *cis*-régulateur Opaque-2 du promoteur  $\alpha$ -zein de 22 kD (Schmidt *et al.*, 1990).

- En présence d'un excès molaire de l'oligodésoxynucléotide oAZM non marqué (X50), lequel porte une séquence core 5'-ACGT-3' issue du promoteur  $\gamma$ -zéine de 27kD, les interactions *in vitro* responsables de la formation des complexes « a » et « b » ne sont pas supprimées (Figure 37b, Piste 6).

Enfin, pour déterminer si la boîte G « like » du promoteur HMWG-Dx5 est réellement la séquence cible des protéines nucléaires de l'albumen de maïs spécifiquement responsable de la formation des complexes « a » et « b » (Figure 37b), nous avons réalisé des tests EMSA avec une sonde oG mutée (oGm) dans laquelle la séquence de la boîte G « like » (5'-TTACGTGG-3') a été remplacée par la séquence mutée 5'-TTctcTGG-3'. Quand l'oligodésoxynucléotide oGm a été utilisé comme sonde, aucun complexe retard n'a été observé (Figure 37c, Piste 2). Réciproquement, l'utilisation de l'oligodésoxynucléotide oGm comme compétiteur n'a pas permis de supprimer la formation des complexes « a » et « b » obtenus avec la sonde oG (Figure 37c, Piste 6). Ces résultats indiquent clairement que la séquence core 5'-ACGT-3' de la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 est nécessaire pour la formation de chacun des deux complexes « a » et « b » observés en EMSA. Ainsi les protéines nucléaires de l'albumen de maïs responsables de la formation des complexes « a » et « b » se fixent indépendamment et alternativement sur la séquence core 5'-ACGT-3' de la boîte G « like » avec une spécificité qui leur est propre et qui est guidée par les nucléotides environnants.

Ces données suggèrent qu'au moins deux protéines distinctes présentent dans les extraits nucléaires d'albumens de maïs au stade de développement 13 DAP ont une affinité spécifique pour la séquence d'ADN de la boîte G « like » du promoteur HMWG-Dx5 de blé. L'une de ces deux protéines présente de l'affinité pour la séquence as-1 du promoteur 35S du CaMV et l'autre présente de l'affinité pour la séquence d'ADN *cis*-activatrice Opaque-2 du promoteur  $\alpha$ -zein de 22 kD.

## **2.2. Caractérisation des deux complexes « oG-protéines ».**

Nous avons réalisé des expériences de cross-compétition en utilisant comme sondes radioactives les oligodésoxynucléotides oO2 et oA1 afin de préciser quels types de facteurs de transcription de l'albumen de maïs sont réellement impliqués dans la liaison *in vitro* avec la boîte G « like » du promoteur HMWG-Dx5.

### 2.2.1. Complexe « a » : affinité de liaison à l'ADN de type ASF-1.

L'utilisation comme sonde radioactive de l'oligodésoxynucléotide oA1 (Figure 38a), lequel comporte la séquence activatrice 1 (as-1) du promoteur 35S du CaMV, a permis d'obtenir deux complexes « oA1-protéines » spécifiques (Figure 38b, Piste 2). Pour faciliter la compréhension et l'interprétation ultérieure des résultats, le complexe inférieur de migration rapide a été appelé complexe « a » et le complexe supérieur de migration lente a été appelé complexe « a' ». La présence des deux bandes retardées s'explique par la nature même de l'élément as-1, lequel comporte une répétition en tandem direct de la séquence 5'-TGACG(T/C)-3'. La bande inférieure est le résultat de l'occupation d'une seule moitié de l'élément as-1 (complexe « a ») alors que la bande supérieure résulte de l'occupation des deux sites cibles (complexe « a' ») (Singh *et al.*, 1989 ; Tokuhisa *et al.*, 1990).

En présence d'un excès molaire (X20) de l'oligodésoxynucléotide oA1, les deux complexes « oA1-protéines » disparaissent (Figure 38b, Piste 3). De même, en présence d'un excès molaire (X20) de l'oligodésoxynucléotide oG, les deux complexes « oA1-protéines » tendent à disparaître (Figure 38b, Piste 4). La disparition partielle du complexe « a » s'explique par la présence d'un seul site de liaison disponible sur l'oligodésoxynucléotide oG (boîte G « like ») contre deux sur l'oligodésoxynucléotide oA1 (élément as-1). L'augmentation de la quantité de compétiteur oG jusqu'à un excès molaire X50 permet d'éliminer le complexe retard résiduel observé avec l'excès molaire X20 (Résultats non montré). En comparaison, aucune compétition n'a été visualisée en présence d'un excès molaire (X20) des oligodésoxynucléotides oO2, oAZM et du vecteur pGL3 basic (Figure 38b, Pistes 5, 6 et 7 respectivement).

Pour confirmer que les protéines nucléaires de l'albumen de maïs responsables de la formation des deux complexes obtenus avec la sonde oA1 (complexes « a » et « a' », Figure 38b) sont vraisemblablement également responsables de la formation du complexe de migration rapide préalablement obtenu avec la sonde oG (complexe « a », Figure 37b), nous avons réalisé des tests de digestion partielle des différents complexes avec la trypsine. Des profils de digestion similaires ont été générés pour les deux complexes « oA1-protéines » (Figure 38c, Pistes 1-4) et pour le complexe de migration rapide « oG-protéines » (Figure 38c, Pistes 5-8). En contraste, le profil de protéolyse partielle obtenu pour le complexe « oG-protéines » de migration lente (complexe « b ») est différents (Figure 38c, Pistes 5-8). De manière très synthétique, il en résulte que les

deux complexes « a » obtenus respectivement avec les sondes oG et oA1 sont confondus et que le complexe « a' » obtenu avec la sonde oA1 correspond à la formation de deux complexes « a » côte à côte sur la séquence de l'élément as-1 du promoteur 35S du CaMV. Il reste cependant à déterminer la nature du complexe « a » ; est-il un complexe homo- ou hétérodimérique ?

L'ensemble de ces résultats indiquent que la ou les protéines fixées *in vitro* sur la séquence de la boîte G « like », responsables du complexe de migration rapide « oG-protéines », sont la ou les mêmes que celles fixées sur chacune des deux séquences cibles présentent sur l'élément as-1. La séquence de la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 fixe au moins une protéine de l'albumen de maïs qui appartient vraisemblablement à la classe de facteurs de transcription bZIP dont la séquence cible caractéristique 5'-TGACG(T/C)-3' est présente dans les éléments *cis*-régulateurs de type as-1, découverts à l'origine dans le promoteur du gène de l'octopine synthase (ocs) d'*Agrobacterium tumefaciens* (Ellis *et al.*, 1987). Le facteur de transcription TGA1a, identifié dans le tabac, constitue et sera considéré comme le facteur de référence de cette famille de protéines responsables de l'affinité de liaison à l'ADN de type ASF-1 (Katagiri *et al.*, 1989).

### **2.2.2. Complexe « b » : affinité de liaison à l'ADN de type O2.**

Un seul complexe « oO2-protéine » spécifique a été observé en utilisant comme sonde l'oligodésoxynucléotide oO2 (Figure 39a), lequel comporte l'élément *cis*-régulateur Opaque-2 du promoteur  $\alpha$ -zein de 22 kD (Schmidt *et al.*, 1990) (Figure 39b, Piste 2). Ce complexe, lequel laisse apparaître au moins deux bandes retardées, est identique au complexe lent visualisé précédemment en utilisant comme sonde l'oligodésoxynucléotide oG (Figure 39b, Piste 2). Sa disparition en présence d'un excès molaire (X50) des oligodésoxynucléotides oO2 et oG non marqués en témoigne (Figure 39b, Pistes 3 et 4 respectivement). Par ailleurs, aucune compétition du complexe « oO2-protéines » n'a été visualisée en utilisant un excès molaire (X50) du vecteur pGL3 basic (ADN non spécifique, Figure 39b, Piste 5).

Ces données suggèrent que la boîte G « like » du promoteur HMWG-Dx5 (5'-TTACGTGG-3') est capable et susceptible de lier les mêmes protéines de l'albumen de maïs que l'élément *cis*-activateur Opaque-2 du promoteur  $\alpha$ -zein de 22 kD (5'-

TCCACGTAGA-3'). Par conséquent, nous pouvons raisonnablement suspecter que la protéine Opaque-2 (Schmidt *et al.*, 1990), laquelle est un activateur transcriptionnel du promoteur  $\alpha$ -zein de 22 kD (Schmidt *et al.*, 1992 ; Ueda *et al.*, 1992), fixe la séquence de la boîte G « like » et est impliquée dans l'activité du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs dérivés dans l'albumen de maïs.

### **2.3. Comparaison de l'activité ASF-1 de l'albumen de maïs avec l'activité ASF-1 des feuilles de tabac.**

Pour déterminer si la séquence de la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 est une séquence activatrice monopartite du type as-1 du promoteur 35S du CaMV, nous avons étudié l'affinité de l'activité de liaison à l'ADN ASF-1 des extraits nucléaires des feuilles de tabac pour la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests de liaison *in vitro* des protéines nucléaires de feuilles de tabac en présence des oligodésoxynucléotides oA1 et oG (Figure 40a).

L'activité de liaison ASF-1 décrite par Katagiri *et al.*, (1989) dans le tabac a été observée à l'aide de la sonde oA1 (Figure 40b, Piste 3). Les deux complexes « oA1-protéines » de tabac sont similaires à ceux obtenus avec les protéines nucléaires de l'albumen de maïs (Figure 40b, Piste 2), excepté que les deux complexes retards présentent une migration légèrement plus rapide. Cette différence de migration peut s'expliquer par une différence de taille ou de maturations post-traductionnelles des facteurs de transcription respectivement impliqués. En présence d'un excès molaire (X20) de l'oligodésoxynucléotide oA1, les deux complexes « oA1-protéines » disparaissent (Figure 40b, Piste 4). De même, la disparition presque totale des deux complexes « oA1-protéines » en présence d'un excès molaire (X20) de l'oligodésoxynucléotide oG (Figure 40b, Piste 5) indique que les protéines responsables de l'activité de liaison ASF-1 dans les feuilles de tabac présentent également de l'affinité pour la boîte G « like » du promoteur HMWG-Dx5. En comparaison, aucune compétition n'a été visualisée en présence d'un excès molaire (X20) des oligodésoxynucléotides oAZM et du vecteur pGL3 basic (Figure 40b, Pistes 6 et 7).

L'activité de liaison *in vitro* à la boîte G « like » (Figure 41a) du promoteur HMWG-Dx5 obtenue avec les protéines nucléaires de feuilles de tabac (Figure 41b, Piste 3) est différente de celle observée avec les protéines nucléaires de l'albumen de maïs (Figure

41b, Piste 2). Un seul complexe majeur « oG-protéines » de tabac a été obtenu. En présence d'un excès molaire (X20) de l'oligodésoxynucléotide oG, le complexe « oG-protéines » disparaît (Figure 41b, Piste 4). De même, la disparition de ce complexe « oG-protéines » de tabac en présence d'un excès molaire (X20) de l'oligodésoxynucléotide oA1 (Figure 41b, Piste 5) soutient l'hypothèse selon laquelle la boîte G « like » est capable de fixer les protéines nucléaires de feuilles de tabac responsables de l'activité de liaison ASF-1. D'autre part, il est important de noter que le décalage de migration des activités de liaison à l'ADN ASF-1 de maïs et de tabac précédemment observé en utilisant l'oligodésoxynucléotide oA1, est également visualisé en utilisant l'oligodésoxynucléotide oG. L'absence de compétition observée en présence d'un excès molaire (X20) des l'oligodésoxynucléotides oO2 (Figure 41b, Piste 6) révèle la spécificité de l'interaction. Par opposition, le complexe « oG-protéines » de tabac de faible intensité, situé juste au-dessus du complexe majeur, semble être non spécifique (Figure 41b, Pistes 3-6).

Ces analyses nous ont donc permis de montrer **(i)** que la boîte G « like » du promoteur HMWG-Dx5 est capable de fixer les facteurs de transcription responsables de l'activité de liaison ASF-1 présente dans les feuilles de tabac et de ce fait peut être considérée comme une séquence activatrice monopartite du type as-1 du promoteur 35S du CaMV, **(ii)** que l'activité de liaison ASF-1 de l'albumen de maïs présente les mêmes caractéristiques de liaison à l'ADN que l'activité de liaison ASF-1 présente dans les feuilles de tabac vis à vis des séquences *cis*-activatrices étudiées et **(iii)** que l'activité de liaison de type Opaque-2 n'est pas présente dans les extraits nucléaires des feuilles de tabac.

# DISCUSSION GENERALE.

## I. Identification et caractérisation moléculaire d'éléments *cis*-régulateurs dans la séquence promotrice de PrHMWG-Dx5.

### 1. Identification d'une boîte albumen bifactorielle atypique dans la séquence promotrice de PrHMWG-Dx5.

La comparaison des rapports d'activité GUS/LUC obtenus en expression transitoire dans l'albumen de maïs sous le contrôle des promoteurs MPr1128, MPr1127 et MPr1126 (Figure 27), nous a permis de démontrer que, (i) la boîte G « like » 5'-TTACGTGG-3' est nécessaire pour une expression maximale de PrHMWG-Dx5, et (ii) que l'élément enhancer décrit par Thomas et Flavell (1990) n'a aucun effet *cis*-activateur quand la boîte G « like » est sélectivement supprimée. Ces données complètent celles précédemment établies par Thomas et Flavell (1990), lesquelles suggéraient mais sans l'avoir identifié, que la boîte G « like » n'a réciproquement aucun effet *cis*-activateur en l'absence de la séquence qu'ils ont défini comme étant un élément activateur. Notre approche, complémentaire à celle de Thomas et Flavell (1990), nous permet donc de conclure que l'élément activateur de PrHMWG-Dx5 agit en combinaison avec la boîte G « like » pour conférer une activité GUS élevée dans l'albumen de maïs.

La boîte prolamine 5'-TGCAAAG-3' (Pb1) localisée à l'extrémité 5' de l'élément activateur est vraisemblablement impliquée dans la régulation coordonnée de PrHMWG-Dx5 par la boîte G « like » et l'élément activateur. L'association d'une boîte prolamine avec d'autres éléments régulateurs a déjà été rapportée. Par exemple, dans la séquence du gène  $\alpha$ -zéine de 22 kDa, l'association d'une boîte prolamine avec le site de liaison à l'ADN du facteur de transcription opaque-2, est suggérée être fonctionnellement très importante (Schmidt *et al.*, 1992 ; Singh, 1998). Couplée avec un motif de type GCN4 de levure (GLM), elle constitue dans de nombreux promoteurs de protéines de réserves des céréales la boîte albumen bifactorielle (Kreis *et al.*, 1985) dont

l'importance fonctionnelle a notamment été démontrée à travers l'étude des promoteurs des gènes  $\gamma$ -zéine de 27 kDa (Marzábal *et al.*, 1998 ; communications personnelles), LMWG-1D1 (Holdsworth *et al.*, 1995 ; Albani *et al.*, 1997 ; Conlan *et al.*, 1999) et B-hordéine (Oñate *et al.*, 1999). En contraste aux boîtes albumens bifactorielles répertoriées, nos résultats suggèrent la présence d'une boîte albumen bifactorielle atypique à l'intérieur de la séquence du promoteur HMWG-Dx5. Cette boîte albumen bifactorielle est caractérisée par l'absence du motif GLM, lequel est remplacé par une boîte G « like », localisée immédiatement en amont de la boîte prolamine Pb1 (Figure 42).

## **2. Effet *cis*-activateur puissant conféré par la répétition du fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5.**

L'analyse des plants de maïs transgéniques a révélé que la répétition du fragment de 89 pb de PrHMWG-Dx5, localisé entre les nucléotides -225 et -136, confère un effet *cis*-activateur additif puissant dans le tissu de l'albumen. Le promoteur MPr1217 qui contient trois copies de ce fragment unitaire est en moyenne (i) deux fois plus actif que le promoteur MPr1216, lequel porte seulement une duplication de ce fragment et (ii) approximativement 4 à 6 fois plus actif que le promoteur HMWG-Dx5 d'origine. Ces résultats indiquent que le fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5 se comporte comme une unité *cis*-activatrice. La présence des boîtes G « like » et Pb1 à l'intérieur de ce fragment reflète leur importance fonctionnelle pour l'activité *in vivo* du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs chimériques dérivés. Un effet activateur similaire lié à la duplication d'une boîte albumen bifactorielle a déjà été rapporté. Marzábal *et al.*, (1998) ont montré que la répétition en tandem direct d'un fragment qui porte la boîte albumen bifactorielle du promoteur du gène  $\gamma$ -zéine de 27 kDa permet d'améliorer d'un facteur deux l'activité du promoteur résultant en expression transitoire dans l'albumen de maïs. Dans la séquence promotrice originale du gène LMWG-1D1 de blé, la boîte albumen bifactorielle est présente à l'état naturel en deux exemplaires juxtaposés et fonctionnels : (i) Hammond-Kosac *et al.* (1993) ont montré que la boîte prolamine et le motif GLM de chacune des deux boîtes albumens bifactorielles sont respectivement la cible des activités de liaison ESBF-1 et ESBF-2 et (ii) la *trans*-activation par le facteur de transcription SPA, lequel est responsable de l'activité de liaison ESBF-2, nécessite la présence des deux boîtes albumens bifactorielles et est modulée *in vitro* par l'activité de

liaison ESBF-1 (Albani *et al.*, 1997 ; Conlan *et al.*, 1999). Ces données supporte l'implication de la boîte albumen bifactorielle atypique de PrHMWG-Dx5 dans le pouvoir activateur conféré par la répétition du fragment unitaire -225/-136.

Dans l'étude présente, nous ne pouvons cependant exclure que d'autres éléments *cis*-régulateurs puissent être impliqués et responsables, en combinaison avec la boîte G « like » et/ou le motif Pb1, de l'effet activateur conféré par la répétition du fragment -225/-136 qui porte la boîte albumen bifactorielle de PrHMWG-Dx5 (Figure 43). A l'exception de la boîte G « like » et du motif Pb1, un seul motif conservé connu pour avoir des fonctions *cis*-régulatrices est présent à l'intérieur du fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5. Il s'agit d'une boîte E (5'-CANNTG-3') dont la séquences 5'-CAATTG-3' est placée dans l'élément activateur entre les positions -172 et -167pb, immédiatement en aval de Pb1. Dans le promoteur du gène  $\beta$ -phaséoline qui code pour une glycoprotéine de réserve prédominante du grain de haricot, la boîte E est présente en deux exemplaires. L'une d'entre-elles agit de manière synergique avec une boîte G (5'-CACGTG-3') pour activer le promoteur  $\beta$ -phaséoline et la seconde se comporte comme un élément *cis*-inhibiteur (Kawagoe *et al.*, 1994). Un synergisme similaire a été montré parmi les motifs CANNTG du promoteur du gène de la chaîne légère de la myosine, lesquels sont reconnus par le facteur de transcription MyoD (Wentworth *et al.*, 1991). Weintraub *et al.* (1990) ont également démontré que la liaison coopérative de MyoD à deux sites CANNTG est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle d'un gène créatine kinase spécifique du muscle. Les facteurs de transcription de la famille bHLH, lesquels reconnaissent les motifs CANNTG (revue de Meshi et Iwabuchi, 1995), sont peu documentés chez les plantes. En dépit de la présence d'une activité de liaison aux motifs CANNTG dans les extraits nucléaires du grain de haricot (Kawagoe et Murai, 1992), le facteur de transcription impliqué n'a pas été identifié. Bien que la fonction potentielle de la boîte E du promoteur HMWG-Dx5 doit être élucidée, ces informations suggèrent (i) qu'elle peut se substituer ou s'associer à Pb1 pour former avec la boîte G « like » l'unité *cis*-activatrice responsable du pouvoir activateur conféré par le fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5 et/ou (ii) que la répétition du fragment unitaire -225/-136 de PrHMWG-Dx5 crée une unité *cis*-régulatrice nouvelle au sein des promoteurs MPr1216 et MPr1217 dont l'effet *cis*-activateur repose sur une interaction synergique des boîtes E respectivement présentes en deux et trois exemplaires (Figure 43).

L'activité limitée des promoteurs MPr1216 et MPr1217 en expression transitoire, laquelle n'est pas significativement différente de celle de PrHMWG-Dx5, laisse supposer que l'effet activateur conféré par la répétition du fragment unitaire -225/-136 de PrHMWG-Dx5 est dépendant de la structure de la chromatine (Figure 44). Ce résultat suggère que la liaison des facteurs de transcription sur les séquences cibles présentes à l'intérieur de ce fragment unitaire pourrait être favorisée et/ou stabilisée par des protéines architecturales de la chromatine, *via* une interaction directe et/ou un repliement favorable de la molécule d'ADN (revue de Grasser, 1998 ; revue de Thomas et Travers, 2001). En effet, les protéines HMG (« high mobility group »), qui sont des protéines non-histones abondantes associées à la chromatine (revue de Grasser, 1995), peuvent être impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes. La stimulation de la transcription par la protéine HMG1 de maïs (Grasser *et al.*, 1993) et l'interaction protéine-protéine de HMG1 avec une protéine DOF sur le même motif ont déjà été rapportées (Yanagisawa et Izui, 1993 ; Yanagisawa, 1997 et 1998). Zhao et Grafi (2000) ont également identifié une protéine du groupe HMG-I/Y, potentiellement capable de déstabiliser l'interaction de l'histone H1 avec une séquence riche en AT du promoteur du gène  $\gamma$ -zéine (Ponte *et al.*, 1994). Dans les cellules animales plusieurs exemples de contrôles combinatoires ont été identifiés ; la formation d'enhanceosomes a été montrée (Carey, 1998). Un des exemples les mieux caractérisés vient de l'analyse du promoteur de l'IFN $\beta$  (interféron  $\beta$ , revue de Singh, 1998) qui pourrait servir d'exemple pour l'étude du contrôle transcriptionnel dans les plantes. L'ensemble de ces informations laissent envisager que l'effet *cis*-activateur puissant conféré par le fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5 en expression stable pourrait être étroitement lié au décompactage de la molécule d'ADN qui intervient à partir de 10 DAP dans l'albumen de maïs et conduit notamment à l'initiation de la synthèse massive des protéines de réserve et au phénomène de l'endoreduplication (Larkins *et al.*, 2001).

L'analyse de l'activité spatio-temporelle des promoteurs MPr1217 et MPr1216 indique que la répétition du fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5 a seulement un effet quantitatif. Le profil d'activité spatiale et temporelle des promoteurs MPr1217 et MPr1216 est similaire à celui du promoteur HMWG-Dx5 original dans le blé (Bartels et Thompson, 1986 ; Lamacchia *et al.*, 2001) ou dans les plants de tabac transgéniques (Robert *et al.*, 1989), et est similaire à celui des promoteurs 526 $\gamma$ Z ou  $\gamma$ -zéine entier dans le maïs (Marks *et al.*, 1985) utilisés dans ce travail en tant que promoteur fort de

référence. Pour déterminer jusqu'à quel point l'effet activateur enregistré est proportionnel au nombre de copies en tandem direct du fragment -225/-136, il serait très intéressant de comparer l'activité de MPr1217 avec celle d'un promoteur homologue comportant une ou plusieurs répliques supplémentaires de la boîte albumen bifactorielle de PrHMWG-Dx5.

### **3. Caractérisation des interactions moléculaires.**

Le résultat des tests de retard de migration indiquent que des protéines nucléaires de l'albumen de maïs sont capables de lier spécifiquement *in vitro* le motif Pb1 et la boîte G « like » qui constituent la boîte albumen bifactorielle du promoteur HMWG-Dx5.

#### **3.1. Liaison *in vitro* et fonctions régulatrices potentielles de la protéine PBF via Pb1.**

Le facteur de transcription PBF, lequel est connu lier les boîtes prolamines du promoteur des gènes  $\alpha$ -zéine de 22 kDa (5'-TGTAAG-3', Vicente-Carbajosa *et al.*, 1997) et  $\gamma$ -zéine de 27 kDa (5'-TGCAAAG-3', Marzábal *et al.*, 1998), est aussi capable de fixer *in vitro* la séquence 5'-TGCAAAG-3' (Pb1) dans l'environnement nucléotidique de PrHMWG-Dx5 (Figure 21). Ce résultat conforte l'importance fonctionnelle potentielle de Pb1 dans la régulation transcriptionnelle du promoteur HMWG-Dx5. Plusieurs évidences et données expérimentales supportent l'implication de PBF dans le contrôle de l'expression des protéines de réserve dans l'albumen de maïs. (i) Le profil d'expression de PBF coïncide avec celui des polypeptides zéines et, la séquence et la localisation de la boîte prolamine sont hautement conservées, dans l'ensemble des promoteurs des gènes zéines et de nombreux gènes des protéines de réserve dans les grains de céréales apparentées (Vicente-Carbajosa *et al.*, 1997). (ii) Marzábal *et al.* ont récemment montré en expression transitoire que la sur-expression de PBF permet d'augmenter l'activité GUS dirigée par le promoteur du gène  $\gamma$ -zéine de 27 kDa *via* une interaction spécifique avec deux boîtes prolamines et notamment avec celle située dans la boîte albumen bifactorielle (communications personnelles). (iii) Le facteur de transcription BPBF, protéine homologue de PBF dans l'orge, est capable de *trans*-activer le promoteur *hor2* (Mena *et al.*, 1998). (iv) La *trans*-activation du promoteur *LMWG-1D1* par le facteur de transcription SPA est modulée par l'activité de liaison ESBF-1 au motif Pb dans l'albumen de blé (Hammond-Kosac *et al.*, 1993 ;

Conlan *et al.*, 1999). La présence de ESBF-1 dans l'albumen de blé laisse supposer que PrHMWG-Dx5, au même titre que le promoteur *LMWG-1D1*, pourrait être régulé dans le blé par WPBF (« wheat PBF », Mena *et al.*, 1998). Ces informations indiquent que la protéine PBF dans l'albumen de maïs et les protéines homologues dans les grains des céréales apparentées sont vraisemblablement des facteurs de transcription centraux impliqués dans le mécanisme général qui assure la régulation coordonnée des différentes protéines de réserve. Cependant, plusieurs questions sont sans réponse à ce jour :

- Quelle est réellement la fonction de PBF dans l'albumen de maïs ? Est-il le facteur de transcription responsable de l'initiation massive de la synthèse des polypeptides zéïnes à partir de 10 DAP ? Est-il un facteur de transcription limitant pour le taux d'expression des zéïnes ? Agit-il seul ou en combinaison avec d'autres facteurs de transcription ? Plusieurs rapports ont suggéré la nécessité d'une interaction coopérative entre les protéines de liaison aux boîtes prolamines et les protéines de liaison aux motifs GLM pour permettre l'activation de nombreux gènes de protéines de réserves des céréales (Wu *et al.*, 1998; Albani *et al.*, 1997; Vicente-Carbajosa *et al.*, 1998). Des réponses à ces questions pourraient venir de l'étude (i) de l'impact de l'expression stable d'un ARNm antisens de PBF dans l'albumen de maïs, (ii) de la sur-expression stable de PBF dans l'albumen de maïs et (iii) de la co-expression transitoire de PBF avec le promoteur  $\gamma$ -zéïne dans les feuilles de tabac, tissu où ils ne sont pas exprimés dans la plante *wt*.

- L'activité du promoteur HMWG-Dx5 original et des promoteurs chimériques dérivés, est-elle réellement dépendante du facteur de transcription PBF dans l'albumen de maïs ? L'interaction de PBF à Pb1 ne constitue pas une preuve incontestable de son implication dans la régulation des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs. En dépit de son interaction *in vitro* avec la boîte 5'-TGTAAG-3' du gène  $\alpha$ -zéïne de 22 kDa (Vicente-Carbajosa *et al.*, 1997), la *trans*-activation du promoteur 22Z-4 n'a pas encore été rapportée. Il serait intéressant et nécessaire de comparer le pouvoir *trans*-activateur de la protéine PBF sur les activités des promoteurs MPr1127 initial et muté spécifiquement dans le motif Pb1.

Si PBF est réellement impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5, nos résultats (Figure 27) nous conduisent à envisager qu'il pourrait interagir fonctionnellement avec des protéines de

liaison à la boîte G « like » pour former l'unité *cis*-régulatrice que nous avons décrit comme étant une boîte albumen bifactorielle atypique.

### **3.2. Activité de liaison redondante des protéines nucléaires de l'albumen de maïs avec la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5.**

Nous avons identifié au moins deux protéines de liaison à l'ADN qui appartiennent à deux familles distinctes de facteurs de transcription capables de lier alternativement *in vitro* la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 et susceptibles d'interagir fonctionnellement avec la protéine PBF.

#### **- Affinité de liaison de type ASF-1.**

Les protéines de l'albumen de maïs impliquées dans la formation du complexe retard « a » en présence de la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 (Figure 37), sont caractérisées par leur affinité de liaison aux séquences 5'-TGACGT-3' et 5'-TGACGC-3' de l'élément as-1 du promoteur 35S du CaMV. En raison de cette spécificité de liaison à l'ADN, responsable de l'activité de liaison ASF-1 (« activating sequence factor-1 »), elle(s) peuvent être classées dans le groupe de protéines bZIP de liaison au motif TGACG (revue de Meshi et Iwabuchi, 1995), qui comprend entre autres les facteurs de transcription TGA1a de tabac (Katagiri *et al.*, 1989) ou TGA1 d'*Arabidopsis* (Schindler *et al.*, 1992). A notre connaissance, c'est la première fois qu'une affinité de liaison à l'ADN de type ASF-1, impliquant une séquence régulatrice proximale d'un gène de protéine de réserve, est décrite dans l'albumen de maïs. L'interaction de cette famille de protéines avec la boîte G « like » n'est pas très surprenante au regard de l'homologie de sa séquence avec la séquence des motifs caractéristiques des éléments de type *ocs* (Figure 45). L'alignement de la séquence de la boîte G « like » avec les séquences de l'élément as-1 du promoteur 35S du CaMV et les séquences *ocs*, *nos* et *mas* d'*Agrobacterium tumefaciens* suggère l'importance des nucléotides 5'-TTACGT-3' de la boîte G « like » pour l'affinité de liaison ASF-1. D'autre part, l'absence d'affinité de ASF-1 pour la séquence cible de la protéine O2 et pour l'oligodésoxynucléotide oAZM (Figure 38) révèle l'importance des nucléotides qui entourent le motif core ACGT pour la spécificité de l'interaction.

Les facteurs de transcription capables de lier les deux motifs caractéristiques de l'élément *ocs* (OTF) semblent être présents dans la plupart des tissus végétaux. Dans le

maïs, des protéines de liaison à l'élément ocs (OBF, « ocs binding factor ») ont été identifiées dans les racines (OBF1 et OBF2 ; Singh *et al.*, 1990) et dans les cellules BMS (OBF3 ; Foley *et al.*, 1993). La fonction *trans*-régulatrice des protéines de cette famille a largement été investie, notamment à travers l'étude d'un mutant négatif dominant de PG13 dans les plants de tabac transgéniques (Rieping *et al.*, 1994) ou à travers l'activation du promoteur 35S du CaMV par TGA1 dans *Saccharmyces cerevisiae* (Ruth *et al.*, 1994). La suppression *trans*-dominante des facteurs de transcription TGA dans le tabac a également révélé leurs rôles négatif et positif dans la réponse de défense des plantes (Miao et Lam, 1995 ; Pontier *et al.*, 2001). Enfin, il a été montré précédemment que les facteurs bZIP de liaison à l'élément as-1 et aux séquences apparentées dans le promoteur de la *glutathion S-transférase 6* d'*Arabidopsis* peuvent interagir avec des protéines de la famille DOF (Zhang *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 1996). Ces informations supportent une implication éventuelle de l'activité de liaison ASF-1 dans la régulation transcriptionnelle de PrHMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs, *via* une interaction avec la boîte G « like ».

ASF-1 associée à la boîte G « like » a-t-elle réellement une fonction activatrice ? Bouchez *et al.*, (1989) ont montré que la fonctionnalité des séquences de type as-1 nécessite l'occupation des deux motifs 5'-TGACG(T/C)-3' et la formation d'un complexe tétramérique. La fonction de ASF-1 dans l'albumen de maïs, *via* des boîtes de type G « like », doit donc être élucidée. L'identification future du ou des facteurs de transcription impliqués nous permettra certainement de compléter nos connaissances sur les mécanismes régulateurs qui régissent l'activité des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs et vraisemblablement l'expression des protéines de réserve des céréales.

### **- Affinité liaison de type O2.**

Les protéines de l'albumen de maïs impliquées dans la formation du complexe retard « b » en présence de la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 (Figure 37), sont caractérisées par leur affinité de liaison au site cible 5'-TCCACGTAGA-3' du facteur de transcription opaque-2 (O2) (Schmidt *et al.*, 1990). Dans l'étude présente, le complexe ADN/protéine(s) « b » pourrait être un dimère du facteur de transcription O2 ou un complexe de la protéine O2 avec une autre protéine telle que OHP1 (Pysh *et al.*, 1993) ou un autre complexe sans la protéine O2. Des rapports antérieurs ont montré que

le facteur de transcription O2 peut interagir *in vitro* spécifiquement avec PBF (Vicente-Carbajosa *et al.*, 1997), et fonctionne comme un régulateur positif de l'expression du gène  $\alpha$ -zéine de 22 kDa (Schmidt *et al.*, 1992). Le rôle activateur de O2 a aussi été montré dans la régulation des gènes des protéines de réserve dans les grains de blé (Holdworth *et al.*, 1995) et de riz (Wu *et al.*, 1998) à travers l'interaction avec un motif GLM. L'interaction de la protéine O2 avec la séquence de la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 est supportée par la similarité de sa séquence avec certains sites de liaison à l'ADN de la protéine O2 (Figure 46). Pour définitivement conclure sans équivoque quant à l'interaction de O2 avec la boîte G « like », il serait intéressant de vérifier si la protéine O2 purifiée reconnaît la boîte G « like » ou si un anticorps spécifique de la protéine O2 est capable de reconnaître le complexe retard « b » pour générer un « supershift ».

Dans le contexte de la séquence des promoteurs dérivés de PrHMWG-Dx5, le facteur de transcription O2 est un bon candidat susceptible d'être impliqué dans la régulation positive conférée par la répétition du fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs transgénique.

## **II. Effet *cis*-régulateur conféré par les séquences as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV sur l'activité transcriptionnelle de PrHMWG-Dx5.**

A travers l'étude des plants de maïs et de tabac transgéniques nous avons montré que l'association des séquences as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV avec la séquence du promoteur HMWG-Dx5, dérégule l'activité des promoteurs chimériques résultants dans les racines et dans les tissus photosynthétiques. Dans le contexte de la séquence promotrice de PrHMWG-Dx5, les éléments as-1 et as-2 conservent donc et transmettent respectivement leurs fonctions activatrices caractéristiques, responsables de l'activité du promoteur 35S du CaMV dans les racines (Lam et Chua, 1989) et dans les tissus photosynthétiques (Lam *et al.*, 1989). Ce résultat suggère que la spécificité tissulaire du promoteur HMWG-Dx5 original n'est pas guidée par la présence d'un élément *cis*-inhibiteur mais plutôt par l'absence, dans les tissus autre que l'albumen, du ou des facteurs de transcription susceptibles de lier les éléments *cis*-activateurs disponibles dans sa séquence pour déverrouiller son activité transcriptionnelle. Dans le travail présent, nos résultats ne nous permettent pas de conclure si l'activité des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans les feuilles et les racines de tabac repose sur la présence de l'élément as-1 et/ou sur celle de l'élément as-2. Par contre, nous avons montré que l'activité de liaison ASF-1 des feuilles de tabac, laquelle interagit spécifiquement avec la boîte G « like », ne permet pas l'activation du promoteur HMWG-Dx5 original dans les tissus photosynthétiques.

L'effet *cis*-activateur conféré par les séquences as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV est cependant très controversé, notamment si l'on compare l'activité transitoire avec l'activité stable des promoteurs MPr1139 et MPr1200. L'effet *cis*-activateur puissant observé en expression transitoire dans l'albumen de maïs et dans les feuilles de tabac n'a pas été observé en expression stable. Dans les plants de maïs transgéniques, l'activité de MPr1139 et de MPr1200 est comparable à celle de PrHMWG-Dx5 alors qu'elle était environ 5 fois plus élevée en expression transitoire. C'est un exemple additionnel qui montre que les tests d'expression transitoire peuvent conduire dans certains cas à des interprétations contradictoires. En terme quantitatif, ils ne peuvent pas

être directement corrélés aux tests d'expression stable. L'activité élevée des promoteurs MPr1139 et MPr1200 en expression transitoire peut néanmoins être expliquée. En particulier, une hypothèse serait que MPr1139 et MPr1200 puissent être induits, *via* les éléments du promoteur 35S du CaMV, par la blessure physique générée lors du bombardement des particules. Plusieurs données expérimentales supportent cette explication : (i) l'élément as-1 est induit par l'acide salicylique (SA, Qin *et al.*, 1994), lequel est un médiateur important de la réponse de défense des plantes aux pathogènes (Gaffney *et al.*, 1993 ; Dong, 1998 ; Reymond et Farmer, 1998 ; Pieterse et Van Loon, 1999 ; Dempsey *et al.*, 1999), (ii) le facteur de transcription de tabac TGA2.2, qui est le composé majeur de l'activité de liaison ASF-1, est impliqué dans l'expression des promoteurs contenant l'élément as-1 en réponse à l'acide salicylique (Niggeweg *et al.*, 2000), (iii) la phosphorylation *in vitro* des protéines nucléaires augmente l'activité de liaison à l'élément as-1 et reproduit l'effet d'un traitement à l'acide salicylique sur une plante entière (Jupin et Chua, 1996 ; Stange *et al.*, 1997 ; Hidalgo *et al.*, 2001) et, (iv) Klessig et ses collaborateurs (2000) ont montré que la blessure par coupure ou frottement active une protéine MAP kinase (« mitogen-activated protein » kinase, Zhang et Klessig, 1998) appelée SIPK (« SA-induced protein kinase »), impliquée dans la réponse de la plante à l'acide salicylique. Ces informations suggèrent que les éléments *cis* de type as-1 sont des éléments centraux dans la réponse de la plante à divers stimuli suite à diverses agressions, telles que l'invasion d'un pathogène ou une blessure, à travers une modification de l'activité du ou des facteurs de transcription qui composent le complexe de liaison ASF-1. D'autre part, l'induction des éléments de type as-1 par le méthyl jasmonate (Xiang *et al.*, 1996 ; Hidalgo *et al.*, 2001), les auxines (Niggeweg *et al.*, 2000), le peroxyde d'hydrogène (Chen et Singh, 1999) et l'oxyde nitrique (Flessig *et al.*, 2000) indiquent qu'ils sont fonctionnellement impliqués dans plusieurs voies de régulation de la plante. Pour vérifier notre hypothèse, il serait intéressant de déterminer si la blessure produite par un bombardement de particules nues pourrait induire une augmentation de l'activité GUS dirigée par les promoteurs MPr1139 et MPr1200 dans l'albumen des grains de maïs ou dans les feuilles de tabac transgéniques.

### III. Modèle de régulation transcriptionnelle du promoteur HMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs.

A la lumière des résultats obtenus dans ce travail, nous proposons un modèle de régulation transcriptionnelle potentiellement responsable de l'activité des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs (Figure 47).

La présence dans l'albumen de maïs de deux activités de liaison redondantes avec la boîte G « like » suggère que plusieurs voies de régulation peuvent être simultanément ou alternativement impliquées dans l'activité du promoteur HMWG-Dx5. Les deux familles de protéines identifiées, dont les facteurs de transcription caractéristiques sont respectivement O2 (Schmidt *et al.*, 1990) et TGA1a (Katagiri *et al.*, 1989), sont susceptibles d'interagir fonctionnellement avec la protéine PBF (Vicente-Carbajosa *et al.*, 1997) à travers la boîte albumen bifactorielle de PrHMWG-Dx5 pour former une unité transcriptionnelle hautement active. Des activités de liaison redondantes similaires ont déjà été observées. Dans *Arabidopsis*, Liljegen *et al.* (2000) ont montré que SHP1 et SHP2 sont deux facteurs de transcription de la famille de protéines MADS-box impliqués dans la maturation du fruit et fonctionnellement redondants ; l'obtention du double mutant est nécessaire pour observer un effet phénotypique. Un tel phénomène de redondance pourrait également être à l'origine de la régulation transcriptionnelle du gène  $\gamma$ -zéine de 27 kDa. En effet, bien que le profil d'expression du polypeptide  $\gamma$ -zéine ne soit pas affecté dans le maïs *o2*, Marzábal *et al.* ont montré en expression transitoire que la sur-expression de la protéine O2 dans l'albumen de maïs permet d'améliorer l'activité du promoteur du gène  $\gamma$ -zéine (communications personnelles).

Dans notre cas, au moins deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la double activité de liaison à la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs : (i) Les protéines impliquées dans les affinités de liaison de type O2 et ASF-1 agissent alternativement pour activer les promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 (Figure 47a). Nous pouvons supposer que si l'un des deux facteurs de transcription s'épuise ou est recruté par d'autres promoteurs, le second peut se substituer pour maintenir une activité transcriptionnelle élevée. (ii) ASF-1 régule négativement l'activité des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 et est impliquée dans la réponse de la plante à divers signaux environnementaux suite à l'invasion d'un

pathogène, à une blessure et à des stress divers. Cette hypothèse est soutenue par le faible pouvoir activateur procuré par l'association de la séquence as-1 aux promoteurs dérivés de PrHMWG-Dx5 en expression stable dans l'albumen de maïs. L'activité de liaison ASF-1 observée n'est-elle pas sous une forme inactive ? Son activation, *via* des processus de phosphorylation/déphosphorylation ne pourrait-elle pas réprimer l'activité des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 et de divers promoteurs actifs dans l'albumen de maïs pour permettre à la plante de s'adapter et se défendre dans un état physiologique défavorable (Figure 47b).

## CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.

L'étude du promoteur HMWG-Dx5 de blé et la création de promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 a permis de répondre avec succès à l'un des facteurs clés de réussite du projet « Molecular Pharming » de MERISTEM Therapeutics à travers l'amélioration du taux d'expression des protéines recombinantes dans l'albumen du grain de maïs. Les résultats obtenus au cours de ce travail ont conduit au dépôt de deux brevets internationaux intitulés « Synthetic and chimeric promoters, expression cassettes, plasmids, vectors, transgenic plants and seeds containing them, and method for producing them » (Norre *et al.*, 1999) et « Bifactorial endosperm box, transactivating factor that binds thereto, and methods for regulating promoter activity » (Norre et Gruber, 2001) et à la publication dans la revue internationale « Plant Molecular Biology » d'un article intitulé « Powerful effect of an atypical bifactorial endosperm box from wheat HMWG-Dx5 promoter in maize endosperm » (Norre *et al.*, sous presse, Annexe).

La transformation transitoire de l'albumen de maïs au stade de développement 12 DAP et l'étude des plants de maïs transgéniques ont été deux approches complémentaires qui nous ont permis d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle du promoteur HMWG-Dx5. Ces deux approches présentent chacune leurs limites. La transformation transitoire par biolistique semble particulièrement adaptée pour étudier l'effet transcriptionnel conféré par un motif *cis*-régulateur déterminé ; c'est une approche qualitative. L'expression stable offre un degré de complexité supérieur lié à l'architecture de la chromatine et limite les effets liés à l'état physiologique du matériel végétal induit par la méthode de transformation transitoire ; c'est une approche qualitative et quantitative. Toutefois, l'état physiologique de la plante reste dépendant des conditions environnementales et la comparaison quantitative de deux promoteurs doit être réalisée dans des conditions de culture bien définies.

Le promoteur le plus actif issu de ce travail, MPr1217, est de l'ordre de 4 à 6 fois plus actif que PrHMWG-Dx5 original dans l'albumen du grain de maïs. Son activité élevée,

spécifique de l'albumen, repose sur la répétition en tandem direct de 3 exemplaires du fragment unitaire -225/-136 de PrHMWG-Dx5. Nous avons identifié à l'intérieur de ce fragment une boîte albumen bifactorielle atypique composée d'une boîte G « like » et d'un motif Pb1. La délétion séquentielle de la boîte G « like » révèle son importance fonctionnelle pour l'activité transcriptionnelle de PrHMWG-Dx5.

La caractérisation moléculaire des interactions protéiques spécifiques de la boîte G « like » et du motif Pb1 indique que le pouvoir activateur du fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5 est dépendant d'au moins 3 familles distinctes de facteurs de transcription, respectivement représentées par la protéine opaque-2 (affinité de liaison O2 « like »), la protéine TGA1a (affinité de liaison ASF-1) et la protéine PBF. La dépendance fonctionnelle de la boîte G « like » et de l'élément activateur (EE) suggère que la protéine PBF peut interagir avec des protéines O2 « like » et/ou avec les protéines responsables de l'activité de liaison ASF-1 pour activer le promoteur HMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs.

L'implication potentielle de ASF-1 dans la réponse de la plante à la blessure observée à travers l'étude de l'effet régulateur conféré par la séquence as-1 du promoteur 35S du CaMV dans l'albumen de maïs et dans les feuilles de tabac, laisse entrevoir un rôle plus général pour les protéines responsables de cette affinité de liaison. En particulier, dans un état physiologique défavorable, elles pourraient être responsables (i) d'une interruption plus ou moins longue de la synthèse des protéines de réserve *via* des boîtes G « like » et (ii) de l'activation de l'expression des gènes de défense *via* des motifs as-1 « like » pour permettre à la plante de survivre.

L'identification des facteurs de transcription impliqués dans les activités de liaison O2 « like » et ASF-1 devra faire l'objet d'études futures pour compléter nos connaissances des mécanismes qui régissent la régulation transcriptionnelle du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs des protéines de réserve dans l'albumen du grain de maïs et des grains des céréales apparentés. L'étude du rôle fonctionnel de la boîte E et du motif AACA de PrHMWG-Dx5 présente également un grand intérêt pour progresser dans cette voie. La sur-expression des facteurs de transcription impliqués dans l'activité de

PrHMWG-Dx5 devrait nous permettre dans un futur proche d'améliorer l'activité transcriptionnelle des promoteurs chimériques décrits dans ce travail.

D'autres séquences *cis*-régulatrices localisées en amont et en aval de la séquence promotrice proximale sont vraisemblablement également très importantes pour l'activité transcriptionnelle des promoteurs. L'étude des séquences riches en AT et des séquences 5' et 3' non traduites devra être prise en compte.

Enfin, au delà de l'optimisation de l'efficacité de la transcription, l'amélioration du taux d'expression des protéines hétérologues dans les plantes passe aussi par la stabilisation de l'ARNm et de la protéine dans les tissus cibles.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- Albani, D., Hammond-Kosack, M.C.U., Smith, C., Conlan, S., Colot, V., Holdsworth, M.J. and Bevan, M.W.** (1997) The wheat transcriptional activator SPA : a seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamin genes. *Plant Cell*, **9**, 171-184.
- Anderson, O.D., Green, F.C., Yip, R.E., Halford, N.G., Shewry, P.R. and Malpica-Romero, J-M.** (1989). Nucleotide sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum* L. cv Cheyenne. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 461-462.
- Anderson, O.D., Abraham-Pierce, F.A. and Tam, A.** (1998) Conservation in wheat high-molecular-weight glutenin gene promoter sequences : comparisons among loci and among alleles of the *GLU-B1-1* locus. *Theor Appl Genet.*, **96**, 568-576.
- Anderson, O.D. and Greene, F.C.** (1989) The characterization and comparative analysis of high-M<sub>r</sub> glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet* **77**, 689-700.
- Azevedo, R.A., Brennecke, K. and Lea, P.J.** (1995) Aspartate kinase from the maize mutants *ask1* and *opaque-2*. *Plant Physiol.* **108**, 133 (Abstract).
- Bagga, S., Adams, H.P., Rodriguez, F.D., Kemp, J.D., Sengupta-Gopalan, C.** (1997) Coexpression of the maize delta-zein and beta-zein genes results in stable accumulation of delta-zein in endoplasmic reticulum-derived protein bodies formed by beta-zein. *Plant Cell* **9**, 1683-96.
- Balconi, C., Rizzi, E., Motto, M., Salamini F. and Thompson, R.D.** (1993) The accumulation of zein polypeptides and zein mRNA in cultured endosperms of maize is modulated by nitrogen supply. *Plant J.* **3**, 325-334.
- Bartels, D. and Tompson, R.D.** (1986) Synthesis of mRNAs coding for abundant endosperm proteins during wheat grain development. *Plant Sci.* **46**, 117-125.
- Benfey, P.N., Ren, L., Chua, N.H.** (1989) The CaMV enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J.* **8**, 2195-2202.
- Benfey, P.N., Ren, L., Chua, N.H.** (1990a) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J.* **9**, 1677-84.
- Benfey, P.N., Ren, L., Chua, N.H.** (1990b) Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J.* **9**, 1685-96.
- Benfey, P.N. and Chua, N.H.** (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter : Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science* **250**, 959-966.

- Berger, F.** (1999) Endosperm development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 28-32.
- Bethke, P.C., Lonsdale, J.E., Fath, A., Jones, R.L.** (1999) Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone cells. *Plant Cell* **11**, 1033-46.
- Bevan, M.W.** (1984) Binary *Agrobacterium* vector for plant transformation. *Nuc. Acids Res.*, **12**, 8711-8722.
- Birnboim H. C. and Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Boronat, A., Martínez, M.C., Reina, M., Puigdomènech, P. and Palau, J.** (1986) Isolation and sequencing of a 28-kDa glutelin-2 gene from maize. Common elements in the 5' flanking regions among zein and glutelin genes. *Plant Sci.* **47**, 95-102.
- Bouchez, D., Tokuhisa, J.G., Llewellyn, D.J., Dennis E.S. and Ellis, J.G.** (1989) The ocs-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *EMBO J.* **8**, 4197-4204.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the detection of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brandt, A., Montembault, A., Cameron-Mills, V. and Rasmusen, S.K.** (1985) Primary structure of a B1 hordein gene from barley. *Carlsberg Res. Commun.* **50**, 333-345.
- Brink, R.A. and Cooper, D.C.** (1947) Effect of the de17 allele on development of the maize caryopsis. *Genetics* **32**, 350-368.
- Brochetto-Braga, M.R., Leite, A., Arruda, P.** (1992) Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and opaque-2 maize endosperm. *Plant Physiol.* **98**, 1139-1147.
- Brown, J.W.S., Wandelt, G., Feix, G., Neuhaus, G. and Schweiger, H.G.** (1986) The upstream of zein genes—sequence analysis and expression in the unicellular green alga *Acetabularia*. *Eur. J. Cell Biol.* **42**, 161-170.
- Carbonero, P., Vicente-Carbajosa, J., Mena, M., Onate, L., Lara, P., Diaz, I.** (2000) bZIP and DOF Transcription Factors in the Regulation of Gene Expression in Barley Endosperm. *Seed Biology: Advances and Applications* (eds M. Black, K.J. Bradford and J. Vazquez-Ramos), 27-41.
- Carey, M.** (1998) The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* **92**, 5-8.
- Chaudhury, A.M., Craig, S., Dennis, E., Peacock, W.** (1998) Ovule and embryo development, apomixis and fertilization. *Curr Opin Plant Biol.* **1**, 26-31.
- Chen, W., Chao, G. and Singh, K.B.** (1996) The promoter of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J.* **10**, 955-966.

- Chen, W., Singh, K.B.** (1999) The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the Arabidopsis GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J.* **19**, 667-77.
- Chui, C-F. and Falco, S.C.** (1985) A new methionine-rich seed storage protein from maize. *Plant Physiol.* **107**, 291.
- Ciceri, P., Gianazza, E., Lazzari, B., Lippoli, G., Genga, A., Hoscheck, G., Schmidt, R.J. and Viotti, A.** (1997) Phosphorylation of opaque2 changes diurnally and impacts its DNA binding activity. *Plant Cell.* **9**, 97-108.
- Ciceri, P., Locatelli, F., Genga, A., Viotti, A. and Schmidt, R.J.** (1999) The activity of the maize opaque2 transcriptional activator is regulated diurnally. *Plant Physiol.* **121**, 1231-1327.
- Cliquet, J.B., Deléens, E. and Mariotti, A.** (1990) C and N mobilization from stalk and leaves during kernel filling by <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N tracing in *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **94**, 1547-1553.
- Coleman, C.E., Herman, E.M., Takasaki, K., Larkins, B.A.** (1996) The maize gamma-zein sequesters alpha-zein and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. *Plant Cell* **8**, 2335-45.
- Coleman, C.E., Larkins, B.A.** (1998). The prolamins of maize. In *seed Proteins*, P.R. Shewry and R. Casey, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), 109-139.
- Colot, V., Robert, L.S., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. and Thompson, R.D.** (1987) Localization of sequences in wheat endosperm protein genes which confer tissue-specific expression in tobacco. *EMBO J.* **6**, 3559-3564.
- Comai, L., Moran, P., Maslyar, D.** (1990) Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements. *Plant Mol Biol.* **15**, 373-81.
- Comeau, D. and Gruber, V.** (2001) Vecteurs synthétiques propres, plasmides, plantes et parties de plantes transgéniques les contenant, et leurs méthodes d'obtention. Brevet WO 01/18192
- Conlan, R.S., Hammond-Kosack, M., Bevan, M.** (1999) Transcription activation mediated by the bZIP factor SPA on the endosperm box is modulated by ESBF-1 in vitro. *Plant J.* **19**, 173-181.
- Deckers, H., Moloney, M. and Baum, A.** (1999) The case for Recombinant Production of Pharmaceutical Proteins in Plants. *Annual Reports in Medicinal Chemistry.* **34**, 237-245.
- Dempsey, D., Shah, J. and Klessig, D.F.** (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 547-575.

- Díaz I., Vicente-Carbajosa J., Abraham Z., Martínez M., Isabel-La Moneda, I., Carbonero P.** (2002) The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor bPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. *Plant J.* **29**, 453-464
- Dieryck, W., Pagnier, J., Poyart, C., Marden, M.C., Gruber, V., Bournat, P., Baudino, S., Merot, B.** (1997) Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature* **386**, 29-30.
- Dong, X.** (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316-323.
- Droog, F., Spek, A., van der Kooy, A., de Ruyter, A., Hoge, H., Libbenga, K., Hooykaas, P., van der Zaal, B.** (1995) Promoter analysis of the auxin-regulated tobacco glutathione S-transferase genes Nt103-1 and Nt103-35. *Plant Mol Biol.* **29**, 413-29.
- Ellis, J.G., Llewellyn, D.J., Walker, J.C., Dennis, E.S. and Peacock, W.J.** (1987) The ocs element : a 16 base pair palindrome essential for activity of the octopine synthase enhancer. *EMBO J.*, **6**, 3203-3208.
- Ellis, J.G., Tokuhisa, J.G., Llewellyn, D.J., Bouchez, D., Singh, K., Dennis, E.S., Peacock, W.J.** (1993) Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? *Plant J.* **4**, 433-43.
- Entwistle, J., Knudsen, S., Müller, M. and Cameron-Mills, V.** (1991) Amber codon suppression: the *in vivo* and *in vitro* analysis of two C-hordein genes from barley. *Plant. Mol. Biol.* **17**, 1217-1231.
- Esen, A.** (1987) Proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *J. Cereal Sci.* **5**, 117-128.
- Fang, R.X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S., Chua, N.H.** (1989) Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell.* **1**, 141-50.
- Feltkamp, D., Masterson, R., Starke, J., Rosahl, S.** (1994) Analysis of the involvement of ocs-like bZip-binding elements in the differential strength of the bidirectional mas1'2' promoter. *Plant Physiol.* **105**, 259-68.
- Fischer, R., Liao, Y.C., Hoffmann, K., Schillberg, S., Emans, N.** (1999) Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biol Chem.* **380**, 825-39.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H.** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 8849-55.
- Foley, R.C., Grossman, C., Ellis, J.G., Llewellyn, D.J., Dennis, E.S., Peacock, W.J. and Singh, K.B.** (1993) Isolation of a maize bZIP protein subfamily: candidates for the ocs-element transcription factor. *Plant J.* **3**, 669-79.

- Forde, B.G., Heyworth, A., Pywell, J. and Kreis, M.** (1985) Nucleotide sequence of a *B1*-hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize. *Nucl. Acids Res.* **13**, 7327-7339.
- Foster R, Izawa T, Chua NH.** (1994) Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J.* **8**, 192-200.
- Fray, R.G., Wallace, A.D. and Grierson, D.** (1994) Identification of unexplained DNA fragments within the T-DNA borders of the Bin 19 plant transformation vector. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 339-342.
- Friedman, W.E.** (1994) The evolution of embryogeny in seed plants and the developmental origin and early history of endosperm. *Am. J. Bot.* **81**, 1468-86.
- Friedman, W.E.** (1998) The evolution of double fertilization and endosperm: an “historical” perspective. *Sex. Plant Reprod.* **11**, 6-16.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J.** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science.* **261**, 754-756.
- Giddings, G.** (2001) Transgenic plants as protein factories. *Curr Opin Biotechnol.* **12**, 450-4.
- Goldberg RB, Barker SJ, Perez-Grau L.** (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell.* **56**, 149-60.
- Gomez, E., Royo, J., Guo, Y., Thompson, R., Hueros, G.** (2002) Establishment of cereal endosperm expression domains: identification and properties of a maize transfer cell-specific transcription factor, ZmMRP-1. *Plant Cell.* **14**, 599-610.
- Grasser, K.D; Hetz, W., Griess, E.A. and Feix, G.** (1993) Stimulatory effect of the maize HMGa protein on reporter gene expression in maize protoplasts. *FEBS Lett.* **327**, 141-144.
- Grasser, K.D.** (1995) Plant cromosomal high mobility group (HMG) proteins. *Plant J.* **7**, 185-192.
- Grasser K.D.** (1998) HMG1 and HU proteins: architectural elements in plant chromatin. *Trends in plant science*, **3**, 260-265.
- Gruber, V., Berna, P.P., Arnaud, T. et al.** (2001) Large-scale production of a therapeutic protein in transgenic tobacco plants: effect of subcellular targeting on quality of a recombinant dog gastric lipase. *Mol Breeding* **7**, 329-340.
- Gruber, V. and Spik, G.** (2000) Production of recombinant therapeutical protein in plants: Recombinant Human Lactoferrin from Transgenic Tobacco as an Example. *IJBC* **5**, 245-254.

- Gruber, V. and Theisen, M.** (2000) Genetically Modified Crops as a Source for Pharmaceuticals. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Trends and Perspectives, Doherty, Ed. 357-364.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J.K. and Jacobsen, J.V.** (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI  $\alpha$ -amylase gene promoter. *Plant Cell*. **7**, 1879-1891.
- Gubler, F., Reventos, D., Keys, M., Wats, R., Mundy, J., and Jacobsen, J.V.** (1999) Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcription activator in cereal aleurone. *Plant J*. **17**, 1-9.
- Gubler, F., Jacobsen, J.V.** (1992) Gibberellin-responsive elements in the promoter of a barley high-pI alpha-amylase gene. *Plant Cell*. **4**, 1435-41.
- Guérineau, F. and Mullineaux, P.** (1993) *In Plant molecular biology labfax* (ed.Croy R.R.D.), BioS Scientific Publishers, Blackwell Scientific Publications.
- Guignard, L.** (1901) La double fecondation dans le maïs. *J. Bot.* **15**, 37-50.
- Guyer, D., Patton, D., Ward, E.** (1995) Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 4997-5000.
- Halford, N.G., Forde, J., Shewry, P.R., Kreis, M.** (1989) Functional analysis of the upstream regions of a silent and an expressed member of a family of wheat seed protein genes in transgenic tobacco. *Plant Science* **62**, 207-216.
- Halford, N.G., Field, J.M., Blair, H. Urwin, P. Moore, K., Robert, L., Thompson, R., Flavell, R.B., Tatham, A.S., Shewry, P.R.** (1989) Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. *Theor. Appl. Gen.* **83**, 373-378.
- Hammond-Kosack, M.C.U., Holdsworth, M.J. and Bevan, M.W.** (1993) In vivo footprinting of a low molecular weight glutenin gene (LMWG-1D1) in wheat endosperm. *EMBO J*. **12**, 545-554.
- Hartings, H., Maddaloni, M., Lazzaroni, N., Di Fonzo, N., Motto, M., Salamini, F. and Thompson, R.** (1989) The *O2* gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *EMBO J*. **8**, 2795-2801.
- Hidalgo, P., Garreton, V.V., Berrios, C.G., Ojeda, H., Jordana, X., Holuigue, L.** (2001) A Nuclear Casein Kinase 2 Activity Is Involved in Early Events of Transcriptional Activation Induced by Salicylic Acid in Tobacco. *Plant Physiol*. **125**, 396-405.
- Higo, K., Saito, Y., Higo, H.** (1993) Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco. *Biosci Biotechnol Biochem*. **57**, 1477-81.

- Hill, D.E., Hope, I.A., Macke, J.P. and Struhl, K.** (1986) Saturation mutagenesis of the yeast *his3* regulatory site: Requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Science*, **234**, 451-457.
- Hoecker, U., Vasil, I.K., McCarty, D.R.** (1995) Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize. *Genes Dev.* **15**, 2459-69.
- 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.
- Holdsworth, M.J., Munoz-Blanco, J., Hammond-Kosack, M., Colot, V., Schuch, W. and Bevan, M.W.** (1995). The maize transcription factor Opaque-2 activates a wheat glutenin promoter in plant and yeast cells. *Plant Mol. Biol.* **29**, 711-720.
- Holsters, M., Dewaele, D., Depicker, A., Messenf, E., Van Montagu, M. and Schell, J.** (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.*, **136**, 181-187.
- Hood, E.E., Witcher, D., Maddock, S. et al.** (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extracting and purification. *Mol Breed* **3**, 291-306.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eiholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T.** (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, **227**, 1229-1231.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R.** (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61-68.
- Horvath, D.M., Chua, N.H.** (1996) Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol Biol.* **31**, 1061-72.
- Huang, N., Sutliff, T.D., Litts, J.C., Rodriguez, R.L.** (1990) Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol Biol.* **14**, 655-68.
- Hueros, G., Varotto, S., Salamini, F., Thompson, R.D.** (1995) Molecular characterization of BET1, a gene expressed in the endosperm transfer cells of maize. *Plant Cell.* **7**, 747-57.
- Hueros G, Royo J, Maitz M, Salamini F, Thompson RD.** (1999) Evidence for factors regulating transfer cell-specific expression in maize endosperm. *Plant Mol Biol.* **41**, 403-14.
- Hull, G.A., Halford, N.G., Kreis, M. and Shewry, P.R.** (1991) Isolation and characterization of genes encoding rye prolamins containing a highly repetitive sequence motif. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1111-1115.

- Inglett, G.E.** (1970) Corn: culture, processing, products. Major feed and food. Crops in agriculture and food series. AVI, Westport, Connecticut, U.S.A. **7**, 123-137.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T.** (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotech.*, **14**, 745-750.
- Izawa, T., Foster, R., Chua, N.H.** (1993) Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol.* **230**, 1131-44.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.
- Jensen, J.S., Marcker, K.A., Otten, L., Schell, J.** (1986) *Nature* **321**, 669.
- Jones, R.L., Jacobsen, J.W.** (1991) Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. *Int Rev Cytol.* **126**, 49-88.
- Jupin, I., Chua, N.H.** (1996) Activation of the CaMV as-1 cis-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA1a. *EMBO J.* **15**, 5679-89.
- Kao, C.Y., Cocciolone, S.M., Vasil, I.K., McCarty, D.R.** (1996) Localization and interaction of the *cis*-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS1, and light activation of the C1 gene of maize. *Plant Cell.* **8**, 1171-9.
- Kasarda, D.D., Bernadin, J.E. and Nimmo, C.C.** (1976) Wheat protein. In *Advances in Cereal Science and Technology*, **1**, Y. Pomeranz, ed (St. Paul, MN: Amer.Assoc. Cereal Chem.), 158-236.
- Katagiri, F., Lam, E. and Chua, NH.** (1989) Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature*, **340**, 727-730.
- Kawagoe, Y., Campbell, B.R., Murai, N.** (1994) Synergism between CACGTG (G-box) and CACCTG cis-elements is required for activation of the bean seed storage protein beta-phaseolin gene. *Plant J.* **5**, 885-90.
- Kawagoe, Y., Murai, N.** (1992) Four distinct nuclear proteins recognize in vitro the proximal promoter of the bean seed storage protein beta-phaseolin gene conferring spatial and temporal control. *Plant J.* **2**, 927-36.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J.** (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, **236**, 1299-1302.
- Kiesselbach, T.A.** (1999) The Structure and Reproduction of Corn. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*, P11.

- Kirihara, J.A., Petri, J.B., Messing, J.** (1988) Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-kDa zein protein from maize. *Gene* **71**, 359-70.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H.** (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 8849-55.
- Kodrzycki, R. Boston, R.S. and Larkins, B.A.** (1989). The opaque-2 mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell.* **1**, 105-114.
- Kolster, P., Krechting, C.F., van Gelde, W.M.J.** (1993) Expression of individual HMW glutenin-subunit genes of wheat (*Triticum aestivum* L) in relation to differences in the number and type of homoeologous subunits and differences in genetic background. *Theor. Appl. Genet.* **87**, 209-216.
- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai N. and Kumashiro, T.** (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.*, **10**, 165-174.
- Kowles, R.V., and Phillips, R.L.** (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7010-7014.
- Kowles, R.V. and Phillips, R.L.** (1988) Endosperm development in maize. *Int. Rev. Cytol.* **112**, 97-136.
- Kreis M., Forde, B.G., Rahman, S., Miflin, B.J. and Shewry, P.R.** (1985) Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J. Mol. Biol.* **183**, 499-502.
- Kridl, J.C., Vieira, J., Rubenstein, I., Messing, J.** (1984) Nucleotide sequence analysis of a zein genomic clone with a short open reading frame. *Gene* **28**, 113-8.
- Kriz, A.L.** (1989) Characterization of embryo globulins encoded by the maize Glb genes. *Biochem Genet.* **27**, 239-51.
- Lam, E., Benfey, P.N. and Chua, N.H.** (1989) Characterization of ASF-1 : A factor binding site on the 35S promoter of cauliflower mosaic virus. In *Plant Gene Transfer : UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series*, C. Lamb and R. Beachy, eds (New York : Academic Press).
- Lam, E. and Chua, N.H.** (1989) ASF-2 : a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. *Plant Cell.* **1**, 1147-1156.
- Lamacchia, C., Shewry, P.R., Di Fonzo, N., Forsyth, J.L., Harris, N., Lazzeri, P.A., Napier, J.A., Halford, N.G., Barcelo, P.** (2001) Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *J Exp Bot.* **52**, 243-50.
- Landry, J., Moureaux, T.** (1970) [Heterogeneity of corn seed glutelin: selective extraction and amino acid composition of the 3 isolated fractions] *Bull Soc Chim Biol.* **52**, 1021-37.

- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McNight, S.L.** (1988) The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. **240**, 1759-1764.
- Lane, B.G.** (1991) Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB J.* **5**, 2893-901.
- Larkins, B.A., Dilkes, B.P., Dante, R.A., Coelho, C.M., Woo, Y., Liu, Y.** (2001) Understanding the hows and whys of endoreduplication. *J. Exp. Bot.* **52**, 183-192.
- Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo YM, Liu Y.** (2001) Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *J. Exp. Bot.* **52**, 183-92.
- Leckie, L., Devoto, A. and De Lorenzo, G.** (1994) Normalisation of GUS by LUC activity from the same cell extract reduces transformation variability. *Biotechniques*, **17**, 52-56.
- Lending C.R. and Larkins B.A.** (1989) Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *The Plant Cell*.**1**, 1011-1023.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., Yanofsky, M.F.** (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* **404**, 766-70
- Lohmer, S., Maddaloni, M., Motto, M., Di Fronzo, N., Hartings, H., Salamini, F. and Thompson, R.D.** (1991) The maize regulatory locus Opaque-2 encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the b-32 gene. *EMBO J.* **10**, 617-624.
- Lopes, M.A., Larkins, B.A.** (1993) Endosperm origin, development and function. *Plant. Cell.* **5**, 1383-1399.
- Luan, S., Bogorad, L.** (1992) A rice cab gene promoter contains separate cis-acting elements that regulate expression in dicot and monocot plants. *Plant Cell* **4**, 971-81.
- Maddaloni M, Donini G, Balconi C, Rizzi E, Gallusci P, Forlani F, Lohmer S, Thompson R, Salamini F, Motto M.** (1996) The transcriptional activator Opaque-2 controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms. *Mol Gen Genet.* **250**, 4647-54.
- Maier, U-G., Brown, J.W.S., Toloczki, C. and Feix, G.** (1987) Binding of a nuclear factor to a consensus sequence in the 5' flanking region of zein genes from maize. *EMBO J.* **6**, 17-22.
- Maier, U.G., Grasser, K.D., Haass, M.M., Feix, G.** (1990) Multiple proteins bind to the P2 promoter region of the zein gene pMS1 of maize. *Mol Gen Genet.* **221**,164-70.
- Marchylo, B.A., Lukow, O.M. and Kruger, J.E.** (1992) Quantitative Variation in High Molecular Weight Glutenin Subunit 7 in Some Canadian Wheats. *Journal of Cereal Science* **15**, 29-37.

- Marks, M.D., Lindell, J.S. and Larkins, B.A.** (1985) Quantitative analysis of the accumulation of zein mRNA during maize endosperm development. *J. Biol. Chem.*, **260**, 16445-16450.
- Marks, M.D., Lindell, J.S., Larkins, B.A.** (1985a) Quantitative analysis of the accumulation of Zein mRNA during maize endosperm development. *J Biol Chem* 260, 16445-50.
- Marks, M.D., Lindell, J.S., Larkins, B.A.** (1985b) Nucleotide sequence analysis of zein mRNAs from maize endosperm. *J Biol Chem.* **260**, 16451-9.
- Marzábal, P., Busk, P.K., Ludevid, M.D. and Torrent, M.** (1998) The bifactorial endosperm box of  $\gamma$ -zein gene : characterisation and function of the Pb3 and GZM *cis*-acting elements. *Plant J.*, **16**, 41-52.
- Masalles, R.M., et al.** (1988). Plantes superiors. Història Natural dels Països Catalans. *Enciclopèdia Catalana.* **6**, 51.
- Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M., Sasaki, R.** (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol.* **27**, 1163-72.
- Mena, M., Vicente-Carbajosa, J. Schmidt, R.J. and Carbonero, P.** (1998) An endospermo-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. *Plant J.* **16**, 53-62.
- Mertz, E.T., Bates, L.S., Nelson, O.E.** (1964) Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* **145**, 279-280.
- Meshi, T. and Iwabuchi, M.** (1995) Plant transcription factors. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 1405-1420.
- Miao, Z.H., Lam, E.** (1995) Construction of a trans-dominant inhibitor for members of the TGA family of transcription factors conserved in higher plants. *Plant J.* **7**, 887-96.
- Mison, D. and Curling, J.** (2000) The Industrial Production Coasts of Recombinant Therapeutics Proteins Expressed in Transgenic Corn. *BioPharm* **13**, 48-54.
- Motto, M., Maddaloni, M., Ponziani, G., Bembrilla, M., Marotta, R., DiFonzo, N., Soave, C., Thompson, R.D. and Salamini, F.,** (1988) Molecular cloning of the o2-m5 allele of *Zea mais* using transposon marking. *Mol. Gen. Genet.* **212**, 488-494.
- Motto, M., DiFonzo, N., Hartings, H., Maddaloni, M., Salamini, F., Soave, C. and Thompson, R.D.** (1989) Regulatory genes affecting maize storage protein synthesis. *Onf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.* **6**, 87-114.
- Muentz, K.** (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* **38**, 77-99.

- Müller, M. and Knudsen, S.** (1993) The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. *Plant J.* **4**, 343-355.
- Müller, M., Muth, J.R., Gallusci, P., Knudsen, S., Maddaloni, M., Motto, M., Schmitz, D., Sorensen, M.B., Salamini, F., Von Wettstein, D. and Thompson, R.D.** (1995) Regulation of storage protein synthesis in cereal seeds: developmental and nutritional aspects. *J. plant Physiol.* **145**, 606-613.
- Müller, M. Dues, G., Balconi, C., Salamini, F., Thompson, R.D.** (1997) Nitrogen and hormonal responsiveness of the 22 kD  $\alpha$ -zein and b-32 genes in maize endosperms is displayed in the absence of the transcriptional regulator Opaque-2. *Plant J.* **12**, 281-291.
- Muller, M., Knudsen, S.** (1993) The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box. *Plant J.* **4**, 343-55.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Muth, J.R., Müller, M., Lohmer, S., Salamini, F. And Thompson, R.D.** (1996) The role of multiple binding sites in the activation of zein gene expression by Opaque-2. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 723-732.
- Neill, S.J., Horgan, R., Parry, A.D.** (1986) The carotenoid and abscisic acid content of *Viviparous* Kernels and seedlings of *Zea mays*. *Planta* **169**, 87-96.
- Neuffer, M.G., Coe, E.H., Wessler, S.R.** (1997) Mutants of maize. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.* 468pp.
- Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C., Gatz C.** (2000) Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters. *J Biol Chem.* **275**, 19897-905.
- Norre, F., Theisen, M. and Gruber, V.** (1999) Synthetic and chimeric promoters, expression cassettes, plasmids, vectors, transgenic plants and seeds containing them, and method for producing them. Brevet WO 01/23593.
- Norre, F. and Gruber, V.** (2001) Bifactorial endosperm box, trans-activating factor that binds thereto, and method of regulation of promoter activity. Brevet PCT/EP 02/08721.
- Norre, F., Peyrot, C., Garcia, C., Rancé, I., Drevet, J., Theisen, M. and Gruber, V.** (2002) Powerful effect of an atypical bifactorial endosperm box from wheat HMWG-Dx5 promoter in maize endosperm. *Plant Mol. Biol.* **50**, 699-712.
- Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N.H.** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-2.
- Olsen O.A.,** (1998) Endosperm developments. *The Plant Cell*, **10**, 485-488.

- Olsen, O.-A., Lemmon, B.E., Brown, R.C.** (1998) A model for aleurone cell development. *Trends Plant Sci.* **3**, 168-69.
- Olsen, O.A.** (2001) ENDOSPERM DEVELOPMENT: Cellularization and Cell Fate Specification. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **52**, 233-267.
- Oñate L, Vicente-Carbajosa J, Lara P, Diaz I, Carbonero P.** (1999) Barley BLZ2, a seed-specific bZIP protein that interacts with BLZ1 in vivo and activates transcription from the GCN4-like motif of B-hordein promoters in barley endosperm. *J Biol Chem.* **274**, 9175-82.
- Onodera Y, Suzuki A, Wu CY, Washida H, Takaiwa F.** (2001) A Rice Functional Transcriptional Activator, RISBZ1, Responsible for Endosperm-specific Expression of Storage Protein Genes through GCN4 Motif. *J Biol Chem.* **276**, 14139-52.
- Opsahl-Ferstad, H.G., Le Deunff, E., Dumas, C., Rogowsky, P.M.** (1997) ZmEsr, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant J.* **12**, 235-46.
- Pedersen, K., Bloom, K.S., Anderson, J.N., Glover, D.V., Larkins, B.A.** (1980) Analysis of the complexity and frequency of zein genes in the maize genome. *Biochemistry* **19**, 1644-50.
- Pedersen, K., Argos, P., Naravana, S.V., Larkins, B.A.** (1986) Sequence analysis and characterization of a maize gene encoding a high-sulfur zein protein of Mr 15,000. *J Biol Chem.* **261**, 6279-84.
- Pérez-Grau, Ll., Cortadas, J., Puigdomènech, P., and Palau, J.** (1986) Accumulation and subcellular localization of glutenin-2 transcripts during maturation of maize endosperm. *FEBS*, **202**, 145-148.
- Perret, S., Merle, C., Bernocco, S., Berland, P., Garrone, R., Hulmes, D.J., Theisen, M., Ruggiero, F.** (2001) Unhydroxylated triple helical collagen I produced in transgenic plants provides new clues on the role of hydroxyproline in collagen folding and fibril formation. *J Biol Chem.* **276**, 43693-8.
- Pieterse, C.M., van Loon, L.C.** (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4**, 52-58.
- Piette, J., Hirai, S.-I. and Yaniv, M.** (1988) Constitutive synthesis of activator protein 1 transcription factor after viral transformation of mouse fibroblasts. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3401-3405.
- Ponte, I., Guillen, P., Debon, R.M., Reina, M., Aragay, A., Espel, E., Di Fonzo, N., Palau, J.** (1994) Narrow A/T-rich zones present at the distal 5'-flanking sequences of the zein genes Zc1 and Zc2 bind a unique 30 kDa HMG-like protein. *Plant Mol Biol.* **26**, 1893-906.
- Pontier, D., Miao, Z.H., Lam, E.** (2001) Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant J.* **27**, 529-38.

- Prat S., Pérez-Grau L., Puigdomenech P.** (1987) Multiple variability in the sequence of a family of maize endosperm proteins. *Gene*, **52**, 4149.
- Pysh, L.D., Aukerman, M.J. and Schmidt, R.J.** (1993) OHP1: a maize basic domain/leucine zipper protein that interacts with Opaque 2. *Plant Cell*, **5**, 227-236.
- Qin, X-F., Holuigue, L., Horvath, D.M. and Chua, N-H.** (1994) Immediate early transcription activation by salicylic acid via the Cauliflower Mosaic Virus *as-1* Element. *Plant Cell*. **6**, 863-874.
- Quayle, T. and Feix, G.** (1992) Functional analysis of the -300 region of maize zein genes. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 369-374.
- Rancé, I., Norre, F., Gruber, V. and Theisen, M.** (2002). Combination of viral promoter sequences to generate highly active chimeric promoters for protein over-expression in plants. *Plant Science* **162**, 833-842.
- Reina, M., Ponte, I., Guillén, P., Boronat, A. and Palau, J.** (1990) Sequence analysis of a genomic clone encoding a Zc2 protein from *Zea mays* W64 A. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6426.
- Reiser, L., Fischer, R.L.** (1993) The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* **5**, 1291-301.
- Reymond, P., Farmer, E.E.** (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol.* **1**, 404-11.
- Rieping, M., Fritz, M., Prat, S., Gatz, C.** (1994) A dominant negative mutant of PG13 suppresses transcription from a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*. **6**, 1087-98.
- Robert, L.S., Thompson, R.D. and Flavell, R.B.** (1989) Tissue-Specific Expression of a Wheat High Molecular Weight Glutenin Gene in Transgenic Tobacco. *Plant Cell*. **1**, 569-578.
- Robichaud, C.S., Sussex, I.M.** (1986) The response of viviparous-1 and wild-type embryos of *Zea mays* to culture in the presence of abscisic acid. *J. Plant Physiol.* **126**, 235-42.
- Roussel, A., Miled, N., Berti-Dupuis, L., Riviere, M., Spinelli, S., Berna, P., Gruber, V., Verger, R., Cambillau, C.** (2002) Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor. *J Biol Chem.* **277**, 2266-74.
- Royo, J., Diaz, I., Rodriguez-Palenzuela, P., Carbonero, P.** (1996) Isolation and promoter characterization of barley gene *Itr1* encoding trypsin inhibitor BTI-CMe: differential activity in wild-type and mutant *lys3a* endosperm. *Plant Mol Biol.* **31**, 1051-9.
- Ruggiero, F., Exposito, J.Y., Bournat, P., Gruber, V., Perret, S., Comte, J., Olganier, B., Garrone, R., Theisen, M.** (2000) Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett.* **469**, 132-6.

- Ruth, J., Schweyen, R.J., Hirt, H.** (1994) The plant transcription factor TGA1 stimulates expression of the CaMV 35S promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol.* **25**, 323-8.
- Sakai, T., Takahashi, Y., Nagata, T.** (1998) The identification of DNA binding factors specific for as-1-like sequences in auxin-responsive regions of parA, parB and parC. *Plant Cell Physiol.* **39**, 731-9.
- Salmon, V., Legrand, D., Slomianny, M.C., el Yazidi, I, Spik., G, Gruber, V., Bournat, P., Olagnier, B., Mison, D., Theisen, M., Merot, B.** (1998) Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein Expr Purif.* **13**, 127-35.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) In "Molecular cloning : a laboratory manual, second edition" . Cold Spring Harbor, New-York.
- Sargant, E.** (1900) Recent works on the results of fertilization in angiosperms. *Ann. Bot.*, **14**, 689-712.
- Schel, J.H.N., Kieft, H., Van Lammeren A.A.M.** (1984) Interactions between embryo and endosperm during early developmental stages of maize caryopses (*Zea mays*). *Can. J. Bot.* **62**, 2842-53.
- Schiltz, P.** (1967) Création de *Nicotiana tabacum* résistants à *Peronospora tabacina* Adam ; Analyse histologique et biologique de la résistance. *Thèse de Doctorat d'Etat*, p145.
- Schindler, U., Beckmann, H. and Cashmore, A.R.** (1992) TGA1 and G-Box binding factors: two distinct classes of Arabidopsis Leucine Zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. *The Plant Cell*, **4**, 1309-1319.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A. and Burr, B.** (1987) Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque-2*. *Science.* **238**, 960-963.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A., Aukerman, M.J. and Burr, B.,** (1990) Maize regulatory gene *opaque-2* encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 46-50.
- Schmidt, R.J., Ketudat, M., Aukerman, M.J. and Hoschek, G.** (1992) Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell*, **4**, 689-700.
- Seilmeier, W., Belitz, H-D. and Weiser, H.** (1991) Separation and quantitative determination of high molecular weight subunits of glutenin from different wheat varieties and genetics variants of the variety Sicco. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung* **2**, 124-129.
- Shewry P.R., Napier, J.A., and Tatham, A.S.** (1995) Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell.* **7**, 945-956.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., Halford, N.G.** (1999) The prolamins of the Triticeae. P.R. Shewry and R. Casey (eds). *Seed Proteins*, 35-78.

- Shewry, P.R. and Casey, R.** (1999) Seed proteins. *In Seed Proteins*, P.R. Shewry and R. Casey, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers) 1-10.
- Sijmons, P.C., Dekker, B.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., van den Elzen, P.J., Hoekema, A.** (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology* **8**, 217-21.
- Singh, K.B., Tokuhsa, J.G., Dennis, E.S. and Peacock, W.J.** (1989) Saturation mutagenesis of the octopine synthase enhancer: correlation of mutant phenotypes with binding of a nuclear protein factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 3733-3737.
- Singh, K., Dennis, E.S., Ellis, J.G., Llewellyn, D.J., Tokuhsa, J.G., Wahleithner, J.A., Peacock, W.J.** (1990) OCSBF-1, a maize ocs enhancer binding factor: isolation and expression during development. *Plant Cell*, **2**, 891-903.
- Singh, K.B.** (1998) Transcriptional regulation in plants : the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* **118**, 1111-1120.
- Singletary, G.W., Doehlert, D.C., Wilson, C.M., Muhitch, M.J. and Below, F.E.** (1990) Response of enzymes and storage proteins of maize endosperm to nitrogen supply. *Plant Physiol.* **94**, 858-864.
- Skeiky, Y.A., Iatrou, K.** (1991) Synergistic interactions of silkworm chorion promoter-binding factors. *Mol Cell Biol.* **11**, 1954-64.
- Smith, A.M.** (1999) Making starch. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 223-29.
- Soave, C., Tardani, L., Di Fonzo, N., Salamini, F.** (1981) Zein level in maize endosperm depends on a protein under control of the opaque-2 and opaque-6 loci. *Cell.* **27**, 403-10.
- Spena, A., Viotti, A., Pirrotta, V.** (1983) Two adjacent genomic zein sequences: structure, organization and tissue-specific restriction pattern. *J Mol Biol.* **169**, 799-811.
- Stange, C., Ramirez, I., Gomez, I., Jordana, X., Holuigue, L.** (1997) Phosphorylation of nuclear proteins directs binding to salicylic acid-responsive elements. *Plant J.* **11**, 1315-24.
- Strompen, G., Gruner, R., Pfitzner, U.M.** (1998) An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Mol Biol.* **37**, 871-83.
- Sumner-Smith, M., Rafalski, J.A., Sugiyama, T., Stoll, M. and Söll, D.** (1985) Conservation and variability of wheat  $\alpha$ /B-gliadin genes. *Nucl. Acids Res.* **13**, 2905-3916.
- Takahashi, Y., Kusaba, M., Hiraoka, Y., Nagata, T.** (1991) Characterization of the auxin-regulated par gene from tobacco mesophyll protoplasts. *Plant J.* **1**, 327-32.
- Takaiwa, F., Oono, K. and Kato, A.** (1991) Analysis of the 5' flanking region responsible for the endosperm-specific expression of a rice glutelin chimeric gene in transgenic tobacco. *Plant. Mol. Biol.* **16**, 49-58.

- Takaiwa, F., Yamanouchi U., Yoshihara T., Washida H., Tanabe F., Kato A. and Yamada K.** (1996) Characterization of common *cis*-regulatory elements responsible for the endosperm-specific expression of members of the rice glutelin multigene family. *Plant. Mol. Biol.*, **30**, 1207-1221.
- Takaiwa, F. and Oono, K.** (1990) Interaction of an immature seed-specific trans-acting factor with the 5' upstream region of a rice glutelin gene. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 289-293.
- Terzaghi, W.B., Cashmore, A.R.** (1995) Photomorphogenesis. Seeing the light in plant development. *Curr Biol.* **5**, 466-8.
- Theisen, M.** (1997) Les plantes comme bioréacteurs. *Biofutur* **168**, 47-51.
- Thomas, M.S. and Flavell, R.B.** (1990) Identification of an Enhancer Element for the Endosperm-Specific Expression of High Molecular Weight Glutenin. *Plant Cell*, **2**, 1171-1180.
- Thomas J.O. and Travers A.A.** (2001) HMG1 and 2, and related architectural DNA-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 167-174.
- Thomas, T.L.** (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell*. **5**, 1401-10.
- Thompson, G.A. and Larkins, B.A.** (1989) Structural elements regulating zein gene expression. *BioEssays*, **10**, 108-112.
- Tokuhisa, J.G., Singh, K., Dennis, E.S. and Peacock, W.J.** (1990) A DNA-binding protein factor recognizes two binding domains within the octopine synthase enhancer element. *Plant Cell*, **2**, 215-24.
- Torrent, M., Alvarez, I., Geli, M.I., Dalcol, I. and Ludevid, D.** (1997) Lysine-rich modified  $\gamma$ -zein accumulate in protein bodies of transiently transformed maize endosperms. *Plant Mol. Biol.*, **34**, 139-149.
- Ueda, T., Wawerczak, W., Ward, K., Sher, N., Ketudat, M., Schmidt, R.J. and Messing, J.** (1992) Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by Opaque-2 protein. *Plant Cell*, **4**, 701-709.
- Ueda, T., Wang, Z., Pham, N. and Messing, J.** (1994) Identification of a transcriptional activator-binding element in the 27-kilodalton zein promoter, the -300 element. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4350-4359.
- Ulmasov, T., Hagen, G. and Guilfoyle, T.** (1994) The ocs element in the soybean GH2/4 promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant Mol Biol.* **26**, 1055-64.
- Van der Zaal, E.J., Droog, F.N., Boot, C.J., Hensgens, L.A., Hoge, J.H., Schilperoort, R.A. and Libbenga, K.R.** (1991) Promoters of auxin-induced genes from tobacco can lead to auxin-inducible and root tip-specific expression. *Plant Mol Biol.* **16**, 983-98.

- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. and Rocha-Sosa, M.** (1990) Construction of an intron-containing marker gene : Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.*, **220**, 245-250.
- Vicente-Carbajosa, J., Moose, S.P., Parson, R.L. and Schmidt, R.J.** (1997) A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7685-7690.
- Vicente-Carbajosa, J., Oñate, L., Lara, P., Díaz, I. and Carbonero, P.** (1998) Barley BLZ1: a bZIP transcriptional activator that interacts with endosperm-specific gene promoters. *Plant J.* **13**, 629-640.
- Vijayaraghavan, M.R. and Prabhakar, K.** (1984) The endosperm. In *Embryology of Angiosperms*, B.M. Johri, ed (Berlin: Springer-Verlag), 319-376.
- Walbot, V.** (1994) Overview of key steps in aleurone development. In *The Maize Handbook*, ed. M freeling, V Walbot, 78-80. New York: Springer-Verlag.
- Wang, X. and Larkins, B.A.** (2001) Genetic analysis of amino acid accumulation in opaque-2 maize endosperm. *Plant Physiol.* **125**, 1766-77.
- Washida, H., Wu, C-Y., Suzuki, A., Yamanouchi, U., Akihama, T., Harada, K. and Takaiwa, F.** (1999) Identification of *cis*-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *Glub-1*. *Plant Mol. Biol.* **40**, 1-12.
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J. and Schulz, A.** (1996) The similarities of *bar* and *pat* gene products make t-(hem equally applicable for plant engineers. *Nature Biotech.* **14**, 1274-1278.
- Weintraub, H., Davis, R., Lockshon, D. and Lassar A.** (1990) MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: occupancy of two sites is required for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5623-7.
- Wentworth, B.M., Donoghue, M., Engert, J.C., Berglund, E.B. and Rosenthal, N.** Paired MyoD-binding sites regulate myosin light chain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1242-6.
- Whitelam, G.C., Cockburn, B., Gandecha, A.R. and Owen, M.R.** (1993) Heterologous protein production in transgenic plants. *Biotechnol Genet Eng Rev.* **11**, 1-29.
- Wilson, D.R. and Larkins, B.A.** (1984) Zein gene organization in maize and related grasses. *J Mol Evol.* **20**, 330-340.
- Wilson, C.M.** (1983) Seed protein fractions of maize, sorghum, and related cereals. Pages 271-307 in : *Seed Proteins : Biochemistry, Genetics, Nutritive Value*. W. Gottschalk and H.P. Muller, eds. M. Nijhoff/Junk, The Hague.

- Witcher, D.R., Hood, E.E., Peterson, D. et al.** (1998) Commercial production of  $\beta$ -glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants. *Mol Breeding* **4**, 301-312.
- Woo Y.-M., Hu D.W.-N., Larkins B.A., and Jung R.** (2001) Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. *The Plant Cell.*, **13**, 2297-2317.
- Wu, C-Y., Suzuki, A., Washida, H. and Takaiwa, F.** (1998) The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by Opaque-2 in transgenic plant rice. *Plant J.* **14**, 673-684.
- Wu, C-Y., Washida, H., Onodera, Y., Harada, K. and Takaiwa, F.** (2000) Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal *cis*-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant J.* **23**, 415-421.
- Wurch, T., Lestienne, F. And Pauwels, P.J.** (1998) A modified overlap extension PCR method to create chimeric genes in the absence of restriction enzymes. *Biotechnology Techniques*, **12**, 653-657.
- Xiang, C., Miao, Z.H. and Lam, E.** (1996) Coordinated activation of as-1-type elements and a tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Mol Biol.* **32**, 415-426.
- Yanagisawa, S and Izui, K.** (1993) Molecular cloning of two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif. *J. Biol. Chem.* **268**, 16028-16036.
- Yanagisawa, S.** (1995) A novel DNA-binding domain that may form a single zinc finger motif. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3403-10.
- Yanagisawa, S.** (1996) Dof DNA-binding proteins contain a novel zinc finger motif. *Trends Plant Sci.* **1**, 213-214.
- Yanagisawa, S.** (1997) Dof DNA-binding domains of plant transcription factors contribute to multiple protein-protein interactions. *Eur. J. Biochem.*, **250**, 403-410.
- Yanagisawa S, Sheen J.** (1998) Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell.*, **10**, 75-89.
- Yoshihara, T., Washida, H. and Takaiwa, F.** (1996) A 45-bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of a rice storage protein glutelin gene, *GluA-3*. *FEBS Let.* **383**, 213-218.
- Young T.E., Gallie D.R. and DeMason D.A.** (1997) Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and shrunken2 genotypes. *Plant Physiol.*, **115**, 737-751.

- Young T.E. and Gallie D.R.** (1999) Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Mol Biol.*, **39**, 915-26.
- Yunes, J.A., Neto, G.C., da Silva, M.J., Leite, A., Ottoboni, L.M.M. and Arruda, P.** (1994) The transcriptional activator Opaque-2 recognizes two different target sequences in the 22-kDa-like  $\alpha$ -prolamin genes. *Plant Cell*, **6**, 237-249.
- Zhang, B., Chen, W., Foley, R.C., Buttner, M. and Singh, KB.** (1995) Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. *Plant Cell*, **7**, 2241-2252.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. and Dong, X.** (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6523-6528.
- Zhang, S., Klessig, D.F.** (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 7225-30.
- Zhao, J. and Grafi, G.** (2000) The high mobility group I/Y protein is hypophosphorylated in endoreduplicating maize endosperm cells and is involved in alleviating histone H1-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem*. **275**, 27494-27499.
- Zheng, Z., Kawagoe, Y., Xiao, S., Li, Z., Okita, T., Hau, T.L., Lin, A., Murai, N.** (1993) 5' distal and proximal *cis*-acting regulator elements are required for developmental control of a rice seed storage protein glutelin gene. *Plant J*. **4**, 357-66.
- Zhong, G-Y., Peterson, D., Deleney, D.E. et al.** (1999) Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Mol Breeding* **5**, 345-356.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>I. Le grain de maïs.....</b>	<b>11</b>
1. Morphologie du grain de maïs. ....	11
2. Développement de l'albumen de maïs. ....	12
2.1. Son origine. ....	12
2.2. La double fécondation. ....	12
2.3. Les quatre phases du développement. ....	12
3. Les protéines de réserve du grain de maïs.....	17
<b>II. Régulation de l'expression des gènes zéïnes.....</b>	<b>19</b>
1. Régulation transcriptionnelle des gènes zéïnes. ....	19
1.1. Le facteur de transcription Opaque-2.....	19
1.2. Le facteur de transcription PBF. ....	20
1.3. La boîte « albumen bifactorielle ».....	21
1.4. Le motif AACAA.....	23
2. Impact des facteurs environnementaux sur la régulation des gènes zéïnes.....	24
2.1. La régulation métabolique.....	24
2.2. L'influence de la lumière. ....	25
<b>III. Projet de thèse.....</b>	<b>26</b>
<b>MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>28</b>
<b>I. Le matériel végétal.....</b>	<b>28</b>
1 Le maïs <i>Zea mays</i> L. ....	28
1.1. Lignées A188 et SN 87165. ....	28
1.2. Culture du maïs. ....	28
2. Le tabac <i>Nicotiana tabacum</i> L. ....	29
2.1. Variété PBD6. ....	29
2.2. Culture du tabac. ....	29
<b>II. Les souches bactériennes. ....</b>	<b>29</b>
1. <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ . ....	29
2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	30
<b>III. Les plasmides d'expression transitoire.....</b>	<b>30</b>
1. Les plasmides de référence. ....	30
1.1. Obtention de pMRT1144. ....	30
1.2. Obtention de pMRT1276. ....	31
1.3. Obtention de pMRT1092. ....	31
1.4. Description du plasmide pCaMV35Sluc.....	32

2. Obtention du plasmide pMRT1125 contenant la séquence entière du promoteur HMWG-Dx5 de blé. ....	32
3. Obtention des plasmides d'expression transitoire contenant des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5.....	32
<b>IV. Les plasmides binaires.....</b>	<b>35</b>
1. Plasmides binaires de référence. ....	35
2. Obtention des plasmides binaires utilisés pour générer les plants de maïs transgéniques. ....	35
3. Obtention des plasmides binaires utilisés pour générer les plants de tabac transgéniques. ....	36
<b>V. Le domaine de liaison à l'ADN natif et muté de la protéine PBF. ....</b>	<b>36</b>
<b>METHODES.....</b>	<b>37</b>
<b>I. Analyses des acides désoxyribonucléiques.....</b>	<b>37</b>
1. Préparation de l'ADN plasmidique. ....	37
1.1. Extraction de l'ADN plasmidique à partir d' <i>Escherichia coli</i> . ....	37
1.2. Extraction de l'ADN plasmidique à partir d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	37
2. Séparation et visualisation des molécules d'ADN. ....	38
3. Dosage de l'ADN. ....	38
3.1. En spectrophotométrie.....	38
3.2. En fluorimétrie. ....	38
3.3. En gel d'agarose. ....	39
4. Clonage dans un vecteur plasmidique. ....	39
4.1. Digestions enzymatiques de l'ADN. ....	39
4.2. Modifications enzymatiques de l'ADN.....	40
4.3. Réaction de polymérisation en chaîne.....	40
4.4. Ligation de l'ADN plasmidique. ....	43
4.5. Transformation bactérienne.....	43
<b>II. Transformation transitoire du matériel végétal.....</b>	<b>44</b>
1. Préparation des extraits végétaux. ....	44
1.1. Obtention et préparation des grains de maïs <i>SN 87165</i> (L2).....	44
1.2. Préparation des feuilles de tabac <i>PBD6</i> . ....	45
2. Adsorption de l'ADN plasmidique sur les microparticules. ....	45
3. Transformation transitoire des extraits végétaux par biolistique. ....	46
3.1. Bombardement des albumens de maïs et expression transitoire. ....	46
3.2. Bombardement des feuilles de tabac et expression transitoire.....	46
<b>III. Transformation stable du matériel végétal. ....</b>	<b>47</b>
<b>1. Transformation stable du maïs J1 par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>. ....</b>	<b>47</b>
2. Transformation stable du tabac <i>PBD6</i> par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	47

<b>IV. Méthodes d'analyses relatives aux protéines.....</b>	<b>48</b>
1. Dosage luminométrique des activités enzymatiques dans les tissus végétaux.....	48
1.1. Préparation de l'extrait brut clarifié. ....	48
1.2. Dosage luminométrique de l'activité $\beta$ -glucuronidase. ....	49
1.3. Dosage luminométrique de l'activité luciférase. ....	49
2. Dosage des protéines solubles.....	49
3. Révélation histochimique de l'activité de la $\beta$ -glucuronidase. ....	50
<b>V. Expériences de retard de migration sur gel. ....</b>	<b>50</b>
1. Préparation des protéines nucléaires d'albumens de maïs L2.....	50
2. Préparation des protéines nucléaires de feuilles de tabac. ....	51
3. Retard de migration (EMSA). ....	51
4. « Proteolytic Clipping Bandshift Assay » (PCBA).....	52
5. Méthodes d'analyse des complexes « ADN-protéines ».....	52
<b>RESULTATS &amp; DISCUSSION .....</b>	<b>53</b>
<b>I. Description des séquences promotrices dérivées de PrHMWG-Dx5.....</b>	<b>53</b>
1. Analyse structurale détaillée du promoteur HMWG-Dx5 original.....	53
1.1. Caractérisation théorique de la séquence promotrice du gène HMWG-Dx5 de blé, données bibliographiques.....	53
1.2. Création de promoteurs HMWG-Dx5 modifiés.....	55
2. Promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5.....	56
2.1. Description des séquences promotrices exogènes.....	56
2.2. Création de promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5. ....	58
<b>II. Activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans le maïs.....</b>	<b>59</b>
1. Expression transitoire dans l'albumen de maïs.....	59
1.1. Coloration histochimique des albumens de maïs. ....	59
1.2. Dosage luminométrique de l'activité $\beta$ -glucuronidase dans l'albumen de maïs.....	60
2. Expression stable dans le maïs transgénique.....	64
2.1. Activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans les grains de maïs transgéniques. ....	64
2.2. Spécificité tissulaire des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5.....	67
2.3. Bilan d'activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5. ....	68
<b>III. Activité des promoteurs chimériques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans le tabac.....</b>	<b>69</b>
1. Expression transitoire dans les feuilles de tabac. ....	69
2. Expression stable dans le tabac transgénique.....	70
2.1. Activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans les feuilles de tabac transgéniques. ....	71
2.1. Activité des promoteurs synthétiques dérivés de PrHMWG-Dx5 dans les graines de tabac transgéniques. ....	72

<b>IV. Identification des interactions ADN-protéines potentiellement responsables de l'activité du promoteur HMWG-Dx5 et des promoteurs dérivés dans l'albumen de maïs.....</b>	<b>74</b>
1. Liaison <i>in vitro</i> du facteur de transcription PBF à la boîte prolamine Pb1 du promoteur HMWG-Dx5.....	74
2. Liaison <i>in vitro</i> d'au moins deux protéines nucléaires d'albumen de maïs sur la boîte G « like » du promoteur HMWG-Dx5.....	75
2.1. Identification et spécificité des interactions moléculaires.....	75
2.2. Caractérisation des deux complexes « oG-protéines ».....	76
2.3. Comparaison de l'activité ASF-1 de l'albumen de maïs avec l'activité ASF-1 des feuilles de tabac.....	79
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>81</b>
<b>I. Identification et caractérisation moléculaire d'éléments <i>cis</i>-régulateurs dans la séquence promotrice de PrHMWG-Dx5.....</b>	<b>81</b>
1. Identification d'une boîte albumen bifactorielle atypique dans la séquence promotrice de PrHMWG-Dx5.....	81
2. Effet <i>cis</i> -activateur puissant conféré par la répétition du fragment -225/-136 de PrHMWG-Dx5.....	82
3. Caractérisation des interactions moléculaires.....	85
3.1. Liaison <i>in vitro</i> et fonctions régulatrices potentielles de la protéine PBF <i>via</i> Pb1... ..	85
3.2. Activité de liaison redondante des protéines nucléaires de l'albumen de maïs avec la boîte G « like » de PrHMWG-Dx5.....	87
<b>II. Effet <i>cis</i>-régulateur conféré par les séquences as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV sur l'activité transcriptionnelle de PrHMWG-Dx5.....</b>	<b>90</b>
<b>III. Modèle de régulation transcriptionnelle du promoteur HMWG-Dx5 dans l'albumen de maïs.....</b>	<b>92</b>
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>94</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>97</b>
<i>Résumé</i> : .....	121
<i>Abstract</i> : .....	121

## REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU PROMOTEUR HMWG-DX5 DE BLE DANS L'ALBUMEN DE MAÏS ET CREATION DE PROMOTEURS CHIMERIQUES.

### *Résumé :*

La région promotrice proximale du gène *Glu-1D1* de gluténine de haut poids moléculaire de blé (PrHMWG-Dx5) porte une boîte albumen bifactorielle atypique qui comprend un motif G « like » (5'-TTACGTGG-3') situé en amont d'une boîte prolamine (Pb1, 5'-TGCAAAG-3'). Les tests d'expression transitoire dans l'albumen de maïs indiquent que le fragment promoteur minimal contenant au moins la boîte G « like » est nécessaire et suffisant pour une activité maximale de PrHMWG-Dx5. Dans le maïs transgénique, nous avons montré que la séquence de 89 pb qui contient la boîte albumen bifactorielle se comporte comme une unité *cis*-activatrice fonctionnelle. Sa répétition en tandem direct confère un effet activateur additif puissant spécifique de l'albumen. En contraste, l'association des séquences activatrices as-1 et as-2 du promoteur 35S du CaMV avec des séquences promotrices dérivées de PrHMWG-Dx5 dérégule son activité dans les plants de maïs et de tabac. Par la technique de retard de migration, nous avons démontré que la boîte G « like » peut fixer deux groupes de protéines qui ont respectivement la même affinité de liaison à l'ADN que les facteurs de transcription de la famille Opaque-2 et de la famille ASF-1. Nos résultats nous conduisent à proposer un modèle hypothétique qui repose sur une dualité fonctionnelle de la boîte G « like » dans l'albumen des céréales, et suggère son implication potentielle alternativement dans la synthèse des protéines de réserve et dans la réponse de défense de la plante.

**Mots Clés :** Albumen de maïs - Promoteurs chimériques - HMWG-Dx5 - Boîte albumen bifactorielle - Facteurs de transcription - Réponse de défense des plantes.

\*\*\*\*\*

## TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF WHEAT HMWG-Dx5 PROMOTER IN MAIZE ENDOSPERM AND CREATION OF CHIMERIC PROMOTERS.

### *Abstract:*

The proximal region of the high molecular weight glutenin promoter of the *Glu-1D1* gene (PrHMWG-Dx5) carries an atypical bifactorial endosperm box containing a G-box like motif (5'-TTACGTGG-3') followed by a prolamin-box motif (Pb1, 5'-TGCAAAG-3'). Transient expression assays in maize endosperm indicate that a promoter fragment containing at least the G-box like element is necessary and sufficient for maximal expression of the HMWG-Dx5 promoter. In transformed maize, we have shown that a 89bp sequence bearing the bifactorial endosperm box behaves like a functional *cis*-acting unit. Its direct tandem repetition confers a strong specific additive effect in endosperm tissue. In contrast, the fusion of the activation sequences as-1 and as-2 of the CaMV 35S promoter with PrHMWG-Dx5 derived sequences deregulates its activity in transformed maize and tobacco. Using gel mobility shift assays we have demonstrated that the G-box like motif binds two protein groups, which respectively, have the same DNA binding affinities as transcription factors of either the O2 family or the ASF-1 family. Our results lead us to propose a hypothetic model which is based on a functional duality of the G-box like element in cereal endosperms, and suggests its potential alternative implication in storage protein synthesis and in plant defense response.

**Key words :** Maize endosperm - Chimeric promoters - HMWG-Dx5 - Bifactorial endosperm box - *Trans*-acting factors - Plant defense response.