

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

STRASBOURG I

2005

THESE

présentée à la

FACULTE DES SCIENCES DE LA VIE

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS
PASTEUR**

Discipline : SCIENCES DU VIVANT

Spécialité : ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

Laure SCHMIDLIN

*Etude moléculaire des facteurs cellulaires et viraux responsables de
la prolifération racinaire observée sur plantes infectées par le virus
des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (BNYVV)*

Soutenue le 29 novembre 2005 devant la Commission d'Examen :

Mario KELLER

RAPPORTEUR INTERNE

Carole CARANTA

RAPPORTEUR EXTERNE

Martine BOCCARA

RAPPORTEUR EXTERNE

Guy WEYENS

EXAMINATEUR

David GILMER

DIRECTEUR DE THESE

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP-CNRS) Strasbourg

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

STRASBOURG I

2005

THESE

présentée à la

FACULTE DES SCIENCES DE LA VIE

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS
PASTEUR**

Discipline : SCIENCES DU VIVANT

Spécialité : ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

par

Laure SCHMIDLIN

*Etude moléculaire des facteurs cellulaires et viraux responsables de
la prolifération racinaire observée sur plantes infectées par le virus
des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (BNYVV)*

Soutenue le 29 novembre 2005 devant la Commission d'Examen :

Mario KELLER

RAPPORTEUR INTERNE

Carole CARANTA

RAPPORTEUR EXTERNE

Martine BOCCARA

RAPPORTEUR EXTERNE

Guy WEYENS

EXAMINATEUR

David GILMER

DIRECTEUR DE THESE

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP-CNRS) Strasbourg

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à Monsieur le Professeur David Gilmer pour m'avoir accueilli dans son équipe dès mon entrée en DEA, et pour m'avoir énormément guidé et conseillé tout au long de ce travail. Je le remercie tout particulièrement de s'être toujours montré disponible pour la correction de mes multiples rapports, résumés et enfin ma rédaction de thèse. Je le remercie également de m'avoir souvent permis de m'absenter pour suivre de nombreux cours et formations dispensés par l'Ecole Doctorale de l'Université de Strasbourg, ainsi que pour effectuer un bilan de compétences avec l'Association Bernard Grégory. Ceci m'a énormément apporté au point de vue scientifique et personnel, pour mieux appréhender la suite de ma carrière.

Je tiens à remercier évidemment Monsieur le Professeur Mario Keller, ainsi que le Professeur Martine Boccara et le Docteur Carole Caranta, d'avoir bien voulu juger ce travail de thèse.

Je remercie tous les membres de mon équipe (laboratoires 309 et 409) pour leur grande disponibilité, leurs nombreux conseils et leurs encouragements : Véronique Ziegler-Graff, Danièle Scheidecker, Salah Bouzoubaa, Hubert Guilley, Gérard Jonard, Ken Richards du laboratoire 309, Elodie Klein, Didier Link, Audrey Schirmer et Guillaume Vetter de l'équipe 409.

Ce travail de thèse a été possible grâce au financement CIFRE soutenu par la société ADVANTA France devenue par la suite SESVanderHave. Je tiens à remercier Messieurs Marc Lefebvre et Guy Weyens de SESVanderHave Tienen Belgique, pour m'avoir fait confiance depuis le début et pour m'avoir toujours encouragé dans mes recherches. Je les remercie également avec Monsieur Eric De Bruyne, pour m'avoir permis d'effectuer un stage au sein de leur société en juillet 2003 pour compléter mon étude sur les betteraves. Je remercie également Xavier Ballenghien de SESVanderHave France, pour son aide administrative.

Ce travail n'aurait en aucun cas été possible sans l'intervention de nombreuses personnes au sein de l'IBMP : Jérôme Mutterer et Mathieu Erhardt de la plateforme de microscopie, Valérie Cognat pour son aide en bioinformatique, Philippe Hammann et Malek Alioua du service de séquençage, les jardiniers Aurélie Bailly, Richard Wagner, Michel Kernéis, et Sébastien Staerck pour leur attention envers mes nombreuses petites plantes chéries, et enfin Michèle Hadji pour toute cette vaisselle de laboratoire.

Je remercie naturellement les stagiaires qui ont mis généreusement une main à la pâte et qui ont contribué à rendre plus agréable ce travail : Jessica Frongia, Konstantina Katsarou et Gaëlle Mercenne.

Un grand merci à toutes les personnes qui, grâce à leur disponibilité, leur soutien et leur bonne humeur m'ont aidé dans les moments difficiles : Valérie Laval, Rozenn Ménard, Valérie Cognat, Jérôme Mutterer, Mathieu Erhardt, Marc Bergdoll, Gabrielle Haas, Emmanuel Boutant, Esther Lechner et les autres...

Enfin, mes derniers remerciements vont à mes parents et mon compagnon Lionel qui m'ont toujours beaucoup soutenu et surtout énormément encouragé à poursuivre dans cette voie.

Et Maman, tout particulièrement, je ne saurais comment te remercier pour ton énorme soutien tout au long de ce chemin, ta grande force, ton courage malgré les épreuves difficiles de la vie.

A ma petite coccinelle.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION GENERALE : LA RHIZOMANIE DE LA BETTERAVE SUCRIERE	8
1. Transmission naturelle du BNYVV par le vecteur <i>Polymyxa betae</i>	8
2. Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave ou BNYVV	9
2.1. Classification	9
2.2. Structure des particules virales	10
2.3. Gamme d'hôtes du BNYVV	10
2.4. Organisation génétique du BNYVV	11
2.5. Variabilité moléculaire et pathogénicité des isolats viraux	13
3. Description des symptômes de rhizomanie sur la betterave sucrière	14
3.1. Symptômes observés en champs	14
3.2. Caractéristiques histologiques et biochimiques de betteraves rhizomaniées	14
3.3. Impacts économiques et mesures de contrôle de la maladie	15
4. Enjeux scientifiques, économique et techniques de la thèse	17
CHAPITRE I : RECHERCHE DES GENES INDUITS ET REPRIMES DANS LES RACINES DE BETTERAVES INFECTEES PAR LE BNYVV	20
1. Introduction : les différentes méthodes d'analyses globales du transcriptome	20
1.1. Le criblage différentiel de banque d'ADNc	21
1.1.1. Principe	21
1.1.2. Utilisation	22
1.2. La méthode "suppression subtractive hybridization" (SSH)	23
1.2.1. Principe	23
1.2.2. Utilisation	24
1.3. La méthode "serial analysis of gene expression" (SAGE)	24
1.3.1. Principe	24
1.3.2. Utilisation	25
1.4. Les puces à ADN	27
1.4.1. Principe	27
1.4.2. Utilisation	29
1.5. La méthode "differential display reverse transcription PCR" (DDRT-PCR)	30
1.5.1. Principe	30
1.5.2. Utilisation	31
1.6. La méthode "cDNA-amplified fragment length polymorphism"	32
1.6.1. Principe	32
1.6.2. Utilisation	33

1.7. La méthode "restriction fragment differential display PCR" (RFDD-PCR)	34
2. Analyse comparative partielle entre le transcriptome de racines de betteraves infectées par le BNYVV et celui de betteraves saines	35
2.1. Reproduction en serre de l'infection naturelle de betteraves par le BNYVV	35
2.2. Recherche de gènes induits ou réprimés par DDRT-PCR dans les racines de betteraves infectées par le BNYVV	37
2.3. Recherche de gènes induits ou réprimés par RFDD-PCR dans les racines de betteraves infectées par le BNYVV	39
3. Vérification de l'expression des gènes candidats identifiés par RFDD-PCR	42
3.1. Analyse de l'expression différentielle par Northern blot	42
3.2. Analyse de l'expression différentielle par Northern inverse	43
4. Mise en évidence des différences d'expression des gènes candidats à un stade très précoce de l'infection virale : utilisation d'un bioessai de betteraves	45
4.1. Infection standardisée de plantules de betteraves en bioessai	45
4.2. Analyse de l'expression des gènes candidats par Northern inverse	46
4.3. Analyse de l'expression de gènes candidats par RT-PCR semi-quantitative	48
5. Mise en évidence des différences d'expression de gènes candidats au niveau des racines de <i>Beta macrocarpa</i> infectées partiellement par le BNYVV	51
5.1 Infection systémique précoce de racines de <i>Beta macrocarpa</i>	51
5.2. Identification de zones saines et virosées sur une même plante	52
5.3. Analyse de l'expression des gènes candidats par RT-PCR semi-quantitative	53
5.4. Analyse de l'expression différentielle par Northern inverse	55
6. Discussion	56
 CHAPITRE II : ETUDE DU ROLE DE LA PROTEINE P25 DU BNYVV DANS LE DEVELOPPEMENT DES SYMPTOMES SUR PLANTES : CARACTERISATION D'ARABIDOPSIS TRANSGENIQUES EXPRIMANT CONSTITUTIVEMENT LA PROTEINE P25	 59
1. Introduction : les différentes caractéristiques de la protéine p25 du BNYVV	59
1.1. Rôle de la protéine p25 dans la symptomatologie foliaire et racinaire	59
1.2. Transport nucléo-cytoplasmique de la protéine p25	61
1.3. Régulation de la localisation subcellulaire par phosphorylation	61
1.4. Propriétés d'activation de la transcription de la protéine p25	62
2. Expression transitoire de la protéine p25 du BNYVV dans des feuilles de plantes hôtes	64
3. Expression constitutive de la protéine p25 du BNYVV chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
3.1. Obtention de lignées <i>Arabidopsis</i> transgéniques exprimant la protéine p25	66
3.1.1. Sélection de lignées stables d' <i>Arabidopsis</i> transgéniques 35S::P25	66
3.1.2. Confirmation de l'expression stable et ubiquitaire de la protéine p25	68
3.2. Caractérisation phénotypique des <i>Arabidopsis</i> transgéniques 35S::P25	70
3.2.1. Phénotype foliaire et racinaire des <i>Arabidopsis</i> 35S::P25	70
3.2.2. Phénotype racinaire des <i>Arabidopsis</i> DR5::GFP x 35S::P25	71

4. Réponse des <i>Arabidopsis 35S::P25</i> à différentes hormones végétales	74
4.1. Croissance racinaire en présence de 2,4-D	74
4.2. Croissance racinaire en présence de MeJA	76
4.3. Germination et croissance en présence de MeJA, SA, ABA, ACC	78
5. Mise en évidence des différences d'expression des gènes candidats sous le contrôle transcriptionnel de l'auxine et du jasmonate	79
5.1. Analyse de l'expression de gènes candidats par RT-PCR semi-quantitative	79
5.2. Recherche des miRNA contrôlant la voie de signalisation de l'auxine	81
6. Réponse des <i>Arabidopsis 35S::P25</i> à l'infection par le BNYVV	83
7. Analyse globale du transcriptome au niveau des racines d'<i>Arabidopsis 35S::P25</i>	85
7.1. Culture standardisée d' <i>Arabidopsis</i> sauvages et transgéniques <i>35S::P25</i>	85
7.2. Analyse du transcriptome par "cDNA-microarray" (CATMA)	86
7.2.1. Méthode d'analyse comparative utilisée	87
7.2.2. Identification de gènes dérégulés dans les trois lignées <i>35S::P25</i>	88
7.2.3. Identification de gènes dérégulés dans la lignée <i>35::P25B</i> : analyse globale préliminaire	88
7.2.3.1. Signalisation de l'auxine	89
7.2.3.2. Transduction de signal et facteurs de transcription	89
7.2.3.3. Protéines de stress de type HSC/HSP, peroxydases et oxydoréductases	90
7.2.3.4. Voie de l'apoptose	90
7.2.3.5. Autres candidats	91
8. Discussion	91
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	96
MATERIEL ET METHODES	101
1. Matériel végétal, méthodes de culture et d'infection	
1.1. Matériel végétal	101
1.1.1. Les plantes hôtes du BNYVV	101
1.1.1.1. La betterave sucrière (<i>Beta vulgaris</i>)	101
1.1.1.2. La betterave sauvage (<i>Beta macrocarpa</i>)	102
1.1.1.3. <i>Chenopodium quinoa</i>	102
1.1.1.4. La tétragone (<i>Tetragonia expansa</i>)	102
1.1.2. L'arabette (<i>Arabidopsis thaliana</i>) écotype Columbia (Col-0)	102
1.1.2.1. Culture <i>in vitro</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	103
1.1.2.2. Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en terre	103
1.2. Infection virale, agroinfiltration et transformation des plantes	104
1.2.1. Multiplication du BNYVV sur <i>Chenopodium quinoa</i>	104
1.2.1.1. Synthèse d'ARN infectieux du BNYVV par transcription <i>in vitro</i>	104
1.2.1.2. Obtention des isolats artificiels du BNYVV	105
1.2.2. Infection systémique de <i>Beta macrocarpa</i> par le BNYVV	105
1.2.3. Infection naturelle de racines de <i>Beta vulgaris</i> par le BNYVV	105
1.2.4. Infiltration de bactéries <i>Agrobacterium</i> dans les feuilles de betteraves (Voinnet <i>et al.</i> , 1998)	106

1.2.5. Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par "floral dip" (Clough and Bent, 1998)	106
2. Souches bactériennes et vecteurs de clonage	107
2.1. Souches bactériennes et milieux de culture	107
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> de souche XL1 Blue	107
2.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> de souche GV3101	107
2.2. Vecteurs de clonage	108
2.2.1. Le plasmide pGEM®-T	108
2.2.2. Le plasmide pBin 61 (Voinnet <i>et al.</i> , 2000)	108
3. Analyse des ARN	109
3.1. Extraction et purification d'ARN totaux de plantes	109
3.1.1. Extraction d'ARN totaux par RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN®)	109
3.1.2. Extraction d'ARN totaux par TRIZOL® Reagent (Invitrogen™) (Chomezynski and Sacchi, 1987)	109
3.1.3. Extraction d'ARN totaux par PURESCRIPT RNA Isolation Kit (GENTRA Systems)	109
3.1.4. Extraction d'ARN totaux dans le tampon "polysomes" (Jackson and Larkins, 1976)	110
3.1.5. Purification des ARN messagers par NucleoTrap® mRNA Mini Kit (Macherey-Nagel)	110
3.2. Analyse des ARN par RT-PCR	111
3.2.1. Transcription inverse des ARNm	111
3.2.2. Amplification des ADNc par PCR	111
3.2.3. Conditions de RT-PCR semi-quantitative	111
3.3. Analyse des ARNm par "differential display reverse transcription PCR" (DDRT-PCR)	112
3.3.1. Transcription inverse des ARNm	112
3.3.2. Amplification par PCR de l'extrémité 5' des ADNc	112
3.3.3. Séparation des produits PCR sur gel de polyacrylamide dénaturant	113
3.3.4. Isolement, réamplification et purification des ADNc d'intérêt	113
3.4. Analyse globale des ARNm par "restriction fragment differential display PCR" (RFDD-PCR)	114
3.4.1. Synthèse et préparation des ADNc	114
3.4.1.1. Transcription inverse des ARNm et synthèse d'ADN double brin	114
3.4.1.2. Fragmentation des ADNc et ligation d'adaptateurs	115
3.4.2. Préparation des amorces radiomarquées par phosphorylation de l'extrémité 5'	115
3.4.3. Amplification des ADNc par PCR radioactive sélective	116
3.4.4. Séparation des produits PCR sur gel de polyacrylamide dénaturant	116
3.4.5. Isolement, réamplification et purification des ADNc d'intérêt	116
3.5. Clonage et séquençage des ADNc d'intérêt	117
3.5.1. Phosphorylation des produits PCR	117
3.5.2. Purification d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose LMP	117
3.5.3. Ligation des ADNc dans le vecteur pGEM®-T	117
3.5.4. Transformation bactérienne par la technique d'électroporation	118
3.5.5. Préparation d'ADN plasmidique (mini-préparation)	118
3.5.6. Analyse de l'ADN plasmidique par séquençage automatique	118

3.5.7. Analyses bioinformatiques	118
3.6. Analyse des ARN par Northern blot	119
3.6.1. Séparation des ARN sur gel d'agarose et transfert sur membrane	119
3.6.2. Synthèse des sondes ribonucléiques	119
3.6.3. Visualisation des ARN viraux par hybridation moléculaire	120
3.6.4. Visualisation des ARNm par hybridation moléculaire	120
3.7. Analyse de l'expression de séquences d'intérêt par Northern inverse	120
3.7.1. Migration des produits PCR sur gel d'agarose et transfert sur membrane	121
3.7.2. Préparation des ADNc radiomarqués	121
3.7.3. Révélation des différences d'expression par hybridation moléculaire	122
3.8. Analyse des siRNA et miRNA (Hamilton and Baulcombe, 1999)	122
3.8.1. Séparation des ARN sur gel de polyacrylamide dénaturant et transfert sur membrane	122
3.8.2. Préparation d'une sonde ADN spécifique des siRNA	122
3.8.3. Préparation d'une sonde ADN spécifique des miRNA	123
3.8.4. Détection de siRNA ou miRNA par hybridation moléculaire	123
4. Analyse de l'ADN génomique	123
4.1. Extraction d'ADN génomique de feuilles d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	123
4.2. Analyse de l'ADN génomique par Southern blot (Southern, 1975)	124
4.2.1. Digestion de l'ADN génomique et purification	124
4.2.2. Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose dénaturant et transfert sur membrane	124
4.2.3. Détection de fragments ADN par hybridation moléculaire	125
4.3. Caractérisation du site d'insertion du T-DNA dans les lignées transgéniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	125
4.3.1. Digestion de l'ADN génomique et purification	126
4.3.2. Ligation intramoléculaire des fragments de restriction	126
4.3.3. Amplification par PCR inverse, purification et séquençage	126
5. Analyse des protéines	126
5.1. Analyse des protéines par la technique du Western blot	126
5.1.1. Extraction des protéines totales de plantes	126
5.1.2. Fractionnement des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	127
5.1.3. Immunodétection des protéines par la technique du Western blot	127
5.2. Immuno-empreintes de racines de betteraves	128
5.3. Immunomarquage de protéines virales et observation par microscopie électronique	128
5.3.1. Préparation des échantillons	129
5.3.2. Immunomarquage à l'or colloïdal sur des coupes ultra-fines	129
5.3.3. Observation des coupes	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131
ANNEXES	150

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
AMV	: <i>Avian myeloblastosis virus</i>
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
ARNr	: acide ribonucléique ribosomique
ARNt	: acide ribonucléique de transfert
BdMV	: <i>Burdock mottle virus</i>
BET	: bromure d'éthidium
BNYVV	: <i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BSA	: bovine serum albumin
BSMV	: <i>barley stripe mosaic virus</i>
BSBMV	: <i>Beet soil borne mosaic virus</i>
BWYV	: <i>Beet western yellows virus</i>
°C	: degré Celsius
CaMV	: <i>Cauliflower mosaic virus</i>
Ci	: Curie
cpm	: coup par minute
Cy	: cyanine
db	: double brin
ddNTP	: 2'-3'-didésoxyribonucléotides-5'-triphosphate (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP)
DNase	: désoxyribonucléase
dNTP	: 2'-désoxyribonucléotides-5'-triphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DTT	: dithiothreitol
EDTA	: ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	: enzyme linked immuno sorbets assay
EMS	: ethyl methane sulfonate
EST	: expressed sequence tag
F	: Farad
g	: accélération de la pesanteur
g	: gramme
h	: heure
HEPES	: acide N-2 hydroxy-éthyl piperazine N'-2 éthane sulfonate
HIV	: <i>Human immunodeficiency virus</i>
h/j	: heure par jour
IPTG	: isopropyl- β -D thiogalactopyranoside
kb	: kilobase
kDa	: kiloDalton
l	: litre
LB	: Luria Broth
LMP	: low melting Point
lux	: unité de mesure d'éclairement lumineux
m	: mètre
M	: Molaire
min	: minute

miRNA	: micro-RNA
MoMuLV	: <i>Moloney murine leukemia virus</i>
N	: Normal
nts	: nucléotides
ORF	: open reading frame (cadre ouvert de lecture)
pb	: paire de bases
PBS	: phosphate buffer saline
PCR	: polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PCV	: <i>Peanut Clump virus</i>
PEG	: polyéthylène glycol
PSTVd	: <i>Potato spindle tuber viroid</i>
PTGS	: post transcriptional gene silencing
pH	: potentiel d'hydrogène
qsp	: quantité suffisante pour
RNase	: ribonucléase
rNTP	: 2'-ribonucléoside-5'-triphosphate (rATP, rUTP, rCTP, rGTP)
RT	: reverse transcription (transcription inverse)
sb	: simple brin
SDS	: sodium dodecyl sulfate (dodécyl sulfate de sodium)
siRNA	: short interfering RNA
ssp	: sous-espèce
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: tampon tris-borate
TEMED	: NNN'N' tétraméthyl éthylène diamine
TMV	: <i>Tobacco mosaic virus</i>
U	: unité enzymatique
UV	: rayonnement Ultra-Violet
V	: Volt
W	: Watt
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
Ω	: ohm

INTRODUCTION GENERALE

LA RHIZOMANIE DE LA BETTERAVE SUCRIERE



INTRODUCTION GENERALE

LA RHIZOMANIE DE LA BETTERAVE SUCRIERE

Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (*Beet necrotic yellow vein virus* ou BNYVV) est l'agent viral responsable de la rhizomanie de la betterave sucrière (Tamada and Baba, 1973). Cette maladie a été mise en évidence pour la première fois en 1959 en Italie (Canova, 1959) et n'a cessé depuis de s'étendre dans le monde dans quasiment toutes les régions de culture betteravière. Le BNYVV, transmis par le protozoaire *Polymyxa betae*, est le membre type du genre *Benyvirus* (pour revue : Rush, 2003). Il possède un génome segmenté composé, selon les isolats, de 4 ou 5 ARN de polarité positive (Putz, 1977 ; Richards *et al.*, 1985 ; Tamada *et al.*, 1989 ; Koenig *et al.*, 1997).

1. Transmission naturelle du BNYVV par le vecteur *Polymyxa betae*

Le BNYVV est transmis de façon obligatoire et persistante par un organisme du sol *Polymyxa betae*. Cet organisme eucaryote, longtemps considéré comme un champignon (Keskin, 1964), est en fait plus proche des protozoaires. La nouvelle classification de Braselton (1995) le définit comme un membre de l'ordre des *Plasmodiophorales* et de la famille des *Plasmodiophoraceae* qui rassemble dix genres : *Polymyxa*, *Spongospora*, *Plasmodiophora*, *Ligniera*, *Membranosorus*, *Octomyxa*, *Sorodiscus*, *Sorosphaera*, *Tetramyxa* et *Woronina*. Le genre *Polymyxa* est notamment représenté par deux espèces économiquement très importantes, *P. graminis* colonisant les racines des plantes céréalières (riz, blé, orge), et *P. betae* colonisant essentiellement les plantes de la famille des Chénopodiacées. Le cycle de vie de ces deux espèces est très similaire, et est décrit sur la

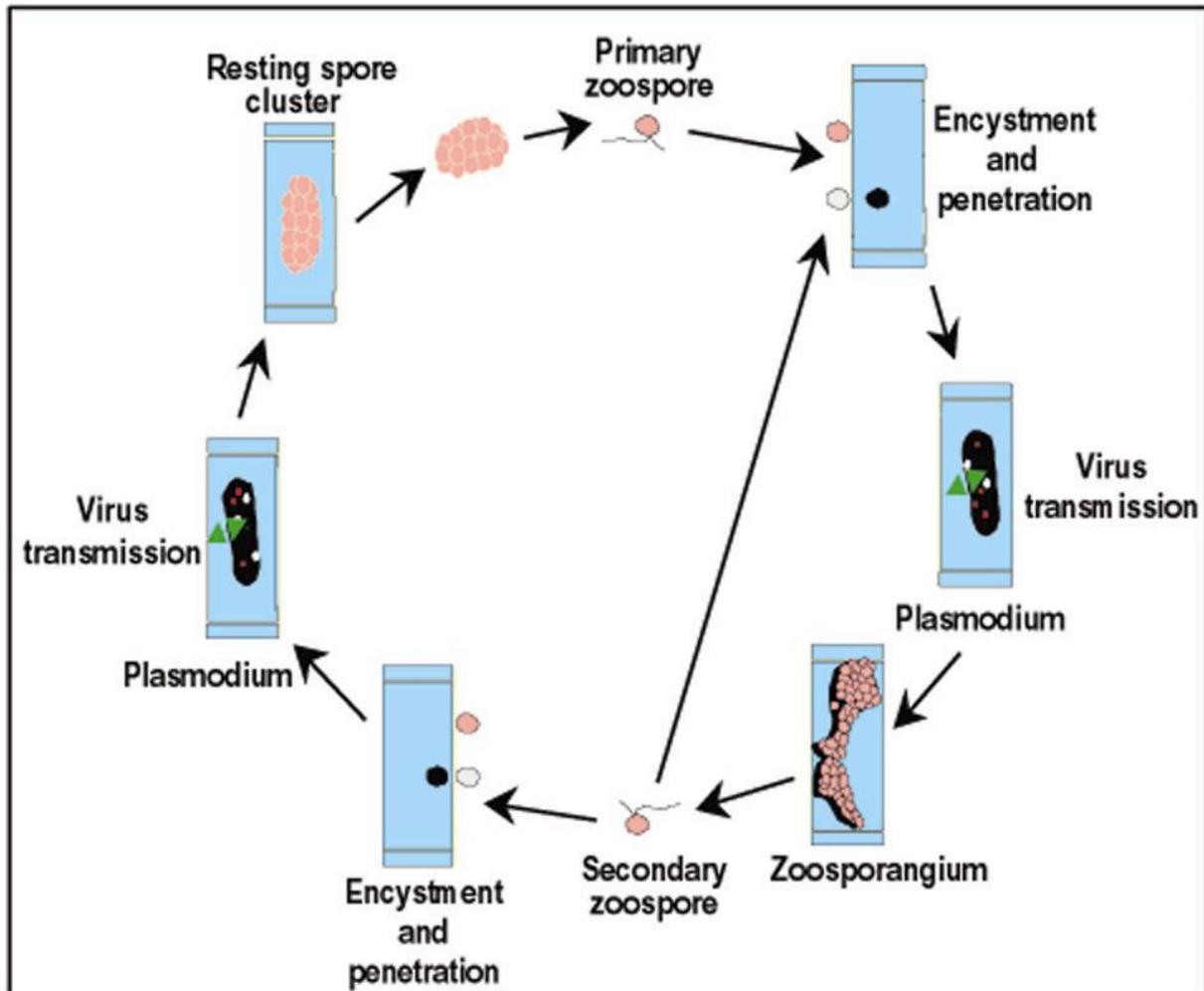


Figure Int.1 : Représentation schématique du cycle de multiplication d'un protozoaire de la famille *Polymyxa* (cycle de *P. graminis* d'après Kanyuka *et al.*, 2003). Le cycle est divisé en deux phases d'infection. La première produit des spores secondaires appelées "secondary zoospores" (partie droite de la figure), la seconde produit des cystosores appelées "resting spores" (partie gauche de la figure). Les stades de développement du protozoaire propices à l'acquisition et/ou à la transmission de virus (triangles verts) sont précisés ("virus transmission").

figure **Int.1** pour l'espèce *P. graminis*, (Kanyuka *et al.*, 2003). Les spores dormantes en amas ("resting spore cluster"), appelées cystosores, germent pour produire des zoospores biflagellées ("primary zoospore") qui nagent jusqu'à atteindre les cellules de l'épiderme racinaire ou des poils racinaires. Elles s'enkystent au niveau de la paroi, forment une structure d'attache ("adhesorium"), et libèrent leur contenu cellulaire dans le cytoplasme des cellules hôtes. Après de nombreux cycles de divisions nucléaires, des plasmodes ("plasmodium") au cytoplasme plurinucléé se forment dans ces cellules. Ces plasmodes se différencient ensuite en zoosporanges ("zoosporangium") et libèrent de nouvelles zoospores ("secondary zoospore") qui peuvent coloniser d'autres racines. Une deuxième phase de multiplication se produit en parallèle et consiste en la différenciation des plasmodes en cystosores (figure **Int.2**). Ces spores peuvent rester en dormance pendant de très longues périodes jusqu'à se trouver dans des conditions idéales pour leur germination en zoospores. Elles peuvent porter des particules virales dans leur cytoplasme et devenir ainsi virulifères lors du parasitisme de racines de plantes infectées par un virus. Ainsi, les spores virulifères de *P. betae* peuvent transmettre le BNYVV aux betteraves après plus de 15 ans de dormance (Abe and Tamada, 1986), ce qui explique la persistance de la maladie dans les sols infestés.

Le mode exact d'acquisition du virus par les espèces *Polymyxa* reste encore non déterminé. L'acquisition du virus pourrait avoir lieu lors de la pénétration des zoospores dans les cellules racinaires et le transfert de leur contenu dans le cytoplasme. Elle pourrait également s'effectuer lors de la formation des plasmodes, où seule une fine membrane les sépare du cytoplasme des cellules hôtes. Enfin, aucune donnée n'est disponible quant à l'éventuelle multiplication du BNYVV dans les cystosores ou dans les zoospores virulifères. Ce parasite n'est pas cultivable *in vitro*, et sa biologie n'est donc pas très avancée.

2. Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave ou BNYVV

2.1. Classification

Le BNYVV, un virus multipartite à ARN simple brin de polarité positive, avait initialement été classé dans le genre *Furovirus*. Suite à une révision du genre *Furovirus* (Torrance and Mayo, 1997 ; Shirako *et al.*, 2000), cinq nouveaux genres ont été distingués : *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus*, *Benyvirus* et *Hordeivirus*. Cette nouvelle classification a été effectuée sur la base du nombre de segments ARN, la présence d'une polyadénylation de l'extrémité 3' des ARN, le type de polymérase, la présence ou l'absence des trois ORF

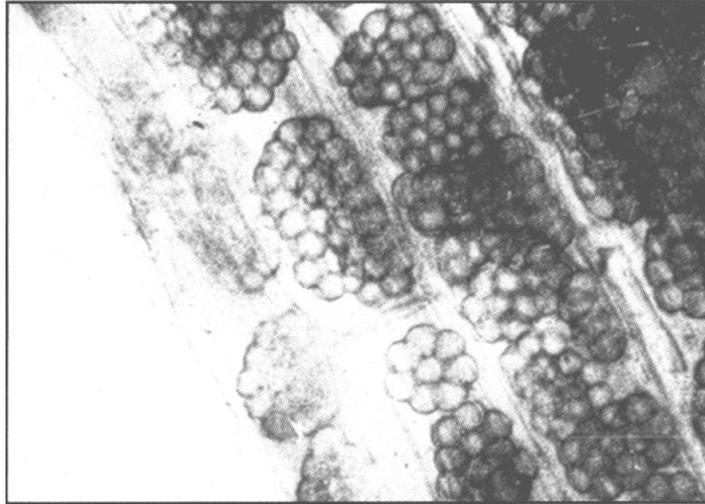


Figure Int.2 : Observation en microscopie optique de racines de betteraves colonisées par *P. betae*. Les cystosores apparaissent en grappes après coloration.

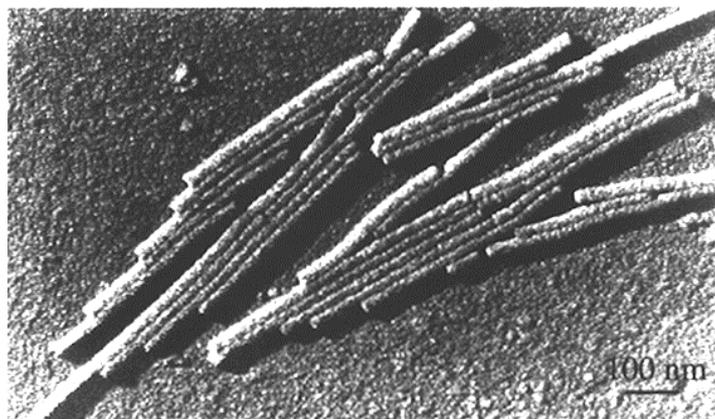


Figure Int.3 : Observation en microscopie électronique de particules du BNYVV purifiées.

constituant le TGB ("triple gene block") ou celle codant la CP-RT ("coat protein readthrough"). Le genre *Benyvirus* comporte deux membres qui présentent des caractéristiques très proches : le BNYVV et le BSBMV (*Beet soilborne mosaic virus*).

Le BNYVV et le BSBMV sont tous deux transmis par *Polymyxa betae*. Ils possèdent une gamme d'hôtes similaire, leurs particules sont en nombre et en morphologie identiques, et leurs ARN sont tous polyadénylés à leur extrémité 3' (Wisler *et al.*, 1994 ; Heidel and Rush, 1994). De plus, les deux virus présentent la même organisation génétique, avec un ARN 1 portant une seule ORF, un ARN 2 possédant six ORF, et les ARN 3 et 4 à une ORF majeure (Lee *et al.*, 2001). Ces deux virus sont bien distincts, même si ils présentent des identités de séquences parfois fortes au niveau de certaines régions. Par exemple, l'ARN 1 du BNYVV et du BSBMV présentent 77% d'identité de séquence, dont plus de 92% pour les 500 derniers acides aminés de la polymérase codée par l'ARN 1. Par contre, les protéines de capsid et les protéines riches en cystéines codées par l'ARN 2 (cistron 3' proximal) possèdent uniquement 56 et 32% d'identité respectivement (Lee *et al.*, 2001).

2.2. Structure des particules virales

L'observation en microscopie électronique de particules purifiées de BNYVV laisse apparaître des virions en forme de bâtonnets (figure **Int.3**). Les nucléocapsides possèdent une symétrie hélicoïdale de diamètre constant 20 nm et de longueur variable de 390, 265, 105, 89 et 80 nm selon le type d'ARN encapsidé (Putz, 1977 ; Tamada *et al.*, 1989). Les hélices, qui ont un pas à droite de 2,6 nm, sont formées de 49 sous unités de protéines de capsid par répétition axiale de 4 tours, chaque sous unité protéique interagissant avec 4 bases de l'ARN (Steven *et al.*, 1981).

2.3. Gamme d'hôtes du BNYVV

Le BNYVV est un virus qui infecte principalement les plantes de la famille des Chenopodiacees. Sur *Beta vulgaris* (betterave sucrière), son hôte naturel, l'infection est systémique, tout comme sur *Beta macrocarpa* (betterave sauvage), ou sur *Spinacea oleracea* (épinard). Au laboratoire, le virus est largement étudié sur d'autres plantes hôtes, comme *Chenopodium quinoa* ou *Chenopodium amaranticolor* de la famille des Chenopodiacees, ou encore *Tetragonia expansa* de la famille des Tétragoniacées, qui répondent toutes à l'infection virale par la formation de lésions locales chlorotiques ou nécrotiques.

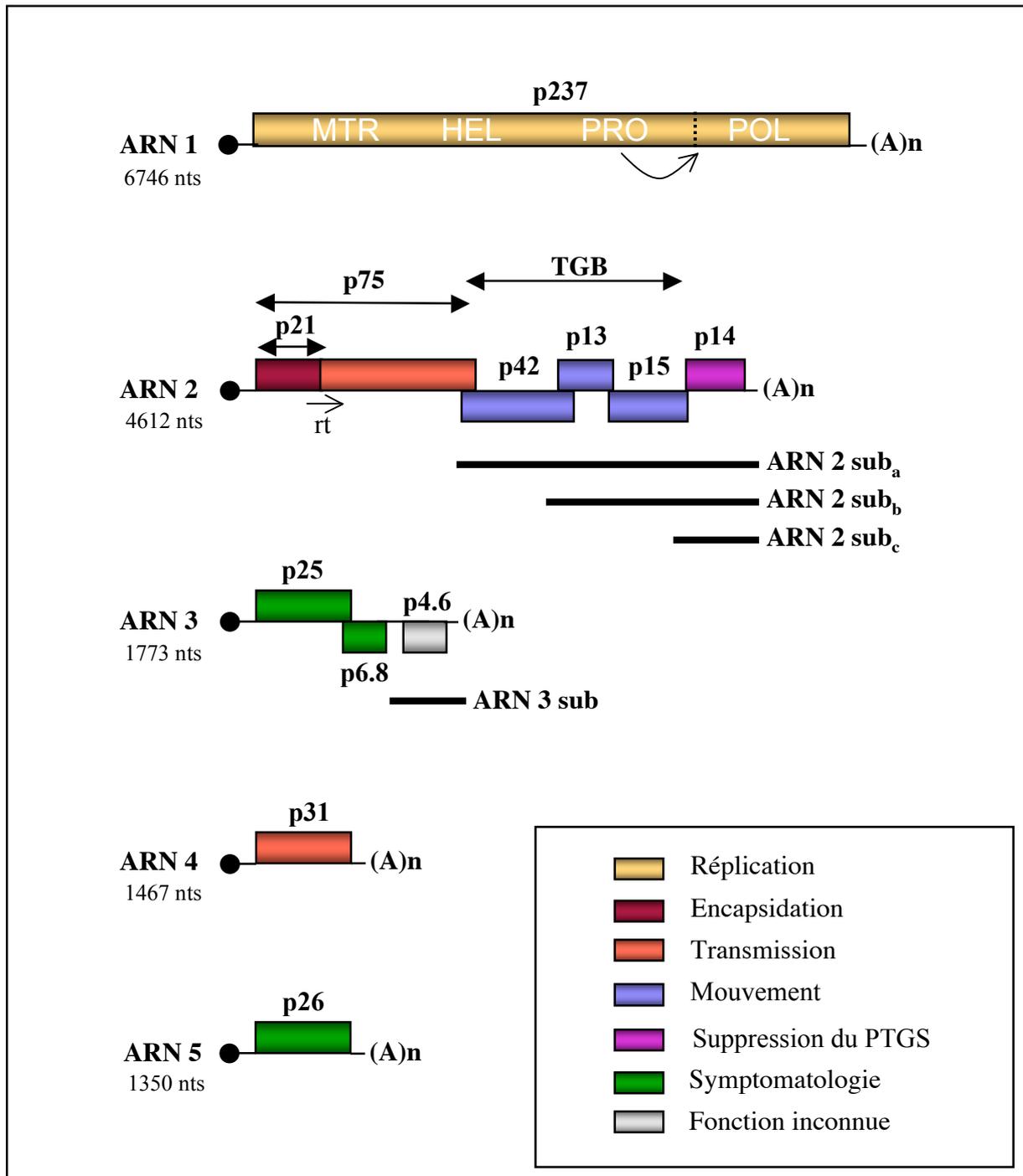


Figure Int.4 : Organisation génétique du BNYVV. Le nom et la taille de chaque ARN sont précisés à gauche de la figure. Les ronds noirs et (A)n schématisent respectivement la coiffe 5' terminale (m⁷GpppG) et la queue polyA 3' terminale présentes sur chacun des ARN. La dénomination des protéines synthétisées à partir des ARN viraux est précisée au dessus de chaque cadre ouvert de lecture. La protéine p237 (jaune) codée par l'ARN 1 subit un clivage autoprotéolytique (flèche noire ciblant les pointillés noirs) qui produit un polypeptide de 150 kDa renfermant les domaines fonctionnels MTR ("methyl-transferase"), HEL ("helicase") et PRO ("protease") et une protéine de 66 kDa portant le domaine POL ("RNA-dependent RNA polymerase"). L'ARN 2 code pour six protéines. La suppression du codon stop ambre (rt) de l'ORF codant pour la protéine p21 (ou CP) conduit à la synthèse de la protéine mineure de capsid appelée p75 (ou CP-RT). Les lignes noires sous les ORF portées par les ARN 2 et 3 correspondent aux ARN subgénomiques. La fonction principale des protéines virales est présentée par le code couleur encadré. TGB : "triple gene block".

2.4. Organisation génétique du BNYVV

Le BNYVV possède un génome multipartite qui comporte selon les isolats 4 ou 5 particules. Chaque particule renferme un ARN simple brin de polarité positive (Putz, 1977 ; Richards *et al.*, 1985 ; Tamada *et al.*, 1989 ; Koenig *et al.*, 1997). Ces ARN sont tous coiffés à leur extrémité 5' (Cap, m⁷GpppG) et polyadénylés à leur extrémité 3' (Putz *et al.*, 1983). Les séquences de ces différents ARN ont été déterminées et ont permis d'établir l'organisation génétique présentée sur la figure **Int.4** (Bouzoubaa *et al.*, 1985, 1986, 1987 ; Kiguchi *et al.*, 1996 ; Saito *et al.*, 1996 ; Koenig *et al.*, 1997). Les clones ADNc infectieux correspondant aux cinq ARN viraux, disponibles au laboratoire (Quillet *et al.*, 1989 ; Link *et al.*, 2005), ont permis d'étudier la fonction des différents gènes viraux. Les ARN 1 et 2 sont suffisants pour produire des lésions chlorotiques, après inoculation mécanique de feuilles de plantes hôtes telles que *C. quinoa*. Ces deux ARN apportent les fonctions de base de réplication, d'encapsidation et de mouvement de cellule à cellule du virus. Sur feuilles de plantes hôtes, les petits ARN deviennent accessoires et peuvent subir des délétions, ou disparaître de l'inoculum (Bouzoubaa *et al.*, 1991). Cependant, la présence des ARN 3 et 4 est nécessaire dans les conditions naturelles d'infection, c'est à dire sur betteraves, car ils sont impliqués respectivement dans l'amplification du virus dans les racines infectées (Quillet *et al.*, 1989 ; Tamada *et al.*, 1989 ; Koenig *et al.*, 1991 ; Lauber *et al.*, 1998) et dans la transmission par *Polymyxa betae* (Lemaire *et al.*, 1988 ; Tamada and Abe, 1989).

L'ARN 1 (6746 nts) comporte une seule ORF. Il code pour une polyprotéine de 237 kDa appelée p237 (Bouzoubaa *et al.*, 1987). Cette protéine renferme les séquences consensus MTR ("methyl-tranferase"), HEL ("helicase"), PRO ("protease" de type papaine) et POL ("polymerase"). Elle subit un clivage autocatalytique entre les domaines PRO et POL, produisant une protéine de 150 kDa renfermant les domaines MTR, HEL et PRO, et une protéine de 60 kDa qui renferme le domaine POL, toutes deux constitutives du complexe de réplication du virus (Hehn *et al.*, 1997).

L'ARN 2 (4612 nts) comporte six ORF.

L'ORF 1 code pour la protéine majeure de capsid de 21 kDa appelée CP (Bouzoubaa *et al.*, 1986). Cette ORF est séparée de la seconde ORF par un codon stop (ambre). Cette seconde ORF est placée dans la même phase de lecture. Ainsi, environ 10% des évènements de traduction de la protéine CP subissent un mécanisme de suppression du codon stop, qui conduit à la synthèse d'une protéine de fusion de 75 kDa appelée CP-RT ("coat protein readthrough") ou plus simplement p75 (Ziegler *et al.*, 1985 ; Niesbach-Klösgen *et al.*, 1990 ;

Haeberlé *et al.*, 1994). Cette protéine CP-RT constitue la protéine mineure de capsidre retrouvée au niveau des particules virales (Haeberlé *et al.*, 1994), et intervient dans la transmission du virus par *P. betae* grâce à un motif KTER situé dans le domaine de translecture (Tamada and Kusume, 1991 ; Tamada *et al.*, 1996b).

Les ORF III, IV et V sont partiellement chevauchantes. Ces trois ORF constituent le TGB ("triple gene block") également retrouvé entre autre chez les *Pomo-*, *Peclu-*, *Potex-*, *Carla-* et les *Hordeivirus*. Ces trois ORF codent respectivement pour les protéines TGBp1 de 42kDa (p42), TGBp2 de 13 kDa (p13) et TGBp3 de 15 kDa (p15). Ces trois protéines sont nécessaires au mouvement des ARN viraux de cellule à cellule (Gilmer *et al.*, 1992). La protéine TGBp1 est exprimée à partir de l'ARN subgénomique 2sub_a, et les protéines TGBp2 et TGBp3 à partir de l'ARN subgénomique 2sub_b (Gilmer *et al.*, 1992 ; Bleykasten-Grosshans *et al.*, 1997). L'utilisation de vecteurs permettant l'expression de la protéine TGBp1 fusionnée à la GFP a permis d'une part de localiser la protéine GFP::TGBp1 au niveau des plasmodesmes, et d'autre part de démontrer que cette localisation nécessite la présence des protéines TGBp2 et TGBp3 (Erhardt *et al.*, 2000).

L'ORF VI code pour une protéine de 14 kDa, appelée p14, exprimée à partir de l'ARN subgénomique 2sub_c (Gilmer *et al.*, 1992). Cette protéine est un suppresseur de PTGS (Dunoyer *et al.*, 2002).

L'ARN 3 (1773 nts) est impliqué dans l'apparition des symptômes foliaires observés sur plantes hôtes (Quillet *et al.*, 1989 ; Tamada *et al.*, 1989). Il est nécessaire au mouvement à longue distance du virus et est important pour l'apparition des symptômes de rhizomanie sur *Beta vulgaris* (Tamada *et al.*, 1989 ; Koenig *et al.*, 1991 ; Lauber *et al.*, 1998). L'ARN 3 code potentiellement pour trois protéines. La première ORF code pour une protéine de 25 kDa, appelée p25, responsable de la sévérité des symptômes foliaires et racinaires (Jupin *et al.*, 1992 ; Tamada *et al.*, 1999). Ses caractéristiques biologiques sont détaillées dans le chapitre II (§1 du chapitre II ; **annexe 1** : Vetter *et al.*, 2004). La seconde ORF (ou gène N) code pour une protéine de 6,8 kDa nommée p6,8. Cette protéine n'est exprimée que par des formes délétées de l'ARN 3. Sur ces ARN plus courts, l'ORF se trouve rapprochée de l'extrémité 5' proximale ou alors fusionnée à une partie de la séquence codante de la protéine p25. Dans de telles situations, des symptômes sévères de nécrose apparaissent sur *T.expansa* et *C.quinoa*, et sont liés à la surexpression de cette protéine (Jupin *et al.*, 1992). L'expression de cette protéine n'a jamais été mise en évidence lors de l'infection naturelle, ce qui nous laisse penser que la séquence du gène N pourrait constituer une ORF cryptique. Quant à la troisième ORF,

elle code potentiellement pour une protéine de 4,6 kDa (p4,6). Cette protéine, exprimée à partir d'un ARN subgénomique (ARN3sub) colinéaire aux 550 derniers nucléotides de l'ARN 3 (Balmori *et al.*, 1993), demeure de fonction inconnue.

L'ARN 4 (1467 nts) code pour une protéine de 31 kDa (p31), essentielle pour la transmission du virus par le vecteur *P. betae* (Lemaire *et al.*, 1988 ; Tamada and Abe, 1989). Cette protéine, encore peu caractérisée sur le plan biologique, pourrait constituer un facteur assistant de la transmission.

L'ARN 5 (1350 nts) est présent uniquement dans certains isolats viraux retrouvés essentiellement au Japon (Tamada *et al.*, 1989) et en France, dans la région de Pithiviers (Koenig *et al.*, 1997). Ces isolats provoquent des symptômes très sévères de rhizomanie. L'ARN 5 contient une seule ORF qui code pour une protéine de 26 kDa appelée p26. L'obtention d'un clone complet ADNc infectieux a permis d'étudier l'influence de l'ARN 5 sur le pouvoir pathogène du virus (**annexe 2** : Link *et al.*, 2005 ; **annexe 3** : Schmidlin *et al.*, 2005). L'étude de l'expression de la protéine p26 en contexte viral a permis de montrer qu'elle est impliquée dans l'apparition de symptômes nécrotiques sur feuilles de *C. quinoa*. Les travaux menés au laboratoire ont également permis de montrer que cette protéine effectue un transport nucléo-cytoplasmique et qu'elle active fortement la transcription en système simple hybride chez la levure (Link *et al.*, 2005).

2.5. Variabilité moléculaire et pathogénicité des isolats viraux

L'étude de la variabilité de séquences existant au niveau de la région de l'ARN 2 codant pour la protéine de capsid, par RFLP ("restriction fragment length polymorphism") et SSCP ("single-strand conformation polymorphism"), et la présence/absence d'ARN 5 dans les isolats viraux, a conduit à la caractérisation et la classification de trois isolats de BNYVV dénommés A, B et P (Kruse *et al.*, 1994 ; Koenig *et al.*, 1995 ; Koenig and Lennefors, 2000). Cette classification a été précisée grâce à l'étude de la variabilité des séquences de deux protéines non structurales impliquées dans la symptomatologie, les protéines p25 et p26 respectivement codées par les ARN 3 et 5 (Schirmer *et al.*, 2004).

Ces trois types d'isolats sont retrouvés dans des régions géographiques bien spécifiques et présentent des différences de pathogénicité. L'isolat A est retrouvé dans l'ensemble des pays européens, en Iran, aux USA, en Chine et au Japon, et l'isolat B est détecté plus particulièrement en France et en Allemagne, et dans certains cas en Suède, en Chine et au Japon (Saito *et al.*, 1996 ; Miyanishi *et al.*, 1999 ; Suarez *et al.*, 1999 ; Lennefors

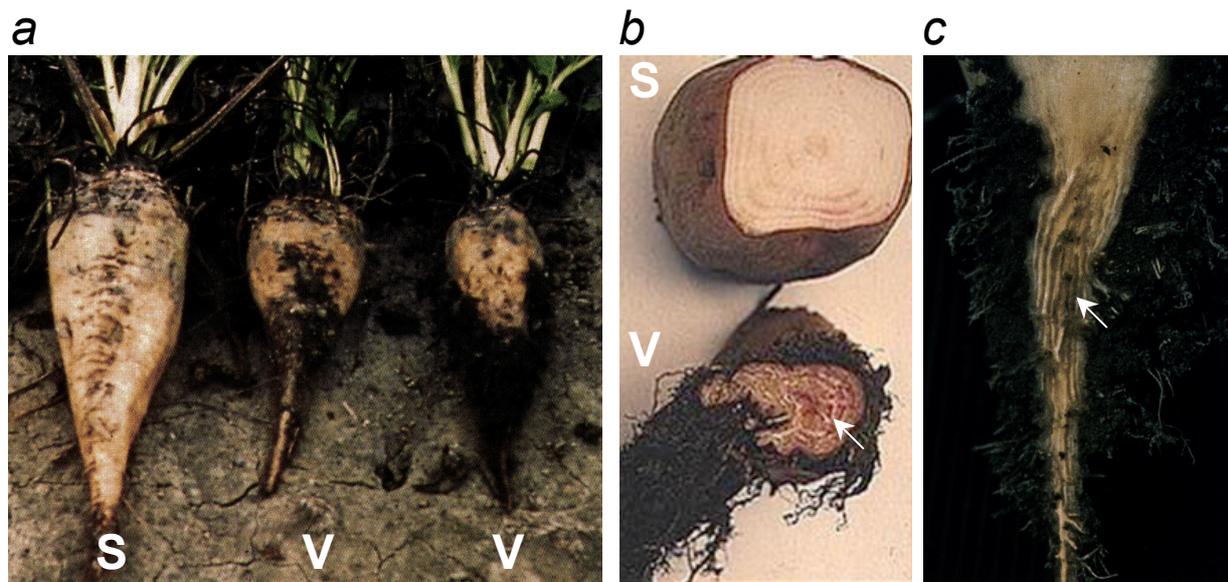


Figure Int.5 : Symptômes racinaires caractéristiques de la rhizomanie. Comparaison des symptômes racinaires observés en champs sur des betteraves sucrières (*Beta vulgaris*) saines (S) ou atteintes de rhizomanie (V). Les plantes saines présentent une croissance normale avec un pivot bien développé (a et b). Les plantes infectées montrent un nanisme sévère et une réduction significative de la taille des pivots (a et b) qui se nécrosent (flèches blanches, b et c). Une importante prolifération des racines latérales est visualisée sur le pivot de la plante infectée (b).

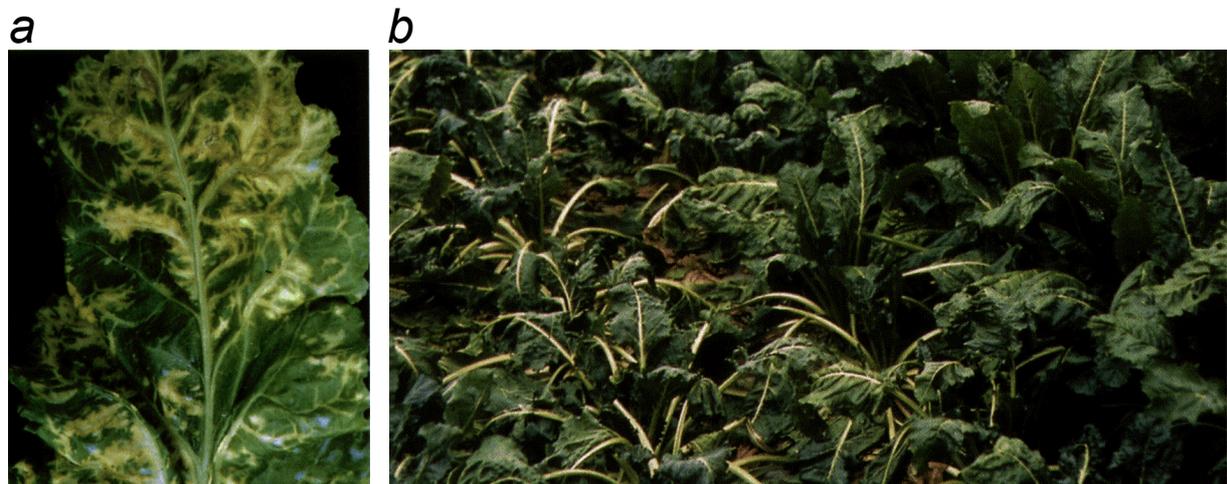


Figure Int.6 : Symptômes foliaires caractéristiques de la rhizomanie. (a) Les feuilles de betteraves (*Beta vulgaris*) infectées par le BNYVV présentent des chloroses vasculaires. (b) Les plantes rhizomaniées flétrissent aux heures chaudes de la journée.

et al., 2000 ; Sohi and Maleki, 2004). Les isolats viraux qui possèdent un cinquième ARN ont été initialement identifiés au Japon (Tamada *et al.*, 1996a) et en France (Koenig *et al.*, 1997), à Pithiviers dans le Loiret, puis découverts au Kazakhstan (Koenig and Lennefors, 2000), en Chine (Koenig and Lennefors, 2000) et en Angleterre (Harju *et al.*, 2002). L'isolat français contenant cinq ARN a été dénommé "isolat P" (Pithiviers).

3. Description des symptômes de rhizomanie sur la betterave sucrière

3.1. Symptômes observés en champs

Comme le nom de la maladie l'indique, les symptômes caractéristiques de la rhizomanie se situent principalement au niveau racinaire. Les betteraves infectées présentent un nanisme général plus ou moins prononcé suivant les plantes (figure **Int.5a**), se traduisant par une réduction significative de la taille du pivot (figure **Int.5a**) qui se nécrose fortement (figure **Int.5b**). L'infection à la base du pivot induit une prolifération anarchique des racines latérales apparaissant friables, nécrotiques, et de couleur caractéristique "poivre-et-sel" (figure **Int.5c**). Cette différenciation racinaire anormale provoque un étranglement du pivot, qui donne à la betterave une forme de navet (figure **Int.5a**). Les symptômes foliaires apparaissent plus tardivement et correspondent à un jaunissement, puis des nécroses, le long des nervures des feuilles (figure **Int.6a**). Les dommages causés aux racines provoquent un déficit hydrique des parties aériennes de la plante, ce qui conduit à un flétrissement important des feuilles aux heures chaudes de la journée (figure **Int.6b**).

3.2. Caractéristiques histologiques et biochimiques de betteraves rhizomaniées

La prolifération anormale des racines latérales est accompagnée d'une nécrose du pivot. Des coupes histologiques effectuées sur des pivots de plantes rhizomaniées laissent croire que la nécrose des racines latérales au niveau de leur point d'origine induit la "reprogrammation" des cellules du pérycyle en cellules méristématiques. Ce changement induirait de nouveaux départs secondaires donnant naissance à de nouvelles racines (Pollini and Giunchedi, 1989). On peut alors imaginer que le virus, ou l'une de ses protéines, est responsable de la modulation de l'expression d'un certain nombre de gènes cellulaires. Ce dérèglement induit par la virose provoque une prolifération racinaire anormale qui devient favorable à l'amplification du virus, mais aussi à la transmission par *P. betae*. En effet, c'est au niveau de ces radicules que le vecteur parasite la plante et peut acquérir le virus.

La prolifération cellulaire est probablement induite directement ou indirectement par l'auxine, une hormone impliquée dans la croissance et le développement des racines. En effet, les betteraves sensibles développant les symptômes classiques de rhizomanie contiennent des taux d'IAA ("indol-3-acetic acid") trois fois plus élevés que dans le cas des plantes saines. De plus, des betteraves "tolérantes" à la maladie, qui ne présentent pas ou peu de prolifération racinaire, contiennent des taux d'IAA plus faibles (Pollini *et al.*, 1990). Il reste cependant à déterminer si ces fortes concentrations en auxine sont réellement la cause ou simplement la conséquence du désordre cellulaire induit par la virose.

3.3. Impacts économiques et mesures de contrôle de la maladie

La présence naturelle de *P. betae* dans presque tous les types de sols, les transports cultureux (betteraves, pommes de terre, navets, etc.) et la dispersion de terre par le matériel agricole, sont autant d'éléments qui ont favorisé le maintien et la dissémination du virus. La persistance des formes virulifères de latence (cystosores) du vecteur dans le sol ne permet en aucun cas de minimiser l'infection, même en allongeant le cycle de rotation des cultures des betteraves avec d'autres plantes. La sévérité de la maladie dépend directement des conditions extérieures favorisant ou non la multiplication du vecteur et modulant les quantités de virus présentes dans le sol. Ainsi, les températures comprises entre 25 et 30°C, la forte humidité des sols et l'irrigation automatisée favorisent la prolifération de *P. betae*. Seul le traitement des sols infestés par fumigation au bromure de méthyle ("methyl bromide") permet de réduire fortement la densité de l'inoculum. Son coût et sa toxicité limitent pourtant son utilisation à grande échelle. Les seules méthodes de lutte actuelles reposent sur la sélection et la culture de variétés tolérantes ou résistantes au virus.

L'infection des plantes provoque une baisse de la teneur en sucre de l'ordre de 10 à 20% (Heijbroek, 1985), mais surtout de lourdes pertes de rendement lors de la purification du saccharose, pertes pouvant atteindre 50% voire 70% dans les cas d'infections sévères (Johansson, 1985 ; Richard-Molard, 1985). Si les dégâts provoqués aux racines sont retrouvés de façon quasi-identique lors de l'infection par l'isolat A ou B, l'isolat viral contenant l'ARN 5 a en revanche toujours montré la plus grande agressivité et pathogénicité, en provoquant des symptômes très sévères de rhizomanie (Tamada *et al.*, 1996a), et en s'accumulant en quantité plus importante dans les pivots (Tamada *et al.*, 1996a ; Heijbroek *et al.*, 1999). Cet isolat P est retrouvé dans les pivots de betteraves dites "résistantes" à la maladie.

D'un point de vue agricole, les variétés de betteraves résistantes, sélectionnées essentiellement sur la base du gène *Rz1* provenant de la variété Holly (Biancardi *et al.*, 2002), présentent l'avantage de ne pas développer les symptômes de rhizomanie. Ces plantes peuvent être cultivées dans des champs ayant une forte densité d'inoculum (haute teneur en *P. betae* virulifère) sans montrer de symptômes de rhizomanie, mais elles renferment toutefois des concentrations en virus élevées comme dans le cas des variétés de betteraves sensibles (Scholten and Lange, 2000). D'un point de vue biologique, cette situation apporte un grand désavantage car elle favorise le maintien de la charge virale dans le sol, et permet toujours la multiplication du virus et son adaptation. En effet, l'utilisation d'un seul gène de résistance contre un virus à ARN présente des risques. La forte pression de sélection exercée par ces betteraves, face à un organisme qui possède un fort taux de mutation (virus à ARN+), peut favoriser l'évolution de nouvelles populations virales contournant cette résistance (Scholten *et al.*, 1999 ; Asher *et al.*, 2002). Dans la région de Pithiviers, ainsi que dans d'autres pays européens et aux USA, des symptômes sévères de rhizomanie ont été observés depuis 2001, en particulier sur des betteraves résistantes, suggérant soit l'émergence de nouveaux variants du BNYVV capables de contourner la résistance, soit un possible effet synergique avec d'autres pathogènes. L'étude approfondie de la variabilité moléculaire corrélée aux variations du pouvoir pathogène démontre l'importance de l'ARN 5 (Tamada *et al.*, 1996a), et surtout de la protéine p25 codée par l'ARN 3, qui possède une région hypervariable localisée en aval de la séquence NLS. La variabilité de cette séquence, analysée sur 136 isolats de BNYVV (ratio de mutations synonymes/non synonymes) se rapproche de celle observée pour des protéines structurales de virus animaux contournant le système immunitaire (Schirmer *et al.*, 2005). Cette variabilité de séquence au niveau du gène de la protéine p25 a été reproduite sur le clone complet infectieux disponible au laboratoire. Ces expériences ont permis de montrer l'importance de cette séquence, d'une part dans le développement des symptômes foliaires sur *Tetragonia expansa*, et d'autre part dans la capacité de la protéine p25 à dimériser et activer la transcription en système simple hybride (Link, Thèse de Doctorat 2004, Université Louis Pasteur Strasbourg).

Ainsi, d'autres sources de résistance, comme celles issues du gène *Rz2* de la betterave sauvage *Beta maritima* (Scholten *et al.*, 1999), permettent d'envisager la sélection de nouvelles variétés doublement résistantes qui présentent une résistance accrue au BNYVV et peut être plus durable.

4. Enjeux scientifiques, économiques et techniques de la thèse

Au laboratoire, les études menées sur le BNYVV ont essentiellement visé à caractériser les principales fonctions des protéines virales, notamment à l'aide de plantes hôtes comme *C. quinoa* ou *T. expansa*. Les protéines de pathogénicité p25 et p26 sont particulièrement étudiées dans l'équipe du Pr. D. Gilmer, qui s'intéresse aux gènes viraux et cellulaires impliqués dans la mise en place de la relation parasitaire. Les propriétés de ces deux protéines sont étudiées en contexte viral ou en expression transitoire dans les cellules BY-2 de tabac et dans la levure (Vetter *et al.*, 2004 ; Link *et al.*, 2005). Cependant, les processus cellulaires perturbés par l'infection virale, en particulier par l'expression de ces protéines de pathogénicité, ne sont pas bien connus. A terme, l'infection conduit à une prolifération racinaire spécifique observée sur betterave, dans laquelle la protéine p25 semble jouer un rôle essentiel (Tamada *et al.*, 1999). La compréhension des mécanismes pouvant expliquer le développement des symptômes de rhizomanie sont autant de pistes pour caractériser de nouvelles variétés résistantes au virus. En effet, l'émergence de nouvelles populations virales, contournant la résistance des variétés actuellement cultivées en champs rhizomaniés, pousse les organismes de recherche et les sociétés betteravières à envisager de nouveaux modes de résistance pour les betteraves.

En collaboration avec la société SESVanderHave, et dans le cadre d'une convention CIFRE, nous avons initié la recherche de gènes de betterave qui sont dérégulés au cours de l'infection virale. Cette approche a pour but de comprendre les mécanismes intimes pouvant expliquer la prolifération racinaire. Cette prolifération cellulaire peut être la conséquence d'une dérégulation hormonale et/ou de la modification d'une cascade d'expression de gènes régulant un processus cellulaire bien défini. L'analyse de l'expression des gènes ainsi identifiés sur plantes totalement résistantes (*B. maritima*), peut conduire à l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires de sélection. Pour les sélectionneurs, ces marqueurs peuvent permettre de discriminer rapidement les betteraves sensibles de celles potentiellement résistantes. Enfin, l'obtention de variétés totalement résistantes à l'infection virale pourrait permettre, à long terme, de réduire la charge virale de *P. betae*. Bien entendu, l'utilisation des betteraves transgéniques totalement résistantes au virus devrait accélérer cet effet. Compte tenu de la réticence générale vis-à-vis des OGM, une approche parallèle doit être menée de front à l'aide de plantes sélectionnées par des voies classiques.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux différences d'expression des gènes cellulaires provoquées par l'infection virale ou par l'expression de la protéine p25. Pour cela, j'ai utilisé deux approches qui sont décrites dans les chapitres 1 et 2 respectivement.

La première approche a consisté à comparer l'expression des gènes par "restriction fragment differential display PCR" (RFDD-PCR) entre les racines de betteraves saines et celles de betteraves infectées par le BNYVV. Après une introduction décrivant les différents moyens techniques disponibles pour réaliser une analyse différentielle de transcriptomes, l'approche que nous avons choisie et utilisée pour caractériser des gènes candidats est présentée dans le chapitre 1 de ce mémoire. Ces gènes sont pour la plupart surexprimés lors de l'infection. Leur expression différentielle a ensuite été recherchée dans différents systèmes de culture et d'infection de betteraves *Beta vulgaris* ou *Beta macrocarpa*, à des stades précoces ou tardifs de l'infection. Ces gènes identifiés par RFDD-PCR ont révélé des différences d'expression souvent faibles et difficiles à valider par d'autres méthodes d'analyses. Ainsi, les difficultés rencontrées nous ont conduit à envisager une approche parallèle par transgénèse.

La deuxième approche a consisté à surexprimer chez *Arabidopsis thaliana* la protéine p25 du BNYVV, la protéine virale supposée responsable de l'apparition des symptômes racinaires. Après une introduction résumant les principales caractéristiques de la protéine p25, l'étude approfondie d'*Arabidopsis* d'écotype Columbia (Col-0) transgéniques exprimant cette protéine est décrite dans le chapitre 2. La caractérisation phénotypique de plusieurs lignées transgéniques indépendantes a tout d'abord permis de mettre en évidence le rôle important que joue la protéine p25, même hors contexte viral, dans la morphogenèse racinaire. Ces plantes présentent une croissance légèrement plus rapide que les plantes sauvages. De plus, elles possèdent un nombre de racines secondaires beaucoup plus important et surtout une sensibilité accrue à un analogue de l'auxine. La protéine p25 pourrait avoir une influence sur la cascade de signalisation de l'auxine favorisant l'émergence exacerbée de racines latérales. De plus, l'étude de la réponse de ces plantes à diverses hormones impliquées dans les voies de signalisation des réactions de défense aux pathogènes (MeJA, SA, ABA) nous laisse penser que la protéine p25 agirait comme facteur de virulence et bloquerait une partie des cascades de signalisation hormonale. Enfin, une analyse globale du transcriptome par "microarray" (CATMA) a été effectuée sur les lignées transgéniques, dans le but de caractériser avec précision la modification du transcriptome en réponse à l'expression constitutive de la protéine p25. Les résultats préliminaires qui sont présentés dans ce mémoire de thèse

apportent des éléments nouveaux qui peuvent être utilisés pour définir les mécanismes cellulaires dérégulés par la protéine p25.

La dernière partie est consacrée aux perspectives apportées par ce travail. En effet, les résultats obtenus sur *Arabidopsis* pourront être transposés sur la betterave. L'expression des gènes orthologues sera analysée à la fois sur des plantes sensibles et résistantes pour identifier de nouveaux marqueurs.

Enfin, en parallèle à cette thématique, j'ai contribué à l'étude des propriétés biologiques des protéines p25 (**annexe 1** : Vetter *et al.*, 2004) et p26 (**annexe 2** : Link *et al.*, 2005), et aussi participé à la construction et à la caractérisation d'un nouveau vecteur d'expression viral dérivé du clone infectieux de l'ARN 5 (**annexe 3** : Schmidlin *et al.*, 2005).

CHAPITRE I

RECHERCHE DES GENES INDUITS ET REPRIMES DANS LES RACINES DE BETTERAVES INFECTÉES PAR LE BNYVV



CHAPITRE I

RECHERCHE DES GENES INDUITS ET REPRIMÉS DANS LES RACINES DE BETTERAVES INFECTÉES PAR LE BNYVV

1. Introduction : les différentes méthodes d'analyses globales du transcriptome

Ces dix dernières années, de nombreuses méthodes d'analyses globales du transcriptome ont été développées. Ces techniques diffèrent par leur facilité de mise en œuvre, les dépenses qu'elles occasionnent, le nombre de transcrits détectés, le nombre d'expériences à prévoir, ainsi que leur sensibilité et reproductibilité (Kuhn, 2001). Ces techniques présentent chacune leurs avantages et inconvénients qu'il vaut mieux appréhender avant d'initier l'analyse de gènes exprimés dans un contexte particulier (pour revue : Matz and Lukyanov, 1998 ; Kuhn, 2001 ; Lievens *et al.*, 2001 ; Donson *et al.*, 2002 ; Meyers *et al.*, 2004a).

De manière générale, ces méthodes d'analyses globales peuvent être classées en deux grands groupes (Donson *et al.*, 2002). Le premier groupe représente toutes les analyses dites **directes** car aboutissant toujours à la caractérisation finale des séquences d'ADNc par séquençage. Ces séquences peuvent être isolées par l'analyse complète de banques EST, ou par l'analyse différentielle de banques d'ADNc effectuée par "differential screening" (DS), ou par des méthodes plus récentes comme "suppression subtractive hybridization" (SSH) ou "serial analysis of gene expression" (SAGE). D'autres méthodes, basées sur la discrimination des ARNm par l'amplification des ADNc de manière aléatoire et sélective par RT-PCR peuvent également être rattachées à ce groupe. La méthode "differential display reverse transcription PCR" (DDRT-PCR) et toutes les techniques qui en sont dérivées, ainsi que la méthode "cDNA-amplified fragment length polymorphism" (cDNA-AFLP) plus récente,

permettent l'isolement et l'identification de séquences partielles qui peuvent renseigner sur la fonction des gènes ainsi caractérisés. Le deuxième groupe englobe toutes les techniques dites **indirectes** car uniquement basées sur l'observation par hybridation moléculaire des différences d'expression de sondes ADNc identifiées uniquement grâce aux séquences disponibles dans les banques de données. Ainsi, le séquençage systématique de certains génomes comme celui d'*Arabidopsis thaliana* ou l'identification de séquences complètes EST ont permis ces dernières années le développement de techniques du type "cDNA microarray" et "oligonucleotide microarray" appelés également "GeneChip®", des techniques très fines basées sur l'hybridation moléculaire de milliers de gènes fixés sur un même support.

1.1. Le criblage différentiel de banque d'ADNc

1.1.1. Principe

Le séquençage des EST ou "expressed sequence tags" a été la première méthode utilisée pour la caractérisation rapide de gènes exprimés dans différents tissus et/ou dans différentes conditions (Adams *et al.*, 1995). Elle fournit des séquences partielles de clones d'ADNc (environ 500 pb). Les séquences ainsi identifiées peuvent dans un premier temps servir à caractériser de nouveaux gènes ou confirmer le rôle d'un gène dans le développement d'un organe spécifique. Dans un deuxième temps, elle permet l'analyse comparative de la fréquence d'apparition de ces séquences EST ainsi caractérisées dans les différentes banques d'ADNc. La comparaison des profils d'expression des gènes peut alors être faite entre plusieurs organes ou différentes conditions biotiques ou abiotiques. La technologie des banques EST a été très utilisée car elle permet de caractériser les gènes exprimés sans information préalable et convient bien à tous les laboratoires équipés pour le séquençage automatisé (Adams *et al.*, 1991). Cette méthode est longue, coûteuse et fortement biaisée par les erreurs de clonage. De plus, le séquençage ne donne accès qu'à un nombre limité de séquences (les plus représentées) sans pouvoir donner des informations quantitatives précises.

Pour limiter le nombre de séquences à caractériser, des méthodes de criblages de banques d'ADNc ou "differential screening" (DH) ont été élaborées à partir de banques construites dans des plasmides ou des phages (Sambrook *et al.*, 1989). Ce type de criblage permet en théorie de caractériser les gènes exprimés différenciellement entre différents échantillons. Pourtant sa faible sensibilité ne permet pas de détecter des ARNm peu représentés et qui peuvent être spécifiquement exprimés dans une situation donnée.

La technique "subtractive hybridization" (SH) permet d'augmenter radicalement la concentration des ARNm différentiels peu représentés. Les ARNm extraits à partir d'un premier échantillon servent de matrice pour synthétiser des ADNc radiomarqués. Ces ADNc sont ensuite hybridés aux ARNm issus d'un second échantillon qui sont ajoutés en excès. Les ADNc correspondant aux ARNm présents dans les deux échantillons forment des hybrides ADN-ARN qui peuvent être séparés des ADNc restés simple-brin. Les ADNc sb radiomarqués "épurés" qui correspondent aux ARNm surexprimés dans le premier échantillon peuvent alors servir de sonde pour cribler une banque générale ou pour construire une banque soustractive. Cette méthode réduit d'un facteur dix le nombre de séquences à analyser (Kuhn, 2001), et permet de détecter certains ARNm peu représentés (de l'ordre de 1/500 à 1/20 000 ; Wan *et al.*, 1996).

1.1.2. Utilisation

Les larges collections d'EST disponibles, notamment pour *Arabidopsis thaliana* ou le riz (*Oriza sativa*), donnent libre accès à une énorme quantité d'informations qui restent directement exploitables pour l'analyse des différences d'expression des gènes. L'analyse informatique approfondie des données EST provenant de dix banques différentes d'ADNc de riz (Ewing *et al.*, 1999) a montré qu'il était possible d'identifier le profil d'expression de chaque gène, à condition de focaliser l'étude sur les banques les plus représentatives contenant le plus grand nombre de séquences EST (plus de 800 ESTs). Par un travail de normalisation des données informatiques puis de "clustering" des profils d'expression des gènes ou des profils d'expression des banques entières, les auteurs ont pu regrouper les gènes de fonction similaire, et identifier les spécificités cellulaires et tissulaires d'expression de gènes.

Pourtant, ce travail de comparaison de banques EST s'avère très souvent impossible lorsque les séquences EST ne sont pas aussi nombreuses, lorsque les banques ne sont pas diversifiées (banques de différents organes), ou bien lorsque ces banques proviennent de banques qui ne sont pas normalisées de la même façon. Le recours au criblage de banques reste alors le meilleur moyen pour cloner et identifier des séquences spécifiques, à l'aide de sondes provenant d'organes différents. On peut citer comme exemple le criblage différentiel d'une banque d'ADNc de fleurs de tabacs (*Nicotiana tabacum*) qui a permis de caractériser une nouvelle famille de gènes d'extensines nommés PELP ("pistil-specific extensin-like protein") spécifique du développement du pistil (Goldman *et al.*, 1992).

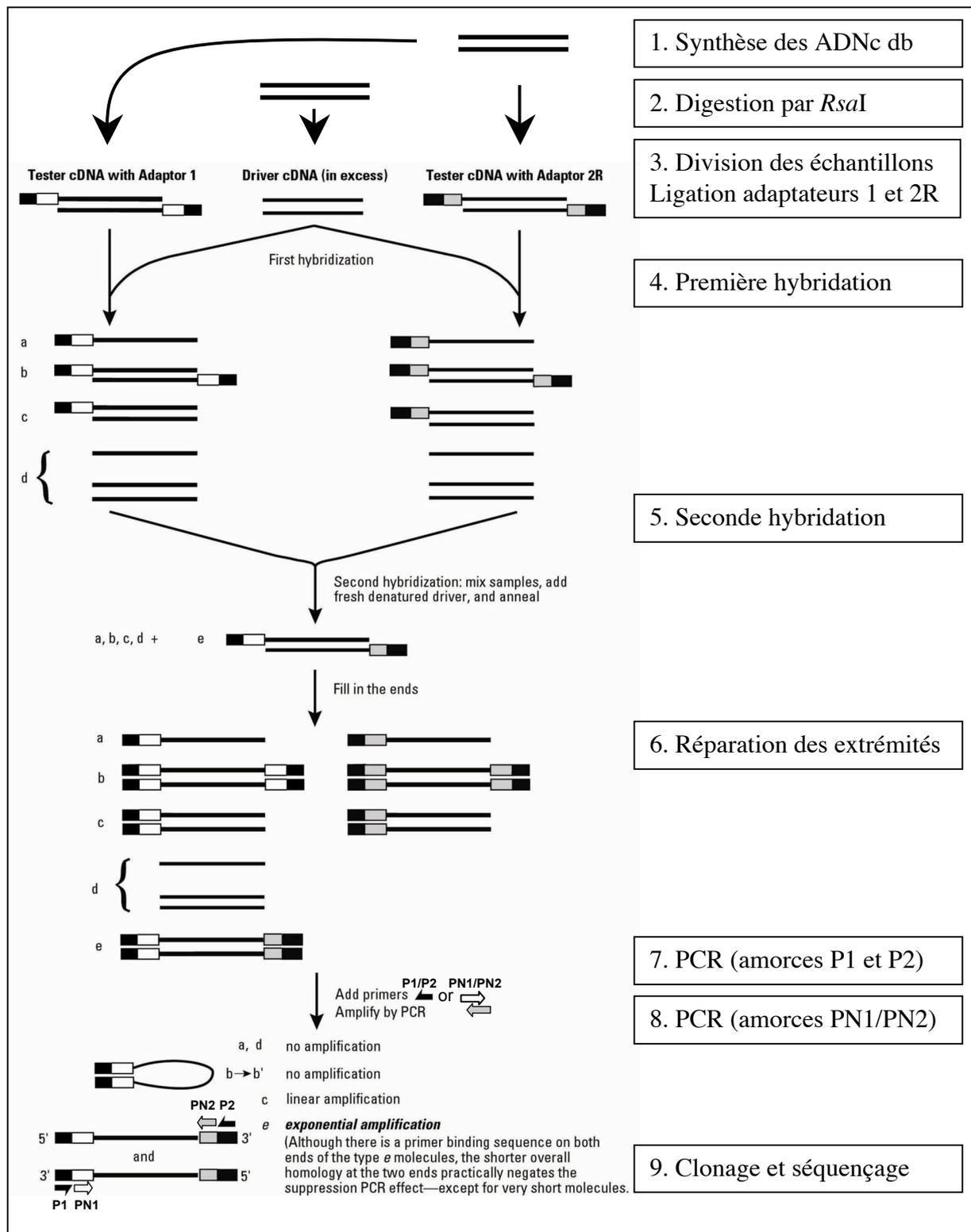


Figure I.1 : Représentation schématique de la méthode SSH ou "suppression subtractive hybridization" (Diatchenko *et al.*, 1996). Les lignes représentent les séquences sens et antisens des deux lots d'ADNc nommés "Tester cDNA" et "Driver cDNA" synthétisés à partir des deux lots d'ARNm à comparer puis digérés par l'enzyme *RsaI*. Les rectangles noirs représentent les parties externes des adaptateurs 1 et 2R de séquences différentes et spécifiques des amorces P1 et P2. Les rectangles blancs et gris correspondent aux parties internes des adaptateurs qui sont spécifiques des amorces PN1 et PN2 respectivement. Les fragments **e** correspondant aux séquences surexprimées dans l'échantillon d'ARNm à l'origine du lot "Tester cDNA" sont amplifiés par PCR grâce aux amorces P1 et P2. Les fragments **b** contenant des extrémités identiques forment des structures en "poêles à frire" qui empêchent toute amplification. Les fragments **a** et **d** ne sont pas amplifiés par manque d'adaptateur à l'une ou l'autre des extrémités, et les fragments **c** ne sont amplifiés que de manière linéaire. D'après CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual (Catalog # : K1804-1 CLONTECH).

La méthode de criblage de type DS permet certes de passer en revue une large proportion du transcriptome, par l'accès à un nombre très important de séquences, mais elle est relativement longue à mettre en œuvre. Cette méthode peut cependant être utile pour identifier un gène fortement exprimé, mais reste inefficace pour déceler des variations d'expression plus fines. La méthode soustractive du type SH permet de répondre en partie à ce problème. Elle garde des aspects négatifs qui limitent pourtant son utilisation. D'une part, elle nécessite de grandes quantités d'ARNm (20 µg d'ARN poly(A)+) et les hybridations de séquences n'aboutissent pas toujours à l'identification de séquences différentielles, en raison d'une trop grande représentation de clones sans intérêt. D'autre part, elle génère un nombre non négligeable de faux-positifs, et a tendance à favoriser l'identification des ARNm les plus abondants au détriment des ARNm plus rares. Enfin, cette méthode fonctionne dans un seul sens : seuls les gènes surexprimés dans l'échantillon servant de matrice pour la synthèse des ADNc radiomarqués sont représentés dans cette analyse. Une deuxième expérience inverse est alors nécessaire pour identifier les gènes exprimés spécifiquement dans l'autre échantillon (Wan *et al.*, 1996).

1.2. La méthode "suppression subtractive hybridization" (SSH)

1.2.1. Principe

Cette méthode soustractive appelée "suppression subtractive hybridization" (SSH) se révèle beaucoup plus efficace et sensible pour détecter des transcrits faiblement exprimés. Elle repose sur l'hybridation de deux populations d'ADNc différentes et l'amplification spécifique par PCR des fragments d'ADNc non hybridés et donc exprimés différemment entre les deux échantillons (Diatchenko *et al.*, 1996).

Le principe de cette méthode est schématisé sur la figure **I.1** qui illustre l'amplification préférentielle des séquences exprimées dans l'échantillon nommé "tester cDNA" et qui sont absentes dans l'échantillon nommé "driver cDNA". Après synthèse de ces deux populations différentes d'ADNc, chaque échantillon d'ADNc est soumis à une digestion par une enzyme de restriction du type *RsaI* ou *HaeIII*. Le lot "tester cDNA" est séparé en deux échantillons, chacun étant soumis à une ligation d'adaptateurs différents. La première étape d'hybridation consiste alors à hybrider chaque échantillon de "tester cDNA" avec un excès de "driver cDNA". Les ADNc correspondant aux ARNm présents dans les deux échantillons forment rapidement des homo-hybrides (b, figure **I.1**) pour les molécules les plus représentées ou même des hétéro-hybrides (c, figure **I.1**). De cette façon, la fraction d'ADNc restée simple-

brin (a, figure **I.1**) est largement enrichie en séquences correspondant aux gènes surexprimés. De plus, les quantités d'ADNc simple-brin sont normalisées, les concentrations en ADNc fortement ou faiblement représentées étant ainsi équilibrées. La deuxième étape d'hybridation consiste à réunir les deux échantillons issus de la première réaction d'hybridation. Seuls des ADNc restés simple-brin sont alors capables de se réassocier (hybrides b, c ou e sur la figure **I.1**). L'addition d'une seconde fraction dénaturée de "driver cDNA" permet d'enrichir encore un peu plus la fraction en séquences différentiellement exprimées (e, figure **I.1**) qui, contrairement aux hybrides (b) et (c), possèdent à chaque extrémité 5' un adaptateur différent. Après une étape de réparation des extrémités, l'amplification par PCR de cette fraction (e) est réalisée grâce à l'utilisation d'amorce P1 et P2 spécifiques des deux adaptateurs. Ces séquences, réamplifiées avec des amorces PN1 et PN2 plus internes, sont ensuite clonées et caractérisées par séquençage ou directement utilisées pour le criblage de banque.

1.2.2. Utilisation

La méthode SSH a permis de revisiter la méthode traditionnelle de construction et criblage de banque, en normalisant et en égalisant les quantités d'ADNc à comparer. Cette technique est rapide, simple à mettre en œuvre, et s'avère efficace pour détecter des ARNm exprimés de manière différentielle et peu représentés dans les cellules (Diatchenko *et al.*, 1996). Grâce aux étapes successives d'hybridation qui permettent ensuite l'amplification spécifique des séquences en surnombre, les étapes classiques de séparation par purification ou chromatographie sont évitées. Cette méthode requiert peu d'ARNm (de l'ordre de 2 µg d'ARN poly(A)+) et génère peu de faux-positifs, en raison des étapes successives d'hybridation soustractive. Pourtant, comme la méthode précédente, elle ne fonctionne que dans un seul sens et ne permet que de comparer deux échantillons à la fois.

1.3. La méthode "serial analysis of gene expression" (SAGE)

1.3.1 Principe

Si le séquençage systématique d'EST a permis le développement de nombreuses banques d'ADNc, cette méthode reste néanmoins relativement laborieuse et coûteuse en raison du grand nombre de séquences ADNc à caractériser et de la longueur des fragments à séquencer (environ 500 pb). La méthode appelée "serial analysis of gene expression" (SAGE), une autre méthode d'analyse globale basée sur le séquençage systématique de courtes séquences ADNc (10 à 14 pb), a permis de réduire considérablement le séquençage nécessaire

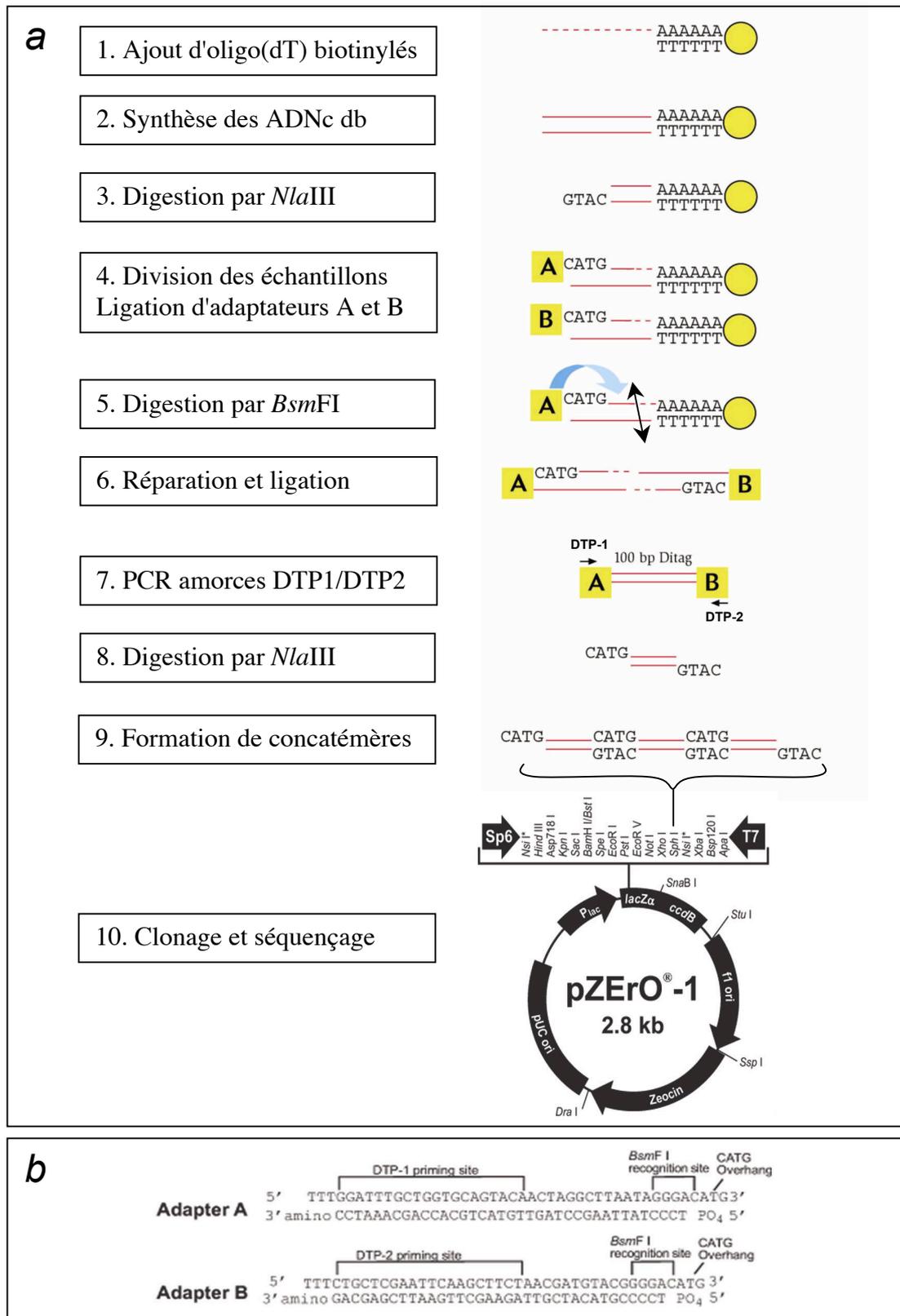


Figure I.2 : (a) Représentation schématique de la méthode SAGE ou "serial analysis of gene expression" (Velculescu *et al.*, 1995). Les ARN poly(A)⁺, sélectionnés par les amorces oligo(dT) couplées à des billes paramagnétiques (ronds jaunes), servent de matrice pour la synthèse d'ADNc. Ces ADNc sont soumis à une digestion par l'enzyme *Nla*III puis divisés en deux populations. Chaque lot d'ADNc est soumis à une ligation d'adaptateurs A ou B, puis une digestion par l'enzyme *Bsm*FI. Après ligation des deux populations d'ADNc, amplification par PCR grâce aux amorces DTP-1 et DTP-2 spécifiques des adaptateurs A et B respectivement, et digestion par l'enzyme *Nla*III, les fragments résultants appelés "Ditags" sont clonés dans le vecteur pZerO®-1. (b) Description de la séquence des adaptateurs A et B. D'après INVITROGEN I-SAGE™ Kit Protocol (Catalog n° T5000-01 Invitrogen).

pour caractériser chaque gène. Elle permet ainsi, tout comme le séquençage d'EST, l'analyse qualitative et quantitative de tous les gènes exprimés (Velculescu *et al.*, 1995).

Le principe de cette méthode relativement simple à mettre en œuvre est schématisé sur la figure **I.2a**. Après capture des ARN poly(A)+ grâce à l'utilisation de billes magnétiques couplées à des oligo(dT) biotinylés, les ADNc db sont synthétisés et soumis à une digestion par l'enzyme *NlaIII*, une enzyme qui reconnaît un site de restriction à 4 bp et coupe fréquemment, générant des fragments d'environ 250 pb. Les extrémités 3' de ces ADNc digérés sont ensuite isolées sur la base de l'interaction streptavidine/biotine, puis séparées en deux échantillons, chacun étant soumis à une ligation d'adaptateurs différents nommés A et B de 40 pb de long contenant à leur extrémité 3' le site de reconnaissance de l'enzyme *BsmFI* (figure **I.2b**). Cette endonucléase reconnaît son site spécifique présent sur l'adaptateur et coupe 10 à 14 pb plus loin. Les produits de digestion correspondent donc à des fragments de 50 pb, contenant 40 pb de séquence d'adaptateur A ou B et 10-14 pb de séquence ADNc appelée étiquette ou "tag". Après une étape de réparation des extrémités cohésives, les deux échantillons sont soumis à une ligation, de manière à former des "ditags" encadrés par les adaptateurs A et B qui sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques DTP-1 et DTP-2 (figure **I.2b**). Après digestion par l'enzyme *NlaIII*, les séquences ADNc "ditags" d'environ 26 pb sont séparées des adaptateurs sur gel de polyacrylamide et purifiées. Une dernière étape de ligation permet de concaténer les "ditags" de 400 à 1000 pb (contenant 20 à 50 ditags). Ces concatémères sont ensuite purifiés sur gel de polyacrylamide et clonés (figure **I.2a**), réamplifiés, puis séquencés. Le séquençage permet ainsi d'identifier les différentes "ditags" séparés les uns des autres par le site de restriction *NlaIII*. Chaque étiquette de 10-14 pb permet alors de caractériser un gène après alignement avec les séquences disponibles dans les banques de données. De plus, l'analyse de la fréquence d'apparition de chaque étiquette spécifique d'un gène permet d'évaluer son taux d'expression dans différents échantillons.

1.3.2. Utilisation

Parce que l'identification des gènes repose essentiellement sur l'alignement des étiquettes avec les séquences déjà présentes dans les banques de données, la technique SAGE a trouvé surtout des applications dans des études effectuées sur les organismes dont les séquences EST ou génomiques étaient disponibles, comme la levure ou l'homme. La méthode SAGE a été initialement utilisée pour caractériser la totalité des gènes exprimés dans le pancréas humain (Velculescu *et al.*, 1995). Les auteurs ont prouvé la fiabilité de cette technique en montrant que les étiquettes les plus représentées (plus de dix fois)

correspondaient toutes à des gènes du pancréas déjà caractérisés. De plus, les étiquettes ne pouvant pas renseigner au départ sur la fonction du gène peuvent être utilisées par la suite pour cribler une banque d'ADNc et obtenir une séquence plus longue et plus informative.

La première analyse SAGE effectuée sur les plantes a consisté à définir le profil d'expression des gènes dans les plantules de riz (Matsumura *et al.*, 1999). Cette analyse correspondait alors à la première étude globale quantitative de l'expression des gènes chez les plantes. L'analyse de 10122 étiquettes a permis d'identifier 5921 séquences parmi lesquelles 1367 gènes ont pu être caractérisés par l'alignement avec les séquences EST disponibles dans les banques de données. Parmi les 30 gènes les plus représentés, certains se sont avérés de fonction inattendue, comme les gènes codant soit pour des métallothionines, soit des protéines de stockage comme la globuline, ou des protéines induites par le stress comme les chitinases. Les mêmes auteurs ont montré que la technique SAGE pouvait être utilisée pour identifier des gènes spécifiques d'un état physiologique donné, en comparant deux situations inverses. Ainsi, l'analyse comparative effectuée entre des transcrits issus de plantules privées d'oxygène et des transcrits de plantules témoins a permis de déceler 18 gènes surexprimés et 6 gènes réprimés en réponse à un tel stress abiotique.

Cette technique, facile à mettre en œuvre sans nécessiter de gros équipements (en dehors d'un séquenceur), permet d'effectuer une analyse globale de l'expression des gènes à partir de quantités raisonnables d'ARN (de l'ordre de 5-10 µg d'ARN totaux ou 50-100 ng d'ARN poly(A)+). Elle permet de détecter également des ARNm faiblement représentés dans les cellules. La caractérisation des gènes passe principalement par l'alignement des étiquettes "tags" avec les séquences EST ou génomiques déjà disponibles dans les banques de données. Cette analyse est pourtant biaisée par le fait que de nombreuses séquences EST correspondent uniquement à la partie 5' terminale des gènes et ne peuvent pas être alignées avec les tags représentant la partie 3' terminale des gènes à l'étude (Matsumura *et al.*, 1999). De plus, la séquence courte des tags (10-14 pb) rend difficile l'identification d'un gène en particulier, en raison de la complexité du génome des plantes, un seul tag pouvant correspondre à la séquence retrouvée sur la partie 3' terminale de plusieurs membres d'une même famille (Meyers *et al.*, 2004a). Pour lever cette ambiguïté, d'autres techniques utilisant des étiquettes plus longues ont été développées. La technique "LongSAGE" permet d'obtenir des séquences de 21-22 pb, par l'utilisation des enzymes de restriction *NlaIII* et *MmeI* (Saha *et al.*, 2002). La technique "SuperSAGE" permet quand à elle de générer des fragments de 26 pb (Matsumura *et al.*, 2003). La méthode "Robust-Long SAGE" (RL-SAGE) a quant à elle permis d'améliorer

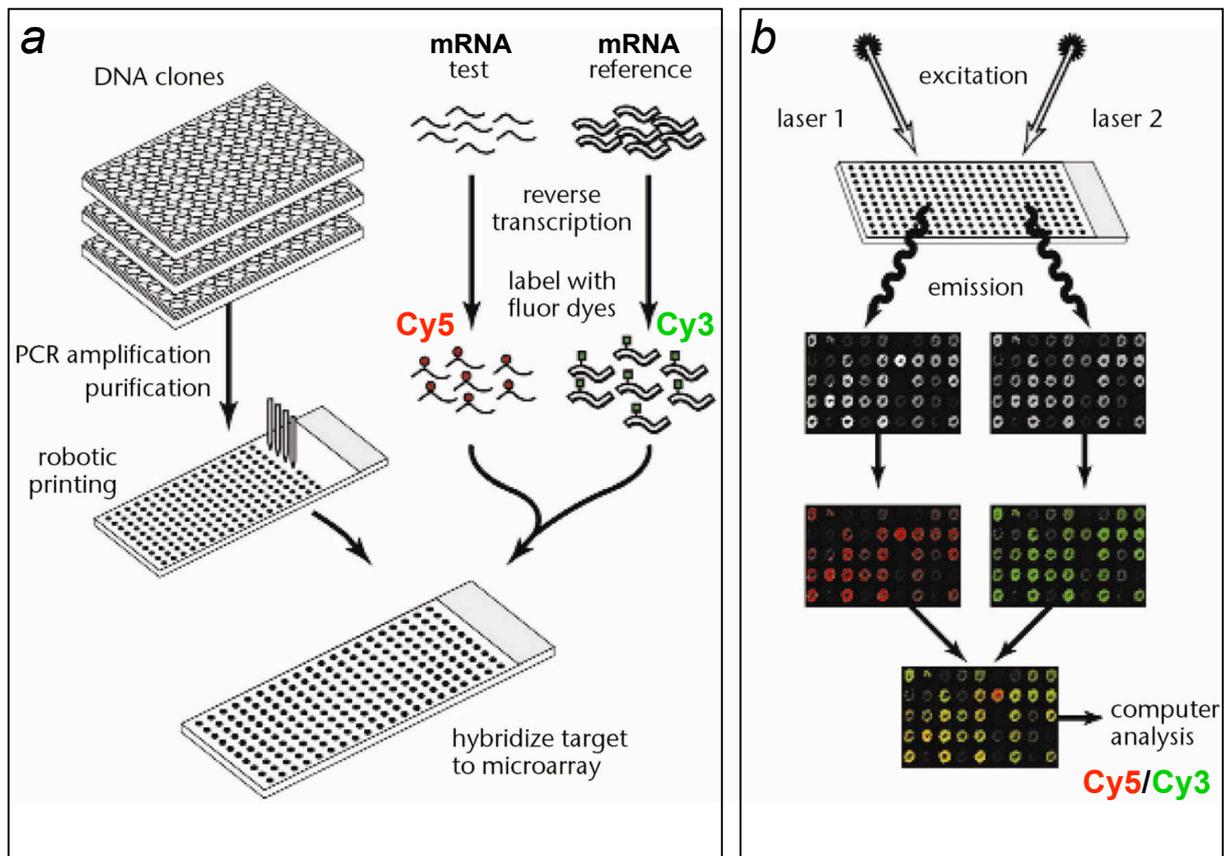


Figure I.3 : Représentation schématique de l'analyse du transcriptome par puce à ADN ou "cDNA microarray" (Duggan *et al.*, 1999 ; Cheung *et al.*, 1999). (a) Construction et hybridation des lames de verre. Les produits PCR représentant les différents gènes ou EST d'un organisme sont déposés en points sur des lames de verre recouvertes le plus souvent d'une couche de polylysine, à l'aide d'un robot (robotic printing). Les deux populations d'ARN messagers à comparer sont copiées en ADNc par une réaction de transcription inverse en présence de fluorochromes différents (Cy3 ou Cy5). Les deux lots d'ADNc sont ensuite hybridés simultanément sur les lames de verre. (b) Lecture des signaux sur lames de verre. Les lames de verre sont excitées successivement par deux lasers différents (excitation), chacun à la longueur d'onde d'excitation de l'un des deux fluorochromes, et les signaux respectivement émis dans les deux cas sont analysés par microscopie confocale (émission). L'analyse informatique (computer analysis) permet de reconstituer les signaux rouges et verts en une seule image composite et informe sur le rapport des signaux émis par chacun des deux fluorochromes (Cy5/Cy3) qui reflète le taux d'expression de chaque gène. D'après Duggan *et al.*, 1999.

l'efficacité de clonage des concatémères, tout en augmentant leur taille et en minimisant le nombre de clones à séquencer (Gowda *et al.*, 2004). Enfin, une méthode très proche, appelée "Massiv parallel signature sequencing" (MPSS) permet l'identification de séquences "signatures" de 20 pb (Brenner *et al.*, 2000a, 2000b ; Meyers *et al.*, 2004b). Toutes ces méthodes basées sur le séquençage systématique de motifs courts restent cependant longues et coûteuses, et donc limitées à certains laboratoires.

1.4. Les puces à ADN

1.4.1. Principe

Le principe de la puce à ADN est basé sur la technique d'hybridation moléculaire déjà utilisée pour l'analyse classique des gènes par Southern blot ou Northern blot. Les premières analyses sur membranes ("macroarray") ont consisté à déposer sous forme de dot blot plusieurs séquences d'intérêt sur différentes membranes de nylon, chacune étant mise en présence d'un ensemble d'ADNc radiomarqués obtenus par transcription inverse à partir de différents échantillons d'ARN totaux à comparer. Chaque ADNc radiomarqué (cible) est reconnu par la séquence correspondante sur les membranes (sonde). L'analyse de l'intensité des signaux générés par chaque sonde sur les différentes membranes renseigne sur le niveau d'expression de chaque gène dans les différentes situations représentées par les échantillons d'ARN totaux utilisés au départ.

Le concept des biopuces est ensuite né d'une association de plusieurs technologies englobant la microélectronique, la microscopie à fluorescence, l'analyse informatisée d'images, ainsi que la bioinformatique. Le principe des puces à ADN ("cDNA microarray"), schématisé sur la figure **I.3** consiste à déposer différentes séquences spécifiques (sondes) sur un seul support hybridé simultanément par les deux lots d'ADNc (cibles) représentant les deux populations d'ARN à comparer (Duggan *et al.*, 1999). Les séquences représentant les différents gènes ou EST ou ADNc (0,6 à 2,4 kb) identifiés dans les banques de données sont amplifiées par PCR, purifiées, puis de petites quantités (1 à 5 nl représentant ~15 ng d'ADN) sont déposées à l'aide d'une micropipette robotisée dirigée par ordinateur, sur des lames de verre du même type que les lames de microscope (figure **I.3a**). Les lames sont en général recouvertes d'une fine couche de polymères (polylysine, amino silanes) qui augmente l'hydrophobicité des lames et facilite l'adsorption du liquide, pour ainsi obtenir des dépôts d'ADN fins et précis. Le verre apporte de nombreux avantages par rapport au nylon : l'ADN est fixé de manière covalente sur la surface en verre traitée, le verre supporte beaucoup mieux

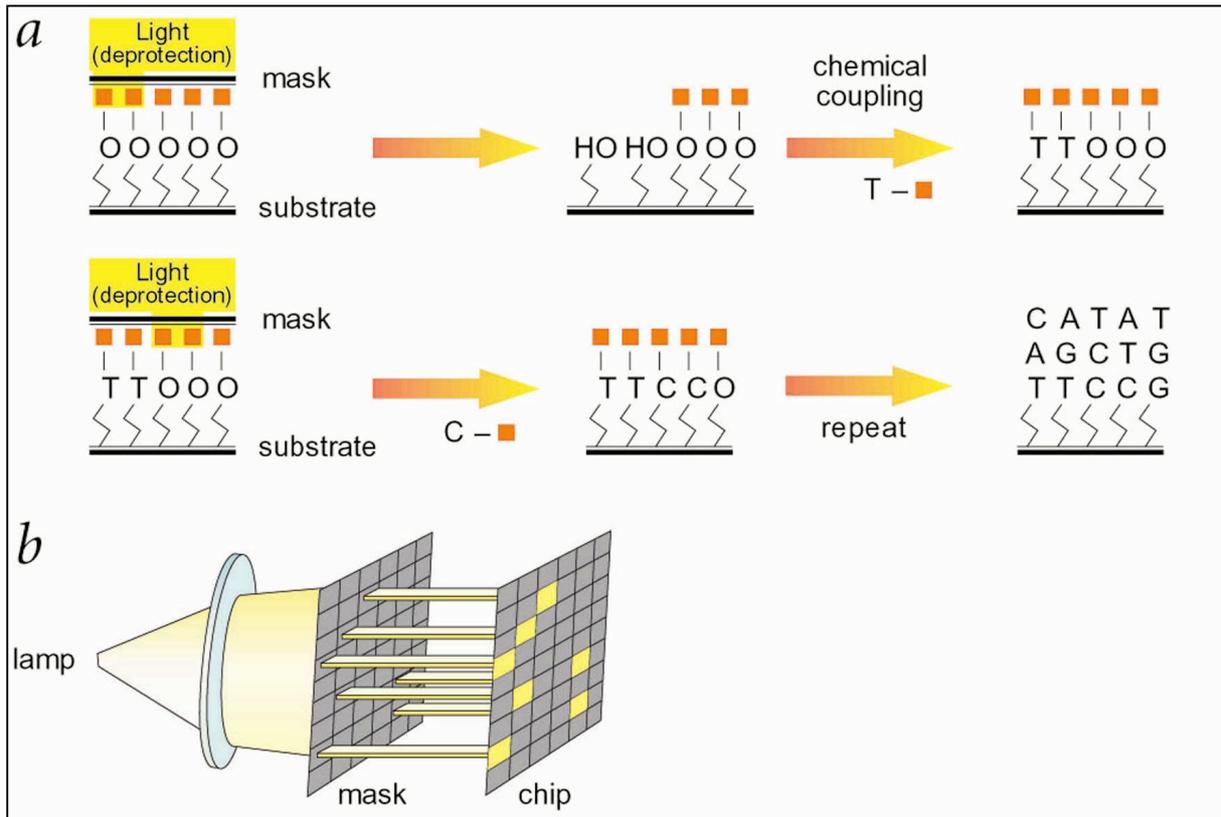


Figure I.4 : (a) Description des étapes de synthèse des oligonucléotides par photolithographie sur puces "GeneChip®" ou "oligonucleotide microarrays" (Affymetrix). Au départ, le support (substrate) est recouvert de groupements protecteurs photosensibles (carré rouge). Chaque passage de la lumière (rayon jaune) à travers les ouvertures du filtre (mask) provoque la déprotection des sites et permet la liaison covalente (chemical coupling) d'une base couplée à un groupement protecteur photosensible (bases T ou C couplées à un carré rouge). La succession des photoactivations (repeat) à travers différents filtres permet l'allongement progressif des oligonucléotides. (b) Représentation du passage du rayon lumineux généré par la source de lumière (lamp) et traversant le filtre (mask) pour venir partiellement activer le support (chip). D'après Lipshutz *et al.*, 1999.

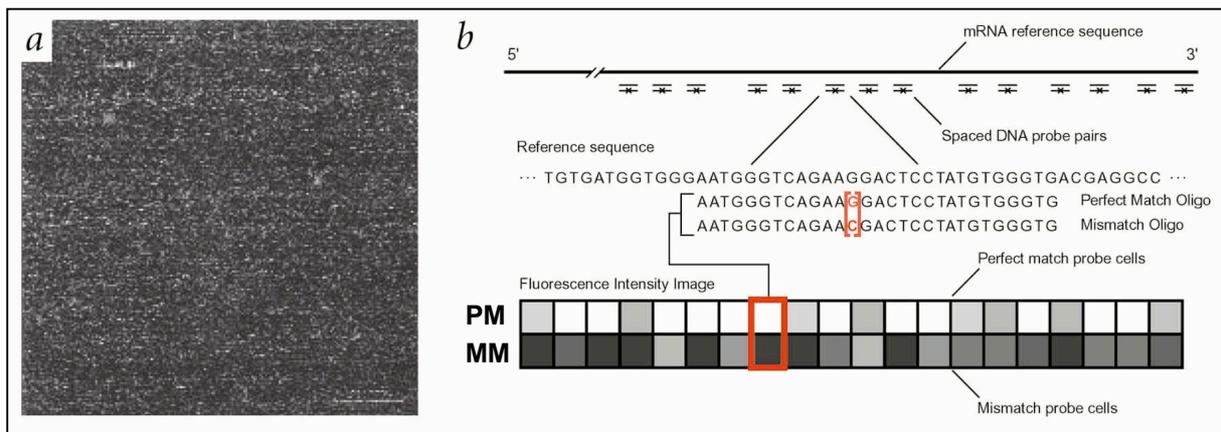


Figure I.5 : (a) Exemple d'une puce "GeneChip®" ou "oligonucleotide microarray" (Affymetrix). Cette puce de 1,28 x 1,28 cm contient un ensemble de sondes représentant 40 000 gènes et EST humains. (b) Description des vingt paires d'oligonucléotides représentant un seul gène sur la puce "GeneChip". A partir de la séquence ARNm de référence, vingt zones différentes conservées et représentatives du gène sont sélectionnées pour déterminer les vingt séquences PM de 29 nucléotides strictement spécifiques (Perfect Match Oligo) ou les vingt séquences MM de 29 nucléotides possédant un seul nucléotide différent (Mismatch Oligo). Après hybridation et lecture des puces, le signal émis par les séquences PM représente le taux d'expression de chaque gène, alors que le signal émis par les séquences MM représente le bruit de fond. D'après Lipshutz *et al.*, 1999.

les hautes températures et les fortes concentrations en sels utilisées lors des lavages, il est moins poreux et permet de minimiser les volumes de liquide d'hybridation, et il n'émet aucune fluorescence après excitation qui provoquerait du bruit de fond (Cheung, *et al.*, 1999). Après dépôts et séchage, les lames sont exposées aux UV pour fixer définitivement l'ADN au support. Chaque population d'ADNc représentant une situation contrôle (appelée référence) et une situation à analyser (appelée test) est synthétisée par transcription inverse à partir d'ARN totaux avec incorporation de nucléotides couplés à un fluorochrome différent (Cy3 ou Cy5 ; figure **I.3a**). Les deux lots d'ADNc sont ensuite hybridés simultanément sur les lames, dans des conditions de forte stringence. Après lavages successifs puis séchage, les lames sont analysées par microscopie confocale ou à l'aide d'un scanner à fluorescence. Les signaux spécifiquement émis par chaque fluorochrome après excitation sont analysés successivement et enregistrés. L'analyse par ordinateur permet de reconstituer les signaux verts (Cy3) et rouges (Cy5) qui forment une image composite (figure **I.3b**). Les rapports Cy5/Cy3 permettent d'évaluer les taux d'expression dans la situation test (signaux rouges, figure **I.3**) par rapport à la situation contrôle (signaux verts, figure **I.3**). Les nombreuses évolutions et améliorations du matériel et des robots utilisés ont permis de perfectionner considérablement la précision des dépôts et ont conduit au développement de lames possédant des sondes ADN de diamètre 100-150 μm séparées par un espace de 200-250 μm , permettant ainsi de déposer de 1 000 à 10 000 gènes/cm² avec une précision de 10 μm (Cheung, *et al.*, 1999).

Le développement des "oligonucléotide microarray" ou "GeneChip®" par Affymetrix a permis d'augmenter la vitesse de construction des lames et la densité des dépôts jusqu'à ~30 000 gènes/cm² (Lockhart *et al.*, 1996). Une seule lame 1,28 x 1,28 cm peut contenir jusqu'à 300 000 gènes (Lipshutz *et al.*, 1999). Dans ce cas, la construction des sondes ADN de 20 à 30 bases de long se fait par dépôt de couches successives des quatre bases de l'ADN directement sur le support en verre, avec fixation des bases par un adressage photochimique schématisé sur la figure **I.4**. La surface est recouverte au départ de groupements protecteurs photolabiles qui ne permettent pas la liaison covalente des bases en contact avec le support. La lumière qui traverse les ouvertures d'un masque lithographique provoque la déprotection des sites correspondant sur le support et permet la liaison covalente d'une base couplée à un groupement protecteur photolabile. L'utilisation séquentielle de différents masques permet de sélectionner chaque base à ajouter sur chaque site et ainsi la synthèse synchronisée de toutes les séquences. La forte densité de sondes apportée par la technologie GeneChip® (figure **I.5a**) a permis de développer des puces qui contiennent plusieurs séquences pour un seul gène

(figure **I.5b**). L'analyse bioinformatique des séquences disponibles dans les banques de données permet de définir, à partir d'une séquence de référence représentant 200 à 300 bases de la région 3' d'un ARNm, plusieurs oligonucléotides non recouvrants (15 à 20) de 20 à 30 bases de long strictement spécifiques appelées PM ("perfect match oligonucleotides"). D'autres oligonucléotides appelés MM ("mismatch oligonucleotide") identiques aux premiers mais possédant une seule base différente en position centrale constituent les sondes aspécifiques du même gène. La détection des signaux émis par ces oligonucléotides MM permet d'estimer le bruit de fond généré par l'hybridation aspécifique d'ADNc de séquence différente et de le soustraire aux signaux émis par les oligonucléotides PM, pour normaliser le taux d'expression de chaque gène. L'analyse des signaux PM/MM permet d'augmenter la sensibilité de quantification des signaux, de minimiser la détection des hybridations aspécifiques, et d'augmenter la reproductibilité. Cette technologie est néanmoins très coûteuse et reste limitée à l'étude du transcriptome de certains organismes (l'homme, la souris, la levure, la drosophile, *C. elegans*, *A. thaliana*...).

1.4.2. Utilisation

La méthode "macroarray" ("nylon filter arrays" ; Desprez *et al.*, 1998), encore appelée Northern inverse ("reverse Northern blotting" ; Dilks *et al.*, 2003) reste largement utilisée notamment pour confirmer par hybridation moléculaire le profil d'expression de certains EST ou ADNc identifiés par d'autres techniques de criblage. Contrairement au Northern blot classique, cette méthode permet d'analyser un grand nombre de candidats (jusqu'à 6 000 fragments sur une seule membrane de 12 x 18 cm) en utilisant des quantités faibles d'ARN totaux (1 à 5 µg) pour la synthèse des ADNc radiomarqués (Kuhn, 2001). On peut citer comme exemple l'analyse comparative effectuée sur 135 EST surexprimés dans les racines d'une variété résistante de *Glycine max* infectées par *Fusarium solani* f.sp. *glycines* et précédemment identifiés par SSH. L'analyse par macroarray effectuée sur les racines de plantes saines et infectées montre qu'il est possible de comparer les profils d'expression des gènes candidats entre variétés sensibles, résistantes et partiellement résistantes (Iqbal *et al.*, 2002). Un autre exemple concerne la confirmation par Northern inverse du profil d'expression de 33 ADNc exprimés dans les racines de pin (*Pinus pinaster* Ait.) en réponse à un stress hydrique et identifiés en premiers lieux par cDNA-AFLP (Dubos and Plomion, 2003).

La technique "microarray" a été utilisée pour la première fois chez les plantes en recherchant les différences d'expression existant entre les feuilles et les racines d'*Arabidopsis*

thaliana (Schena *et al.*, 1995). Seulement 48 ADNc sélectionnés dans les banques de données avaient été analysés, et la comparaison des signaux avait permis de sélectionner 26 gènes montrant des taux d'expression cinq fois plus élevés dans un échantillon par rapport à l'autre. Depuis, les puces à ADN n'ont cessé de se développer grâce à l'accessibilité à un plus grand nombre de gènes (de l'ordre de 7 000 à 10 000 gènes) identifiés par le séquençage complet du génome des plantes. Ainsi, les puces à ADN ont trouvé de nombreuses applications en particulier chez *Arabidopsis thaliana*. Certaines analyses globales très larges sont effectuées de manière à comparer, par exemple, le profil d'expression des gènes en réponse à trois stress abiotiques différents, la sécheresse, le froid et la forte salinité à différents moments des traitements, et ainsi caractériser les gènes spécifiques à un stress donné ou au contraire impliqués dans la réponse générale de la plante (Seki *et al.*, 2002). D'autres analyses sont plus ciblées sur une catégorie de gènes, comme par exemple les facteurs de transcription identifiés chez *Arabidopsis*. Elles visent à caractériser leur profil d'expression dans différentes situations de stress biotique (bactéries, virus, oomycètes,...), de stress abiotique (blessure, froid, sels,...) ou en réponse aux hormones (auxine, acide salicylique, jasmonate, éthylène ; Chen *et al.*, 2002). Ces analyses globales permettent de mieux comprendre les cascades de signalisation induites par différents stress biotiques ou abiotiques et les cascades d'activation de gènes induites par les hormones qui se mêlent et s'entrecroisent. Les gènes clés de ces cascades d'activation ainsi caractérisés peuvent être ensuite étudiés plus en détail par l'étude approfondie de leur promoteur ou l'utilisation de mutants "knock out" (stratégie antisens).

En résumé, cette technologie permet d'effectuer une analyse globale de l'expression d'un très grand nombre de gènes (parfois l'ensemble du transcriptome), à partir de faibles quantités d'ARN (1-5 µg d'ARN totaux). Cette méthode est très sensible, fiable, reproductible, génère très peu de faux-positifs, et permet ainsi de détecter des ARNm faiblement représentés. Cette technologie n'est cependant accessible qu'aux organismes dont les gènes sont largement caractérisés et représentés dans les banques de données.

1.5. La méthode "differential display reverse transcription PCR" (DDRT-PCR)

1.5.1. Principe

Le développement du "RNA differential display" (Liang and Pardee, 1992) appelé par la suite "differential display reverse transcription PCR" (DDRT-PCR) a ouvert la porte à de nombreuses autres techniques basées sur la discrimination puis l'amplification d'un certain nombre d'ARNm par RT-PCR. L'amplification des ADNc de manière aléatoire permet

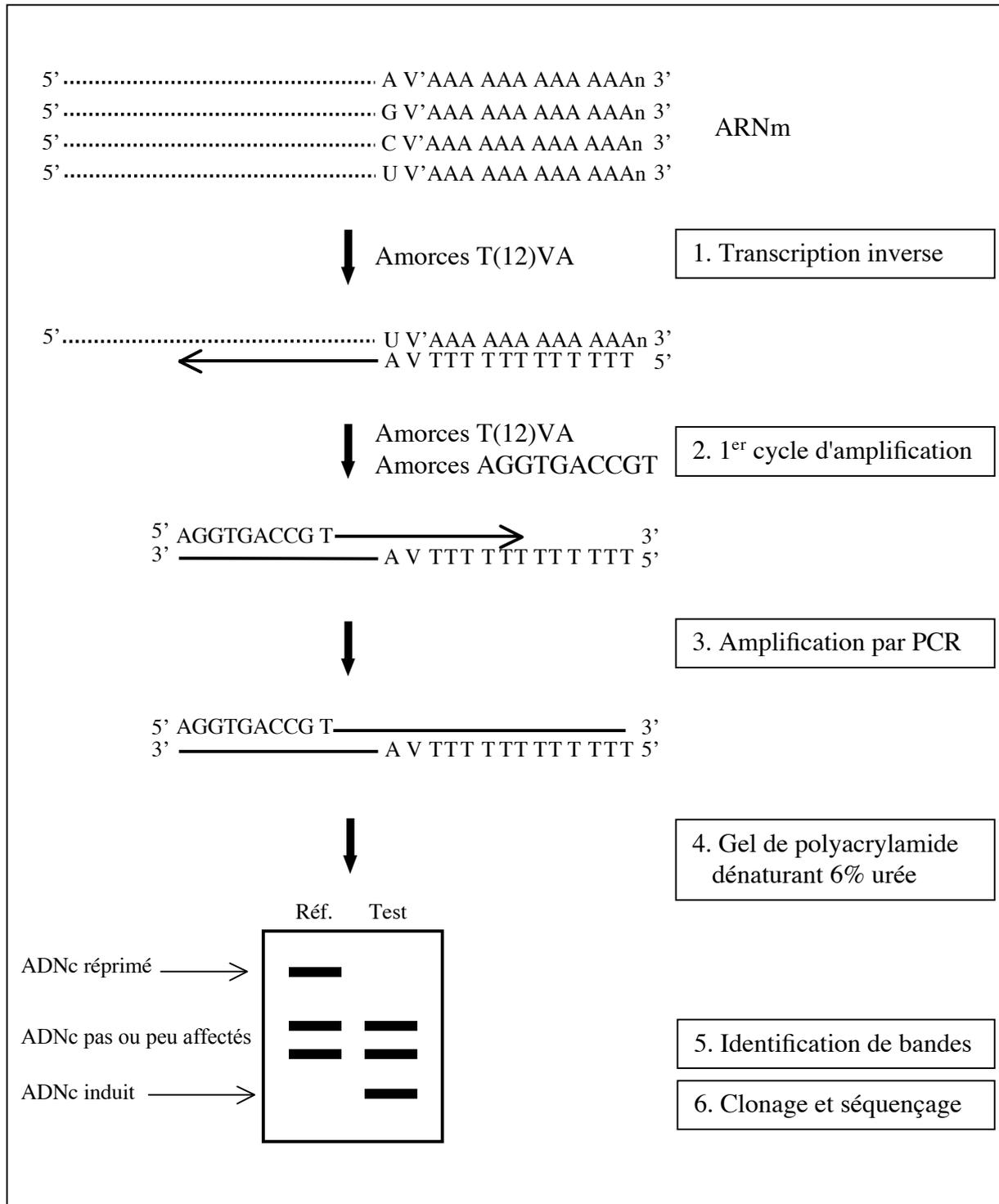


Figure I.6 : Représentation schématique de la méthode DDRT-PCR ou "RNA Differential Display" (Liang and Pardee, 1992 ; Liang *et al.*, 1995). Dans cet exemple, les amorces T12VA (V une base dégénérée A, G ou C) s'hybrident aux ARN messagers possédant la séquence 3' terminale complémentaire UV'(A)n et permettent leur copie en ADNc par une réaction de transcription inverse. Les ADNc servent de matrices pour amplifier des fragments de tailles variables à l'aide des amorces T12VA et des amorces O3 (5'-AGGTGACCGT-3'). Les fragments PCR sont analysés sur gel de polyacrylamide dénaturant 6%, et les profils de bandes obtenus à partir de plusieurs échantillons (Réf. et Test) sont comparés. Les fragments montrant une expression stable (ADNc pas ou peu affectés) servent à évaluer la reproductibilité de l'expérience. Les fragments montrant une expression différentielle (ADNc réprimés ou induits) sont sélectionnés, découpés, réamplifiés, clonés et séquencés.

d'identifier rapidement de courtes séquences (200 à 400 pb) différentiellement exprimées qui peuvent renseigner sur la fonction du gène ciblé après interrogation des banques de données. Ces techniques présentent toutes l'énorme avantage de pouvoir caractériser des gènes sans aucune connaissance préalable des séquences génomiques ou EST encore indisponibles pour certaines espèces végétales, contrairement aux techniques SAGE ou "microarray".

Le principe du "RNA differential display" (Liang *et al.*, 1995), schématisé sur la figure **I.6**, repose sur l'analyse détaillée de fragments d'amplification obtenus à partir d'ADNc issus des ARN messagers de cellules ou tissus à comparer. Quatre réactions indépendantes de transcription inverse permettent de copier l'ensemble des ARNm grâce à l'utilisation de quatre amorces $T_{12}VN$, où V est une base dégénérée (A, G ou C), et N représente une base A, T, G ou C. Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par cinq réactions PCR radioactives différentes en combinant à l'amorce $T_{12}VN$ utilisée, une des cinq amorces décimériques N_{10} nommées O1 à O5 de séquence aléatoire connue. Les fragments PCR sont finalement séparés sur gel de polyacrylamide 6% dénaturant, et les ADNc d'expression différentielle sont sélectionnés et clonés pour être ensuite caractérisés par séquençage. L'utilisation de telles amorces de spécificité assez large permet d'amplifier un nombre limité d'ADNc, mais les vingt combinaisons d'amorces (4 amorces $T_{12}VN$ et 5 amorces N_{10}) permettent d'explorer une grande partie du transcriptome pour isoler le maximum d'ADNc dont l'expression est différentielle. Enfin, cette technique permet d'obtenir des fragments de 200 à 400 pb, assez courts pour pouvoir être séparés sur gel, mais suffisamment longs pour étudier les gènes.

1.5.2. Utilisation

La méthode DDRT-PCR a été très utilisée ces dix dernières années et a montré de multiples applications chez les micro-organismes, les animaux et les végétaux. Elle est simple, facile, rapide à mettre en œuvre, et ne demande aucun matériel coûteux. De plus, elle nécessite peu d'ARN (0,2 à 1 µg par échantillon), et permet la comparaison de nombreux profils d'expression des gènes dans différents tissus et/ou dans différentes conditions. Elle est très sensible, et permet ainsi l'identification de transcrits faiblement représentés.

Cette technique montre cependant des problèmes majeurs (Matz and Lukyanov, 1998). En effet, si elle permet, par le biais de l'amplification par PCR, de détecter des différences d'expression faibles, celles-ci sont parfois difficiles à détecter et à confirmer par d'autres méthodes classiques d'hybridation moléculaire du type Northern blot. De plus, malgré la visualisation sur gel de plusieurs répétitions d'expériences effectuées sur les mêmes

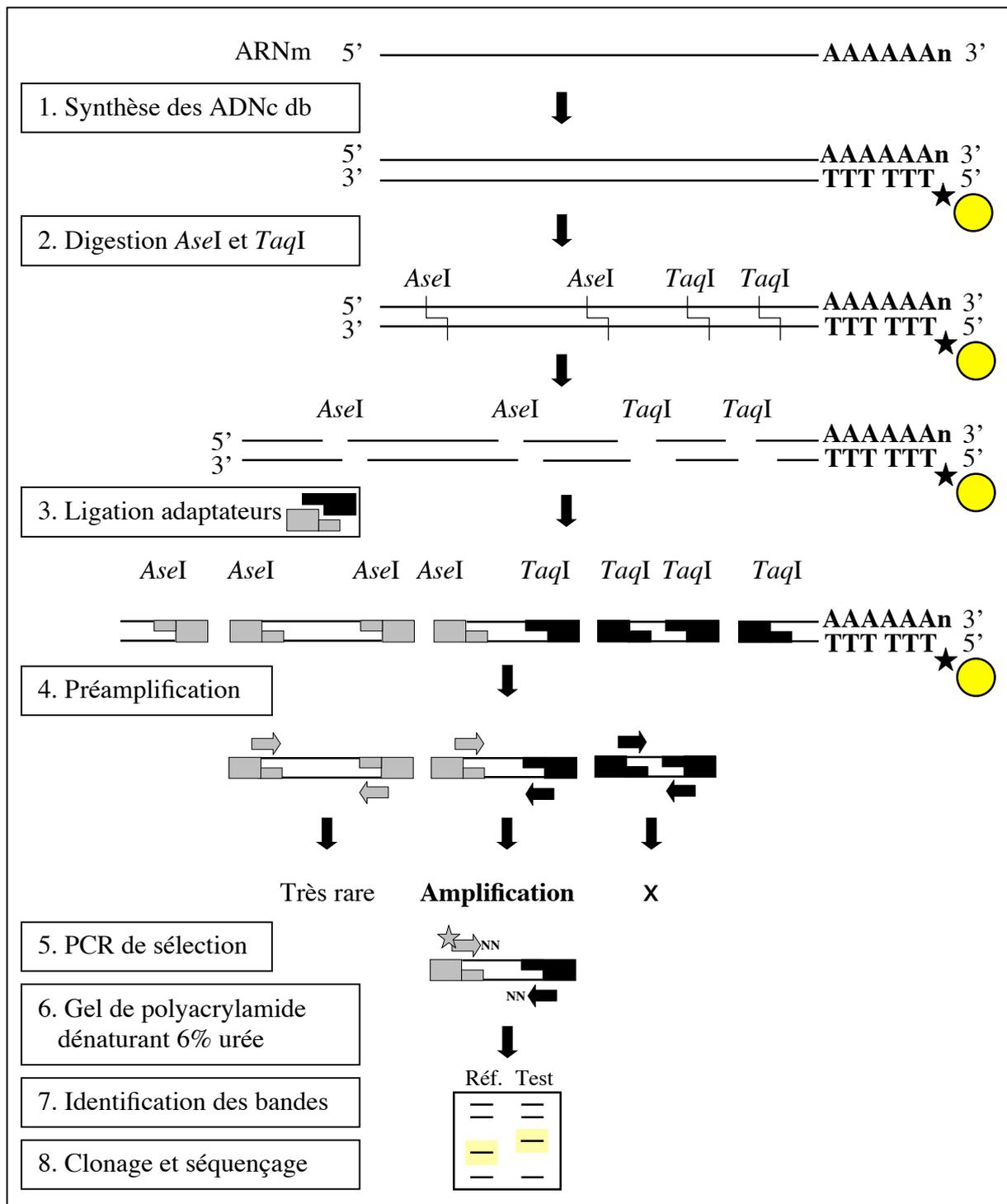


Figure I.7 : Représentation schématique de la méthode cDNA-AFLP (Bachem *et al.*, 1996, 1998). Les ADNc sont synthétisés grâce à l'utilisation d'amorces oligo(dT) biotinylées (étoile noire) fixées à des billes paramagnétiques de streptavidine (cercles jaunes), puis digérés par les enzymes *AseI* (sites de restriction de 6-pb) et *TaqI* (sites de restriction de 4-pb). Les rectangles gris correspondent aux adaptateurs ajoutés aux extrémités cohésives générées par l'enzyme *AseI*, et les rectangles noirs représentent les adaptateurs ajoutés aux extrémités générées par l'enzyme *TaqI*. Une PCR de préamplification avec des amorces spécifiques de ces adaptateurs permet d'amplifier les fragments ADNc. Les molécules comportant un site *AseI* à chaque extrémité sont rares et sont très peu amplifiées. Les molécules contenant un site *TaqI* à chaque extrémité sont fréquentes mais elles forment des structures en "poêles à frire" qui empêchent toute amplification. Seules les molécules contenant un site de restriction différent à chaque extrémité sont amplifiées de manière exponentielle. Une seconde PCR menée avec des amorces spécifiques de chaque adaptateur mais possédant deux bases supplémentaires en 3', dont l'une est radiomarquée en 5' (étoile grise), permet d'amplifier une partie des fragments d'ADNc qui sont analysés sur gel de polyacrylamide dénaturant 6%. D'après Bachem *et al.*, 1998.

échantillons, de nombreux faux-positifs restent présents parmi les fragments isolés (pouvant représenter 50 % ou plus des séquences). Cette faible reproductibilité réside essentiellement dans l'utilisation d'amorces de séquence courte et arbitraire qui donne la possibilité d'amplifier de manière aléatoire un certain nombre de fragments par PCR dans des conditions de basse stringence. De telles conditions rendent l'amplification peu sélective et sensible aux très faibles variations de température pouvant varier d'un tube à l'autre, ou aux très faibles différences de concentrations initiales en ARN variant d'un échantillon à l'autre, générant ainsi des fausses bandes différentielles relatives aux conditions expérimentales. Enfin, ces faux-positifs peuvent également correspondre à des séquences contaminantes de même taille que les bandes différentielles visualisées sur gel ou de taille différente mais très proche qui sont ainsi purifiées, amplifiées et clonées de la même façon que le fragment d'intérêt. L'utilisation d'amorces plus longues (20 bases) et l'augmentation des températures d'hybridation des dernières étapes d'amplification permettent d'améliorer la reproductibilité de cette technique (Matz and Lukyanov, 1998).

1.6. La méthode "cDNA-amplified fragment length polymorphism "

1.6.1. Principe

Pour contourner les problèmes associés à la technique DDRT-PCR, celle dite "cDNA-amplified fragment length polymorphism" (cDNA-AFLP) a été développée à partir de la technique AFLP utilisée au départ pour morceler les génomes en divers fragments identifiables sur gel et produire des profils de bandes spécifiques de chaque espèce (Vos *et al.*, 1995). Cette méthode consiste à appliquer le protocole classique AFLP à des ADNc synthétisés à partir de différents échantillons d'ARNm (Bachem *et al.*, 1996).

Le principe de cette méthode est schématisé sur la figure I.7. Après capture des ARN poly(A)+ grâce à l'utilisation de billes magnétiques couplées à des amorces poly(dT)₂₅V biotinylés, les ADNc db sont synthétisés puis soumis à une digestion par deux enzymes de restriction. Une enzyme du type *AseI* reconnaît un site de restriction de 6 pb de manière à couper rarement les ADNc (environ 50 % des ADNc ayant un site *AseI*), et l'autre enzyme du type *TaqI* coupe plus fréquemment en reconnaissant les sites de restriction de 4 pb et générant ainsi des fragments de 100 à 1 000 pb (environ 90% des ADNc avec un site *AseI* ayant un site *TaqI*). Ces ADNc digérés sont purifiés et les extrémités 3' terminales éliminées sur la base de l'interaction streptavidine/biotine et élimination des billes paramagnétiques. Les fragments de restriction restants sont soumis à une ligation de deux adaptateurs différents, l'un spécifique

du site de restriction *AseI* (rectangles gris, figure I.7), l'autre spécifique du site *TaqI* (rectangles noirs, figure I.7). Ces fragments sont ensuite amplifiés partiellement par PCR en combinant des amorces spécifiques des deux adaptateurs dont l'une est radiomarquée en 5'. Ces deux amorces possèdent 2 nucléotides supplémentaires en 3' et permettent d'amplifier une sous-population d'ADNc dans des conditions de haute stringence. Les fragments PCR de tailles variables sont finalement séparés sur gel de polyacrylamide 6 % dénaturant, et les profils de bandes sont comparés. Les séquences différentielles sont sélectionnées et clonées pour être ensuite caractérisées par séquençage. Les amplifications successives utilisant les diverses amorces aux deux bases différentes en 3' (au total 256 combinaisons possibles) permettent ainsi d'explorer une bonne partie du transcriptome.

1.6.2. Utilisation

La méthode cDNA-AFLP a été initialement utilisée pour caractériser les gènes spécifiquement exprimés lors de la formation des tubercules de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* ; Bachem *et al.*, 1996). L'utilisation des enzymes *AseI* et *TaqI* et des amorces comportant deux bases sélectives en 3' (+2/+2) ont permis la comparaison simultanée de dix stades différents de formation du tubercule dans un modèle *in vitro* standardisé et synchronisé. Deux fragments TDF531 et TDF536 codant pour des lipoxygénases (*lox* gene) ont été identifiés. Une analyse par Northern blot a montré que ces gènes sont fortement induits dès le début du développement du tubercule (5^{ème} jour) jusqu'aux stades plus tardifs (15^{ème} jour). Ces gènes sont très spécifiques du tubercule puisqu'ils ne sont pas exprimés dans les feuilles, ni dans les pétioles, et seule une expression très faible est détectée dans les racines et les tiges (Bachem *et al.*, 1996). D'autres fragments d'ADNc ont également pu être caractérisés. On peut citer le fragment TDF441 codant pour un facteur α -SNAP interagissant avec le complexe SNARE qui intervient dans le transport des vésicules probablement nécessaire pour le transport des nutriments vers les tubercules en pleine croissance (Bachem *et al.*, 2000), et le fragment TDF511 codant pour un gène de la famille des alcool deshydrogénases et qui pourrait avoir un effet régulateur indirect sur l'hormone gibbérelline (Bachem *et al.*, 2001). Dans ces deux derniers exemples, les auteurs ont choisi d'observer le phénotype de plantes transgéniques antisens pour étudier le rôle respectif de ces gènes.

La méthode cDNA-AFLP a ainsi trouvé de nombreuses autres applications en biologie végétale, tout en subissant quelques adaptations selon le modèle étudié. Par exemple, le protocole cDNA-AFLP a été appliqué en utilisant les enzymes *ApoI* et *MseI* et des amorces

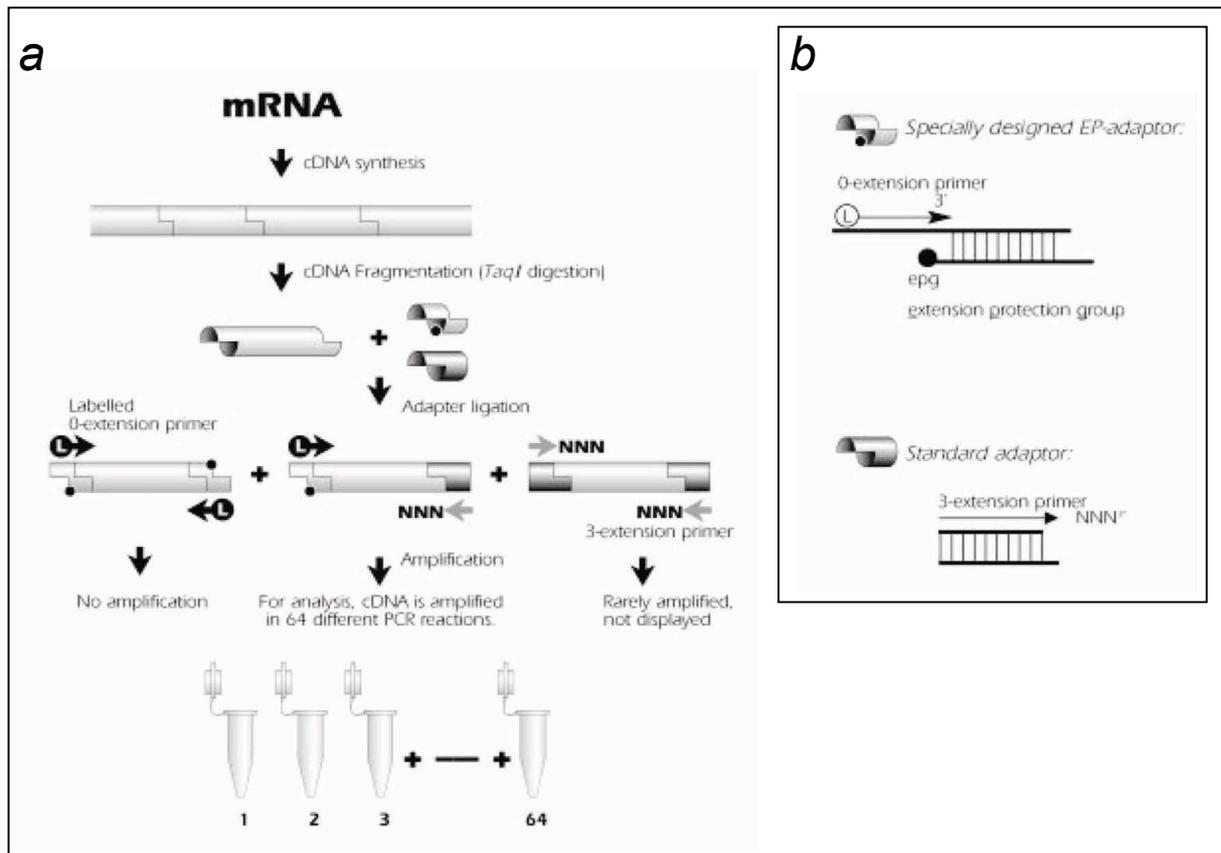


Figure I.8 : (a) Principe de la méthode RFDD-PCR ou "restriction fragment differential display PCR" (Gravesen *et al.*, 2000). Les ADNc synthétisés par transcription inverse sont digérés par l'enzyme *TaqI* (sites de restriction de 4-pb). Deux types d'adaptateurs sont ajoutés aux extrémités cohésives. Les rectangles gris foncé correspondent aux "Standard adaptor", et les rectangles gris clairs aux "EP-adaptor". Une partie des fragments d'ADNc est amplifiée par PCR en combinant des amorces radiomarquées "Labelled 0-extension primer" strictement spécifiques des "EP-adaptor" et des amorces "3-extension primer" spécifiques des "Standard adaptor" contenant trois bases supplémentaires de sélection. Les fragments possédant deux "EP-adaptor" ne peuvent pas être amplifiés, et les fragments comportant deux "Standard adaptor" sont très rarement ciblés. Seuls les fragments possédant un adaptateur différent à chaque extrémité peuvent être amplifiés de manière exponentielle et visualisés sur gel de polyacrylamide dénaturant 6%. Plusieurs réactions PCR indépendantes (1 à 64) combinant les amorces "0-extension primer" à différentes amorces "3-extension primer" permettent d'explorer une grande partie du transcriptome. (b) Représentation schématique des deux types d'adaptateurs "Standard adaptor" et "EP-adaptor". Le point noir représente le ddC appelé epg (extension protection group) présent sur l'extrémité 3' du brin inférieur des "EP-adaptor". La présence de ce didésoxynucléotide empêche l'élongation complète du premier brin d'ADN synthétisé par PCR. D'après displayPROFILE™ Kit Restriction Fragment Differential Display Protocol (Catalog # : 602-100 Qiagen).

comportant deux bases sélectives en 3' (+2/+2) pour rechercher les gènes induits lors des réactions de défense générées dans des cellules de tabac suite à l'interaction Avr9/Cf-9. Sur 30 000 fragments générés, 290 ont montré une expression différentielle. Parmi les 260 séquences identifiées, seulement 37 ADNc surexprimés et 5 ADNc réprimés ont pu être alignés avec les séquences disponibles dans les banques de données, révélant des fonctions de transduction du signal ou d'activation de la transcription (Durrant *et al.*, 2000). Un autre exemple concerne la recherche de gènes impliqués dans la maturation des fruits de la framboise (*Rubus idaeus*). Les auteurs ont alors utilisé les enzymes *EcoRI* et *MseI* et des amorces comportant une ou deux bases sélectives en 3' (+1/+2). La comparaison de quatre stades de maturation (du fruit vert au fruit mûr) a permis la caractérisation de gènes codant pour des protéines de fonctions diverses, comme une protéine 14-3-3, une "DNA helicase", une "DNA méthyltransferase", et des hydrolases de la paroi cellulaire (Jones *et al.*, 2000).

1.7. La méthode "restriction fragment differential display PCR" (RFDD-PCR)

Lors des analyses par cDNA-AFLP, l'utilisation de deux enzymes de restriction telles que *AseI* et *TaqI* ne permet de cibler que la moitié des transcrits existants dans les échantillons (Bachem *et al.*, 1996). Pour obtenir des profils de bandes plus complets, une variante de cette technique a été développée (Habu *et al.* 1997). La méthode consiste à digérer les ADNc db par une seule enzyme de restriction coupant fréquemment comme *TaqI* pour générer un plus grand nombre de fragments plus courts (de 200 à 400 pb). Ces fragments sont soumis à une ligation avec un seul type d'adaptateurs, puis sont amplifiés partiellement par PCR en combinant une amorce radiomarquée en 5' possédant 3 nucléotides de sélection en 3' et une autre amorce possédant un seul nucléotide de sélection en 3'. Des amplifications successives utilisant les diverses amorces aux trois bases différentes à l'extrémité 3' (au total 96 combinaisons possibles) ont permis d'analyser 5 000 bandes au total, chaque amplification générant environ 50 bandes (Habu *et al.* 1997). Après comparaison des profils de bandes obtenus à partir de fleurs en boutons de lignées d'*Ipomoea purpurea* produisant des fleurs blanches ou des fleurs rouges, les auteurs ont pu caractériser deux fragments d'ADNc surexprimés dans les fleurs colorées correspondant au gène de la chalcone synthase.

La technique "restriction fragment differential display PCR" (RFDD-PCR) disponible sous forme de kit commercialisé par Qbiogen appelé displayPROFILE™ Expression Profiling Kit, se rapproche de cette variante cDNA-AFLP en utilisant une seule enzyme de restriction *TaqI*. Les étapes suivantes, schématisées sur la figure **I.8a**, diffèrent légèrement (Gravesen *et*

al., 2000). Le principe repose sur la ligation de manière aléatoire de deux sortes d'adaptateurs, un adaptateur standard (rectangles sombres, figure **I.8a**) et un adaptateur EP (EP pour "Extension Protection group" ; rectangles clairs portant un point noir, figure **I.8a**). La présence du didesoxynucléotide ddC à l'extrémité 3' du brin inférieur, appelé "Extension Protection group" (figure **I.8b**), empêche l'élongation complète du premier brin d'ADN néosynthétisé lors de la première étape de PCR, privant l'amplification des fragments possédant aux deux extrémités un adaptateur EP. Les autres fragments d'ADNc sont donc amplifiés en combinant une amorce "0-extension primer" radiomarquée en 5' strictement spécifique de l'adaptateur EP et une amorce "3-extension primer" spécifique de l'adaptateur standard et contenant trois bases supplémentaires sélectionnant une sous-population d'ADNc. Les fragments PCR de taille variable (200 à 400 pb) sont finalement séparés sur gel de polyacrylamide 6% dénaturant, et les ADNc d'expression différentielle sont sélectionnés et clonés pour être ensuite caractérisés par séquençage. Les amplifications successives utilisant les diverses amorces "3-extension primer" aux trois bases différentes en 3' (au total 64 combinaisons possibles) permettent ainsi d'explorer une grande partie du transcriptome et isoler le maximum d'ADNc montrant une expression différentielle.

2. Analyse comparative partielle entre le transcriptome de racines de betteraves infectées par le BNYVV et celui de betteraves saines

2.1. Reproduction en serre de l'infection naturelle de betteraves par le BNYVV

Pour mettre en évidence les gènes cellulaires dérégulés lors de la prolifération racinaire observée dans les betteraves rhizomaniées, nous avons choisi d'étudier le développement de la maladie dans des conditions reproduisant l'infection en champ. Le principe de cette étude réside dans l'obtention de betteraves infectées de manière naturelle, c'est-à-dire par les racines, en cultivant les plantes dans des bacs de terre contenant le vecteur *Polymyxa betae* virulifère.

Les premiers essais ont consisté à cultiver en serre plusieurs lots de betteraves sensibles (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) dans différents bacs de terreau additionné de 10% de terres de provenances diverses et contenant toutes le vecteur *P. betae*. Pour obtenir des racines de betteraves saines (S) contrôles, nous avons mêlé au terreau de la terre provenant d'Angleterre et contenant le vecteur *P. betae* avirulifère. Pour obtenir des racines rhizomaniées, nous avons additionné au terreau de la terre contenant le vecteur *P. betae*

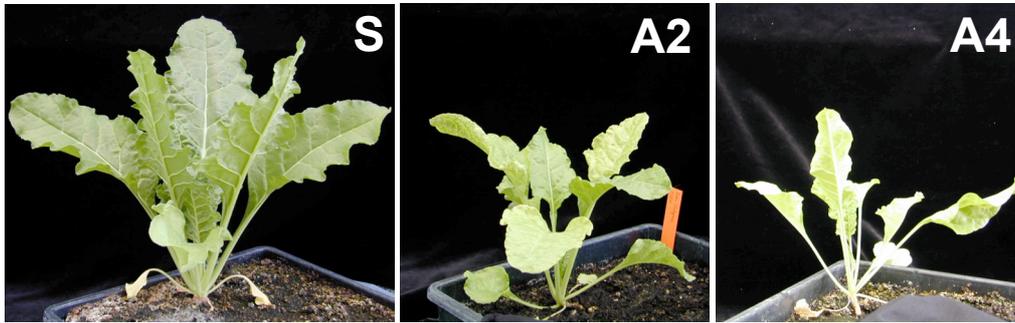


Figure I.9 : Aspect général des betteraves sucrières (*Beta vulgaris*) saines (S) ou atteintes de rhizomanie (A2 et A4) après deux mois de croissance en serre. Les plantes saines (S) cultivées en présence du vecteur *Polymyxa betae* avirulifère présentent une croissance normale, alors que les plantes infectées (A2 et A4) cultivées en présence du vecteur contenant le BNYVV ont une croissance fortement retardée.

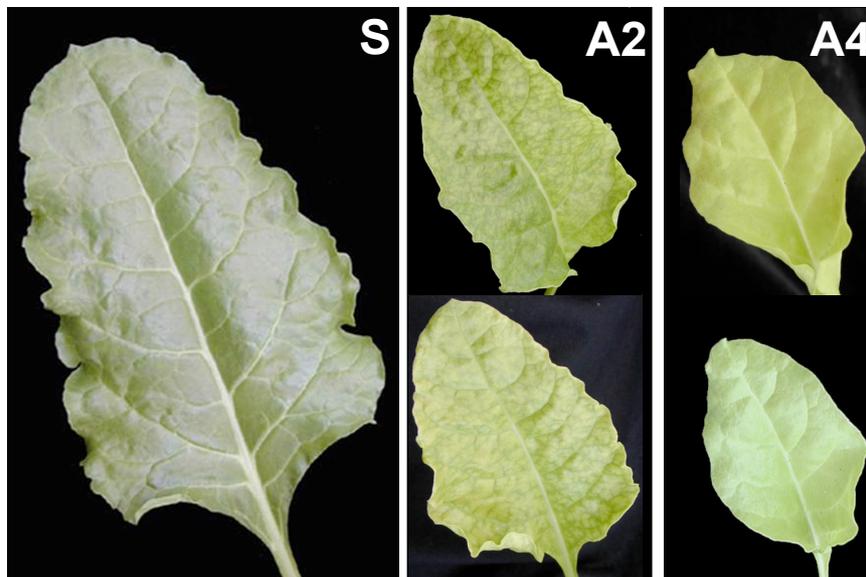


Figure I.10 : Comparaison des symptômes foliaires de betteraves sucrières (*Beta vulgaris*) saines (S) ou atteintes de rhizomanie (A2 et A4) après deux mois de croissance. Les plantes saines (S) cultivées en présence du vecteur *Polymyxa betae* avirulifère possèdent de grandes feuilles d'un vert intense. A l'inverse, les plantes infectées (A2 et A4) cultivées en présence du vecteur virulifère possèdent des feuilles plus petites qui présentent de fortes chloroses : des marbrures pour les plantes A2, ou une couleur vert pâle pour les plantes A4.

virulifère provenant de quatre parcelles françaises différentes infestées par la maladie et recensées par l'ITB (Institut Technique de la Betterave). Les betteraves ont été cultivées pendant deux mois dans ces quatre lots de terres infestées dénommées A1, A2, A3 et A4. Les betteraves cultivées dans les bacs contenant les terres A1 ou A3 ont présenté une nécrose du pied très importante provoquant la mort ou un fort retard de croissance à des stades très précoces, probablement en raison de la présence d'un autre pathogène (bactérie ou champignon) non caractérisé. Les terres A1 et A3 ont donc été abandonnées par la suite.

Les betteraves cultivées dans les bacs contenant les terres A2 (Amifontaine - Aisne) et A4 (Yèvre-la-Ville - Loiret) ont pu atteindre le stade de 6 à 8 feuilles tout en présentant les symptômes foliaires et racinaires caractéristiques de la maladie. Les plantes témoins S cultivées en présence du *P. betae* avirulifère, indemnes de toute infection par le BNYVV, présentent une croissance normale (S, figure **I.9**) et comportent de grandes feuilles de couleur vert foncé (S, figure **I.10**). Au contraire, les plantes cultivées dans les bacs A2 et A4 montrent un nanisme général sévère (plus de la moitié de la taille normale ; A2 et A4, figure **I.9**), avec des feuilles plus petites, moins vigoureuses, de couleur vert pâle pour les plantes A4 (A4, figure **I.10**) ou présentant de fortes chloroses ("marbrures") pour les plantes A2 (A2, figure **I.10**). Ces symptômes traduisent en partie une mauvaise alimentation en eau et en nutriments caractéristique d'une infection par le BNYVV à un stade de croissance très précoce des betteraves (dès la germination des graines). Les plantes témoins S présentent un système racinaire bien structuré (S, figure **I.11**), comportant une racine primaire déjà bien différenciée en pivot (I), prolongée en racines secondaires robustes (II) et se terminant par de nombreuses radicules blanches et rigides (III). La croissance des plantes en milieu confiné provoque une croissance du pivot limitée, favorisant le développement des racines inférieures, contrairement à la situation observée en champ. Par comparaison, les plantes infectées A4 (A4, figure **I.11**) possèdent une racine primaire complètement atrophiée, avec une inhibition de la croissance en pivot (I'), se terminant directement en un chevelu racinaire dense, non structuré, et composé de radicules caractéristiques de couleur "poivre et sel" très friables (III'). Des symptômes racinaires identiques ont été observés pour les plantes A2 (non montré). Ces plantes ont été choisies comme modèle d'étude pour rechercher les gènes exprimés dans les racines suite à l'infection naturelle par le virus. Ainsi, les racines des plantes S, A2 et A4 ont été lavées, et les ARN totaux extraits par kit RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN®) en incluant une étape d'incubation à la DNase I recommandée pour les analyses par RT-PCR.

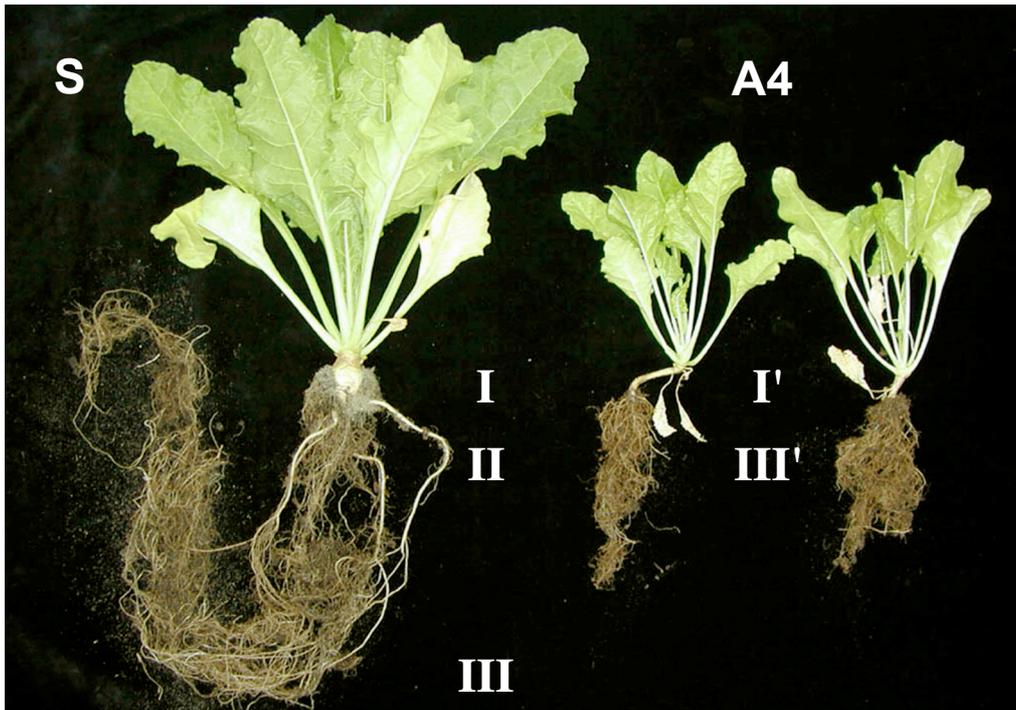


Figure I.11 : Comparaison du système racinaire des betteraves sucrières (*Beta vulgaris*) saines (S) ou atteintes de rhizomanie (A4) après deux mois de croissance. Les plantes saines cultivées en présence du vecteur *Polymyxa betae* avirulifère présentent une croissance ordonnée des racines avec une racine primaire formant un début de pivot (I) et des racines secondaires charnues (II) se terminant par des radicelles blanches (III). Les plantes infectées (A4) cultivées en présence du vecteur virulifère montrent les signes caractéristiques de rhizomanie : une racine primaire atrophiée (I') et des racines secondaires inexistantes remplacées par un amas de radicelles "poivre et sel" très friables (III').

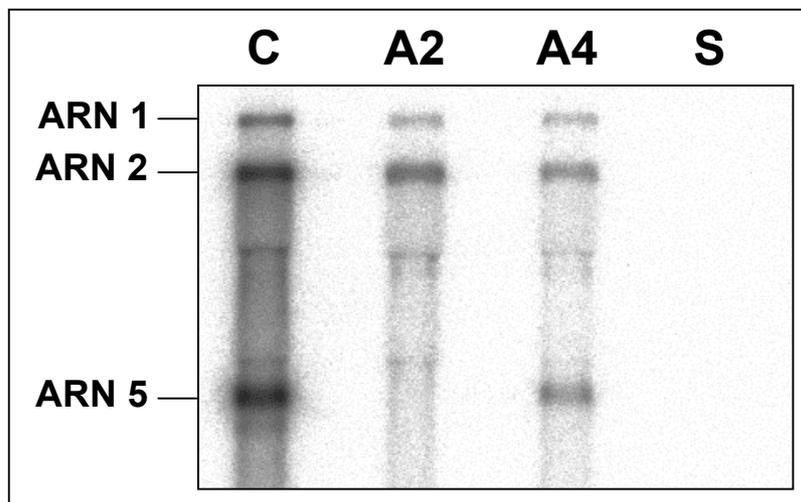


Figure I.12 : Détection par Northern blot des ARN 1, 2 et 5 du BNYVV dans les racines de betteraves cultivées dans les terres S, A2 et A4. Les mêmes quantités d'ARN totaux (7 µg) de racines de betteraves saines (S) ou de betteraves rhizomaniées (A2 et A4) sont déposées sur gel et analysées par hybridation moléculaire. Les ARN viraux sont révélés par des sondes ARN synthétisées *in vitro* et complémentaires à l'extrémité 3' de l'ARN 1, à une séquence interne de l'ARN 2, ou à la séquence interne de l'ARN 5. La piste C (contrôle virus) correspond à la totalité des ARN totaux extraits à partir d'une lésion locale obtenue sur feuille de *Chenopodium quinoa* inoculée par un isolat de BNYVV témoin provenant de Pithiviers (Loiret) et contenant l'ARN 5.

Avant toute analyse différentielle de gènes, et pour s'assurer que les racines des lots de betteraves A2 et A4 étaient bien infectées par le BNYVV, nous avons recherché par Northern blot la présence des ARN viraux 1, 2 et 5 parmi les ARN totaux des racines. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure **I.12**. Si les plantes témoins (piste S) ne présentent aucune trace d'ARN du BNYVV, les ARN totaux des racines des plantes A2 et A4 renferment des ARN viraux (piste A2 et A4) en quantité équivalente et de taille comparable à celle des ARN du BNYVV du contrôle (piste C) constitué d'ARN totaux de feuilles infectées de *Chenopodium quinoa*. Cette analyse confirme la nature différente des isolats viraux présents dans les terres A2 et A4. En effet, l'isolat provenant de la terre A4 possède en plus des quatre ARN génomiques, l'ARN 5, absent de l'isolat de la terre A2. Après caractérisation moléculaire, nous avons retrouvé un isolat B dans la terre A2 et un isolat P dans la terre A4 (Schirmer *et al.*, 2005). Les deux lots de plantes A2 et A4 infectées par deux isolats viraux distincts, présentent des symptômes racinaires identiques de rhizomanie. Ils constituent ainsi un bon modèle d'étude pour rechercher les gènes induits ou réprimés dans ces racines infectées.

2.2. Recherche de gènes induits ou réprimés par DDRT-PCR dans les racines de betteraves infectées par le BNYVV

Nous avons initié la recherche des gènes induits ou réprimés qui pourraient être responsables des symptômes observés après deux mois de culture et d'infection par la technique "differential display reverse transcription PCR" (DDRT-PCR). Cette technique a été choisie car aucune banque d'EST n'est disponible au laboratoire et en raison de sa facilité et rapidité de mise en œuvre. De plus, il faut rappeler qu'elle présente l'énorme avantage de pouvoir comparer plusieurs échantillons à la fois. Nous l'avons appliqué aux échantillons d'ARN provenant de racines de plantes saines (S) et infectées (A2 et A4).

Des expériences de mise au point se sont révélées nécessaires pour optimiser la technique, et obtenir des profils de bandes corrects. Nous avons vérifié sa fiabilité, sa reproductibilité, et optimisé les conditions de réaction, en utilisant du [α -³³P] dCTP moins énergétique que le [α -³²P] dCTP, le ³³P étant un isotope radioactif plus approprié pour obtenir des profils de bandes résolutifs (Liang and Pardee, 1995).

Une première analyse partielle du transcriptome a été entreprise à partir d'ARN totaux de racines de betteraves saines S et infectées A2 et A4. Les ARN totaux de racines ont été copiés en ADNc par transcription inverse en utilisant les amorces T₁₂VA puis T₁₂VT. Ces

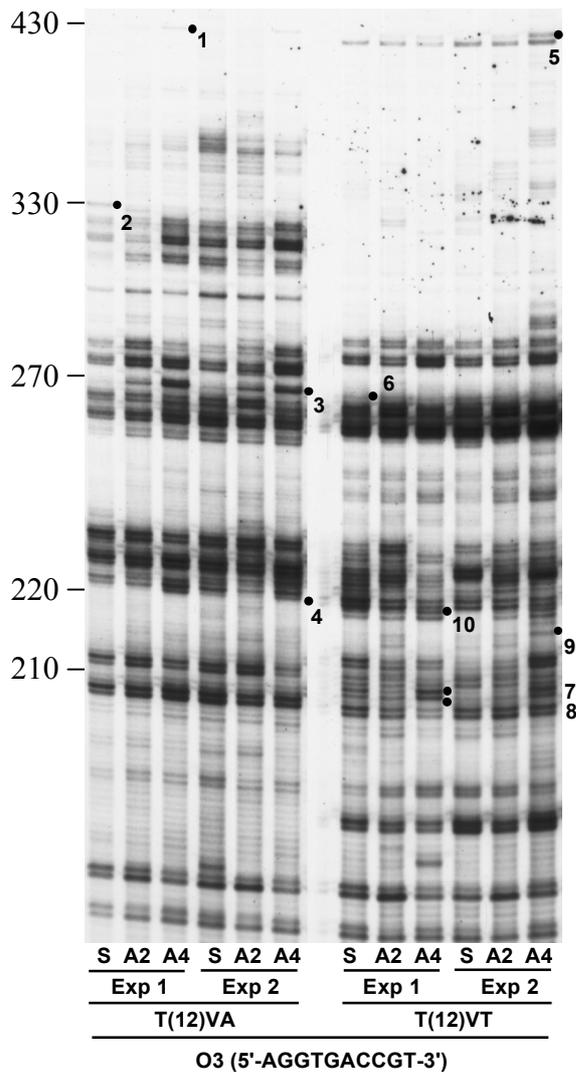


Figure I.13 : Analyse des différences d'expression par DDRT-PCR entre les racines de betteraves saines (S) et les racines de betteraves infectées par l'isolat viral B à 4 ARN (A2) ou un isolat viral P à 5 ARN (A4). Les ADNc sont synthétisés à partir des ARN totaux de racines par des réactions indépendantes de transcription inverse réalisées à l'aide d'amorces T(12)VA ou T(12)VT (V correspond aux nucléotides A, G ou C). Les amplifications d'ADNc sont réalisées par PCR en utilisant les amorces O3 (5'-AGGTGACCGT-3') combinées aux amorces T(12)VA (partie gauche) ou T(12)VT (partie droite). Les fragments radiomarqués par l'incorporation de [α - 33 P] dCTP lors des réactions PCR sont visualisés sur gel de polyacrylamide dénaturant 6%. Chaque expérience PCR est effectuée en double (Exp1 et Exp2) sur les mêmes échantillons d'ARN totaux pour vérifier la reproductibilité de la technique. Les bandes différentielles marquées par un point et possédant un numéro identifiant correspondent aux séquences sélectionnées et caractérisées après réamplification, purification, clonage et séquençage de l'ADNc. La taille des fragments (en pb) est précisée à gauche du gel.

N°	S	A2	A4	Séquence	Taille	Fréquence	BLAST	Identité de séquence	e-value
1			X	AO3V1	430 pb	3 sur 4	TBLASTN BLASTX	Oryza sativa genomic DNA, chromosome 10 Arabidopsis th.genomic DNA, chromosome 3	0,006 9,00E-38
2	X			AO3S1	??	7 sur 7	BLASTX	No significant similarity	
3		X	XX	AO3V2	??	6 sur 6	BLASTX	No significant similarity	
4			X	AO3V3	226 pb	4 sur 4	TBLASTN BLASTX	putative 60s L37a ribosomal protein Arabidopsis thaliana BAC chromosome 3	5,1 0,7
5		X	XX	TO3V1	428 pb	2 sur 4 2 sur 4	TBLASTN BLASTX TBLASTN	Arabidopsis thaliana BAC chromosome 5 peptidylpropyl isomerase like protein Oryza sativa genomic DNA, chromosome 4	0,12 0,012 4
6	X			TO3S1	271 pb	3 sur 3		idem AO3V3	
7	X	X	XX	TO3V2	209 pb	4 sur 4		idem AO3V3	
8	X	X	XX	TO3V3	206 pb	3 sur 3		idem AO3V3	
9	X	X		TO3V4	215 pb	2 sur 2		idem AO3V3	
10			X	TO3V5	223 pb	3 sur 3		idem AO3V3	

Tableau I.1 : Récapitulatif des identités de séquence des fragments ADNc caractérisés par DDRT-PCR et présentant une expression différentielle. Le numéro figurant dans la première colonne correspond au numéro identifiant les bandes sur gel DDRT-PCR (figure I.13). Les colonnes suivantes récapitulent le profil d'expression de chaque bande : expression dans les plantes saines (S) ou infectées (A2 et A4). Les séquences (colonne Séquence) ont été nommées en fonction de la combinaison d'amorces utilisée pour leur amplification et de leur profil d'expression (voir §2.2.). Après séquençage de six clones recombinants pour chaque ADNc, les séquences ont été retrouvées avec une fréquence variable (colonne Fréquence). Les identités de séquence (colonne Identité de séquence) ont été obtenues après alignement par BLASTX ou TBLASTN (colonne BLAST) avec les séquences disponibles dans les banques de données sur le serveur du NCBI (National Center for Biotechnology Information ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

ADNc ont ensuite servi de matrice pour effectuer une amplification par PCR en présence de [α - 33 P] dCTP, en utilisant les couples d'amorces T₁₂VA/décamère O3 et T₁₂VT/décamère O3. Les sous-populations de séquences ADNc ainsi amplifiées ont été ensuite séparées sur gel de polyacrylamide 6 % dénaturant. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure **I.13**. Nous avons pu constater que les intensités des bandes communes à tous les échantillons amplifiés par le même couple d'amorce sont très homogènes (expériences exp1 et exp2), montrant la fiabilité de la technique. L'analyse détaillée de ces profils de migration a révélé l'existence de bandes différentielles dont certaines sont identifiées sur la figure **I.13**. Chaque séquence a été nommée en fonction de la combinaison d'amorces utilisée pour son amplification (A pour l'amorce T₁₂VA, T pour l'amorce T₁₂VT, O3 pour l'amorce décamerique O3) et en fonction de son profil d'expression (S lorsque la séquence est retrouvée uniquement dans les plantes saines, et V lorsque la séquence est exprimée dans les plantes virosées). On peut citer comme exemple la séquence AO3S1 représentée uniquement dans les plantes saines (numéro 2, figure **I.13**), la séquence AO3V2 retrouvée dans les deux lots de plantes infectées A2 et A4 (numéro 3, figure **I.13**), ou les séquences AO3V1 (numéro 1, figure **I.13**) et AO3V3 (numéro 4, figure **I.13**) retrouvées uniquement dans le lot de plantes A4 infectées par l'isolat viral P.

Dix bandes ont été sélectionnées à l'issue de cette première analyse (tableau **I.1**), et ont permis d'obtenir, après élution, purification et réamplification, dix produits PCR, de 200 pb à 430 pb, qui ont été clonés dans le vecteur pGEM[®]-T puis séquencés. Le séquençage d'au moins six clones bactériens recombinants nous a permis d'obtenir des séquences uniques pour sept constructions plasmidiques (AO3S1, AO3V2, AO3V3, TO3V2, TO3V3, TO3V4, et TO3V5). Par contre, nous avons isolé deux types de séquences distinctes pour les trois autres constructions (AO3V1, TO3V1 et TO3S1 ; présentés dans le tableau **I.1** uniquement pour TO3V1), illustrant le premier inconvénient de la technique DDRT-PCR, à savoir l'existence de plusieurs séquences de même taille dans une seule bande du gel (Liang and Pardee, 1995 ; Liang *et al.*, 1995). Dans une telle situation, il est difficile de déterminer la nature des séquences ayant une expression différentielle réelle de celles contaminantes et correspondant à des faux-positifs. Le tableau **I.1** résume les identités de séquences obtenues pour chacun de ces ADNc après alignement avec les séquences disponibles dans les banques de données sur le serveur du NCBI (National Center for Biotechnology Information ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), en utilisant l'algorithme BLASTX sur les séquences nucléotidiques brutes, ou l'algorithme TBLASTN sur les séquences préalablement traduites et qui possèdent un codon stop marquant la fin d'une ORF. Ce tableau fait apparaître plusieurs

éléments qui illustrent le second inconvénient de la technique DDRT-PCR. D'une part, les séquences nommées TO3V2, TO3V3, TO3V4 et TO3V5 se sont révélées strictement identiques entre elles et identiques à la séquence AO3V3. Ainsi, des ADNc de taille différente et amplifiées par des couples d'amorces différents peuvent correspondre à une seule et même séquence redondante, probablement en raison des conditions PCR relativement peu stringentes (avec une étape d'hybridation des amorces à 37°C). La redondance de ces ADNc provoque une perte de temps et de moyens considérable, puisque de nombreux plasmides recombinants sont séquencés pour identifier au final une seule séquence d'intérêt. D'autre part, dans la majorité des cas, les alignements de séquences ne permettent pas d'assigner une fonction putative aux ADNc détectés, car ils correspondent à des séquences de clones BAC ou des séquences génomiques d'*Arabidopsis thaliana* ou *Oriza sativa* sans autres indications de gènes ou de fonctions caractérisés (par exemple AO3V1, tableau **I.1**). De plus, les valeurs "e-value" trop élevées (de 0,01 à 4) de ces alignements ne permettent pas de prendre en considération la fonction putative du gène prédit (par exemple AO3V3 et TO3V1, tableau **I.1**). Ainsi, l'inconvénient majeur de la technique DDRT-PCR réside dans le fait que seules les extrémités 3' des ARNm sont amplifiées à partir de leur séquence polyA, générant des ADNc de 200 à 500 pb qui correspondent en grande partie à la séquence non codante des messagers, non informative sur *Beta vulgaris*.

2.3. Recherche de gènes induits ou réprimés par RFDD-PCR dans les racines de betteraves infectées par le BNYVV

Pour contrecarrer les difficultés rencontrées pour la caractérisation des séquences différentiellement exprimées par DDRT-PCR, nous avons opté pour une autre méthode d'analyse globale du transcriptome appelée "restriction fragment differential display PCR" (RFDD-PCR) disponible sous forme de kit appelé displayPROFILE™ Expression Profiling Kit (Qbiogen). Cette méthode très proche de la technique "cDNA amplified fragment length polymorphism" (cDNA-AFLP ; Bachem *et al.*, 1996) présente l'énorme avantage d'induire l'amplification d'ADNc correspondant à des parties internes des messagers, et ainsi permettre la caractérisation de séquences codantes (voir principe §1.7 et figure **I.8**). De plus, la mise en œuvre de cette technique, très proche de la méthode DDRT-PCR, a nécessité peu d'expériences de mise au point et a été utilisée rapidement pour poursuivre la caractérisation de gènes dans les betteraves rhizomaniées.

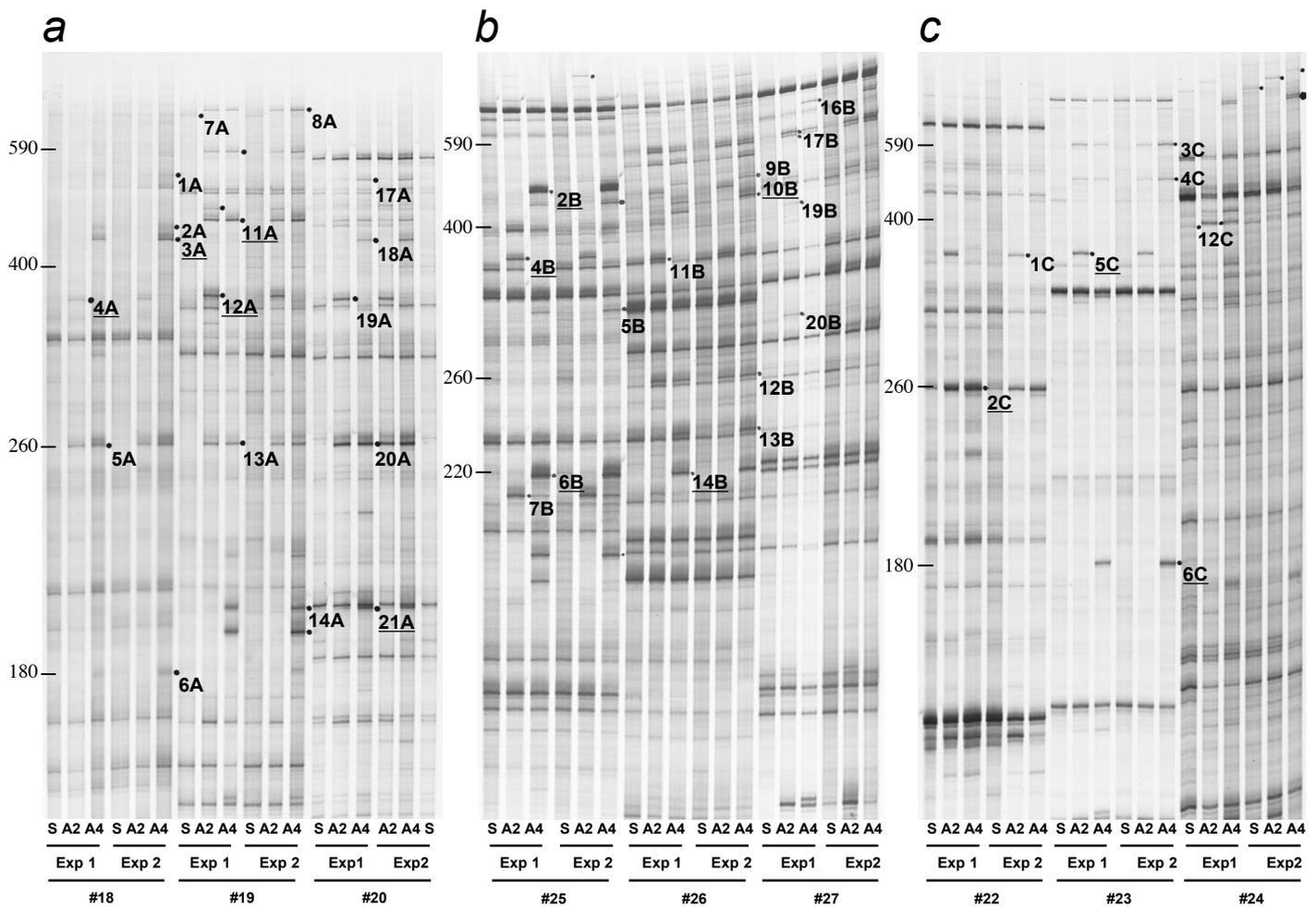


Figure I.14 : Analyse par RFDD-PCR des différences d'expression des messagers issus de racines de betteraves saines (S) et infectées par l'isolat viral B à 4 ARN (A2) ou l'isolat viral P à 5 ARN (A4). Les amplifications d'ADNc sont réalisées par PCR en combinant des amorces "0-extension Primer" radiomarquées au $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ en 5' et des amorces "displayPROBE" différentes pour chaque réaction PCR, notée ici #18 à #27. Chaque expérience est effectuée en double (Exp1 et Exp2) sur les mêmes échantillons d'ARN totaux pour vérifier la reproductibilité de la méthode. Les produits PCR ont été séparés sur plusieurs gels de polyacrylamide 6% dénaturants (a, b et c). Les bandes différentielles marquées par un point et possédant un numéro identifiant correspondent aux séquences sélectionnées et caractérisées après réamplification, purification, clonage et séquençage de l'ADNc. Les bandes désignées par un numéro souligné sont exclusivement d'origine virale (BNYVV). Les autres bandes possèdent des séquences d'intérêt caractérisées par alignement avec les séquences disponibles dans les banques de données. La taille des fragments (en pb) est précisée à gauche de chaque gel.

Ainsi, une nouvelle analyse partielle par RFDD-PCR a été effectuée à partir d'ARN totaux de racines de betteraves saines S et infectées A2 et A4. Trois gels de polyacrylamide 6 % dénaturants différents ont été nécessaires pour visualiser les profils de bandes obtenus par PCR en combinant à la même amorce "0-extension Primer" neuf amorces différentes "displayPROBE" notées #18 à #27 (figure **I.14**). Chaque expérience PCR a été effectuée en double sur les mêmes échantillons d'ARN totaux (Exp1 et Exp2, figure **I.14**). Les bandes communes à tous les échantillons amplifiés par le même couple d'amorce ont montré des intensités identiques, illustrant la reproductibilité de la technique (chacun des ensembles de 6 pistes représenté par Exp1 et Exp2, figure **I.14**). L'analyse plus détaillée des profils électrophorétiques a permis d'identifier 53 fragments d'expression différentielle, dont 51 sont visibles sur la figure **I.14** (bandes marquées par un point). Parmi ces 53 candidats, 13 n'ont pas pu être caractérisés, soit pour des problèmes de réamplification de l'ADNc, soit pour des problèmes de séquençage. Les 40 autres candidats annotés sur la figure **I.14** ont pu être caractérisés. Le tableau **I.2** résume leur provenance, leur taille et leurs caractéristiques. Deux candidats correspondent à des gènes exprimés uniquement dans les plantes saines (numéros 7A et 12C, figure **I.14** et tableau **I.2**), 14 candidats sont surexprimés dans les deux lots de plantes infectées A2 et A4 (numéros 1A, 5A, 8A, 11A, 13A, 17A, 20A, 22A, 7B, 12B, 17B, 2C, 3C et 4C), 9 proviennent exclusivement des plantes A2 (numéros 4A, 12A, 19A, 4B, 11B, 19B, 20B, 1C, 5C), et 15 exclusivement des plantes A4 (numéros 2A, 3A, 6A, 14A, 18A, 21A, 2B, 5B, 6B, 9B, 10B, 13B, 14B, 16B, 6C). Le séquençage d'au moins six clones bactériens de chaque construction plasmidique, nous a permis de constater que de nombreux candidats comportaient plusieurs séquences distinctes. Ces séquences ont été renommées (colonne Séquence, tableau **I.2**) et leur fréquence d'apparition reportée (colonne Fréquence, tableau **I.2**). Parfois, les problèmes rencontrés lors du séquençage de certains plasmides recombinants expliquent le faible nombre de séquences totales représentant un gène d'intérêt (colonne Fréquence, tableau **I.2**).

L'alignement des séquences ADNc obtenues avec celles disponibles dans les banques de données a permis de nous renseigner sur l'identité de séquence de chaque candidat (colonne TBLASTX, tableau **I.2**). A l'inverse de la méthode précédente, les alignements obtenus possèdent des valeurs "e-value" correctes (inférieures à 0,001) permettant de prendre en considération les résultats. Sur les 40 ADNc caractérisés, 14 correspondent à des séquences virales (cases grises, tableau **I.2** ; numéros 3A, 4A, 11A, 12A, 21A, 22A, 2B, 4B, 6B, 10B, 14B, 2C, 5C, et 6C), 15 correspondent à des séquences d'intérêt mêlées à des

N°	S	A2	A4	Séquence	Taille	Fréquence	TBLASTX	% identité	e-value
1A		X	X	18V11	583 pb	1 sur 3	bnyvv rna2		
				18V15	584 pb	1 sur 3	glyoxalase I, putative [Arabidopsis thaliana]	18/48 (37%)	6.0
2A			X	18V21	464 pb	1 sur 5	Spinacia oleracea cytosolic heat shock 70 protein (HSC70-1) gene	139/141 (98%)	5,00E-86
				18V25	455 pb	1 sur 5	Nicotiana tabacum mRNA for phospholipase D	60/67 (89%)	7,00E-33
3A			X	18V31	446 pb	4 sur 4	bnyvv rna5		
4A		X		18V41	365 pb	4 sur 4	bnyvv rna2		
5A		X	X	18V51	263 pb	3 sur 4	bnyvv rna2		
				18V56	262 pb	1 sur 4	Arabidopsis thaliana chromosome II glutathione S-transferase(GST16) mRNA	45/60 (75%)	3,00E-23
6A			X	18V61	185 pb	1 sur 4	Beta vulgaris subsp. vulgaris mitochondrial genomic DNA (NADH dehydrogenase subunit 5)	43/46 (93%)	4,00E-23
				18V62	181 pb	1 sur 4	Geobacillus stearothermophilus adhT gene for alcohol dehydrogenase,complete cds (Bacteria)	26/48 (54%)	1,00E-06
				18V63	181 pb	1 sur 4	Pseudomonas fluorescens Pf-5, complete genome	48/48 (100%)	3,00E-25
				18V66	109 pb	1 sur 4	bnyvv rna5		
7A	X			19S12	233 pb	1 sur 5	Orpinomyces sp. OUS1 partial 18S rRNA gene	37/50 (74%)	4,00E-19
				19S13	874 pb	4 sur 5	Glaucozystis nostochinearum 26S ribosomal RNA gene	132/160 (82%)	2,00E-106
11A		X	X	19V41	481 pb	2 sur 5	bnyvv rna2		
12A		X		19V52	372 pb	2 sur 3	bnyvv rna2		
13A		X	X	19V62	263 pb	2 sur 4	bnyvv rna2		
				19V65	262 pb	1 sur 4	Plantago major ubq1 gene for polyubiquitin	69/73 (94%)	1,00E-36
14A			X	19V72	196 pb	1 sur 4	Dechloromonas aromatica RCB, complete genome (Cytochrome B561, bacterial)	14/28 (50%)	0.13
				19V74	196 pb	1 sur 4	bnyvv rna1		
17A		X	X	20V12	83 pb	1 sur 3	bnyvv rna1		
				20V16	576 pb	1 sur 3	Rhizobium gallicum 23S ribosomal RNA gene	159/172 (92%)	2,00E-101
18A			X	20V21	442 pb	3 sur 4	Arabidopsis thaliana amino acid transporter 4, putative (AAP4) (At5g63850) mRNA, complete cds	105/127 (82%)	1,00E-66
				20V26	444 pb	1 sur 4	Oryza sativa genomic DNA, chromo12 (hypothetical protein, similar to H. pilory nifS like protein)	33/42 (78%)	5,00E-38
19A		X		20V31	369 pb	2 sur 4	bnyvv rna2		
				20V34	369 pb	1 sur 4	Arabidopsis thaliana mRNA for hypothetical protein	33/53 (62%)	2,00E-09
				20V36	369 pb	1 sur 4	Triticum aestivum plasma membrane H+-ATPase gene (bread wheat)	85/109 (77%)	7,00E-47
20A		X	X	20V41	260 pb	3 sur 4	bnyvv rna2		
				20V46	260 pb	1 sur 4	No significant similarity		
21A			X	20V53	196 pb	4 sur 4	bnyvv rna1		
22A		X	X	20V62	130 pb	4 sur 4	bnyvv rna1		
1C		X		22V11	368 pb	1 sur 2	bnyvv rna2		
				22V12	368 pb	1 sur 2	Unidentified eukaryote 18S ribosomal RNA	107/111 (96%)	5,00E-70
2C		X	X	22V21	262 pb	5 sur 5	bnyvv rna2		
3C		X	X	23V11	594 pb	1 sur 6	A. t. zinc finger (DHHC type) family protein / ankyrin repeat family protein (At5g20350) mRNA	138/172 (80%)	9,00E-90
				23V12	594 pb	2 sur 6	bnyvv rna2		
				23V16	584 pb	1 sur 6	Streptomyces sp. pfB34 16S ribosomal RNA gene	182/182 (100%)	3,00E-117
4C		X	X	23V21	489 pb	1 sur 6	Drosophila melanogaster CG11138-PB, isoform B (CG11138) mRNA	20/91 (21%)	0.76
				23V23	494 pb	3 sur 6	bnyvv rna1		
5C		X		23V31	371 pb	2 sur 2	bnyvv rna2		
6C			X	23V41	188 pb	2 sur 2	bnyvv rna2		
12C	X			24S21	406 pb	1 sur 6	Xanthorhiza simplicissima 26S ribosomal RNA gene	43/45 (95%)	1,00E-25
				24S22	406 pb	3 sur 6	Beta vulgaris BvMS1 mRNA for methionine synthase	72/77 (93%)	3,00E-78
				24S23	406 pb	1 sur 6	Sorghum bicolor putative fatty acid desaturase mRNA	9/21 (42%)	0.54
				24S24	338 pb	1 sur 6	Phytolacca dioica 26S ribosomal RNA gene	90/93 (96%)	6,00E-59
2B			X	25V21	486 pb	2 sur 2	bnyvv rna4		
4B		X		25V41	370 pb	2 sur 2	bnyvv rna2		
5B			X	25V51	313 pb	1 sur 2	Arabidopsis thaliana carbamoyl phosphate synthetase large chain (CARB) mRNA	77/92 (83%)	4,00E-48
				25V55	313 pb	1 sur 2	Arabidopsis thaliana putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase (At5g46330) mRNA	35/58 (60%)	2,00E-31
6B			X	25V62	217 pb	2 sur 2	bnyvv rna2		
7B		XX	X	25V75	213 pb	1 sur 2	Oryza sativa DAHPS2 mRNA for 3-deoxy-D-arabino heptulosonate-7-phosphate synthase	34/38 (89%)	2,00E-15
				25V76	213 pb	1 sur 2	bnyvv rna3		
9B			X	26V12	469 pb	1 sur 2	Arabidopsis thaliana germin-like protein (GLP2a) (GLP5a) (At5g39160) mRNA	50/81 (61%)	6,00E-51
				26V13	483 pb	1 sur 2	Lettuce big-vein virus LBVV-pol gene for L protein	36/117 (30%)	5,00E-15
10B			X	26V25	446 pb	2 sur 2	bnyvv rna5		
11B		X		26V31	365 pb	1 sur 2	H.catenoides gene for 28S ribosomal RNA	32/39 (82%)	6,00E-28
				26V32	365 pb	1 sur 2	bnyvv rna2		
12B	X	X		26V46	255 pb	1 sur 1	Arabidopsis thaliana glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase / G6PD (ACG12) (At5g40760) mRNA	63/72 (87%)	6,00E-37
13B			X	26V52	235 pb	1 sur 2	Maytenus foemieri 26S ribosomal RNA gene	43/56 (76%)	2,00E-20
				26V53	235 pb	1 sur 2	bnyvv rna2		
14B			X	26V63	217 pb	2 sur 2	bnyvv rna2		
16B			X	27V22	700 pb	2 sur 5	bnyvv rna4		
				27V24	700 pb	1 sur 5	Bordetella bronchiseptica complete genome	163/185 (88%)	1,00E-117
17B		X	X	27V33	585 pb	1 sur 3	Streptomyces hygroscopicus subsp. limoneus partial 16S rRNA gene	172/175 (98%)	3,00E-110
				27V36	585 pb	1 sur 3	Streptomyces sp. pfB34 16S ribosomal RNA gene	179/183 (97%)	9,00E-116
19B		X		27V51	414 pb	1 sur 2	Trimenia moorei 26S ribosomal RNA gene	125/126 (99%)	6,00E-82
				27V52	414 pb	1 sur 2	Verrucomicrobium spinosum 23S ribosomal RNA gene	68/88 (77%)	6,00E-43
20B		X		27V61	302 pb	1 sur 2	Medusagyne oppositifolia 26S ribosomal RNA gene	87/87 (100%)	3,00E-55
				27V62	302 pb	1 sur 2	Arabidopsis thaliana threonine aldolase family protein (At3g04520) mRNA	44/62 (70%)	3,00E-29

Tableau I.2 : Récapitulatif des identités de séquences des fragments ADNc caractérisés par RFDD-PCR et présentant une expression différentielle. Le numéro figurant dans la première colonne correspond au numéro identifiant les bandes sur gel RFDD-PCR (figure I.14). Les colonnes S, A2 et A4 récapitulent le profil d'expression de chaque bande dans les plantes saines (S) ou infectées (A2 et A4). Après séquençage de six clones recombinants pour chaque ADNc, plusieurs séquences ont été parfois caractérisées à partir de la même bande (colonne Séquence) avec une fréquence d'apparition variable (colonne Fréquence). Les identités de séquences (colonne TBLASTX) ont été obtenues après alignement des fragments d'ADNc avec les séquences disponibles dans les banques de données sur le serveur du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Les séquences purement virales sont présentées en gris. Les séquences montrant des fonctions putatives intéressantes sont présentées en jaune lorsque celles-ci sont mêlées à des séquences virales dans la même bande, ou sont présentées en rose lorsqu'elles sont identifiées sans séquence virale contaminante.

séquences virales au sein de la même bande (cases jaunes, tableau **I.2** ; numéros 1A, 5A, 6A, 13A, 14A, 17A, 19A, 20A, 7B, 11B, 13B, 16B, 1C, 3C et 4C), et seulement 11 concernent des séquences exclusivement non virales (cases roses, tableau **I.2** ; numéros 2A, 7A, 8A, 18A, 5B, 9B, 12B, 17B, 19B, 20B et 12C). L'amplification de séquences virales a révélé une faiblesse dans l'utilisation du kit pour notre modèle d'étude. Les amorces ciblent également les ARN du BNYVV et conduisent à leur amplification quelque soit la séquence de l'amorce "displayPROBE" utilisée. Ceci nous a malheureusement amené à purifier, cloner et séquencer beaucoup d'ADNc inutiles.

Parmi ces séquences non accompagnées de séquences virales, on retrouve bien sûr les deux séquences présentes dans les plantes saines et réprimées dans les plantes infectées (numéros 7A et 12C). Les séquences 19S12 et 19S13 issues de la bande 7A se sont révélées d'origine ribosomique et potentiellement sans intérêt, la séquence 24S22 retrouvée trois fois à partir de la bande 12C a montré une fonction de méthionine synthase (*Beta vulgaris* BvMS1).

Parmi les candidats induits lors de la virose et exempts de séquences virales (cases roses, tableau **I.2**), nous avons pu retrouver une protéine "heat shock" du type HSC70 ("cytosolic heat shock 70 protein" ; séquence 18V21), une phospholipase D (séquence 18V25), un transporteur d'acides aminés du type AAP ("amino acid permease" ; séquence 20V21), une fonction de "carbamoyl phosphate synthetase large chain" (CARB ; séquence 25V51), une kinase du type "leucine-rich repeat transmembrane protein kinase" (séquence 25V55), une germine proche des GLP2a ou GLP5a ("germin-like protein" ; séquence 26V12), une fonction de "glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase" (G6PD ; séquence 26V46), et une thréonine aldolase (séquence 27V62).

D'autres candidats également induits dans les plantes infectées, mais caractérisés à partir de bandes du gel RFDD-PCR présentant un mélange de séquences virales et non virales (cases jaunes, tableau **I.2**), ont été tout de même pris en considération. Nous avons trouvé une "glutathione S-transferase" (GST ; séquence 18V56), une polyubiquitine du type UBQ1 (séquence 19V65), une pompe à proton de la membrane plasmique ("plasma membrane H⁺ATPase" ; séquence 20V36), une protéine à doigt de zinc (zinc finger DHHC type family protein/ankyrin repeat family protein ; séquence 23V11), et une fonction de "3-deoxy-D-arabino heptulosonate-7-phosphate synthase" (DAHPS2 ; séquence 25V75).

Tous ces gènes candidats présentent une expression différentielle (pour la plupart une surexpression lors de la maladie) qu'il convenait de vérifier par d'autres méthodes d'analyse. En effet, certains de ces ADNc pouvaient correspondre à des faux-positifs, en particulier ceux

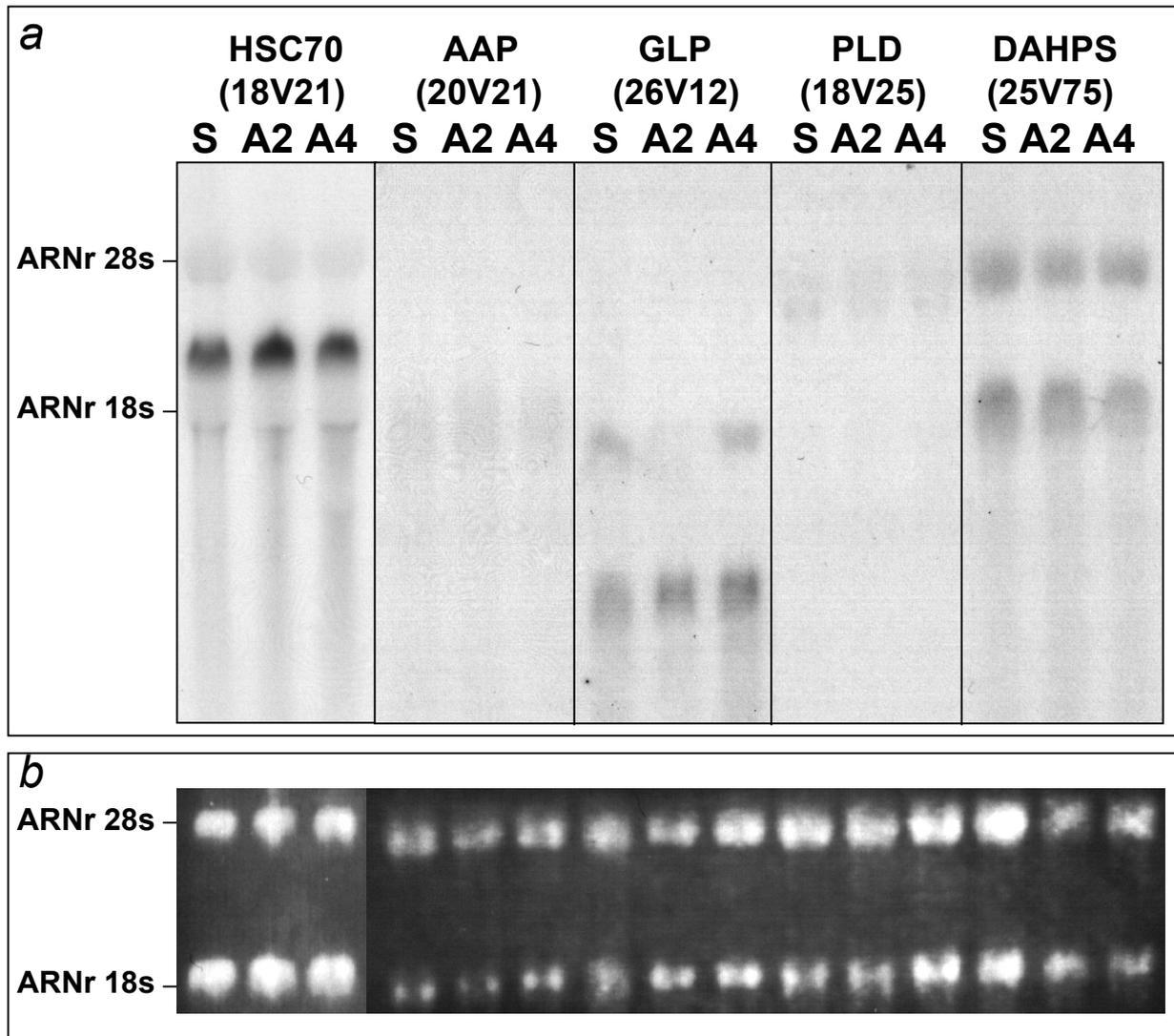


Figure I.15 : (a) Détection par Northern blot des messagers correspondant aux gènes candidats HSC70, AAP, GLP, PLD et DAHPS dans les racines de betteraves cultivées dans les terres S, A2 et A4. Des quantités similaires d'ARN totaux (~10 µg) de racines de betteraves saines (S) ou rhizomaniées (A2 et A4) sont déposées sur gel et analysées par des expériences indépendantes d'hybridation moléculaire. Les ARN messagers sont révélés par des sondes complémentaires aux séquences caractérisées par RFDD-PCR. (b) Visualisation des ARN ribosomiques 28s et 18s contenus dans les échantillons d'ARN totaux déposés sur gel exposé aux UV. L'observation des ARN ribosomiques renseigne sur les quantités d'ARN totaux déposés dans chacune des pistes du gel.

faiblement représentés (parfois un clone sur 6), ou ceux contaminés par des séquences virales. Dans un premier temps, j'ai cherché à confirmer les différences d'expression pour certains candidats par des expériences de Northern blot. Puis dans un deuxième temps, j'ai mis en œuvre la technique de Northern inverse pour analyser l'expression différentielle de l'ensemble des séquences d'intérêt identifiées.

3. Vérification de l'expression des gènes candidats identifiés par RFDD-PCR

3.1. Analyse de l'expression différentielle par Northern blot

Nous avons choisi de vérifier l'expression différentielle des ARN messagers de cinq candidats identifiés par RFDD-PCR. Ces séquences correspondent à la protéine "heat shock" (HSC70), le transporteur d'acides aminés (AAP), la protéine "germin-like" (GLP) et la phospholipase D (PLD), toutes surexprimées dans les racines des plantes A4, ainsi que la "3-deoxy-D-arabino heptulosonate-7-phosphate synthase" (DAHPS) activée dans les racines des plantes A2 et A4 (figure **I.15**).

Des quantités équivalentes d'ARN totaux (environ 10 µg) issus de racines de betteraves témoins (S) et infectées (A2 et A4) ont été déposées sur gel, visualisées sous UV (figure **I.15b**) et analysés par Northern blot (figure **I.15a**). Des sondes ADNc radiomarquées spécifiques de chaque gène d'intérêt ont été utilisées dans cinq expériences indépendantes. Les sondes dirigées contre les messagers AAP, PLD et DAHPS ont révélé une hybridation aspécifique des ARN ribosomiques sans présenter de signal différentiel probant pour les ARN messagers recherchés (panneaux AAP, PLD, DAHPS, figure **I.15a**, ARNr 28s et 18s). La sonde dirigée contre les messagers du gène HSC70 révèle faiblement les deux populations d'ARN ribosomiques mais aussi un fort signal correspondant aux messagers HSC70 (panneau HSC70, figure **I.15a**). Pourtant, aucune différence d'expression n'est détectée dans les échantillons infectés. Enfin, la sonde dirigée contre les messagers de la "germin-like" révèle faiblement les ARN ribosomiques 18s mais également les messagers GLP qui pourraient être légèrement surexprimés dans les plantes infectées A4 (panneau GLP, figure **I.15a**).

Aucune de ces analyses par Northern blot ne nous a permis de détecter des différences significatives dans l'expression de ces cinq ADNc d'intérêt. Cette technique d'hybridation moléculaire a donc été rapidement abandonnée car elle nécessite de grandes quantités d'ARN totaux, et ne permet pas de vérifier facilement l'expression de l'ensemble des gènes candidats. La technique d'hybridation moléculaire appelée Northern inverse a été utilisée car elle offre la

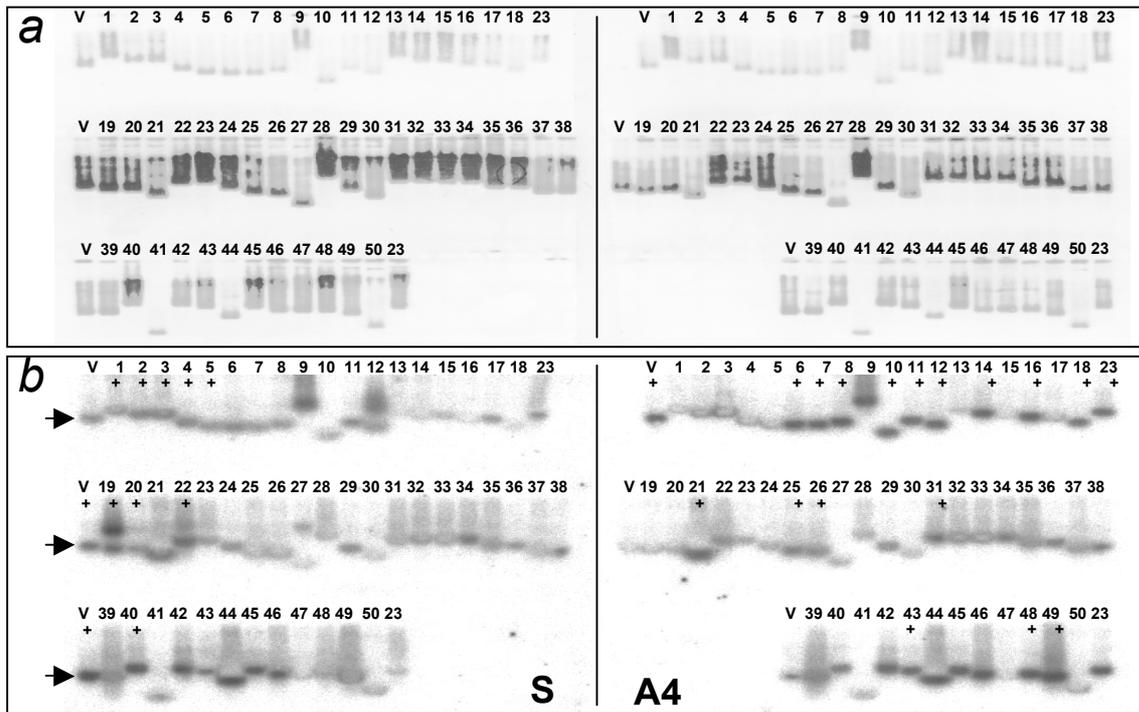


Figure I.16 : (a) Visualisation des fragments ADNc candidats amplifiés par PCR et déposés en double sur gel exposé aux UV. L'observation du gel avant transfert sur membrane renseigne sur la qualité des échantillons et sur les quantités déposées. (b) Détection par Northern inverse des taux d'expression des messagers correspondant aux ADNc candidats. Les mêmes quantités d'ARN totaux (5 µg) de racines de betteraves saines (S) ou rhizomaniées (A4) servent de matrices pour la synthèse des ADNc radiomarqués utilisés comme sondes dans ces deux expériences. Les différences de signaux entre les échantillons (S) et (A4) sont indiquées par les signes (+). La séquence témoin (V) correspondant à l'ARN 2 du BNYVV détectée dans l'échantillon sain (S) invalide ces résultats (flèches noires).

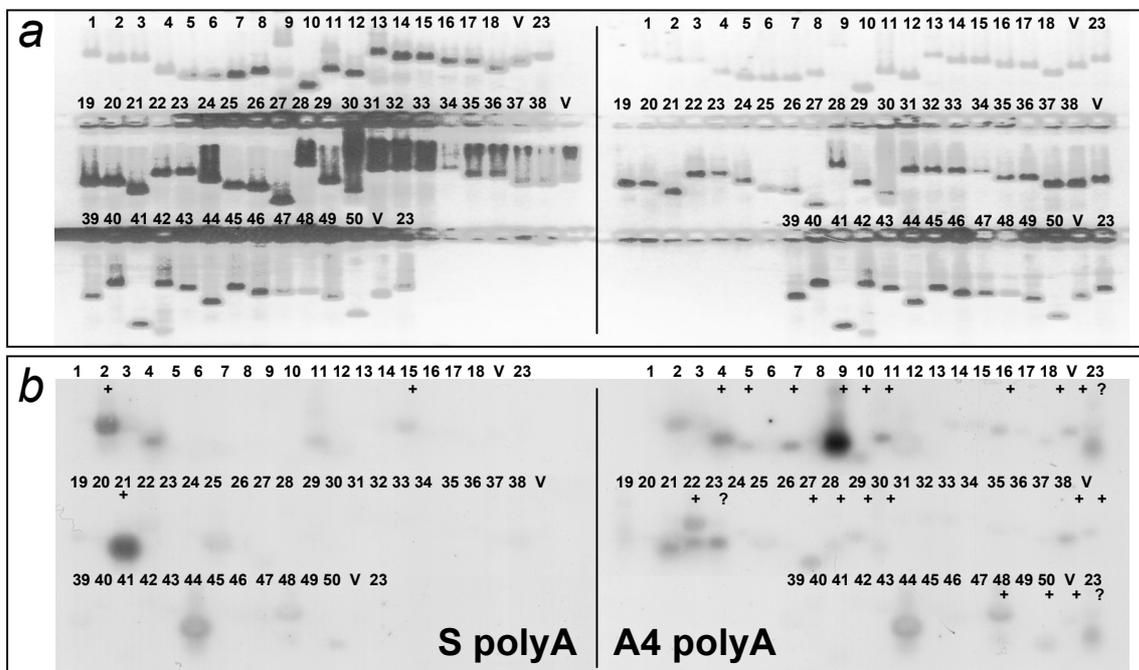


Figure I.17 : (a) Visualisation des fragments ADNc candidats amplifiés par PCR et déposés en double sur gel exposé aux UV. (b) Détection par Northern inverse des taux d'expression des messagers correspondant aux ADNc candidats. Les mêmes quantités d'ARN poly(A)+ purifiés à partir de racines de betteraves saines (S) ou rhizomaniées (A4) servent de matrices pour la synthèse des ADNc radiomarqués utilisés comme sondes dans ces deux expériences. Les différences de signaux entre les échantillons (SpolyA) et (A4polyA) sont indiquées par les signes (+). Dans cette expérience, la séquence témoin (V) correspondant à l'ARN 2 du BNYVV n'est détectée que dans l'échantillon infecté (A4polyA).

possibilité d'observer les différences d'expression d'un ensemble de gènes candidats en une seule expérience, tout en utilisant des quantités très faibles d'ARN totaux.

3.2. Analyse de l'expression différentielle par Northern inverse

Cette technique est très proche de celle du macroarray (voir §1.4.1. et §1.4.2.). Elle permet une analyse simultanée par hybridation moléculaire des taux d'expression de plusieurs séquences présentes sur un même support, en utilisant des ADNc radiomarqués représentant l'ensemble des ARN messagers de situations distinctes que l'on souhaite comparer. Dans le cas du Northern inverse, les fragments ADN à tester sont au préalable soumis à une électrophorèse en gel d'agarose et sont transférés sur membrane de nylon dans des conditions identiques à celles du Southern blot.

Au total, 50 séquences ont été analysées par Northern inverse. Un certain nombre de séquences qui ne figurent pas dans le tableau **I.2**, amplifiées et clonées normalement mais n'ayant pas pu être caractérisées par séquençage, ont été analysées lors de ces expériences (séquences 19V12, 23V13, 23V22, 23V24, 24V31, 27V21, 27V26, 27V31, 27V42, 27V44, tableau **I.3**). Les fragments à analyser ont été amplifiés par PCR à partir de matrices plasmidiques en utilisant les amorces T7 et SP6 spécifiques des séquences situées de part et d'autre des inserts. Les produits PCR numérotés de 1 à 50 (figures **I.16** et **I.17**, tableau **I.3**) ont été purifiés, séparés en deux échantillons identiques, et déposés en parallèle sur deux gels. Pour chaque expérience, un témoin positif (V) est ajouté et correspond à une séquence de l'ARN 2 du BNYVV retrouvée par RFDD-PCR (séquence 18V41, tableaux **I.2** et **I.3**). Après migration sur gel, les quantités respectives d'ADN sont visualisées par exposition aux UV (figures **I.16a** et **I.17a**). Après transfert, la membrane correspondant au gel présentant les signaux les plus intenses est choisie pour être hybridée avec les ADNc synthétisés à partir des ARN totaux de racines de plantes témoins (S), alors que l'autre membrane est hybridée avec les ADNc produits à partir des ARN totaux de racines de plantes infectées (A4). Après hybridation, lavages et autoradiographie, l'intensité des signaux est estimée et comparée entre les différents fragments étudiés (figures **I.16b** et **I.17b**). Une première expérience, effectuée en utilisant les ARN totaux non purifiés comme matrice pour la synthèse des ADNc radiomarqués, ne s'est pas révélée informative, compte tenu des forts marquages aspécifiques obtenus au niveau de la séquence virale témoin après hybridation des ADNc provenant du matériel végétal non infecté (flèches noires, pistes V, figure **I.16b**). Par la suite, l'utilisation d'ADNc radiomarqués synthétisés à partir d'ARN poly(A)+ purifiés à partir des mêmes

N°	RFDD	S	A2	A4	Séquence	Taille	TBLASTX	SpolyA	A4polyA
V	4A		X		18V41	365 pb	BNYVV RNA 2	o	x
1	1A		X	X	18V15	584 pb	Arabidopsis thaliana putative glyoxalase I	o	o
2	2A			X	18V21	464 pb	cytosolic heat shock 70 protein	xx	x
3					18V25	455 pb	Phospholipase D	x	x
4	5A		X	X	18V56	262 pb	Glutathione S-transferase(GST)	x	xx
5	6A			X	18V61	185 pb	Beta vulgaris mitochondrial genomic DNA	o	x
6					18V62	181 pb	Geobacillus stearothermophilus (Bacteria)	o	o
7					18V63	181 pb	Pseudomonas fluorescens Pf-5, complete genome	x	xx
8	7A	X			19S12	233 pb	Orpinomyces sp. OUS1 partial 18S rRNA gene	o	o
9					19S13	874 pb	Glaucozystis nostochinearum 26S ribosomal RNA	o	x
10	8A		X	X	19V12	? (61 pb)	No significant similarity	o	x
11	13A		X	X	19V65	262 pb	Polyubiquitin	x	xx
12	14A			X	19V72	196 pb	Dechloromonas aromatica RCB, complete genome	x	x
13	17A		X	X	20V16	576 pb	Rhizobium gallicum 23S ribosomal RNA gene	o	o
14	18A			X	20V21	442 pb	Putative amino acid permease	o	o
15					20V26	444 pb	Oryza sativa genomic DNA, chrom12	x	o
16	19A		X		20V34	369 pb	Arabidopsis thaliana mRNA for hypothetical protein	o	x
17					20V36	369 pb	Plasma membrane H ⁺ -ATPase	o	o
18	20A		X	X	20V46	260 pb	No significant similarity	o	x
19	5B			X	25V51	313 pb	Carbamoyl phosphate synthetase large chain (CARB)	o	o
20					25V55	313 pb	Putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	o	o
21	7B		XX	X	25V75	213 pb	3-deoxy-D-arabino heptulosonate-7-phosphate synthase	xxx	x
22	9B			X	26V12	469 pb	Germin-like protein (GLP2)	x	xx
23					26V13	483 pb	Lettuce big-vein virus LBVV-pol gene for L protein	o	o
24	11B		X		26V31	365 pb	H.catenoides gene for 28S ribosomal RNA	o	x
25	12B		X	X	26V46	255 pb	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PD)	x	x
26	13B			X	26V52	235 pb	Maytenus fournieri 26S ribosomal RNA gene	o	o
27	16B			X	27V21	700 pb	Staphylococcus aureus phage phi 13, complete genome	o	x
28					27V24	700 pb	Bordetella bronchiseptica complete genome	o	x
29					27V26	700 pb	Beta vulgaris partial mRNA for peroxidase (per2 gene)	o	x
30	17B		X	X	27V31	585 pb	Trypanosoma cruzi microtubule-associated protein gene	o	x
31					27V33	585 pb	No significant similarity	o	o
32					27V36	585 pb	No significant similarity	o	o
33	18B		X	X	27V42	575 pb	No significant similarity	o	o
34					27V44	575 pb	No significant similarity	o	o
35	19B		X		27V51	414 pb	Trimenia moorei 26S ribosomal RNA gene	o	o
36					27V52	414 pb	Verrucomicrobium spinosum 23S ribosomal RNA gene	o	o
37	20B		X		27V61	302 pb	Medusagynia oppositifolia 26S ribosomal RNA gene	o	o
38					27V62	302 pb	Threonine aldolase family protein	o	o
39	1C		X		22V12	368 pb	Unidentified eukaryote 18S ribosomal RNA	o	o
40	3C		X	X	23V11	594 pb	Zinc finger (DHHC type) family protein	o	o
41					23V13	594 pb	No significant similarity	o	o
42					23V16	584 pb	No significant similarity	o	o
43	4C		X	X	23V21	489 pb	Drosophila melanogaster mRNA	o	o
44					23V22	494 pb	Beta vulgaris pal gene for phenylalanine ammonia lyase	x	x
45					23V24	?	Arabidopsis thaliana U2 snRNP auxiliary factor	o	o
46	12C	X			24S21	406 pb	Xanthorhiza simplicissima 26S ribosomal RNA gene	o	o
47					24S22	406 pb	Beta vulgaris BvMS1 mRNA for methionine synthase	o	o
48					24S23	406 pb	Sorghum bicolor putative fatty acid desaturase mRNA	x	xx
49					24S24	338 pb	Phytolacca dioica 26S ribosomal RNA gene	o	o
50	10C			X	24V31	? (134 pb)	Nicotiana tabacum mitochondrial DNA	x	xx

Tableau I.3 : Récapitulatif des différences d'expression visualisées par Northern inverse concernant les fragments ADNc initialement caractérisés par RFDD-PCR. Le numéro figurant dans la première colonne correspond à celui utilisé en Northern inverse (figure I.17). La deuxième colonne réfère à l'identifiant des bandes sur gel RFDD-PCR (figure I.14). Les colonnes suivantes récapitulent le profil d'expression obtenu par RFDD-PCR (expression dans les plantes saines S ou infectées A2 et A4) et les identités de séquences (colonne TBLASTX). Les séquences potentiellement intéressantes sont présentées en jaune lorsque celles-ci sont mêlées à des séquences virales, ou sont présentées en rose lorsqu'elles sont identifiées sans séquence virale contaminante. Les différences d'expression visualisées par Northern inverse en utilisant des ARN poly(A)⁺ de plantes saines (colonne SpolyA) et infectées (colonne A4polyA) sont présentés à droite du tableau. Les résultats contraires à ceux obtenus par RFDD-PCR sont présentés en gris. Les résultats confirmant ceux obtenus par RFDD-PCR sont présentés en jaune ou rose pour les séquences de fonction putative intéressante.

échantillons d'ARN de racines de plantes témoins (SpolyA) ou de racines infectées (A4polyA) a permis d'optimiser la technique (figure **I.17**). La détection de signaux au niveau de la séquence virale uniquement avec les ADNc issus du matériel infecté permet de confirmer la spécificité des hybridations (pistes V, figure **I.17b**), même si ces signaux apparaissent peu intenses.

Nous avons estimé les niveaux d'expression de chaque séquence dans les échantillons provenant des plantes saines (SpolyA) et infectées (A4polyA ; figure **I.17b** et tableau **I.3**). Si certains candidats ne présentent pas de différence d'expression, comme par exemple ceux des pistes 31 à 37, d'autres sont fortement exprimés dans les tissus infectés (figure **I.17b**, partie droite, pistes 4, 5, 7, 9 à 11, 16, 18, 22, 23, 27 à 30, 38, 48, 50). Beaucoup de ces candidats représentent des séquences non identifiables dans les banques de données (tableau **I.3**, séquences 19V12, 20V46, 27V21, 27V26, 27V31, 24V31) ou ne présentent pas de fonctions intéressantes (tableau **I.3**, séquences 18V61, 18V63, 26V31, 27V24). Pourtant quelques candidats dont la surexpression dans les plantes infectées a pu être confirmée correspondent à des gènes de fonction intéressante : la GST (séquence 18V56), la polyubiquitine (séquence 19V65, cases jaunes), la GLP (séquence 26V12, cases roses) et la séquence 20V34 ("*Arabidopsis thaliana* hypothetical protein"). Trois autres candidats présentent par contre un signal plus fort avec les ADNc issus du matériel sain et correspondent à ceux des pistes 2, 15 et 21 (figure **I.17b**, partie gauche). On retrouve, parmi ces candidats qui ont montré un profil d'expression contraire à celui obtenu par RFDD-PCR (tableau **I.3**, cases grises), la protéine HSC70 (séquence 18V21), la fonction DAHPS (séquence 25V75) et la séquence 20V26 ("*Oriza sativa* genomic sequence").

Les difficultés rencontrées lors de la confirmation par hybridation moléculaire de l'expression différentielle des gènes candidats ont soulevé plusieurs problèmes liés à notre propre modèle d'étude et à la technique RFDD-PCR. En effet, des différences d'expression ont bien été détectées pour certaines séquences, mais elles sont trop faibles pour être validées (Northern blot), ou rarement confirmées par plusieurs expériences (Northern inverse). Nous en avons conclu que la technique RFDD-PCR très sensible car basée sur le principe de l'amplification par RT-PCR, permet de déceler des variations de l'expression des ARN qui sont en réalité faibles et peu détectables par d'autres méthodes. Si ces ARN messagers sont faiblement représentés parmi tous les messagers cellulaires, c'est probablement lié à la nature du matériel biologique utilisé. En effet, deux mois après la mise en place de la rhizomanie, les signaux de différenciation cellulaire, qui sont induit probablement dès le début de l'infection,

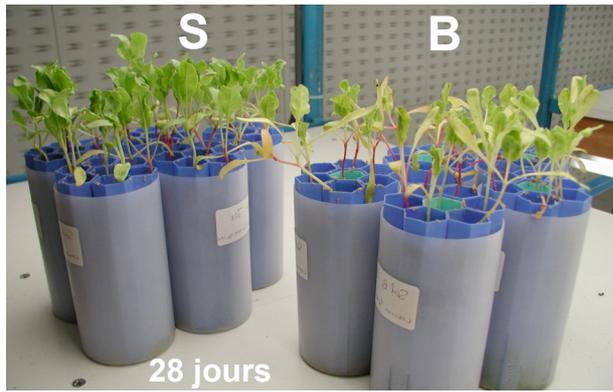


Figure I.18 : Vue d'ensemble du système de culture et d'infection standardisé développé en bioessai (SESVanderHave, Tienen, Belgique). Les plantules saines (S) contrôles sont cultivées dans des tubes de sable contenant le vecteur *Polymyxa betae* avirulifère, et les plantules infectées (B) dans des tubes de sable infesté par le vecteur *Polymyxa betae* virulifère.

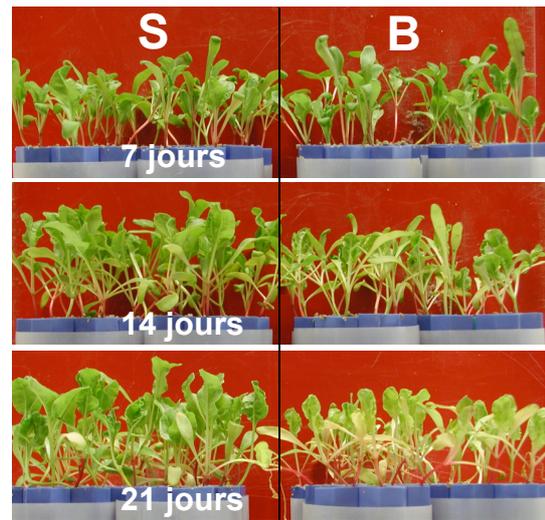


Figure I.19 : Comparaison des symptômes foliaires de betteraves (*Beta vulgaris*) saines (S) ou infectées par le BNYVV (B) après 7, 14 et 21 jours d'infection en bioessai. Les plantules saines (S) présentent une croissance normale. Les plantes infectées (B) présentent un nanisme général et une chlorose des feuilles détectables à partir de 14 jours d'infection.

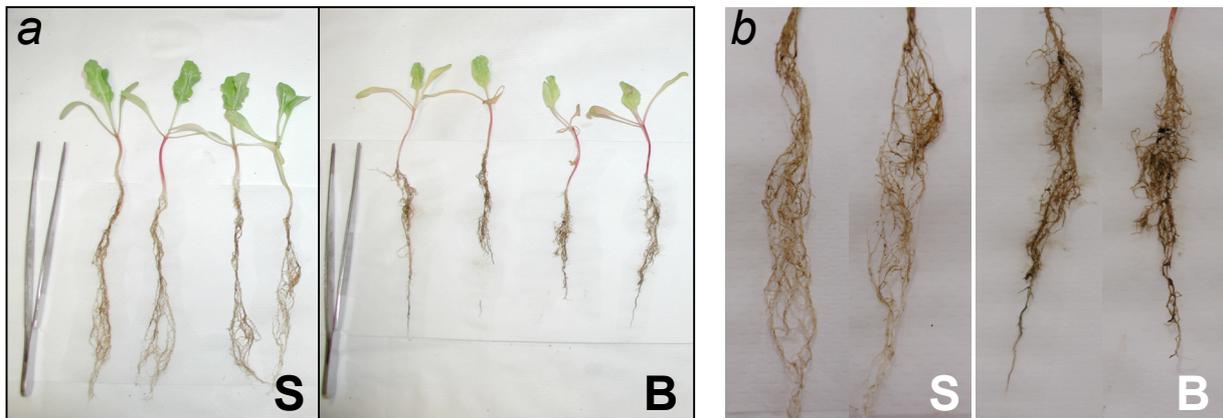


Figure I.20 : Comparaison phénotypique des racines de betteraves (*Beta vulgaris*) saines (S) ou infectées par le BNYVV (B) après 28 jours d'infection en bioessai. Les plantules saines présentent une croissance normale et ordonnée du système racinaire comportant des racines blanches et robustes. Les plantules infectées présentent un système racinaire fortement diminué composé de radicelles nécrotiques. (a) Vue d'ensemble. (b) Vue détaillée.

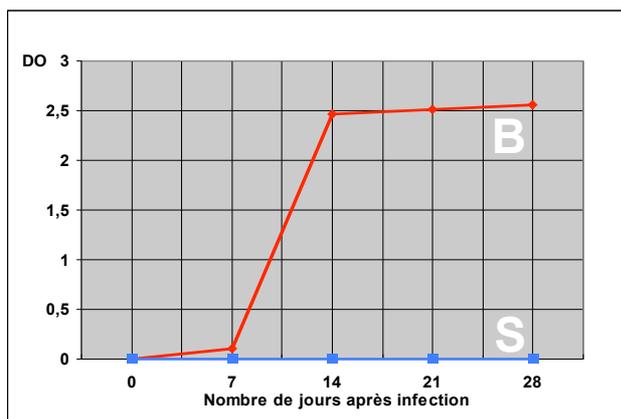


Figure I.21 : Cinétique de multiplication du BNYVV dans les racines de betteraves (*Beta vulgaris*) cultivées en bioessai. Des quantités identiques (50 mg) de racines de plantules saines (S) ou infectées par le BNYVV (B) sont prélevées après 7, 14, 21 et 28 jours d'infection et analysées par ELISA. La présence du BNYVV est révélée par l'utilisation d'anticorps primaires dirigés contre la protéine de capside du virus.

ont déjà conduit aux principaux dérèglements racinaires observés sur ces plantes et ne sont donc plus aussi significatifs dans les phases tardives. De plus, les différences d'expression de gènes détectées par RFDD-PCR ne concernent certainement qu'une population infime et très isolée de cellules et se retrouvent ainsi diluées dans la masse racinaire entièrement récoltée.

Nous avons donc décidé d'étudier les différences d'expression des gènes à un stade plus précoce de l'infection. Le système de culture et d'infection virale très standardisé (Paul *et al.*, 1992) développé en bioessai au sein du département R&D de l'entreprise SESVanderHave (Tienen, Belgique) a été choisi pour obtenir des plantules jeunes aux racines infectées très peu développées, et ainsi détecter des variations d'expression induites par le virus qui prédominent par rapport à l'expression constante des autres messagers cellulaires.

4. Mise en évidence des différences d'expression des gènes candidats à un stade très précoce de l'infection virale : utilisation d'un bioessai de betteraves

4.1. Infection standardisée de plantules de betteraves en bioessai

Le bioessai que j'ai organisé et effectué au sein du département R&D de l'entreprise SESVanderHave (Tienen Belgique) a consisté à cultiver en logette plusieurs lots de jeunes plantules de betteraves sensibles (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) dans des tubes individuels contenant du sable additionné de 10% de terre contenant le vecteur *P. betae* avirulifère (terre d'Angleterre) pour obtenir des racines saines (S) contrôles, ou 10% de terre contenant le vecteur *P. betae* virulifère portant l'isolat B du BNYVV (terre d'Allemagne) pour obtenir des racines infectées (B ; figure **I.18**). Pour obtenir une cinétique régulière de croissance et d'infection de ces betteraves, nous avons récolté des lots de 35 plantules saines (S) et 35 plantules infectées (B) après 7, 14, 21, et 28 jours de croissance en logette. Les plantules contrôle (S) restent au cours du temps indemnes de toute infection virale, elles présentent une croissance normale avec des feuilles de couleur vert foncé (S, 21 jours, figure **I.19**). Les plantules infectées (B) présentent un nanisme général détectable dès 14 jours d'infection (B, 14 jours, figure **I.19**), avec des feuilles plus petites de couleur vert pâle qui jaunissent à partir de 21 jours (B, 21 jours, figure **I.19**). Après 28 jours, le système racinaire de ces plantes infectées est fortement diminué (B, figure **I.20a**) et composé de radicelles sombres et nécrotiques très fragiles (B, figure **I.20b**), distinctes des racines blanches et robustes des plantes contrôles (S, figure **I.20b**).

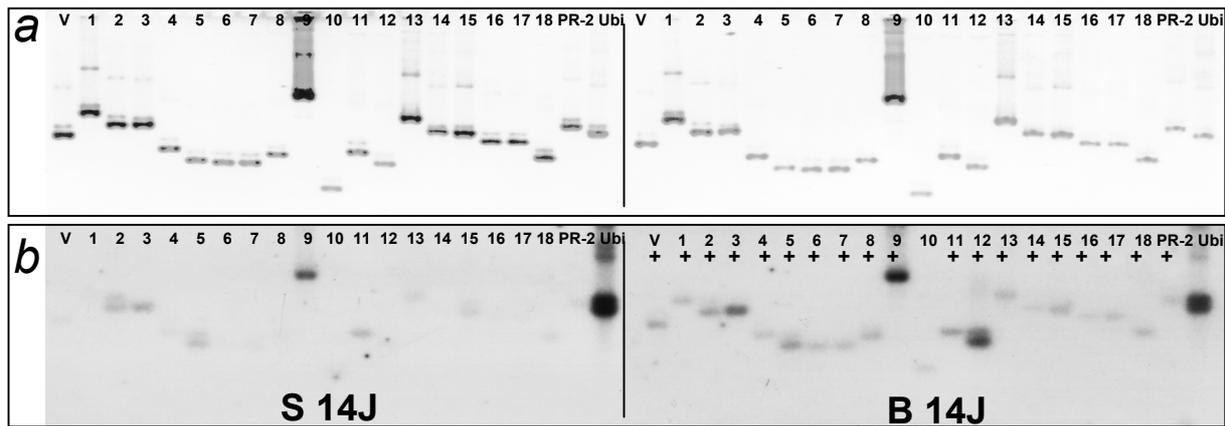


Figure I.22 : (a) Visualisation des fragments ADNc candidats amplifiés par PCR et déposés en double sur gel exposé aux UV. L'observation du gel avant transfert sur membrane renseigne sur la qualité des échantillons et sur les quantités déposées. (b) Détection par Northern inverse des taux d'expression des messagers correspondant aux ADNc candidats dans les racines de betteraves saines ou infectées par le BNYVV récoltées après 14 jours de culture en bioessai. Les mêmes quantités d'ARN totaux (5 µg) de racines de plantules saines (S14J) ou infectées (B14J) servent de matrices pour la synthèse des ADNc radiomarqués utilisés comme sondes dans ces deux expériences. Les différences de signaux entre les échantillons (S14J) et (B14J) sont indiquées par les signes (+). La séquence (V) (contrôle virus) correspond à une partie de l'ARN 2 du BNYVV. Les séquences (PR-2) et (Ubi) correspondent respectivement à une partie du gène de la β -1,3-glucanase basique de betterave (GenBank Acc. BQ591809) et à une partie du gène de l'ubiquitine de betterave (GenBank Acc. BQ583989).

N°	RFDD	S	A2	A4	Séquence	TBLASTX	S/d	B/d	B/S
V	4A		X		18V41	BNYVV RNA 2	0	1.26	+
PR-2						Beta vulgaris beta-1,3-glucanase (PR-2)	0	6.72	+++
Ubi						Beta vulgaris ubiquitine (Ubi)	35.53	53.30	1.5
1	1A		X	X	18V15	Arabidopsis thaliana putative glyoxalase I	0	0.1	+
2	2A			X	18V21	cytosolic heat shock 70 protein	1.02	2.03	1.98
3					18V25	Phospholipase D	0.55	4.86	8.9
4	5A		X	X	18V56	Glutathione S-transferase(GST)	0	0.39	+
5	6A			X	18V61	Beta vulgaris mitochondrial genomic DNA	1.64	6.24	3.79
6					18V62	Geobacillus stearothermophilus (Bacteria)	0	0.09	+
7					18V63	Pseudomonas fluorescens Pf-5, complete genome	0	0.10	+
8	7A	X			19S12	Orpinomyces sp. OUS1 partial 18S rRNA gene	0.25	4.4	17.36
9					19S13	Glaucocystis nostochinearum 26S ribosomal RNA	1.89	5.59	2.96
10	8A		X	X	19V12	No significant similarity	0	0	ND
11	13A		X	X	19V65	Polyubiquitin	0.74	2.41	3.24
12	14A			X	19V72	Dechloromonas aromatica RCB, complete genome	2.94	38.65	13.14
13	17A		X	X	20V16	Rhizobium gallicum 23S ribosomal RNA gene	0.13	2.23	17.01
14	18A			X	20V21	Putative amino acid permease	0	1.56	+
15					20V26	Oryza sativa genomic DNA, chrom12	0.29	3.72	12.64
16	19A		X		20V34	Arabidopsis thaliana hypothetical protein	0	3.96	++
17					20V36	Plasma membrane H ⁺ -ATPase	0	8.64	++
18	20A		X	X	20V46	No significant similarity	0.12	5.1	41.46

Tableau I.4 : Récapitulatif des différences d'expression observées par Northern inverse concernant les fragments ADNc initialement caractérisés par RFDD-PCR. Les deux premières colonnes représentent le numéro utilisé en Northern inverse (figure I.22) puis celui identifiant les bandes sur gel RFDD-PCR (figure I.14). Les colonnes suivantes récapitulent le profil d'expression obtenu par RFDD-PCR (dans les plantes saines S ou infectées A2 et A4), ainsi que les identités de séquences (colonne TBLASTX). Les séquences montrant des fonctions putatives intéressantes sont présentées en jaune lorsque celles-ci sont mêlées à des séquences virales, ou en rose lorsqu'elles sont identifiées sans séquence virale contaminante. Les différences d'expression visualisées par Northern inverse en utilisant les ARN totaux de racines de *Beta vulgaris* saines (S) et infectées (B) en bioessai sont présentées à droite du tableau. La quantification des signaux a permis d'estimer les taux normalisés d'expression (S/d et B/d) ainsi que les différences d'expression (B/S). Les résultats contraires à ceux obtenus par RFDD-PCR sont présentés en gris. Les résultats confirmant l'analyse RFDD-PCR sont présentés en jaune ou rose pour les séquences montrant des fonctions putatives intéressantes. Les signes +, ++ et +++ indiquent une expression plus ou moins forte détectée uniquement dans les plantes infectées. ND : non déterminé.

L'analyse par ELISA effectuée à partir de prélèvements racinaires de ces plantes à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid du BNYVV nous a permis de déceler le début de l'infection et visualiser la cinétique de multiplication du virus (figure **I.21**). L'infection des radicules est rapide et optimisée : la détection du virus est possible mais faible après 7 jours d'infection, et devient maximale après 14 jours d'infection (B, figure **I.21**).

Les ARN totaux issus des différents lots de racines de plantules S et B ont été utilisés pour rechercher des différences d'expression apparaissant lors des premières étapes d'infection et de multiplication du virus.

4.2. Analyse de l'expression des gènes candidats par Northern inverse

Les ARN totaux des racines de plantules récoltées à 14 jours qui présentent un taux maximal de multiplication virale (B, figure **I.21**) ont été utilisés pour analyser par Northern inverse le profil d'expression des gènes identifiés précédemment par RFDD-PCR.

Une analyse partielle de 18 séquences (n°1 à 18, figure **I.22** et tableau **I.4**) a été réalisée par Northern inverse en utilisant les ARN totaux issus des racines de plantes contrôles (S) et infectées (B) cultivées pendant 14 jours pour la synthèse des ADNc radiomarqués. Comme précédemment, nous avons utilisé le témoin positif correspondant au fragment 18V41 identifié par RFDD-PCR et spécifique de l'ARN 2 du BNYVV (V, figure **I.22**). Dans cette expérience, un autre témoin positif a été additionné correspondant à une partie de la séquence codante de la β -1,3-glucanase basique (Glu2) de betterave (GenBank Acc. BQ591809, PR-2, figure **I.22**). La β -1,3-glucanase basique fait partie des protéines du type PR (pathogenesis related protein) induites de manière significative lors de la réponse des plantes à l'infection ou au stress. Ces protéines de type PR ont été particulièrement étudiées chez la betterave sucrière (*Beta vulgaris*) infectée (Coutts *et al.*, 1994, Fleming *et al.*, 1991). La β -1,3-glucanase (PR-2) est activée à la fois dans les feuilles de betteraves infectées par *Cercospora beticola* (Gottschalk *et al.*, 1998) et dans les racines de betteraves infectées par le BNYVV (Burketova *et al.*, 2003). La séquence PR-2 représente donc un témoin de l'activation des gènes de betterave impliqués dans la réponse générale aux pathogènes. Une autre séquence correspondant à une partie de la phase codante de l'ubiquitine de betterave (GenBank Acc. BQ583989, Ubi, figure **I.22**) a également été clonée et utilisée (banque de données GABI ; <http://gabi.rzpd.de/>). Choisie initialement pour représenter un gène ubiquitaire d'expression stable, les fortes identités de séquences avec le messager de la polyubiquitine identifié par

RFDD-PCR (séquence 19V65), nous ont pourtant laissé penser que ce fragment ne pouvait pas constituer un témoin de standardisation.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure **I.22**. Nous avons quantifié l'ADN déposé sur chaque membrane (figure **I.22a**) et les signaux radioactifs obtenus pour chaque candidat (figure **I.22b**) pour pouvoir estimer, grâce au rapport signal radioactif/quantité d'ADN, les taux d'expression des 18 séquences visualisés dans le matériel sain (colonne S/d, tableau **I.4**) ou infecté (colonne B/d, tableau **I.4**). Le rapport entre ces deux valeurs normalisées a permis de calculer un quotient d'expression pour chaque candidat (colonne B/S). L'analyse de la figure **I.22** permet de constater que les témoins (V et PR-2) sont exclusivement retrouvés exprimés dans les plantes infectées, tout comme certains gènes candidats portant les fonctions putatives de glyoxalase I (18V15 au n°1), de GST (18V56 au n°4), d'AAP (20V21 au n°14) et de pompe H⁺ATPase (20V36 au n°17), et la séquence "hypothetical protein" (20V34 au n°16). Ces résultats sont résumés et annotés +/+/+++ dans la colonne B/S du tableau **I.4**. D'autres candidats sont révélés par cette approche (18V62 au n° 6, 18V63 au n°7), mais l'origine non végétale de ces séquences (*Geobacillus stearothermophilus* ou *Pseudomonas fluorescens*) et la faible intensité des signaux (rapport B/S de 0,09 et 0,10, tableau **I.4**) nous laissent croire à des signaux non spécifiques. Dans le cas des candidats présentant une expression relative (B/S) comprise entre 1,5 à 42, certains restent peu informatifs comme les séquences 19V72 au n° 12 ("*Dechloromonas aromatica* RCB"), 20V16 au n° 13 ("*Rhizobium gallicum* 23S ribosomal RNA") ou 20V46 au n° 18 (sans fonction associée ; tableau **I.4**). D'autres sont plus intéressants car leur fonction putative peut être corrélée à des mécanismes de réponse au stress. C'est le cas du gène HSC70 (18V21 au n°2) et du gène PLD (18V25 au n°3 ; tableau **I.4**, colonne B/S, cases roses) et celui de la polyubiquitine (19V65 au n° 11, tableau **I.4**, colonne B/S, cases jaunes) proche de celui de l'ubiquitine (témoin Ubi).

Il faut rappeler que parmi ces derniers gènes candidats surexprimés dans les plantes infectées en bioessai, seuls les candidats GST et polyubiquitine ont été détectés par l'expérience de Northern inverse effectuée sur les betteraves cultivées et infectées en serre (cases jaunes, tableau **I.3**). Il faut toutefois relativiser ces valeurs B/S car l'analyse des signaux de faible intensité (figure **I.22b**) reflète un taux d'expression des messagers recherchés très faible. Nous avons donc choisi d'utiliser une autre approche permettant d'amplifier les différences d'expression, la RT-PCR semi-quantitative, une méthode d'analyse plus sensible et plus fiable.

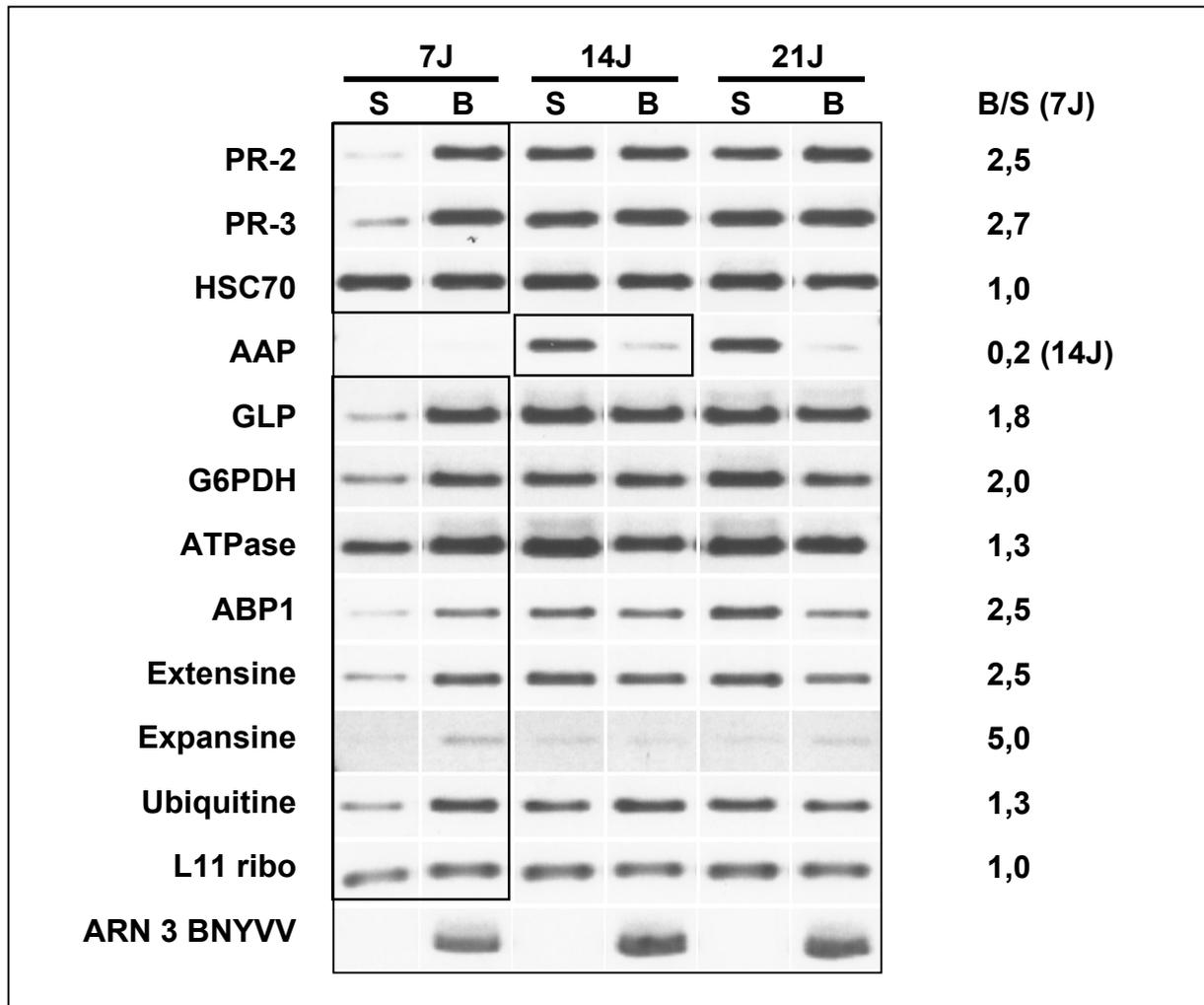


Figure I.23 : Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des gènes candidats HSC70, AAP, GLP, G6PDH, ATPase et Ubiquitine initialement caractérisés par RFDD-PCR, et des gènes ABP1 (GenBank Acc. BQ584486), Extensine (GenBank Acc. BQ583860) et Expansine (GenBank Acc. BQ586143). Ces analyses ont été effectuées sur les ARN totaux de racines de betteraves saines (S) et infectées (B) récoltées après 7, 14, et 21 jours de culture en bioessai. Les profils d'expression des gènes candidats sont normalisés sur celui du gène de la protéine ribosomique L11 (L11 ribo ; GenBank Acc. BE590348). L'amplification d'une séquence spécifique de l'ARN 3 du BNYVV (ARN 3 BNYVV) confirme l'infection des racines. Les différences d'expression des gènes candidats ont été comparées à l'induction des messagers des protéines PR-2 (GenBank Acc. BQ591809) et PR-3 (GenBank Acc. CF542771) de betterave. Les rapports d'expression B/S indiqués à droite sont calculés par quantification des signaux obtenus sur gel et encadrés en noir sur la figure, c'est-à-dire à 7 jours pour la majorité des gènes, à l'exception du gène AAP quantifié à 14 jours.

4.3. Analyse de l'expression de gènes candidats par RT-PCR semi-quantitative

La technique RT-PCR semi-quantitative permet d'étudier de manière rapide et simple l'expression d'un nombre illimité de gènes dont la séquence est accessible. Pour étudier l'expression de gènes candidats chez la betterave, les séquences EST disponibles dans la banque de données GABI (<http://gabi.rzpd.de/>) nous a permis de cibler un certain nombre de séquences qui restent parfois de fonction putative et non caractérisée.

Les analyses par RT-PCR semi quantitative ont été effectuées sur les ARN totaux de racines des plantes récoltées après 7, 14, et 21 jours d'infection en bioessai (figure **I.23**), en équilibrant les échantillons de manière à visualiser sur gel une expression stable du gène codant pour la protéine ribosomique L11 de betterave (GenBank Acc. BE590348 ; Guy Weyens, SESVanderHave, communication personnelle). Comme témoin positif, nous avons recherché la présence de l'ARN 3 du BNYVV. Comme attendu, l'ARN 3 du virus est retrouvé exclusivement dans les lots de plantes infectées (pistes B, figure **I.23**). Nous avons également visualisé l'expression du gène codant pour la β -1,3-glucanase basique (PR-2), mais aussi celui codant pour la chitinase basique de classe IV (Ch4) de betterave (GenBank Acc. CF542771, PR-3). L'expression des chitinases chez la betterave sucrière a été très étudiée (Nielsen *et al.*, 1993, 1994). Leur expression est détectée en particulier dans les feuilles de betteraves infectées par *Cercospora beticola* (Nielsen *et al.*, 1996) et dans les racines de betteraves rhizomaniées ou traitées par le benzothiadiazole (BTH), un inducteur synthétique des réponses SAR ou "systemic acquired resistance" (Burketova *et al.*, 2003). Dans nos expériences, nous avons observé une forte induction de l'expression des messagers codant pour ces deux protéines PR dans les betteraves infectées (B) par rapport aux plantes saines (S) après 7 jours d'infection (figure **I.23**, PR-2 et PR-3, rapport B/S de 2,5 et 2,7). Ce résultat indique que les voies de défenses en amont des protéines PR sont activées dès la primoinfection des cellules végétales. Pourtant, lorsque l'on regarde la progression de leur expression après 14 et 21 jours d'infection, les signaux s'équilibrent dans les plantes saines et infectées. Le système de culture des betteraves en bioessai provoque une situation de stress lié à l'environnement confiné des plantules. J'ai donc choisi par la suite de me focaliser sur les résultats obtenus après 7 jours d'infection qui renseignent probablement plus sur les différences d'expression des gènes induites par l'infection virale.

Nous avons ensuite choisi de rechercher par RT-PCR semi-quantitative les différences d'expression d'un certains nombre de gènes candidats identifiés par RFDD-PCR.

Aucune différence d'expression n'est observée pour la protéine du type HSC70 (figure **I.23**, HSC70, rapport B/S de 1,0) qui présentait néanmoins en Northern inverse une surexpression dans les plantules infectées (n°2, figure **I.22**, tableau **I.4**). Les protéines "heat shock" sont impliquées dans de nombreuses situations de stress, et leur expression dans les plantes contrôles (S) pourrait également s'expliquer ici par les conditions de culture.

Concernant le gène candidat de l'AAP, aucun signal n'est détecté après 7 jours d'infection, puis son expression est activée dans les plantes saines après 14 et 21 jours, et semble réprimée dans les plantes infectées (figure **I.23**, AAP, 14J et 21J, pistes S et B). Ce résultat est en contradiction avec celui obtenu par RFDD-PCR et Northern inverse (n°14, figure **I.22**, tableau **I.4**).

Toutefois, nous avons pu confirmer la surexpression d'un certains nombre de gènes candidats dans les plantules infectées de manière précoce. Il s'agit des gènes suivants : le gène codant pour la protéine "germin-like" (GLP, figure **I.23**, rapport B/S de 1,8) également détecté par Northern blot (figure **I.15**) et par Northern inverse (n°22, figure **I.17**, tableau **I.3**) ; le gène codant pour la G6PDH (figure **I.23**, rapport B/S de 2,0) dont l'expression différentielle n'avait pas pu être confirmée par Northern inverse (n° 25, figure **I.17**, tableau **I.3**) ; le gène codant pour l'H+ATPase (figure **I.23**, rapport B/S de 1,3) détecté également par Northern inverse (n°17, figure **I.22**, tableau **I.4**) ; et le gène codant pour l'ubiquitine (figure **I.23**, rapport B/S de 1,3) proche de la polyubiquitine identifiée par RFDD-PCR (séquence 19V65) et dont l'expression différentielle a pu être confirmée par Northern inverse (n°11, figure **I.17**, tableau **I.3**, figure **I.22**, tableau **I.4**).

Nous avons également inclus dans cette analyse trois candidats décrits dans d'autres modèles d'étude dont la fonction ou la perte de fonction est associée à des caractéristiques phénotypiques retrouvées lors de l'infection par le BNYVV.

Ainsi, nous avons recherché les variations d'expression de l'ABP1 ("auxine binding protein", GenBank Acc. BQ584486), une protéine fortement activée en réponse à l'auxine, une hormone intervenant en particulier dans la division cellulaire et l'élongation cellulaire (Chen *et al.*, 2001a, 2001b). Rappelons ici que des taux élevés d'auxine ou IAA (indole-3-acetic acid,) sont souvent détectés dans des tissus végétaux en prolifération, tout comme dans les betteraves rhizomaniées. En effet, l'équipe Pollini *et al.* (1990) avait trouvé des teneurs en IAA trois fois plus élevées dans les betteraves sensibles rhizomaniées que dans les betteraves dites résistantes. Cette forte teneur en auxine pourrait donc expliquer les symptômes de prolifération racinaire visualisés sur les betteraves infectées.

Nous avons également recherché les variations d'expression d'un gène codant pour une extensine (GenBank Acc. BQ583860). Les extensines font partie de la famille des "hydroxyproline-rich glycoproteins" (HRGP) qui sont des éléments clés de la structure primaire des parois cellulaires (pour revue, Showalter, 1993 ; Cassab, 1998). Ces protéines basiques sont riches en résidus hydroxyproline et serine dont la plupart sont glycosylés (Wilson and Fry, 1986). De nombreuses protéines à domaine extensine ("extensin-like protein") ont été caractérisées chez les plantes. Elles présentent chacune une expression bien spécifique et très régulée au cours du développement. Ces protéines interviennent généralement dans l'expansion de la paroi cellulaire nécessaire lors de la croissance des tissus (Carpita and Gibeaut, 1993). Certaines sont exprimées spécifiquement dans les racines, lors de l'initiation de la croissance des racines latérales (Keller and Lamb, 1989 ; Vera *et al.*, 1994), ou lors de la morphogenèse et l'élongation des poils racinaires (Bucher *et al.*, 1997 ; Baumberger *et al.*, 2001). Elles peuvent être également induites dans les racines lors de différents stress, comme la blessure (Guzzardi *et al.*, 2004) ou l'infection par les nématodes (Niebel *et al.*, 1993).

Sur cette même hypothèse d'élongation et d'expansion cellulaire occasionnée dans les racines, nous avons également recherché le profil d'expression d'un gène codant pour une expansine (GenBank Acc. BQ586143). Les expansines sont également impliquées dans l'extension des parois cellulaires (pour revue, Cosgrove *et al.*, 2002). Elles participent à leur relâchement en intervenant dans la rupture des liaisons existant entre les différents polymères de cellulose et xyloglucan (Catala, *et al.*, 2000 ; Cosgrove *et al.*, 2002). Les expansines sont nombreuses et très diversifiées, toutes spécifiques d'un organe ou d'un tissu. Elles sont généralement exprimées fortement dans les méristèmes apicaux ou dans les tissus en croissance comme l'hypocotyle, les tiges, les jeunes feuilles et les fleurs, ainsi que dans les fruits en maturation (Reinhardt *et al.*, 1998 ; Caderas *et al.*, 2000 ; Catala *et al.*, 2000). Certaines expansines sont exprimées plus spécifiquement dans les racines. Chez *Glycine max*, le gène *GmEXP1* est exprimé au niveau des zones de division cellulaire et d'élongation des racines primaires et secondaires (Lee *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes *AtEXP7* et *AtEXP18* sont impliqués dans l'initiation et la croissance des poils racinaires, et leur expression est fortement activée par l'éthylène et l'auxine, ou en réponse aux changements de l'environnement (Cho and Cosgrove, 2002). Ces exemples montrent que les expansines sont impliqués dans les mécanismes d'initiation et d'élongation des racines primaires ou secondaires pouvant avoir lieu lors de la prolifération racinaire observée sur betteraves rhizomaniées. De plus, la dérégulation des mécanismes d'action des expansines

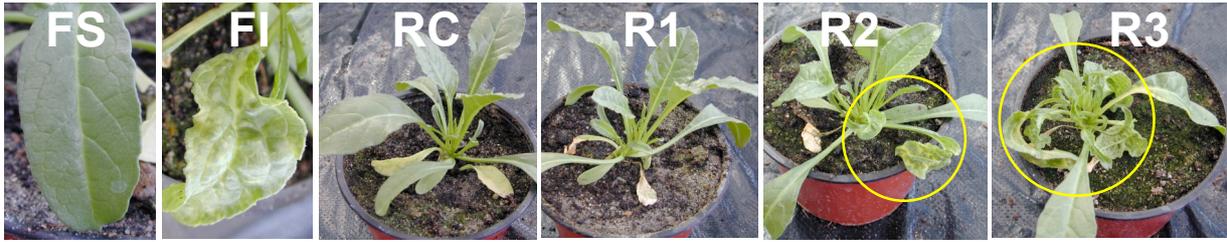
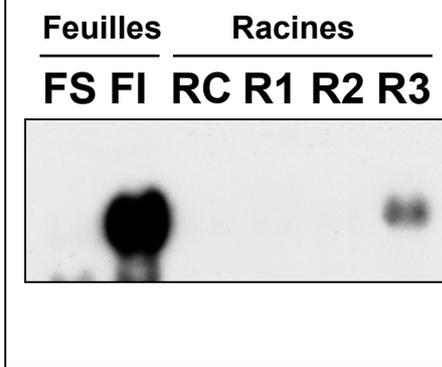
a**b**

Figure I.24 : (a) Comparaison des symptômes foliaires de *Beta macrocarpa* après 13 jours d'infection. Les plantes contrôles infectées par un isolat non systémique du BNYVV (RC) possèdent des feuilles apicales saines (FS). Les plantes infectées par un isolat complet présentent des stades différents d'infection : aucun symptôme (R1), une feuille infectée de manière systémique (R2 et FI), ou l'ensemble des feuilles infectées (R3). (b) Détection par Northern blot de l'ARN 3 du BNYVV dans les racines de *Beta macrocarpa* contrôles (RC) ou infectées (R1, R2, R3). Des quantités similaires d'ARN totaux sont déposées sur gel et analysées par hybridation moléculaire en utilisant une sonde complémentaire à l'extrémité 5' de l'ARN 3 du BNYVV. Les ARN totaux d'une feuille saine (FS) ou infectée (FI) constituent respectivement les témoins négatifs et positifs de l'expérience.

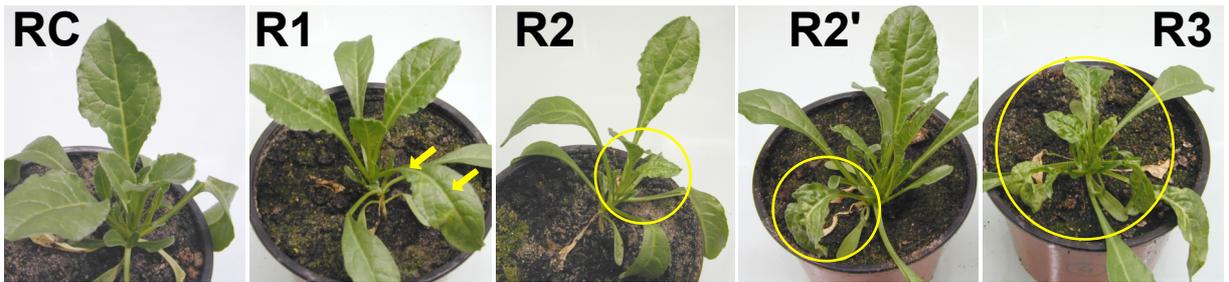
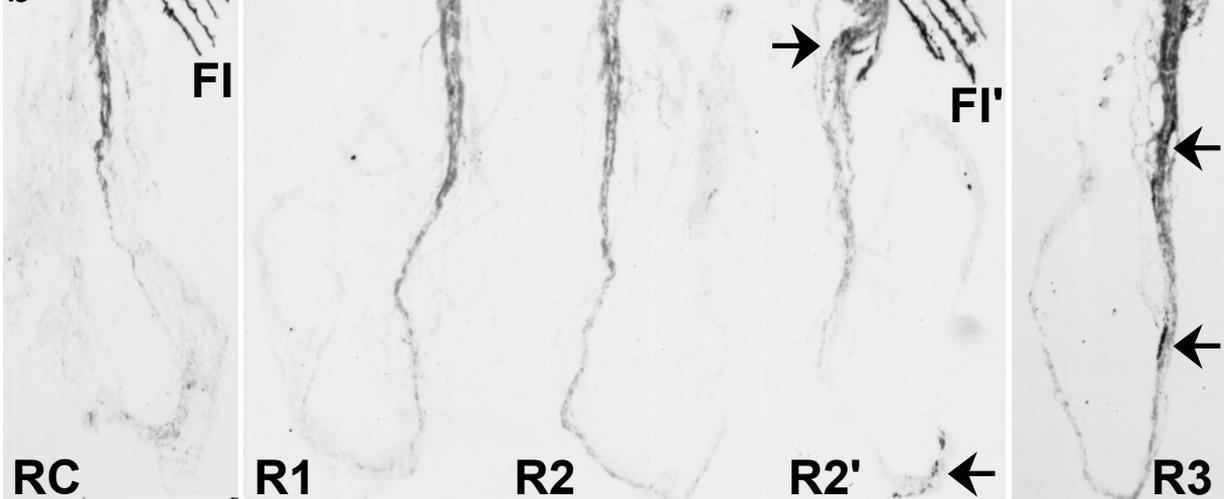
a**b**

Figure I.25 : (a) Comparaison des symptômes foliaires de *Beta macrocarpa* après 13 jours d'infection systémique. Les plantes contrôles infectées par un isolat non systémique du BNYVV (RC) sont comparées aux plantes infectées par un isolat complet induisant différents stades d'infection : des nervures jaunes sur une feuille (R1), une feuille apicale (R2) ou mature (R2') infectées de manière systémique, ou toutes les feuilles apicales infectées (R3). (b) Immuno-empreintes obtenues à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid de BNYVV. Les zones virosées (flèches noires) apparaissent au niveau des racines des plantes qui développent une systémie foliaire avancée (R2' et R3). La fixation aspécifique des anticorps sur les débris cellulaires entraîne un bruit de fond au niveau des racines des plantes contrôles (RC) ou des racines non infectées (R1 et R2). Des empreintes de coupes de feuilles infectées (FI et FI') correspondent aux contrôles positifs en haut à droite des membranes.

conduit à l'inhibition de l'expansion cellulaire et l'apparition des phénotypes de nanisme et de boursoufflement des feuilles, comme dans le cas de l'infection de la tomate par le viroïde PSTVd (Qi and Ding, 2003), phénotypes retrouvés également lors de l'infection de *Beta macrocarpa* par le BNYVV (observations personnelles, R3, figure **I.24a**).

Les analyses par RT-PCR semi quantitative nous ont permis d'observer une induction de l'expression des trois gènes candidats codant pour l'ABP1, une extensine et une expansine, lors de l'infection des racines de betteraves par le BNYVV. Leur taux d'expression augmente significativement dans les plantules après 7 jours d'infection en bioessai (figure **I.23**, rapport B/S de 2,5 à 5,0).

5. Mise en évidence des différences d'expression de gènes candidats au niveau des racines de *Beta macrocarpa* infectées partiellement par le BNYVV

5.1 Infection systémique précoce de racines de *Beta macrocarpa*

L'utilisation au laboratoire de la betterave sauvage (*Beta macrocarpa*), hôte systémique du BNYVV, permet d'obtenir des racines infectées par le virus en s'affranchissant totalement du vecteur *Polymyxa betae* par la simple inoculation d'une feuille par un isolat artificiel contenant l'ARN 1, 2 et 3. En effet, l'ARN 3 est nécessaire au mouvement à longue distance du virus (système) qui gagne les feuilles apicales et les racines (Tamada *et al.*, 1989, Lauber *et al.*, 1998). Cette situation est difficile à obtenir de manière reproductible avec la betterave sucrière (*Beta vulgaris*). Nous avons donc utilisé ce mode d'infection de *Beta macrocarpa*, en mettant au point un système d'analyse cinétique de l'infection racinaire. Nous avons ainsi identifié les zones virosées de celles non virosées présentes sur la même plante à des temps précoces de la systémie, puis recherché les différences d'expression de gènes candidats dans ces deux types de tissus.

La première étape de l'analyse a consisté à rechercher la durée nécessaire à la propagation du BNYVV dans le système racinaire. Pour cela, plusieurs lots de betteraves (*Beta macrocarpa*) ont été inoculées mécaniquement au stade deux feuilles (après 3 à 4 semaines de culture), soit par un isolat constitué des ARN 1 et 2 qui reste restreint à la feuille inoculée et permet d'obtenir des racines contrôles, soit par un isolat contenant les quatre ARN génomiques capable d'infecter l'ensemble de la plante pour obtenir des racines virosées. Ainsi, 13 jours après l'inoculation, plusieurs stades d'infection ont été observés sur ces plantes. Certaines ne présentent aucun signe de systémie (FS et R1, figure **I.24a**) de façon comparable

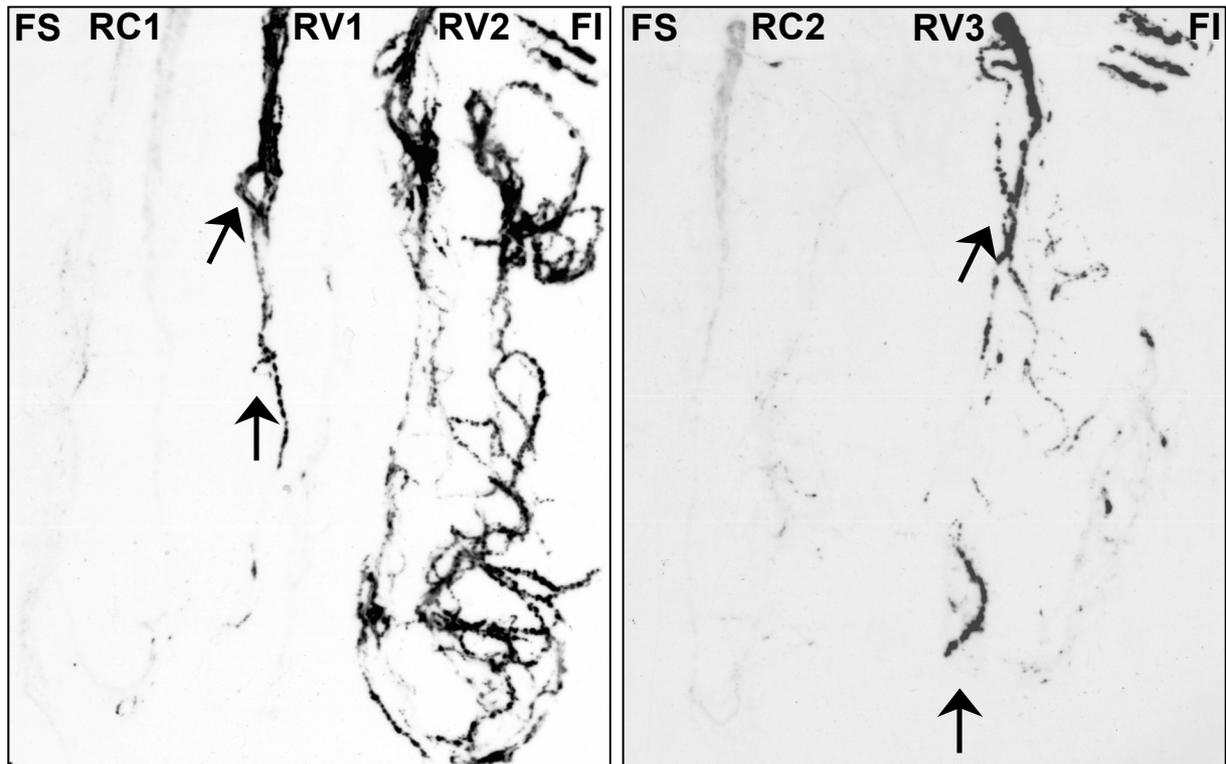


Figure I.26 : Immuno-empreintes obtenues à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid du BNYVV. Les zones infectées par le virus apparaissent en noir au niveau des racines partiellement virosées (RV1 et RV3) (flèches noires) ou totalement infectées (RV2). La fixation aspécifique des anticorps sur les débris cellulaires entraîne un bruit de fond au niveau des racines saines des plantes contrôles (RC1 et RC2). Des empreintes de coupes de feuilles saines (FS) et infectées de manière systémique par le virus (FI) ont été effectuées respectivement comme contrôles négatifs en haut à gauche et contrôles positifs en haut à droite des membranes.

aux plantes contrôles (RC), d'autres au contraire montrent des symptômes de début de systémie sur une seule feuille (R2) devenue crispée, gaufrée, et aux nervures jaunes (FI). Enfin, d'autres plantes apparaissent complètement virosées au niveau des feuilles apicales qui se tordent, se déforment et jaunissent (R3, figure **I.24a**). Une analyse par Northern blot a été effectuée à partir d'ARN totaux de racines de ces plantes. Nous avons pu ainsi détecter la présence de l'ARN 3 du BNYVV seulement dans les racines des plantes montrant une systémie foliaire avancée (R3, figure **I.24b**). En parallèle, j'ai cherché à visualiser par immuno-empreinte la présence de virus dans le système racinaire de plantes aux différents stades d'infection en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine de capsid du BNYVV. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure **I.25**. Le virus est détectable au niveau de zones très restreintes des racines (flèches noires, R2' et R3, figure **I.25b**), lorsque les symptômes systémiques foliaires sont largement étendus (R2' et R3, figure **I.25a**). L'utilisation d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase, ainsi qu'un substrat métabolisé par cette enzyme pour la révélation, explique la présence du bruit de fond sur les empreintes des racines témoins (RC, figure **I.25b**) lié à la libération de peroxydases cellulaires lors de l'écrasement des tissus. Toutefois, l'intensité des signaux permet de discriminer aisément un tissu sain d'un autre virosé. Nous avons donc conclu que l'observation de l'évolution des symptômes foliaires sur les plantes infectées permet de sélectionner celles qui présentent un début d'infection racinaire plus ou moins étendu.

Un criblage par immuno-empreinte a été utilisé pour distinguer les zones infectées par le virus des zones restées "saines" au sein d'une même plante. La figure **I.26** présente deux types de résultats obtenus à partir de plantes récoltées 13 jours après inoculation et présentant les mêmes symptômes foliaires. L'utilisation dans cette expérience d'anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline a considérablement réduit le bruit de fond sur les empreintes des racines contrôles (RC1 et RC2 figure **I.26**). Dans cet exemple, les racines des plantes infectées (RV1, RV2 et RV3, figure **I.26**) sont comparées aux racines de plantes contrôles (RC1 et RC2, figure **I.26**). Les zones virosées qui apparaissent en noir (flèches noires) sont plus ou moins étendues : la racine RV2 est totalement infectée et sans intérêt pour notre étude, alors que les racines RV1 et RV3 ne sont que partiellement virosées et correspondent bien à l'infection partielle recherchée.

5.2. Identification de zones saines et virosées sur une même plante

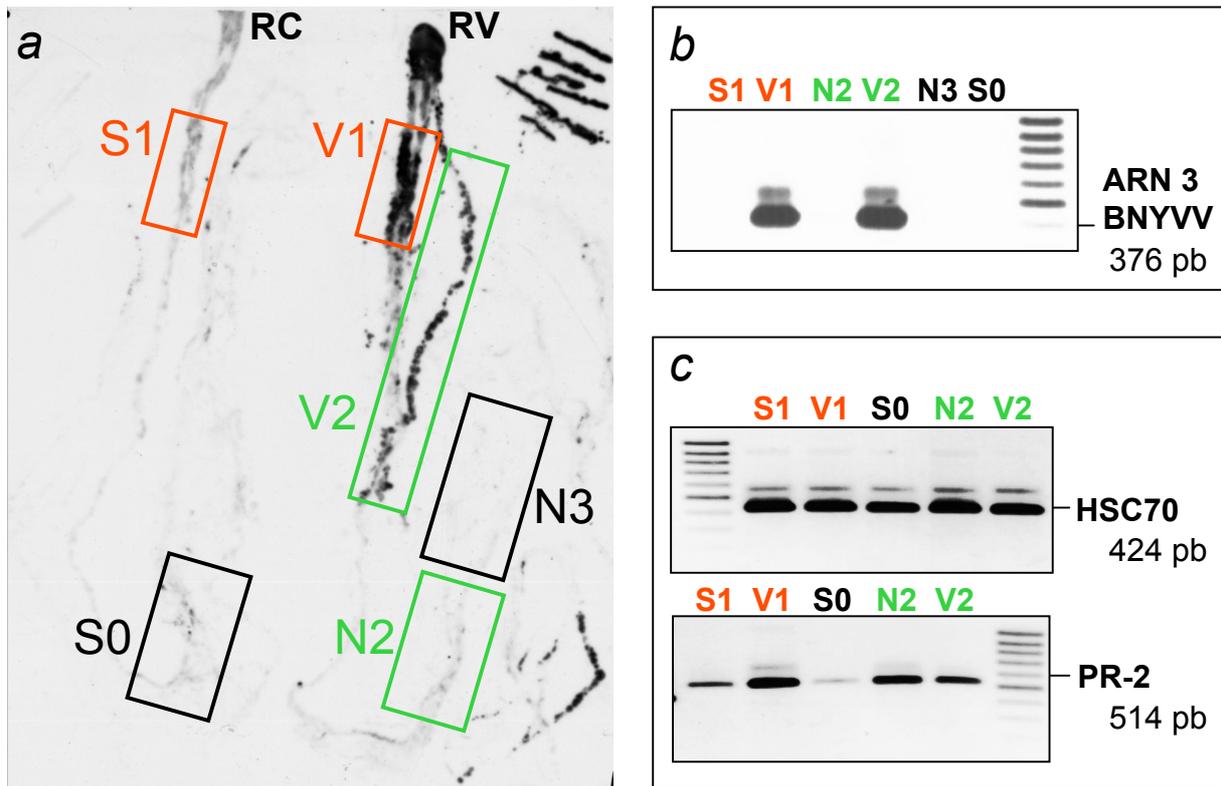


Figure I.27 : (a) Immuno-empreintes obtenues à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid du BNYVV. Les zones infectées par le virus apparaissent en noir. Des zones racinaires saines (S0 et S1) au niveau des racines contrôles (RC), ainsi que des zones apparemment non virosées (N2 et N3) ou virosées (V1 et V2) au niveau des racines partiellement infectées (RV) ont été découpées pour en extraire les ARN. (b) Amplification par RT-PCR d'une séquence de 376 pb correspondant à l'ARN 3 du BNYVV (ARN 3 BNYVV) et confirmant l'infection des radicules (V1 et V2). (c) Détection par RT-PCR des messagers correspondant au candidat HSC70 initialement caractérisé par RFDD-PCR et au gène de la PR-2 de betterave (GenBank Acc. BQ591809). Ces analyses ont été effectuées sur les échantillons d'ARN totaux de radicules de *Beta macrocarpa* identifiés en (a).

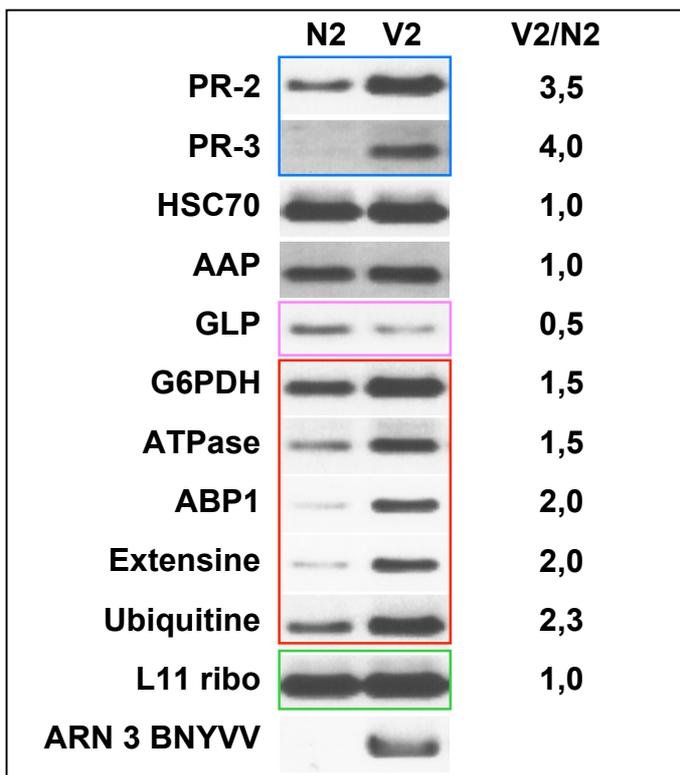


Figure I.28 : Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des gènes candidats HSC70, AAP, GLP, G6PDH, ATPase et Ubiquitine initialement caractérisés par RFDD-PCR, et des gènes ABP1 (GenBank Acc. BQ584486), Extensine (GenBank Acc. BQ583860), PR-2 (GenBank Acc. BQ591809) et PR-3 (GenBank Acc. CF542771). Ces analyses ont été effectuées sur les ARN totaux de radicules de *Beta macrocarpa* non virosées (N2) et virosées (V2) correspondant aux zones racinaires identifiées sur la figure I.27a. Les profils d'expression sont normalisés sur celui du gène codant pour la protéine ribosomique L11 (L11 ribo ; GenBank Acc. BE590348). L'amplification d'une séquence correspondant à l'ARN 3 du BNYVV (ARN 3 BNYVV) confirme l'infection des radicules (V2). Les rapports d'expression V2/N2 indiqués à droite de la figure sont calculés par quantification des signaux obtenus sur gel.

Grâce à l'immuno-empreinte présentée sur la figure **I.27a**, nous avons extrait les ARN totaux provenant de zones saines (S0, S1) de la racine contrôle (RC, figure **I.27a**) et de zones restées apparemment "saines" (N2, N3) ou infectées par le virus (V1, V2) de la racine virosée (RV, figure **I.27a**).

Avant de procéder à l'analyse différentielle des gènes candidats, nous nous sommes assuré que les zones racinaires de la plante infectée qui apparaissent "saines" par immuno-empreinte (N2, N3, figure **I.27a**) n'étaient pas infectées par le virus. Pour cela, nous avons recherché par RT-PCR la présence de l'ARN 3 du BNYVV. Comme attendu, les échantillons V1 et V2 sont infectés (pistes V1 et V2, figure **I.27b**), alors que les échantillons N2 et N3 ne contiennent pas encore d'ARN viral (pistes N2 et N3, figure **I.27b**).

Nous avons ensuite visualisé l'expression des messagers de la protéine HSC70 et de la β -1,3-glucanase (PR-2) dans ces tissus racinaires sains et infectés. Les résultats, présentés sur la figure **I.27c**, ne permettent pas de déceler des variations notables de l'expression du candidat HSC70. A l'inverse, les messagers de la β -1,3-glucanase détectés faiblement dans la plante contrôle (pistes S0 et S1, figure **I.27c**), sont particulièrement induits dans la plante systémique, aussi bien au niveau des zones virosées (pistes V1 et V2, figure **I.27c**) que des zones qui ne sont pas encore touchées par l'infection virale (piste N2, figure **I.27c**). Cette surexpression de la β -1,3-glucanase dans les tissus environnant les zones infectées par le virus a également été observée dans les coupes de racines de betteraves *Beta vulgaris* rhizomaniées (Burketova *et al.*, 2003). Elle traduit l'induction systémique des mécanismes de défense de type SAR dans l'ensemble du système racinaire avant même l'extension de la virose.

Nous avons poursuivi l'étude de l'expression des candidats identifiés par RFDD-PCR dans les échantillons non virosés (N2) et virosés (V2). En effet, ces échantillons représentent un matériel biologique de choix pour étudier l'induction précoce des gènes d'une même plante lors des premières étapes de multiplication du virus dans les radicules.

5.3. Analyse de l'expression des gènes candidats par RT-PCR semi-quantitative

Les analyses par RT-PCR semi quantitative ont été effectuées sur les ARN totaux de radicules "saines" N2 et virosées V2 (figure **I.28**), en équilibrant les échantillons de manière à visualiser une expression stable des messagers codant pour la protéine ribosomique L11 (cadre vert, figure **I.28**). Comme précédemment, nous avons recherché la présence de l'ARN 3 du BNYVV comme témoin positif. Celui-ci est uniquement amplifié à partir des radicules virosées (ARN3 BNYVV, figure **I.28**).

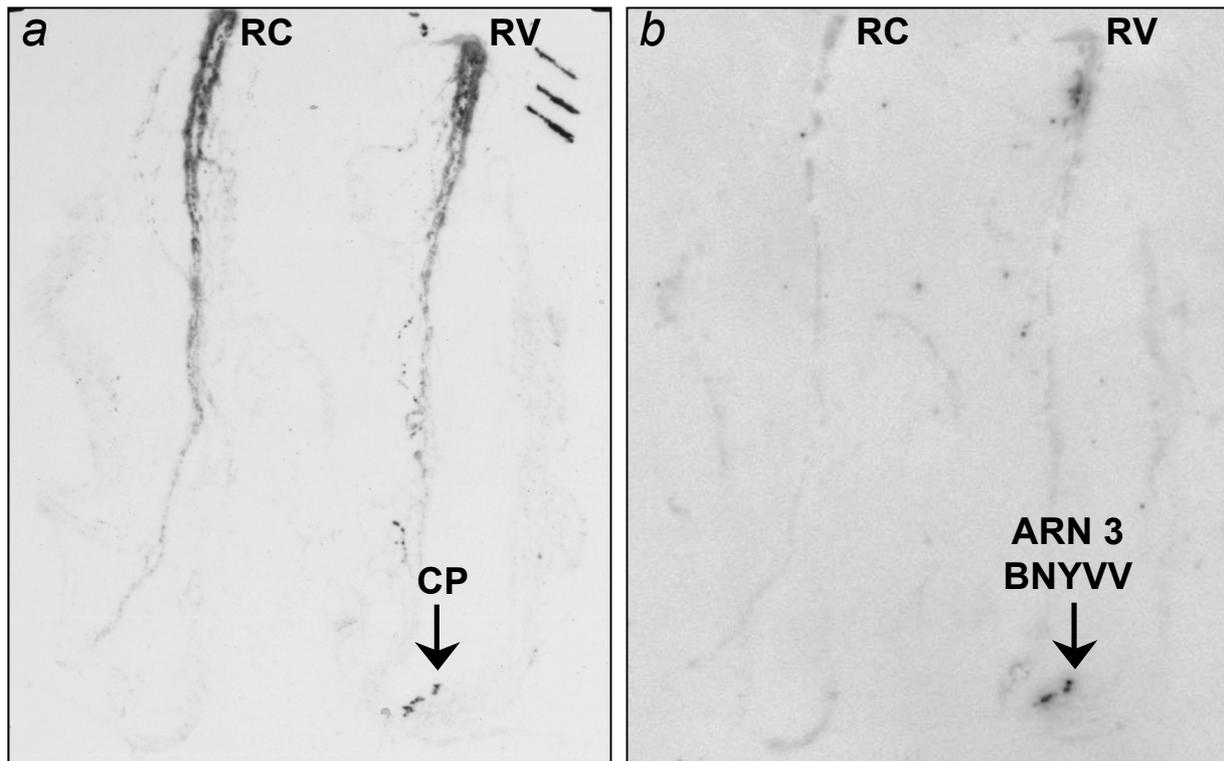


Figure I.29 : Co-localisation des zones d'infection du BNYVV avec les zones de réplication de l'ARN 3 du virus au niveau d'empreintes racinaires identiques effectuées à partir d'une plante saine contrôlée (RC) et d'une plante partiellement infectée par le virus (RV). (a) Immuno-empreintes obtenues sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid (CP) du BNYVV. (b) Détection de l'ARN 3 du BNYVV par hybridation moléculaire sur membrane de nylon en utilisant une sonde ciblant une séquence de 645 pb spécifique de l'ARN 3 du virus. Les flèches indiquent les zones révélées par les anticorps ou la sonde.

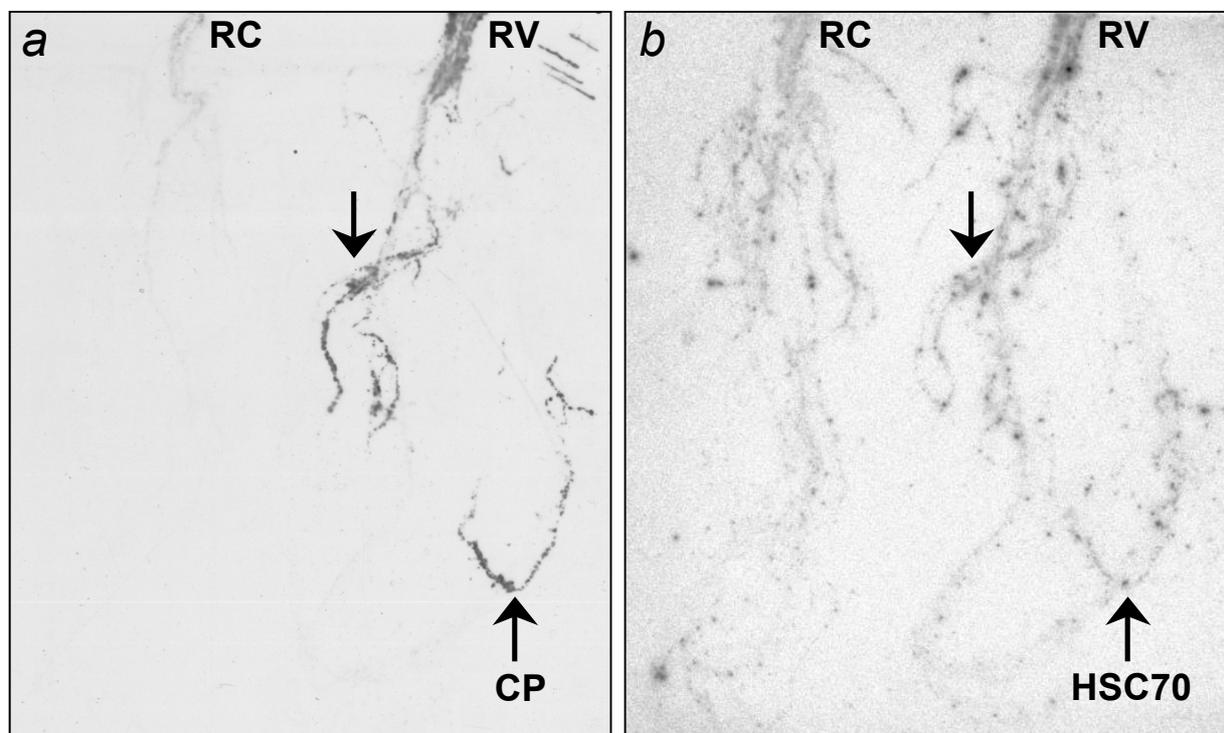


Figure I.30 : Co-localisation des zones d'infection du BNYVV avec les zones de surexpression du candidat HSC70 au niveau d'empreintes racinaires identiques effectuées à partir d'une plante saine contrôlée (RC) et d'une plante partiellement infectée par le virus (RV). (a) Immuno-empreintes obtenues sur membrane de nitrocellulose à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid (CP) du BNYVV. (b) Détection des messagers du gène candidat HSC70 par hybridation moléculaire sur membrane de nylon en utilisant une sonde ciblant la séquence 18V21 identifiée par RFDD-PCR. Les flèches indiquent les zones révélées par les anticorps ou la sonde.

Les amorces spécifiques des gènes candidats caractérisés chez *Beta vulgaris* permettent d'amplifier les mêmes gènes chez *Beta macrocarpa*, à l'exception de la séquence codante de l'expansine qui n'a pas pu être détectée sur gel (non montré). L'expression différentielle des messagers des gènes candidats HSC70, AAP, GLP, G6PDH, H+ATPase, celui de l'ubiquitine (similaire à la polyubiquitine), ABP1, et celui de l'extensine, a ensuite été visualisée et quantifiée, tout comme celle des messagers des protéines PR-2 et PR-3.

L'expression de ces protéines PR est induite dans les deux types de tissus racinaires de la même plante (cadre bleu, figure **I.28**). L'expression de la protéine PR-2 est détectée dans les tissus "sains" mais augmente sensiblement dans les tissus véritablement virosés (figure **I.28**, rapport V2/N2 de 3,5). L'expression de la PR-3 est extrêmement faible dans les radicelles non virosées et est fortement activée dans les radicelles atteintes par le virus (figure **I.28**, rapport V2/N2 de 4,0). Cette chitinase de betterave semble être fortement exprimée au niveau des zones de contact avec le pathogène et très peu activée de façon systémique. Ce résultat est en accord avec les observations effectuées sur feuilles infectées par *Cercospora beticola* (Nielsen *et al.*, 1996).

Nous avons pu observer l'activation des gènes candidats G6PDH, H+ATPase, ABP1, ainsi que ceux de l'extensine et de l'ubiquitine, lors de l'infection par le BNYVV (cadre rouge, figure **I.28**). Leur expression augmente d'un facteur de 1,5 à 2,3 dans les tissus virosés par rapport aux tissus "sains" (figure **I.28**, rapports V2/N2). Cependant, ces valeurs restent inférieures à celles des messagers des protéines de type PR. A l'inverse, nous avons mis en évidence une diminution du taux d'expression du gène de la GLP (cadre rose, figure **I.28**), un gène dont l'expression est pourtant induite dans les betteraves infectées en bioessai (figure **I.23**). Enfin, aucune différence d'expression n'a été détectée pour les gènes de l'HSC70 et de l'AAP (figure **I.28**, rapport V2/N2 de 1,0).

L'analyse simultanée d'une empreinte de racines par immuno-localisation sur membrane de nitrocellulose, et par hybridation moléculaire sur membrane de nylon, nous a permis de co-localiser la présence du BNYVV (figure **I.29a**) avec l'ARN 3 du virus (figure **I.29b**). Une analyse similaire a été effectuée pour co-localiser la présence du virus (figure **I.30a**) avec les messagers du gène HSC70 (figure **I.30b**). Nous n'avons pas pu co-localiser avec certitude une expression préférentielle du gène HSC70 avec les sites d'infection virale (flèches noires, figure **I.30b**). Cependant, l'expression du gène HSC70 qui est constitutive dans les racines saines (RC, figure **I.30b**), semble légèrement activée dans les racines

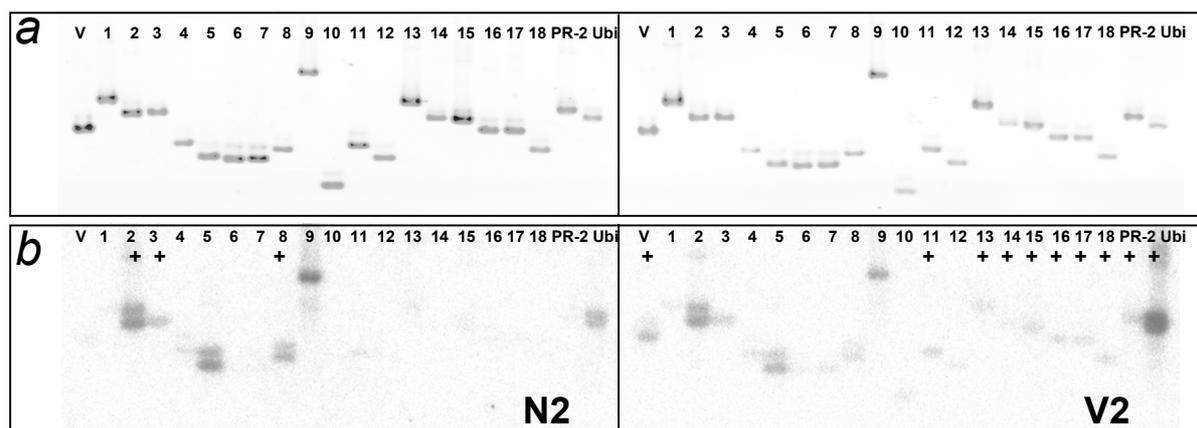


Figure I.31 : (a) Visualisation des fragments ADNc candidats amplifiés par PCR et déposés en double sur gel exposé aux UV. L'observation du gel avant transfert sur membrane renseigne sur la qualité des échantillons et sur les quantités déposées. (b) Détection par Northern inverse des taux d'expression des messagers correspondant aux ADNc candidats dans les radicelles non virosées ou virosées prélevées sur la même plante *Beta macrocarpa* infectée partiellement (figure I.27a). Les mêmes quantités d'ARN totaux (5 µg) de radicelles non virosées (N2) ou virosées (V2) servent de matrices pour la synthèse des ADNc radiomarqués utilisés comme sondes dans ces deux expériences. Les différences de signaux entre les échantillons (N2) et (V2) sont indiquées par les signes (+). La séquence (V) (contrôle virus) correspond à une partie de l'ARN 2 du BNYVV. Les séquences (PR-2) et (Ubi) correspondent respectivement au gène de la protéine PR-2 (GenBank Acc. BQ591809) et au gène de l'ubiquitine (GenBank Acc. BQ583989) de betterave.

N°	RFDD	S	A2	A4	Séquence	TBLASTX	N2/d	V2/d	V2/N2
V	4A		X		18V41	BNYVV RNA 2	1.30	28.8	22.50
PR-2						Beta vulgaris beta-1,3-glucanase (PR-2)	14.80	43.7	2.95
Ubi						Beta vulgaris ubiquitine (Ubi)	433.20	646.80	1.49
1	1A		X	X	18V15	Arabidopsis thaliana putative glyoxalase I	4.60	2.30	0.51
2	2A			X	18V21	cytosolic heat shock 70 protein	234.80	127.10	0.54
3					18V25	Phospholipase D	67.10	23.90	0.36
4	5A		X	X	18V56	Glutathione S-transferase(GST)	52.90	49.70	0.94
5	6A			X	18V61	Beta vulgaris mitochondrial genomic DNA	4.90	88.80	18.06
6					18V62	Geobacillus stearothermophilus (Bacteria)	13.70	2.90	0.21
7					18V63	Pseudomonas fluorescens Pf-5, complete genome	126.6	4.30	0.03
8	7A	X			19S12	Orpinomyces sp. OUS1 partial 18S rRNA gene	538.30	36.50	0.07
9					19S13	Glaucocystis nostochinearum 26S ribosomal RNA	16.40	67.60	4.11
10	8A		X	X	19V12	No significant similarity	21.00	12.90	0.61
11	13A		X	X	19V65	Polyubiquitin	11.40	23.40	2.06
12	14A			X	19V72	Dechloromonas aromatica RCB, complete genome	22.00	3.50	0.16
13	17A		X	X	20V16	Rhizobium gallicum 23S ribosomal RNA gene	5.40	8.80	1.62
14	18A			X	20V21	Putative amino acid permease	5.50	15.30	2.80
15					20V26	Oryza sativa genomic DNA, chrom12	8.20	21.90	2.66
16	19A		X		20V34	Arabidopsis thaliana hypothetical protein	3.60	15.40	4.29
17					20V36	Plasma membrane H+-ATPase	4.70	22.50	4.76
18	20A		X	X	20V46	No significant similarity	5.90	38.80	6.60

Tableau I.5 : Récapitulatif des différences d'expression visualisées par Northern inverse concernant les fragments ADNc initialement caractérisés par RFDD-PCR. Les deux premières colonnes représentent le numéro de séquence utilisé en Northern inverse (figure I.31) puis celui identifiant les bandes sur gel RFDD-PCR (figure I.14). Les colonnes suivantes récapitulent le profil d'expression obtenu par RFDD-PCR (dans les plantes saines S ou infectées A2 et A4), ainsi que les identités de séquences (colonne TBLASTX). Les séquences montrant des fonctions putatives intéressantes sont présentées en jaune lorsque celles-ci sont mêlées à des séquences virales, ou en rose lorsqu'elles sont identifiées sans séquence virale contaminante. Les différences d'expression visualisées par Northern inverse en utilisant les ARN totaux de radicelles de *Beta macrocarpa* non infectées (N2) et infectées (B) sont présentées à droite du tableau. La quantification des signaux a permis d'estimer les taux normalisés d'expression (N2/d et V2/d) ainsi que les différences d'expression (V2/N2). Les résultats contraires à ceux obtenus par RFDD-PCR sont présentés en gris. Les résultats confirmant ceux obtenus par RFDD-PCR sont présentés en jaune ou rose pour les séquences montrant des fonctions putatives intéressantes.

infectées (RV, figure **I.30b**). Nous avons donc conclu que les faibles variations d'expression du gène HSC70, si elles existent, sont difficilement détectables par cette approche.

5.4. Analyse de l'expression différentielle par Northern inverse

Une analyse de l'expression de 18 candidats identifiés par RFDD-PCR a été réalisée par Northern inverse en utilisant les ARN totaux de racines non virosées N2 et virosées V2 de *Beta macrocarpa* (figure **I.31**). Comme précédemment, nous avons utilisé le témoin positif spécifique de l'ARN 2 du BNYVV (V, figure **I.31**), et les deux séquences des gènes PR-2 et ubiquitine comme témoins de l'activation des gènes dans les tissus infectés par le BNYVV (PR-2 et ubi, figure **I.31**). La quantification de l'ADN déposé sur membrane (figure **I.31a**) et des signaux radioactifs obtenus (figure **I.31b**) nous a permis d'estimer les taux normalisés d'expression des candidats dans les racines "saines" (colonne N2/d, tableau **I.5**) ou infectées (colonne V2/d, tableau **I.5**), et le quotient d'expression (colonne V2/N2, tableau **I.5**). Nous pouvons constater que le témoin (V) est très faiblement détecté dans les racines non virosées (rapport N2/d de 1,3, tableau **I.5**) et largement représenté dans les racines infectées (rapport V2/d de 28,8). De plus, nous retrouvons dans les racines infectées une activation de l'expression de la PR-2 (rapport V2/N2 de 3) et de l'ubiquitine (rapport V2/N2 de 1,5) observée précédemment par RT-PCR semi-quantitative.

L'analyse de l'expression différentielle des 18 candidats (figure **I.31**, tableau **I.5**) révèle des variations d'expression qui traduisent la répression d'un certain nombre de gènes dans les zones racinaires infectées (tableau **I.5**, cases grises, rapports V2/N2 de 0,03 à 0,54). C'est le cas des gènes candidats portant les fonctions putatives de glyoxalase I (18V15 au n°1), de protéine HSC70 (18V21 au n° 2), de PLD (18V25 au n°3), et de GST (18V56 au n°4), ou de séquences d'origine non végétale (*Geobacillus stearothermophilus* au n°6, *Pseudomonas fluorescens* au n°7, ou *Dechloromonas aromatica* au n°12, tableau **I.5**).

D'autres candidats présentent une expression activée dans les zones infectées (tableau **I.5**, cases blanches, jaunes, roses, rapports V2/N2 de 1,6 à 18). Certains portent des fonctions peu informatives, comme les séquences 19S13 au n°9 ("*Glaucocystis nostochinearum* 26s rRNA") ou 20 V16 au n°13 ("*Rhizobium gallicum* 23s rRNA"). D'autres correspondent à des séquences potentiellement intéressantes mais de fonction inconnue, comme les séquences 18V61 au n°5 ("*Beta vulgaris* mitochondrial genomic DNA"), 20V26 au n°15 ("*Oryza sativa* genomic DNA"), 20V34 au n°16 ("*Arabidopsis thaliana* hypothetical protein"), 20V46 au n°18 (inconnue), ou correspondent aux candidats portant les fonctions de polyubiquitine

(19V65 au n°11), d'AAP (20V21 au n° 14), et de pompe H+ATPase (20V36 au n°17 ; tableau **I.5**, colonne B/S, cases jaunes et roses).

La synthèse des résultats obtenus à l'aide des différentes approches (tableau **I.6**) met en évidence l'activation systématique des gènes codant pour les protéines PR-2 et PR-3, l'ABP1, l'extensine, l'ubiquitine et la polyubiquitine de séquence proche, la pompe H+ATPase, et la G6PDH, mais aussi de séquences ribosomiques ("*Glaucocystis nostochinearum* 26s rRNA" ou "*Rhizobium gallicum*" 23s rRNA"), ainsi que d'autres séquences moins informatives ("*Beta vulgaris* mitochondrial genomic DNA", "*Arabidopsis thaliana* hypothetical protein", ou la séquence 20V46). L'expression différentielle des autres candidats paraît modulée d'une part en fonction de l'approche utilisée pour visualiser ces expressions (Northern, Northern inverse ou RT-PCR), et d'autre part en fonction des plantes hôtes (*Beta vulgaris* ou *Beta macrocarpa*) et du stade de développement de ces plantes.

6. Discussion

Pour étudier les mécanismes moléculaires responsables de la prolifération racinaire observée sur betteraves rhizomaniées, nous avons initié la recherche de gènes induits ou réprimés sur un modèle qui reproduit les conditions d'infection réelles en champs. Pour cela, des betteraves (*Beta vulgaris*) ont été cultivées en présence du vecteur *Polymyxa betae* avirulifère ou virulifère, puis les racines ont été récoltées et analysées après deux mois d'infection. La première méthode DDRT-PCR choisie pour effectuer la comparaison des transcriptomes des racines saines et infectées a conduit à la caractérisation de séquences d'ADNc représentant des messagers différentiellement exprimés. Ces séquences qui correspondent uniquement à la partie 3' terminale des messagers se sont révélées non informatives. Nous avons donc opté pour la technique RFDD-PCR fournissant des séquences internes aux messagers et donc plus informatives sur la fonction des gènes.

Les difficultés rencontrées lors des tentatives de confirmation de l'expression des gènes candidats par hybridation moléculaire nous ont révélé l'une des faiblesses majeures de notre système d'étude. L'analyse de la globalité du système racinaire, présentant les symptômes caractéristiques de prolifération des radicelles après deux mois d'infection, consiste en fait à étudier la maladie à des stades tardifs de l'infection où les événements de différenciation racinaire sont dans leur quasi-totalité révolus. Les faibles variations du transcriptome induites encore dans ces plantes et détectées par RFDD-PCR correspondent à des événements bien réels, mais difficilement détectables par d'autres méthodes. Ces

RFDD	S	A2	A4	Séquence	TBLASTX	a		b				c						
						<i>B. vulgaris</i> S/A4		North inv		<i>B. vulgaris</i> bioessai S/B			rt-pcr		Northern inverse		rt-pcr	
						S	A4	S	A4	S/d	B/d	B/S	B/S	N2/d	V2/d	V2/N2	V2/N2	
					Beta vulgaris basic Beta-1,3-galactanase (PR-2) (BQ591809)					0	6.72	+++	2.5	14.8	43.7	2.95	3.5	
					Beta vulgaris basic class IV Chitinase (PR-3) (CF542771)								2.7				4.0	
					Beta vulgaris Ubiquitin (Ubi) (BQ583989)					35.53	53.30	1.5	1.3	433.2	646.8	1.49	2.3	
					Beta vulgaris auxin binding protein 1 (BQ584486)								2.5				2.0	
					Beta vulgaris putativ expansin (BQ583860)								2.5				2.0	
					Beta vulgaris putativ expansin (BQ586143)								5					
1A		X	X	18V15	Arabidopsis thaliana putative glyoxalase I			o	o	0	0.1	+		4.6	2.3	0.51		
2A			X	18V21	cytosolic heat shock 70 protein	x	x	xx	x	1.02	2.03	1.98	1	234.8	127.1	0.54	1	
				18V25	Phospholipase D	o	o			0.55	4.86	8.9		67.1	23.9	0.36		
5A		X	X	18V56	Glutathione S-transferase(GST)			x	xx	0	0.39	+		52.9	49.7	0.94		
6A			X	18V61	Beta vulgaris mitochondrial genomic DNA			o	x	1.64	6.24	3.79		4.9	88.8	18.06		
				18V62	Geobacillus stearothermophilus (Bacteria)			o	o	0	0.09	+		13.7	2.9	0.21		
				18V63	Pseudomonas fluorescens Pf-5, complete genome			x	xx	0	0.10	+		126.6	4.3	0.03		
7A	X			19S12	Orpinomyces sp. OUS1 partial 18S rRNA gene			o	o	0.25	4.4	17.36		538.3	36.5	0.07		
				19S13	Glaucocystis nostochinearum 26S ribosomal RNA			o	x	1.89	5.59	2.96		16.4	67.6	4.11		
8A		X	X	19V12	No significant similarity			o	x	0	0	ND		21.0	12.9	0.61		
13A		X	X	19V65	Polyubiquitin			x	xx	0.74	2.41	3.24	1.3	11.4	23.4	2.06	2.3	
14A			X	19V72	Dechloromonas aromatica RCB, complete genome			x	x	2.94	38.65	13.14		22.0	3.5	0.16		
17A		X	X	20V16	Rhizobium gallicum 23S ribosomal RNA gene			o	o	0.13	2.23	17.01		5.4	8.8	1.62		
18A			X	20V21	Putative amino acid permease	o	o	o	o	0	1.56	+	0.2	5.5	15.3	2.80	1	
				20V26	Oryza sativa genomic DNA, chrom12			x	o	0.29	3.72	12.64		8.2	21.9	2.66		
19A		X		20V34	Arabidopsis thaliana mRNA for hypothetical protein			o	x	0	3.96	++		3.6	15.4	4.29		
				20V36	Plasma membrane H+-ATPase			o	o	0	8.64	++	1.3	4.7	22.5	4.76	1.5	
20A		X	X	20V46	No significant similarity			o	x	0.12	5.1	41.46		5.9	38.8	6.60		
5B			X	25V51	Carbamoyl phosphate synthetase large chain (CARB)			o	o									
				25V55	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase			o	o									
7B	XX	X		25V75	3-deoxy-D-arabino heptulosonate-7-phosphate synthase	x	x	xxx	x									
9B			X	26V12	Germin-like protein (GLP2)	x	xx	x	xx				1.8				0.5	
				26V13	Lettuce big-vein virus LBVV-pol gene for L protein			o	o									
11B		X		26V31	H.catenoides gene for 28S ribosomal RNA			o	x									
12B		X	X	26V46	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PD)			x	x				2.0				1.5	
13B			X	26V52	Maytenus fournieri 26S ribosomal RNA gene			o	o									
16B			X	27V21	Staphylococcus aureus phage phi 13, complete genome			o	x									
				27V24	Bordetella bronchiseptica complete genome			o	x									
				27V26	Beta vulgaris partial mRNA for peroxidase (per2 gene)			o	x									
17B		X	X	27V31	Trypanosoma cruzi microtubule-associated protein gene			o	x									
				27V33	No significant similarity			o	o									
				27V36	No significant similarity			o	o									
18B		X	X	27V42	No significant similarity			o	o									
				27V44	No significant similarity			o	o									
19B		X		27V51	Trimenia moorei 26S ribosomal RNA gene			o	o									
				27V52	Verrucomicrobium spinosum 23S ribosomal RNA gene			o	o									
20B		X		27V61	Medusagyne oppositifolia 26S ribosomal RNA gene			o	o									
				27V62	Threonine aldolase family protein			o	o									
1C		X		22V12	Unidentified eukaryote 18S ribosomal RNA			o	o									
3C		X	X	23V11	Zinc finger (DHC type) family protein			o	o									
				23V13	No significant similarity			o	o									
				23V16	No significant similarity			o	o									
4C		X	X	23V21	Drosophila melanogaster mRNA			o	o									
				23V22	Beta vulgaris pal gene for phenylalanine ammonia lyase			x	x									
				23V24	Arabidopsis thaliana U2 snRNP auxiliary factor			o	o									
12C	X			24S21	Xanthorhiza simplicissima 26S ribosomal RNA gene			o	o									
				24S22	Beta vulgaris BvMS1 mRNA for methionine synthase			o	o									
				24S23	Sorghum bicolor putative fatty acid desaturase mRNA			x	xx									
				24S24	Phytolacca dioica 26S ribosomal RNA gene			o	o									
10C			X	24V31	Nicotiana tabacum mitochondrial DNA			x	xx									

Tableau I.6 : Récapitulatif des différences d'expression des fragments ADNc initialement caractérisés par RFDD-PCR. Le numéro figurant dans la première colonne correspond à celui identifiant les bandes sur gel RFDD-PCR (voir figure I.14). Les colonnes suivantes récapitulent le profil d'expression obtenu par RFDD-PCR (dans les plantes saines S ou infectées A2 et A4), ainsi que les identités de séquences (colonne TBLASTX). Les séquences montrant des fonctions putatives intéressantes sont présentées en jaune lorsque celles-ci sont mêlées à des séquences virales, ou en rose lorsqu'elles sont identifiées sans séquence virale contaminante. Les résultats obtenus par Northern, Northern inverse et RT-PCR semi-quantitative sont présentés à droite du tableau. (a) Estimation des différences d'expression observées dans les racines de *Beta vulgaris* saines (S et SpolyA) et infectées (A4 et A4polyA) (figures I.15 et I.17.). (b) Quantification des taux d'expression observés dans les racines de *Beta vulgaris* saines (S) et infectées (B) en bioessai (figure I.22 et I.23). (c) Quantification des taux d'expression observés dans les radicules de *Beta macrocarpa* non infectées (N2) et infectées (V2) (figures I.28 et I.31). Les résultats contraires à ceux obtenus par RFDD-PCR sont présentés en gris. Les résultats confirmant ceux obtenus par RFDD-PCR sont présentés en jaune ou rose pour les séquences montrant des fonctions putatives intéressantes.

différences d'expression se retrouvent, en effet, minimisées par rapport à l'expression constante des autres messagers cellulaires les plus représentés dans les systèmes racinaires analysés dans leur globalité.

Pour contourner ce problème, nous avons recherché les différences d'expression des gènes candidats à des stades plus précoces de l'infection. Nous avons utilisé dans un premier temps le système d'infection standardisé de l'entreprise SESVanderHave. Ce système de bioessai a consisté à repiquer des plantules de betteraves (*Beta vulgaris*) de 7 jours dans un sable contenant le vecteur avirulifère ou virulifère, puis analyser les racines après 7, 14, ou 21 jours d'infection. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé un autre modèle d'étude, où des betteraves sauvages *Beta macrocarpa* âgées de 3 à 4 semaines ont été inoculées par les feuilles. Après mise en place de la systémie (13 jours), les racines ont été analysées. Ce système, qui s'affranchit totalement du vecteur, nous a donné la possibilité de sélectionner très précisément des tissus racinaires restés "sains" ou virosés sur une même plante, et ainsi analyser des différences d'expression très localisées sur une même plante.

Nous avons étudié en détail le profil d'expression des gènes candidats identifiés par RFDD-PCR dans ces deux derniers modèles. Nous avons également recherché l'expression d'un certain nombre de gènes candidats comme l'ABP1, une extensine et une expansine. Les modifications de l'expression de ces candidats ont pu être caractérisées dans d'autres systèmes biologiques et sont reliées à des particularités phénotypiques qui se rapprochent des symptômes foliaires et/ou racinaires observés sur betteraves infectées. L'ensemble des résultats synthétisés dans le tableau **I.6** révèle l'activation d'une partie des gènes candidats identifiés par RFDD-PCR. Cette activation est retrouvée, quelque soit le modèle d'étude, sur *Beta vulgaris* ou *Beta macrocarpa*. Il s'agit des gènes codant pour l'ubiquitine, une pompe H⁺-ATPase et la G6PDH identifiés par RFDD-PCR, les gènes candidats codant pour l'ABP1 et l'extensine, tous deux impliqués dans les mécanismes de différenciation et d'élongation cellulaire, ainsi que des séquences de fonction indéterminée. L'activation systématique de ces gènes laisse penser qu'ils ont une réelle signification biologique. Leur étude approfondie, comprenant la caractérisation de leur séquence complète et l'identification des promoteurs, permettra à terme de confirmer leur rôle dans l'établissement des symptômes sur betteraves.

D'autres gènes présentent un profil d'expression variable selon la plante hôte utilisée (*Beta vulgaris* ou *Beta macrocarpa*) et le stade d'infection considéré (infection très précoce ou plus tardive). C'est le cas par exemple du gène candidat codant pour la "germin-like" (GLP) qui est surexprimé dans les racines de betteraves (*Beta vulgaris*) aussi bien après deux mois

d'infection en serre (tableau **I.6a**) qu'après sept jours d'infection en bioessai (tableau **I.6b**), mais l'expression de son message est réprimée dans les radicules de *Beta macrocarpa* (tableau **I.6c**).

Il ne faut pas oublier que l'expression d'un gène est régulée par de nombreux facteurs internes ou environnementaux. Cette expression est régulée tout au long du développement et de façon très spécifique, tant au niveau tissulaire que cellulaire. Elle est également fortement modulée en réponse à des changements de l'environnement ou à des stress biotiques ou abiotiques tels que l'infection virale. Ainsi, il est difficile et délicat de réaliser une comparaison des résultats obtenus à l'aide des trois approches décrites ci-dessus. En effet, les trois modèles d'étude utilisent des plantes à des stades différents de croissance et d'infection (deux mois d'infection en serre, ou 7 à 21 jours d'infection en bioessai), ou des plantes d'origine différente (*Beta vulgaris* ou *Beta macrocarpa*). Cependant, chacun de ces systèmes d'infection apporte une contribution différente à la compréhension des mécanismes induits par l'infection virale. Les variations d'expression visualisées peuvent nous renseigner sur le rôle potentiel de chaque gène à des stades précoces, tardifs, voire très tardifs, de la rhizomanie.

Les difficultés de standardisation des croissances et des infections des betteraves, mais aussi des analyses par hybridation moléculaire, nous ont conduit à utiliser une approche par transgénèse. Nous avons envisagé alors la recherche des gènes induits et réprimés non pas en réponse à l'infection virale, mais en réponse à l'expression constitutive de la protéine p25 du BNYVV responsable des symptômes foliaires et racinaires (Jupin *et al.*, 1992 ; Tamada *et al.*, 1999). Ce travail de transgénèse a consisté à exprimer la protéine p25 sous contrôle du promoteur 35S du CaMV dans deux plantes, l'une hôte (*Beta vulgaris*), et l'autre non hôte (*Arabidopsis thaliana*), afin de visualiser l'effet de son expression, hors contexte viral, sur le phénotype foliaire et racinaire, voire le développement de ces plantes. Si *Arabidopsis* n'est pas hôte du BNYVV, cette plante modèle présente néanmoins l'énorme avantage de pouvoir envisager l'étude globale et standardisée de son transcriptome par "cDNA microarray". Cette étude par transgénèse est abordée dans le chapitre II.

CHAPITRE II

**ETUDE DU ROLE DE LA PROTEINE P25 DU BNYVV DANS
LE DEVELOPPEMENT DES SYMPTOMES SUR PLANTES :**

**CARACTERISATION D'*ARABIDOPSIS* TRANSGENIQUES
EXPRIMANT CONSTITUTIVEMENT LA PROTEINE P25**



CHAPITRE II

ETUDE DU ROLE DE LA PROTEINE P25 DU BNYVV DANS LE DEVELOPPEMENT DES SYMPTOMES SUR PLANTES :

CARACTERISATION D'*ARABIDOPSIS* TRANSGENIQUES EXPRIMANT CONSTITUTIVEMENT LA PROTEINE P25

1. Introduction : les différentes caractéristiques de la protéine p25 du BNYVV

La protéine p25 codée par l'ARN 3 du BNYVV est un facteur de virulence et de pathogénicité du virus qui est responsable des symptômes foliaires et racinaires observés sur plantes hôtes. Cette protéine a été très étudiée dans notre laboratoire pour élucider ses principales propriétés cellulaires.

1.1. Rôle de la protéine p25 dans la symptomatologie foliaire et racinaire

L'ARN 3 du BNYVV n'est pas obligatoire pour la réplication du virus mais est responsable de la symptomatologie foliaire observée sur plantes hôtes (Quillet *et al.*, 1989, Tamada *et al.*, 1989). En effet, l'inoculation de feuilles de *Chenopodium quinoa* par un isolat viral artificiel constitué des ARN 1 et 2 seuls induit six jours après l'infection l'apparition de lésions chlorotiques vertes, alors qu'un inoculum renfermant l'ARN 3 complet associé aux ARN 1 et 2 du BNYVV produit des lésions chlorotiques jaunes (figure II.1). Cette aggravation des symptômes est liée à l'expression de la protéine p25. Des études de mutagenèse dirigée (délétions et mutations ponctuelles) ont montré que des formes mutées de l'ARN 3 incapables de diriger la synthèse de la protéine p25 induisent des symptômes comparables à ceux produits par les ARN 1 et 2 seuls sur *C. quinoa* (Jupin *et al.*, 1992, Vetter *et al.*, 2004). Cette situation est retrouvée chez d'autres plantes hôtes comme *Beta*

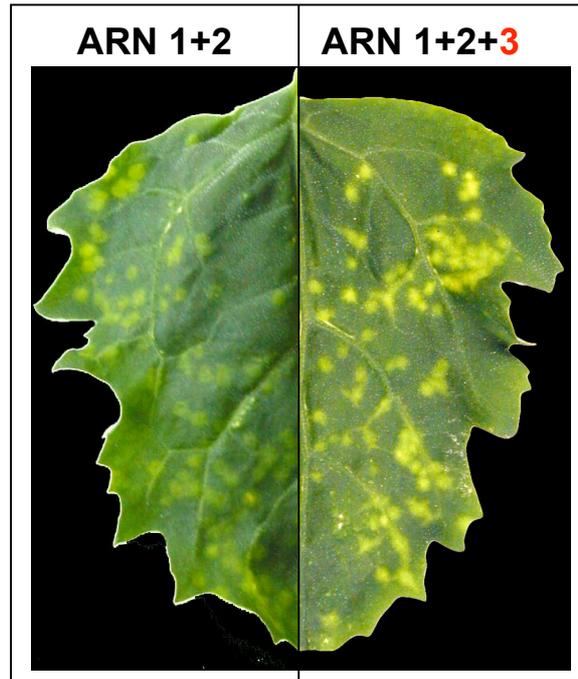


Figure II.1 : L'expression de la protéine p25 codée par l'ARN 3 du BNYVV est responsable de l'aggravation des symptômes foliaires (Jupin *et al.*, 1992). Symptômes observés sur feuilles de *C. quinoa* 7 jours après inoculation par les ARN 1 et 2 seuls (partie gauche) ou supplémentés par l'ARN 3 (partie droite).

Isolat	Composition de l'ARN 3	<i>Beta macrocarpa</i>		<i>Beta vulgaris</i>
		FI	FS	SR
S-34	ARN 3 	LJ	MJ	+++
S-3c4	ARN 3c 	LV	MM	-
T-3d4	ARN 3d 	LV	MM	-

Figure II.2 : L'intégrité de la séquence de la protéine p25 est nécessaire à l'expression des symptômes foliaires et racinaires sur plantes hôtes (Tamada *et al.*, 1999). Les isolats S-3c4 et T-3d4 contenant respectivement les ARN 3 mutés 3c et 3d induisent des symptômes atténués sur *Beta macrocarpa*, et plus de prolifération racinaire sur *Beta vulgaris* sensibles cv. Monomidori contrairement à l'isolat S-34. Les lignes noires correspondent aux régions délétées de l'ARN 3. **FI** : feuille inoculée ; **FS** : feuille apicale systémique ; **LJ** : lésions jaunes ; **LV** : lésions vertes ; **MJ** : marbrures jaunes ; **MM** : marbrures modérées ; **SR** : symptômes de rhizomanie ; **+++** : prolifération racinaire ; **-** : absence de symptômes racinaires.

macrocarpa, et est même plus marquée sur *Beta vulgaris* et *Tetragonia expansa*. Dans ces deux derniers cas, l'infection foliaire par les ARN 1 et 2 est asymptomatique mais l'infection en présence de l'ARN 3 exprimant une protéine p25 fonctionnelle engendre des lésions chlorotiques jaunes caractéristiques (observations personnelles, Link, Thèse de Doctorat 2004, Université Louis Pasteur Strasbourg).

L'ARN 3 est également associé à l'apparition des symptômes racinaires. L'ARN 3 est nécessaire au mouvement à longue distance (systémie) du virus (Tamada *et al.*, 1989, Lauber *et al.*, 1998). En effet, seuls les isolats viraux contenant les ARN 1, 2 et 3 inoculés sur feuilles de *Beta macrocarpa* gagnent les feuilles apicales non inoculées et les racines. De plus, seuls ces isolats inoculés aux betteraves par le biais de *Polymyxa betae* induisent une prolifération racinaire significative (Tamada *et al.*, 1989, Koenig *et al.*, 1991). Le développement des symptômes de prolifération racinaire est également intimement lié à l'expression de la protéine p25. La caractérisation de deux isolats naturels a permis de montrer que ces isolats incapables d'exprimer la protéine p25 provoquent uniquement des symptômes foliaires atténués (chloroses vertes) sur *Tetragonia expansa* et sur *Beta macrocarpa*, ainsi que des symptômes de systémie très modérés sur *Beta macrocarpa* (Tamada *et al.*, 1999). La transmission naturelle de ces deux isolats par l'intermédiaire de *P. betae* au niveau des racines de betteraves a montré que le virus reste confiné au niveau des radicules initialement infectées et aucun signe de prolifération racinaire n'est observé (figure **II.2**).

Si le rôle de l'ARN 3 est clairement établi dans l'établissement de l'infection systémique des betteraves, l'intervention directe de la protéine p25 reste toutefois encore à être démontrée. En effet, les travaux menés au laboratoire par Lauber *et al.* (1998) suggèrent la nécessité d'une séquence de l'ARN 3 plutôt que d'un polypeptide pour la mise en place de la systémie du virus. Ces résultats nous laissent encore penser que l'infection virale pourrait induire la production de siRNA qui cibleraient les messagers d'un facteur cellulaire, et favoriserait alors le mouvement à longue distance du virus.

Les travaux préliminaires effectués par immuno-localisation et microscopie électronique (Haeberlé and Stussi-Garaud, 1995) ont permis de localiser la protéine p25 à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules de feuilles de *C. quinoa* infectées (figure **II.3**). Selon ces auteurs, la localisation nucléaire de la protéine p25 pouvait s'expliquer par la présence dans la partie N terminale (résidus 57 à 62) d'une séquence basique riche en arginines (57-KRIRFR-62) pouvant représenter une séquence de localisation nucléaire (NLS) intervenant dans le transport actif de cette protéine à travers le noyau. Les travaux menés dans

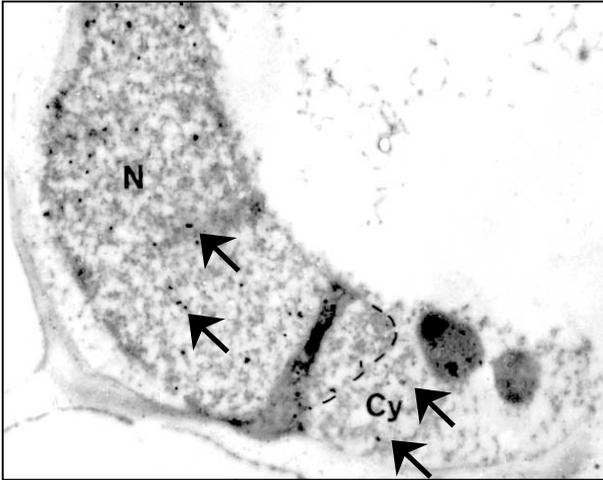


Figure II.3 : La protéine p25 est localisée dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées. Immuno-détection de la protéine p25 et observation par microscopie électronique de cellules de *C. quinoa* infectées par le BNYVV (d'après Haeblerlé and Stussi-Garaud, 1995). Le noyau de la cellule infectée est délimité par les pointillés. La localisation de la protéine p25 est visualisée grâce aux billes d'or colloïdal couplées aux anticorps secondaires (Deux marquages nucléaires et cytoplasmiques sont pointés par des flèches noires). N : noyau ; Cy : cytoplasme.

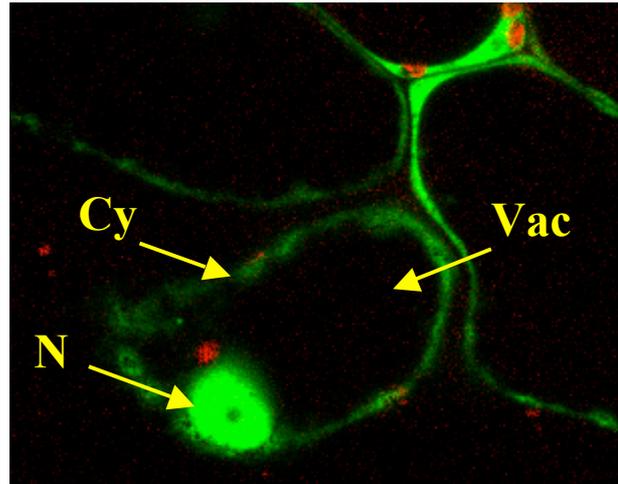


Figure II.4 : La protéine de fusion GFP::P25 est localisée dans le noyau et le cytoplasme des cellules infectées (Vetter *et al.*, 2004). Analyse par microscopie confocale de la localisation de la protéine de fusion GFP::P25 exprimée par un ARN 3 recombinant. Les cellules des lésions de *C. quinoa* sont observées 6 jours après inoculation. N : noyau ; Cy : cytoplasme ; Vac : vacuole. Les chloroplastes apparaissent en rouge.

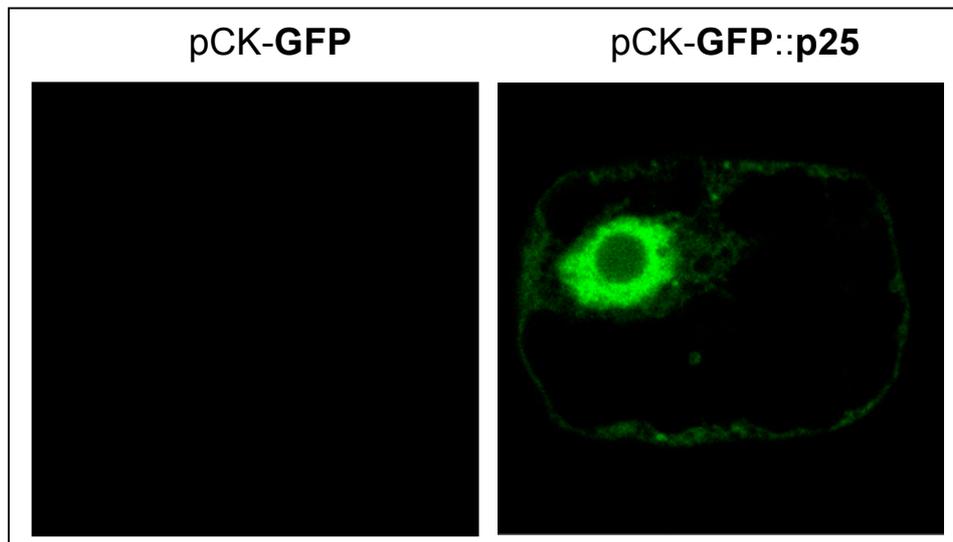


Figure II.5 : La protéine de fusion GFP::P25 est retenue dans le nucléoplasme des cellules transfectées après solubilisation membranaire. Des cellules BY-2 de tabac transfectées par biolistique et exprimant la protéine GFP seule (pCK-GFP, partie gauche) ou la protéine de fusion GFP::P25 (pCK-GFP::P25, partie droite) ont été traitées par 0.5% de Triton X-100 et visualisées en microscopie confocale. La protéine GFP disparaît totalement des cellules transfectées alors que la protéine GFP::P25 reste fortement ancrée dans le noyau et partiellement associée au système endomembranaire des cellules.

notre laboratoire ont consisté à caractériser plus en détail le mécanisme d'adressage nucléaire de cette protéine virale et son rôle sur le développement des symptômes foliaires et racinaires.

1.2. Transport nucléo-cytoplasmique de la protéine p25

L'utilisation de la protéine GFP ("green fluorescence protein") comme marqueur de la localisation subcellulaire a permis de démontrer l'adressage de la protéine de mouvement TGBp1 (protéine p42) du BNYVV au niveau des plasmodesmes (Erhardt *et al.*, 2000). L'expression en contexte viral d'une protéine de fusion GFP::P25 a permis ainsi de confirmer la localisation nucléo-cytoplasmique de la protéine p25 dans des feuilles de *C. quinoa* infectées (figure **II.4**).

Une approche similaire a été entreprise en utilisant la protéine GFP fusionnée au domaine N terminal de la protéine p25 et en induisant l'expression de la protéine de fusion en contexte viral dans des feuilles de *C. quinoa* ou de manière transitoire dans des cellules BY-2 de tabac. Ainsi, nous avons pu montrer que la localisation nucléaire et cytoplasmique de la protéine p25 était indépendante de la présence d'autres facteurs viraux (Table 1, Vetter *et al.*, 2004). De plus, une étude par mutagenèse dirigée a clairement démontré que l'adressage nucléaire de la protéine p25 nécessitait la séquence 57-**KRIRFR**-62 (Fig.2, Vetter *et al.*, 2004), un motif NLS monopartite reconnu par les importines α de riz et de poivron (fig.3, Vetter *et al.*, 2004). L'expression de protéines de fusion tronquées (Fig.4, Fig.5, Vetter *et al.*, 2004) nous a également permis de localiser avec précision un domaine d'export nucléaire (NES), non conventionnel à quatre valines, 169-**VYMVCLVNTV**-178, présent dans la partie C terminale de la protéine p25 (fig.6, Vetter *et al.*, 2004).

Enfin, replacées en contexte viral, les protéines mutées qui sont touchées dans leur capacité à effectuer un transport nucléo-cytoplasmique n'induisent plus de lésions jaunes caractéristiques sur feuilles de *C. quinoa* (Table 1, Vetter *et al.*, 2004). Cette relation existant entre la localisation subcellulaire des différentes formes de la protéine p25 avec la modulation des symptômes foliaires nous a fortement suggéré que cette protéine pouvait agir comme un facteur de transcription modulant l'expression des gènes cellulaires impliqués dans la mise en place des symptômes.

1.3. Régulation de la localisation subcellulaire par phosphorylation

Les expériences de perméabilisation membranaire effectuées sur les cellules BY-2 de tabac exprimant la protéine GFP ou la protéine de fusion GFP::P25 ont permis de visualiser la

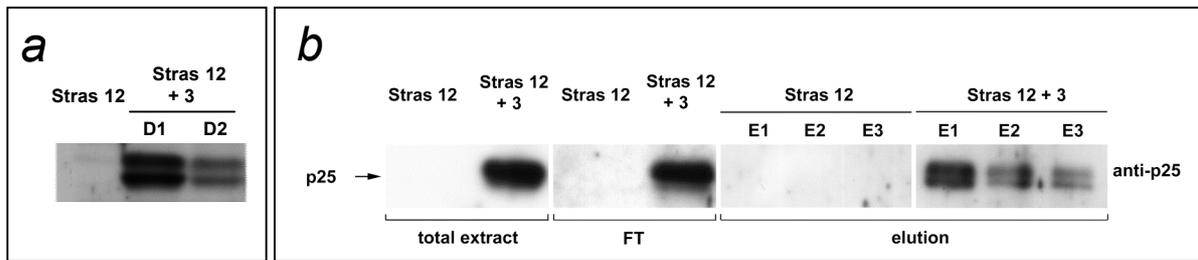


Figure II.6 : La protéine p25 est phosphorylée *in vivo*. (a) Des extraits totaux de lésions obtenues 6 jours après inoculation de feuilles de *C. quinoa* en absence (Stras12) et en présence d'ARN 3 (Stras12+3) sont analysés par western blot à l'aide d'anticorps primaires dirigés contre la protéine p25 (D2 est une dilution au 1/3 de D1). (b) Ces extraits (total extract) sont déposés sur colonne d'affinité spécifique de résidus phospho-sérines et phospho-thréonines. Les protéines non retenues (FT) et éluées (E1 à E3) après lavage de la colonne ont été précipitées (10% TCA) et analysées par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine p25.

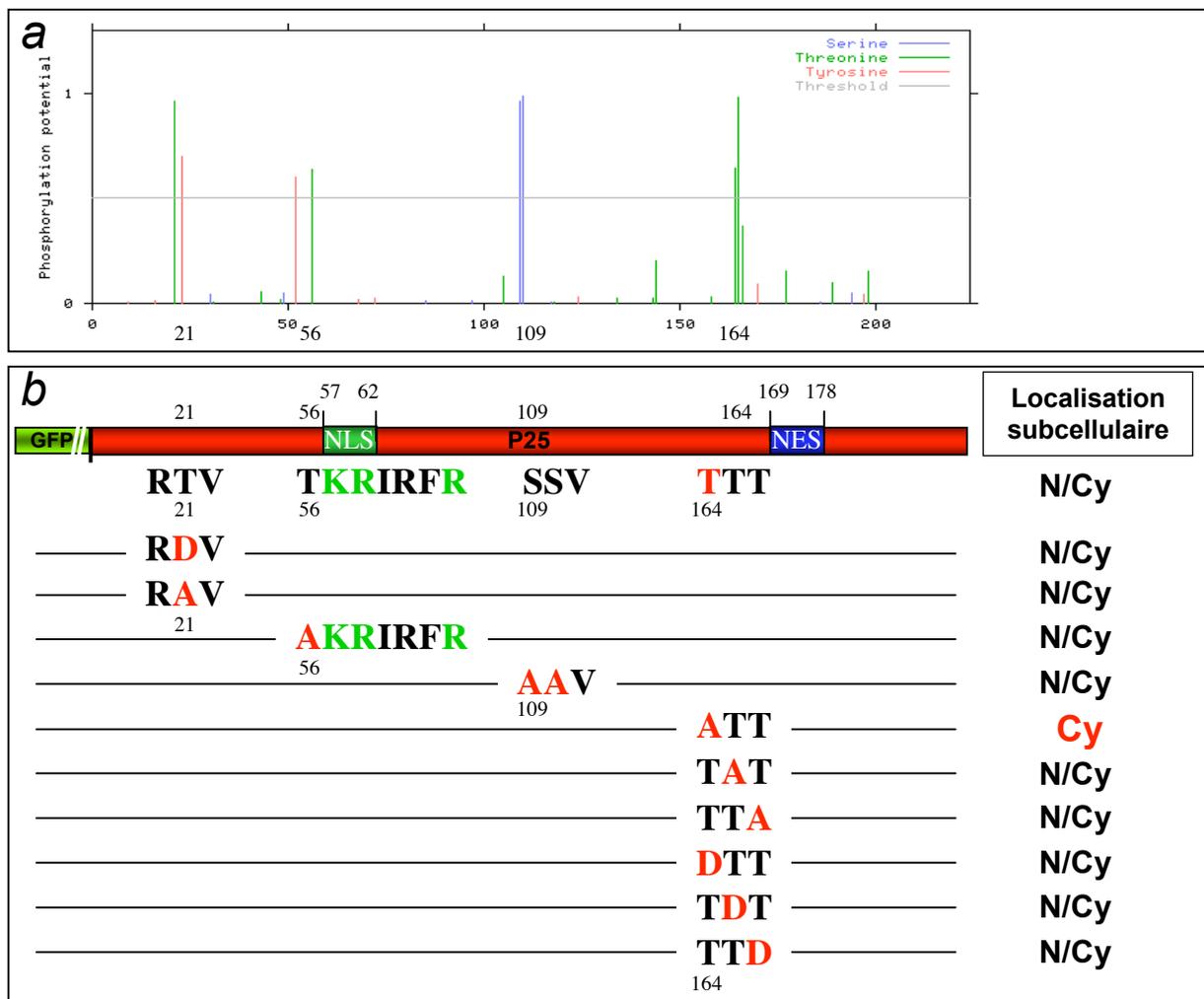


Figure II.7 : Identification des résidus phosphorylés sur la protéine p25. (a) Analyse prédictive des résidus phosphorylables présents sur la séquence de la protéine p25 à l'aide de l'algorithme NetPhos 2.0. (b) Analyse de l'effet des substitutions Alanine et Aspartate sur l'adressage nucléaire de la protéine GFP::P25 (Vetter, Thèse de Doctorat 2003, Université Louis Pasteur Strasbourg). N/Cy : localisation nucléaire et cytoplasmique ; Cy : localisation exclusivement cytoplasmique. La séquence NLS de la protéine p25 est représentée en vert. Les remplacements effectués sont indiqués en rouge.

forte interaction de la protéine p25 avec des composants du nucléoplasme. En effet, la fluorescence issue de la protéine de fusion GFP::P25 est maintenue après traitement au détergent (Triton X-100 0,5%), contrairement à celle issue de la protéine GFP qui disparaît (figure **II.5**). De plus, lors de la détection de la protéine p25 par western blot dans des extraits de feuilles de *C. quinoa* infectées par les ARN 1, 2 et 3 du BNYVV (Stras12+3), celle-ci apparaît sous forme d'un doublet (figure **II.6a**). Ces résultats nous ont donc laissé penser que la protéine p25 pouvait être phosphorylée et que cette phosphorylation pouvait modifier sa répartition nucléo-cytoplasmique.

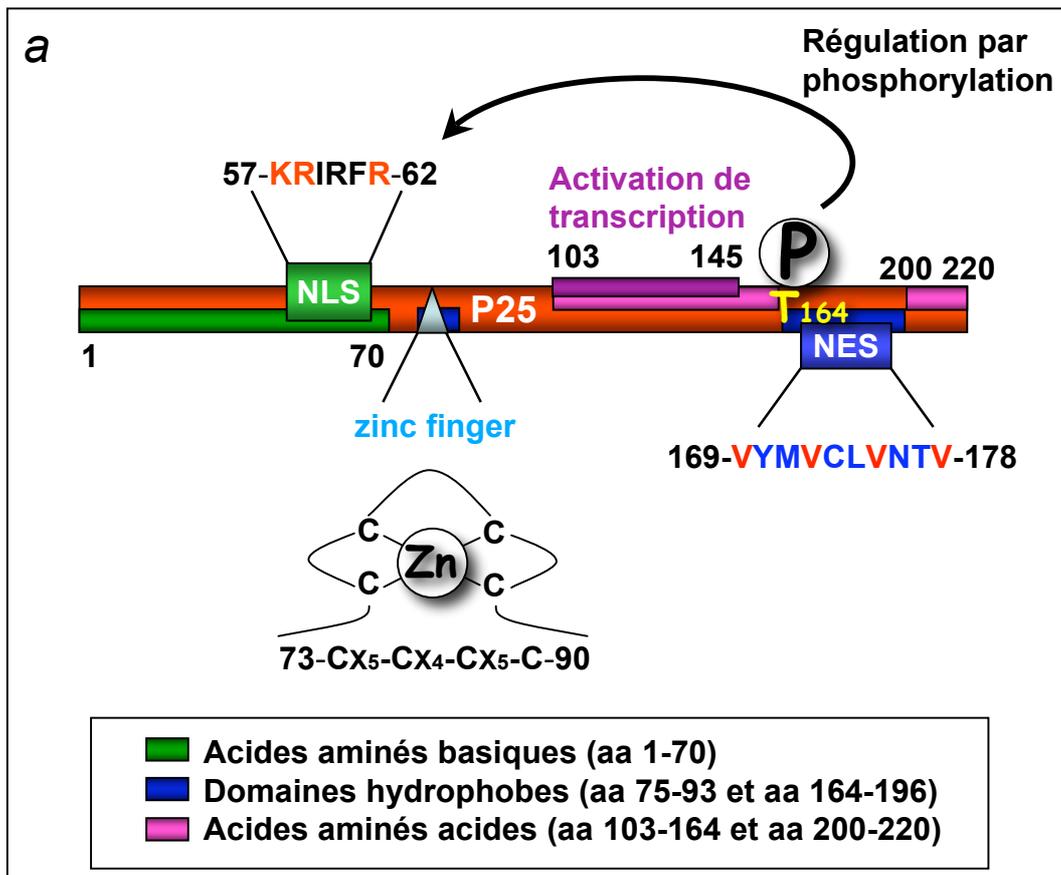
La purification de protéines phosphorylées, à partir d'extraits de feuilles de *C. quinoa* infectées (Stras12+3) déposés sur colonne d'immuno-affinité reconnaissant spécifiquement les résidus sérines et thréonines phosphorylés, permet de retrouver la protéine p25 sous forme d'un doublet (figure **II.6b**). Ce résultat indique que la protéine subit un ou plusieurs événements de phosphorylation in vivo (Vetter, Thèse de Doctorat 2003, Université Louis Pasteur Strasbourg).

Une approche par mutagenèse dirigée a consisté à remplacer les résidus sérines ou thréonines potentiellement phosphorylables de la protéine p25 (figure **II.7a**) par des alanines ("alanine scanning") pour bloquer la phosphorylation, ou par des aspartates ("aspartate scanning") pour mimer leur état phosphorylé (figure **II.7b**), puis observer la localisation subcellulaire de la protéine de fusion GFP::P25. L'ensemble des résultats a clairement établi que le remplacement de la thréonine en position 164 par une alanine (ATT, figure **II.7b**) empêche l'entrée de la protéine de fusion GFP::P25 dans le noyau (Vetter, Thèse de Doctorat 2003, Université Louis Pasteur Strasbourg). Par contre son remplacement par un acide aspartique (DTT, figure **II.7b**), mimant l'état phosphorylé de la protéine par la charge négative de son groupement carboxylique, ne modifie pas la localisation subcellulaire de la protéine GFP::P25.

1.4. Propriétés d'activation de la transcription de la protéine p25

La capacité de la protéine p25 à effectuer un transport nucléo-cytoplasmique régulé par phosphorylation, ainsi que la présence d'un motif en doigt à zinc putatif ("zinc finger") 73-CX₅-CX₄-CX₅-C-90 (Niesbach-Klöggen *et al.*, 1990, Jupin *et al.*, 1992), rappellent fortement les propriétés des activateurs de transcription.

Des expériences de simple hybride dans la levure ont permis de vérifier la capacité d'activation de la transcription de la protéine p25. Fusionnée au domaine de fixation de l'ADN



b

1 MGDILGAVYDLGHRPYLARRTVYEDRLILSTNGNICRAINLLTHDNRTSL 50

51 VYHNNTKRIRFRGLLCAYHRPYCGFRALCRVMLCSLPRLCDIPINGSRDF 100

NLS zinc finger

101 VADPTRLDSSVNELLVSTGLVIHYDRVHDVPIHTDGFVVDFTTVFRGPG 150

Domaine d'activation de transcription

151 NFLLPNATNFPRPTTDDQVYMVCLVNTVDCVLRFESELTVWIHSGLYTGD 200

NES

201 VLDVDNNVIQAPDGVDDDD 219

Figure II.8 : (a) Représentation schématique des caractéristiques principales de la protéine p25 du BNYVV (Jupin *et al.*, 1992, Haeberlé and Stussi-Garaud, 1995, Vetter *et al.*, 2004, Link, Thèse de Doctorat 2004, Université Louis Pasteur Strasbourg). (b) Localisation du motif en doigt à zinc putatif (zinc finger), des séquences d'adressage nucléaire (NLS), d'export (NES), et d'activation de la transcription de la protéine p25.

du facteur de transcription GAL4, la protéine est capable de recruter l'ARN polymérase II pour activer la synthèse du gène rapporteur *HIS3* et rendre les levures prototrophes à l'histidine (Vetter, Thèse de Doctorat 2003, Université Louis Pasteur Strasbourg ; Link, Thèse de Doctorat 2004, Université Louis Pasteur Strasbourg). L'expression dans la levure de différentes protéines p25, tronquées ou non, fusionnées au domaine de fixation de l'ADN de GAL4 a permis de montrer que la protéine p25 se comporte comme un activateur de transcription faible, et que le domaine responsable de cette activation est localisé entre les résidus 103 et 145 de la protéine. Des résultats identiques sont obtenus avec la protéine p25 fusionnée à la protéine LexA et exprimée dans la levure (Klein, DEA 2003, Université Louis Pasteur Strasbourg).

Enfin, la faible activation de transcription médiée par GAL4::P25 a permis d'effectuer des expériences en système double hybride dans la levure (Klein, DEA 2003, Université Louis Pasteur Strasbourg ; Link, Thèse de Doctorat 2004, Université Louis Pasteur Strasbourg). Par cette approche, des interactions entre la protéine p25 et elle-même ont été observées, confirmant la dimérisation de la protéine p25 observée auparavant par far-western (Vetter, Thèse de Doctorat 2003, Université Louis Pasteur Strasbourg).

Toutes les caractéristiques de la protéine p25 décrites par l'ensemble de ces résultats sont schématisées sur la figure **II.8**. Cette protéine possède une séquence d'adressage nucléaire (NLS) et une séquence d'export (NES) qui lui permet d'effectuer une navette entre le noyau et le cytoplasme des cellules infectées (Vetter *et al.*, 2004). Ce transport nucléocytoplasmique, régulé par phosphorylation, influence les symptômes foliaires. La fonction de pathogénicité portée par cette protéine pourrait ainsi s'expliquer par les propriétés d'activation de la transcription, ainsi que la présence d'un motif en doigt à zinc putatif.

Toutes ces caractéristiques, proches de celles des facteurs de transcription, nous laissent penser qu'elle pourrait être activement importée dans le noyau, pour moduler directement ou indirectement, par le biais d'interactions avec des protéines cellulaires, l'expression des gènes conduisant à la prolifération racinaire observée sur plantes infectées. Pour préciser les fonctions cellulaires de la protéine p25, nous avons choisi d'observer le phénotype des plantes suite à l'expression constitutive de la protéine chez *Arabidopsis thaliana*, mais également suite à l'expression transitoire de la protéine dans des feuilles de plantes hôtes du virus, *Tetragonia expansa* ou *Beta vulgaris*.

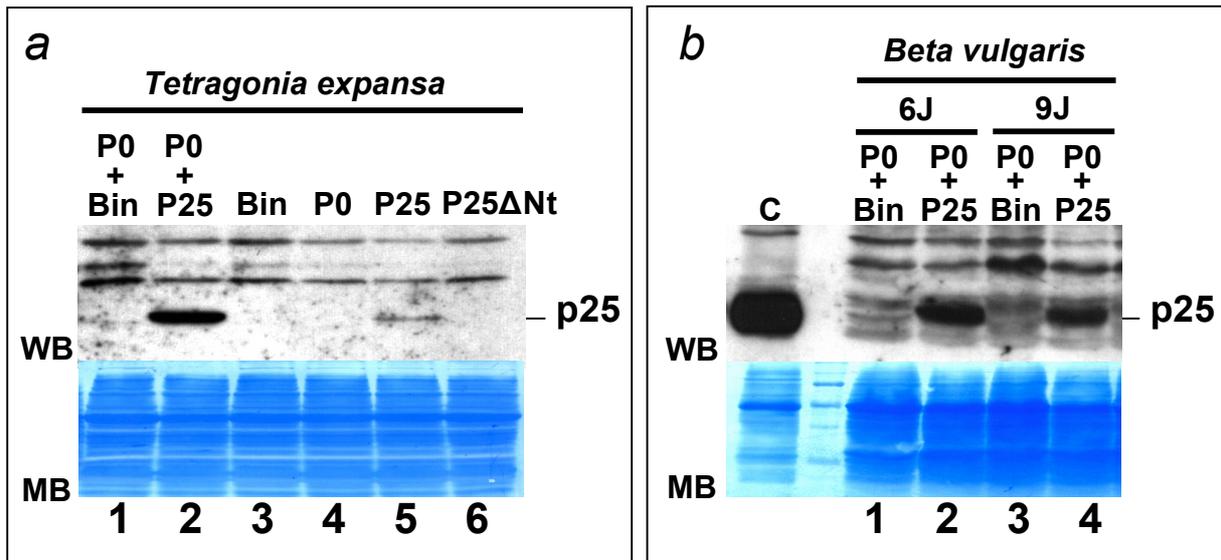


Figure II.9 : Immuno-détection de la protéine p25 (a) dans des feuilles de *T. expansa* 9 jours après agroinfiltration et (b) dans des feuilles de *B. vulgaris* 6 et 9 jours après agroinfiltration. Les feuilles sont infiltrées par des agrobactéries contenant les constructions pBin-P25 (p25 entière) ou pBin-P25ΔNt (p25ΔNt, délétion de la moitié N terminale ; Vetter *et al.*, 2004) supplémentées ou pas d'agrobactéries possédant le vecteur pBin-P0 (la protéine P0 est un suppresseur fort de PTGS, Pfeffer *et al.*, 2002). Les feuilles témoins sont infiltrées par des agrobactéries possédant le vecteur vide pBin61 (Bin), la construction pBin-P0 (P0), ou par un mélange des deux bactéries (P0+Bin). Des quantités similaires d'extraits protéiques (MB) sont analysées par western blot (WB) à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine p25. Le témoin positif (C) est obtenu à partir d'un extrait de feuilles de *C. quinoa* infectées.

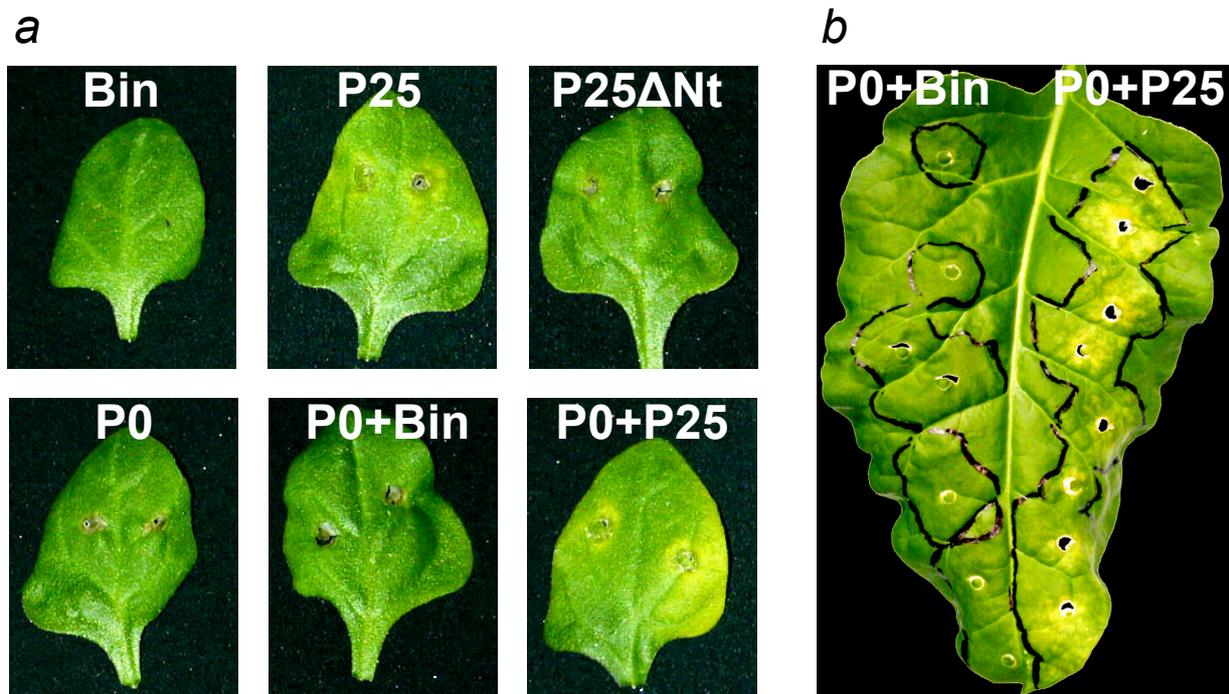


Figure II.10 : L'expression transitoire de la protéine p25 est capable d'induire des chloroses jaunes. (a) Comparaison des symptômes foliaires de *T. expansa* 9 jours après agroinfiltration de bactéries renfermant les vecteurs décrits dans la légende de la figure II.9. (b) Comparaison des symptômes foliaires de betteraves (*B. vulgaris*) 13 jours après agroinfiltration de bactéries contenant les vecteurs contrôles (P0+Bin, partie gauche de la feuille) ou les vecteurs permettant l'expression optimale de la protéine p25 (P0+P25, partie droite de la feuille).

2. Expression transitoire de la protéine p25 du BNYVV dans des feuilles de plantes hôtes

Avant de produire des plantes transgéniques exprimant constitutivement la protéine p25 du BNYVV, nous avons vérifié que l'expression de cette protéine pouvait être détectée après agroinfiltration de feuilles de plantes hôtes par des agrobactéries de souche GV3101 renfermant le plasmide binaire pBin-P25 ou pBin-P25 Δ Nt. Ces vecteurs contiennent la phase codante de la protéine p25 sauvage ou de la protéine p25 délétée de sa partie N terminale (p25 Δ Nt, Vetter *et al.*, 2004) placée entre le promoteur 35S et le terminateur 35S du CaMV (figure **M.M.3**, §2.2.2 du chapitre Matériel et Méthode).

L'analyse par western blot des feuilles de *Tetragonia expansa* et *Beta vulgaris* agroinfiltrées a permis de détecter l'expression transitoire de la protéine p25, 6 ou 9 jours après agroinfiltration (figure **II.9**). Chaque expérience par western blot étant effectuée en équilibrant les quantités de protéine totales déposées sur gel (figure **II.9a**, partie MB), les différences d'expression ont pu être comparées. Ainsi l'expression de la protéine p25 est détectable dans les feuilles de *Tetragonia expansa* 9 jours après agroinfiltration (figure **II.9a**, partie WB, piste 5). Cette expression est accentuée d'un facteur 6 à 8 lorsque des agrobactéries exprimant la protéine p0 du BWYV, un suppresseur de PTGS (Pfeffer *et al.*, 2002), sont infiltrées conjointement aux agrobactéries contenant le plasmide pBin-P25 (P0+P25, figure **II.9a**, partie WB, piste 2). Aucun signal n'est détectable dans les feuilles infiltrées à l'aide d'agrobactéries contenant le vecteur sans insert (Bin, piste 3, figure **II.9a**), le vecteur contenant la phase codante de la protéine p0 du BWYV (P0, piste 4, figure **II.9a**), ou dans les feuilles infiltrées par ces deux dernières sortes d'agrobactéries (P0+Bin, piste 1, figure **II.9a**). Il faut préciser que les anticorps dirigés contre la protéine p25 utilisés dans ces expériences ne permettent pas de détecter la protéine tronquée p25 Δ Nt (P25 Δ Nt, piste 6, figure **II.9a**). Une expression stable de la protéine a pu être également observée dans les feuilles de *Beta vulgaris*, 6 et 9 jours après agroinfiltration (figure **II.9b**, partie WB, pistes 2 et 4) d'agrobactéries exprimant à la fois la protéine p25 du BNYVV et la protéine P0 du BWYV.

Même si l'expression de la protéine p25 du BNYVV à partir du seul plasmide pBin-P25 fonctionne, celle-ci est améliorée par l'expression simultanée lors de l'agroinfiltration de la protéine p0 du BWYV qui permet de bloquer localement une éventuelle activation du PTGS dans la plante. De nombreuses études montrent que l'expression d'un transgène est très efficace par agroinfection et se révèle beaucoup plus élevée que dans le cas d'une expression

constitutive après transformation stable. Chez le tabac, l'expression transitoire est cinq fois plus forte que celle observée dans les plantes transgéniques (Vaquero *et al.*, 2002). Chez la laitue, l'expression de la protéine GUS dans les feuilles agroinfiltrées est jusqu'à vingt fois plus élevée que dans les plantes transgéniques (Wroblewski *et al.*, 2005). Pourtant, dans certains cas, le mécanisme de défense du type PTGS est activé et empêche l'expression transitoire du transgène. Dans une telle situation, l'expression peut être améliorée par la co-expression d'un suppresseur viral naturel du PTGS (Voinnet *et al.*, 1999, 2003). Il convient alors de sélectionner le suppresseur viral le plus efficace et donc le plus adapté à l'espèce végétale utilisée (Voinnet, 2001).

Nous avons pu corréler l'expression plus ou moins forte de la protéine p25 détectée par western blot avec les symptômes observés sur feuilles agroinfiltrées. L'infiltration d'agrobactéries témoins renfermant le vecteur vide (Bin) ou la construction pBin-P0 (P0), ou celle d'agrobactéries exprimant conjointement les deux (P0+Bin), n'induit pas de symptômes notoires sur feuille de *Tetragonia expansa* (figure **II.10a**) ou *Beta vulgaris* (partie gauche, figure **II.10b**). Par contre, l'expression de la protéine p25, médiée par la même souche GV3101 dans toutes les expériences, induit une chlorose jaune autour de la zone d'infiltration faible sur feuilles de *Tetragonia expansa* (figure **II.10a**) et plus forte sur feuilles de *Beta vulgaris* (partie droite, figure **II.10b**). L'intensité de cette chlorose jaune, qui rappelle celle observée en contexte viral, semble dépendre de la quantité de protéine p25 exprimée et détectée par western blot (comparer les pistes 2 et 5, figure **II.9a** et les feuilles P0+P25 et P25, figure **II.10a**).

Enfin, il faut préciser que les expériences conduites sur feuilles de *Beta vulgaris* permettent d'éliminer toute variabilité pouvant exister d'une plante à une autre, voire d'une feuille à une autre. Ces expériences ont été réalisées en infiltrant les constructions témoins dans la partie gauche de la feuille, et celles exprimant la protéine p25 dans la partie droite. Ainsi, Nous avons pu conclure définitivement que la chlorose observée était spécifiquement liée à l'expression transitoire de la protéine p25.

La protéine étant correctement exprimée à partir du plasmide pBin-P25 et apparemment fonctionnelle, nous avons initié la transgénèse sur *Arabidopsis thaliana* et collaboré avec Guy Weyens (SESVanderHave, Tienen, Belgique) pour effectuer la transgénèse de betteraves. La transgénèse effectuée sur cellules de stomates de betteraves *Beta vulgaris* n'a permis la régénération que de huit lignées supposées exprimer la protéine p25. L'analyse par western blot effectuée sur des feuilles des plantes T1 issues de ces huit

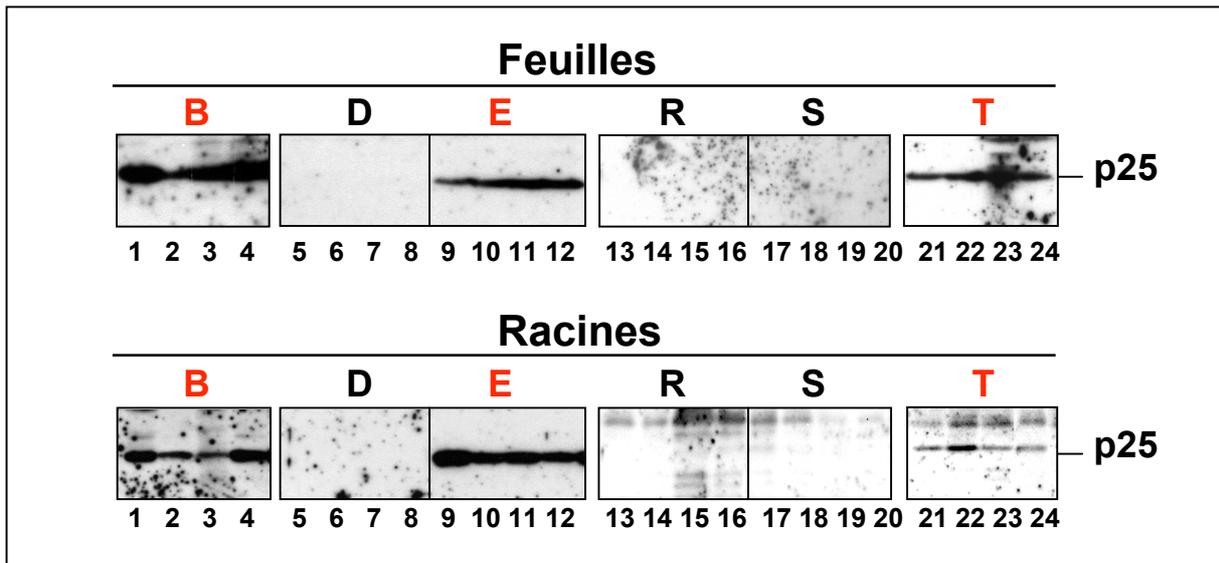


Figure II.11 : Des *A. thaliana* transformées par la construction pBin-P25 sont capables d'exprimer la protéine p25 dans les feuilles et les racines. Des quantités similaires de protéines ont été extraites à partir de quatre plantes issues de plusieurs lignées indépendantes résistantes à la kanamycine [lignée 35S::P25B (pistes 1 à 4), D (5 à 8), E (9 à 12), R (13 à 16), S (17 à 20) et T (21 à 24)]. La protéine p25 est recherchée par western blot. Les lignées monocopies sont indiquées en rouge.

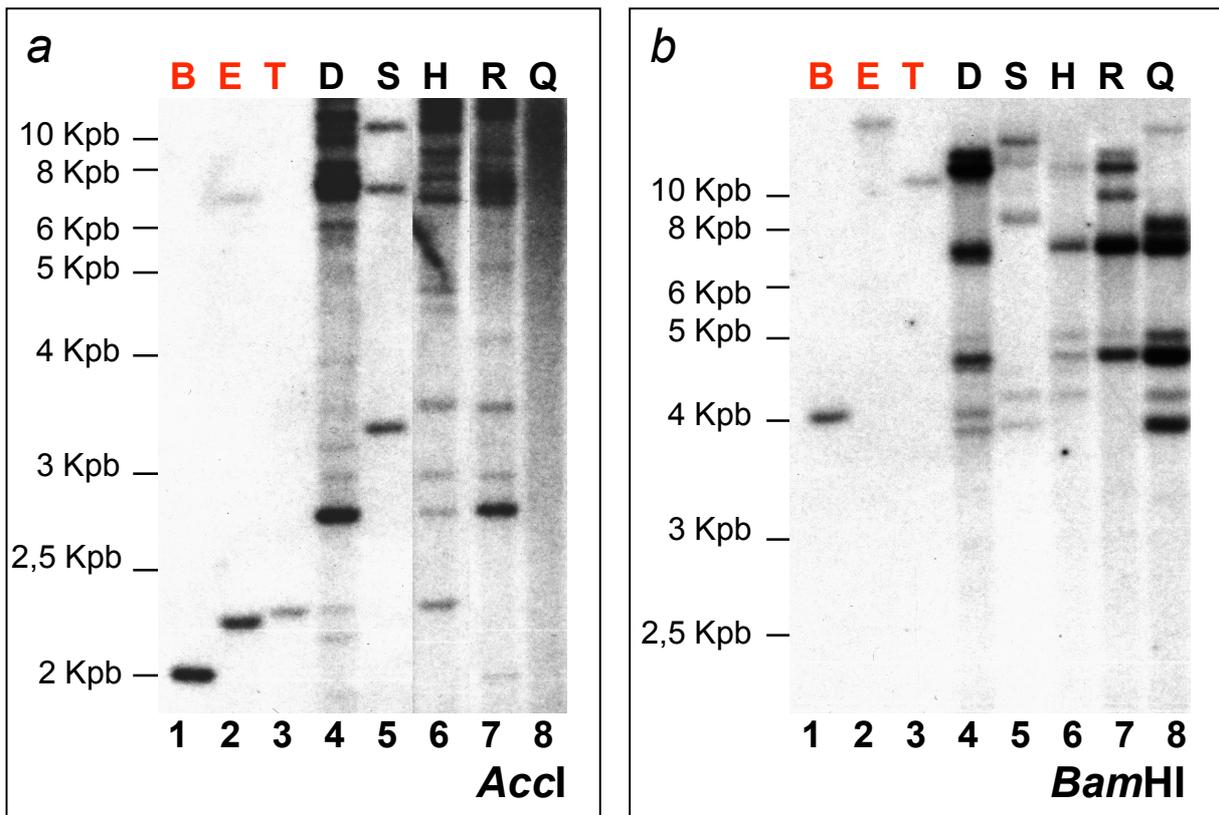


Figure II.12 : Détermination du nombre d'insertions du T-DNA par Southern blot dans le génome des plantes *Arabidopsis thaliana* transgéniques 35S::P25. Des quantités similaires d'ADN génomique des lignées indépendantes B, E, T, D, S, H, R et Q sont digérées et analysées par hybridation moléculaire respectivement par : (a) digestion par l'enzyme *AccI* et utilisation d'une sonde spécifique aux 300 premiers nucléotides de la séquence codante de la protéine p25 (b) digestion par l'enzyme *BamHI* et utilisation d'une sonde spécifique aux 360 derniers nucléotides de la même séquence codante. La taille des fragments est précisée à gauche de chaque membrane. Les lignées monocopies sont indiquées en rouge.

lignées n'a pas permis de détecter l'expression de la protéine p25. La caractérisation de ces plantes n'a donc pas été poursuivie.

3. Expression constitutive de la protéine p25 du BNYVV chez *Arabidopsis thaliana*

3.1. Obtention de lignées *Arabidopsis* transgéniques exprimant la protéine p25

3.1.1. Sélection de lignées stables d'*Arabidopsis* transgéniques 35S::P25

Après la transformation par "floral dip" d'*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia (Col-0) avec la souche d'agrobactéries GV3101 portant le plasmide binaire pBin-P25, nous avons obtenu un lot de graines T1 qui a permis la régénération de 25 plantes T1 résistantes à la kanamycine, supposées exprimer la protéine p25. Ces plantes ont été désignées par les lettres A à Y. Après deux ségrégations par autofécondation et sélection des plantes basée sur la résistance à la kanamycine, les 25 lignées indépendantes ont été conservées sous forme de différents lots de graines T3. Chaque lot de graines a ensuite permis de générer des plantes T3 qui ont été sélectionnées sur un milieu sélectif contenant de la kanamycine. Ces plantes ont été analysées par western blot pour sélectionner les lignées exprimant la protéine p25. La figure **II.11** rassemble l'ensemble des analyses conduites sur quatre échantillons représentatifs de chacune des six lignées étudiées ici. Les plantes issues des trois lignées nommées 35S::P25B, 35S::P25E et 35S::P25T (B, E, T ; pistes 1 à 4, 9 à 12, 21 à 24, figure **II.11**) expriment la protéine p25 à la fois dans les feuilles et dans les racines, contrairement aux plantes issues des lignées 35S::P25D, 35S::P25R ou 35S::P25S (D, R et S ; pistes 5 à 8, 13 à 20, figure **II.11**) où aucun signal spécifique à la protéine p25 n'est détectable.

Le nombre de copies du transgène contenu dans le génome des différentes lignées a été caractérisé par deux expériences de Southern blot. La première expérience (figure **II.12a**) a consisté à réaliser une digestion totale de l'ADN génomique par l'enzyme *AccI*. Un seul site de restriction spécifique de cette enzyme est retrouvé dans la séquence du T-DNA. Ce site unique de restriction est présent au sein de la séquence codante de la protéine p25, 600 pb en aval du codon d'initiation. Ainsi, la digestion totale de l'ADN génomique des plantes génère une première catégorie de fragments qui comportent un fragment d'ADN génomique flanqué de la partie gauche du T-DNA et qui renferme également les 600 premières paires de bases de la séquence codante de la protéine p25, mais aussi une deuxième catégorie de fragments constitués de la partie droite du T-DNA flanquée d'une séquence d'ADN génomique délimitée par un site de restriction *AccI*. L'utilisation d'une sonde spécifique complémentaire

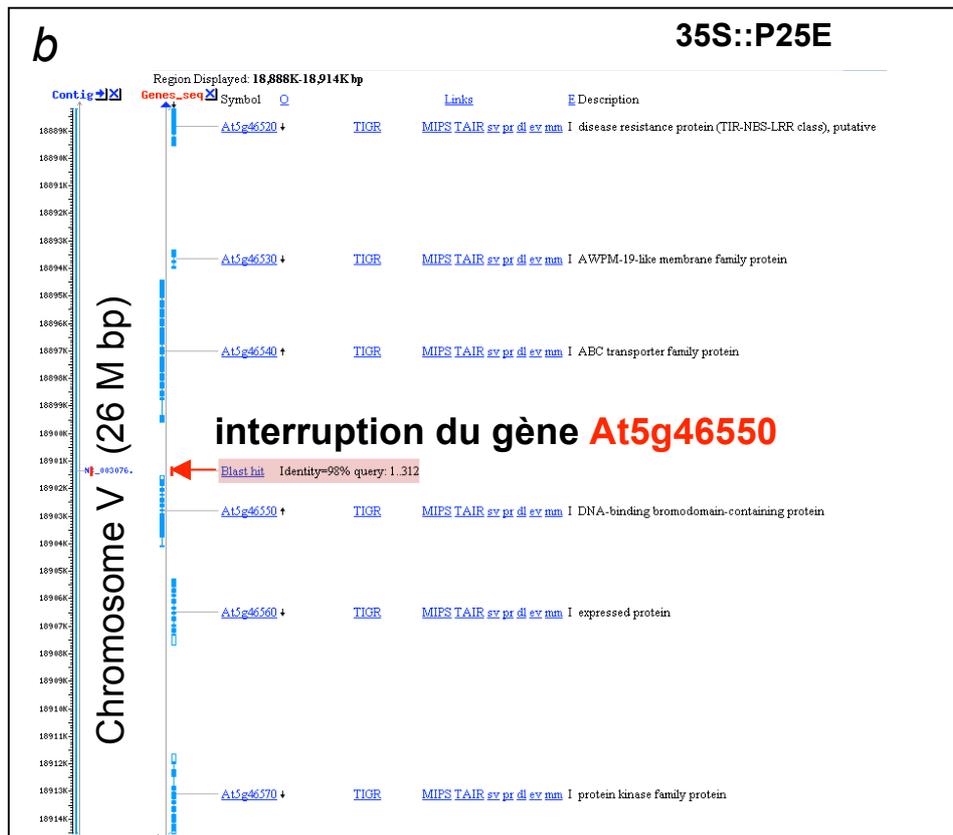
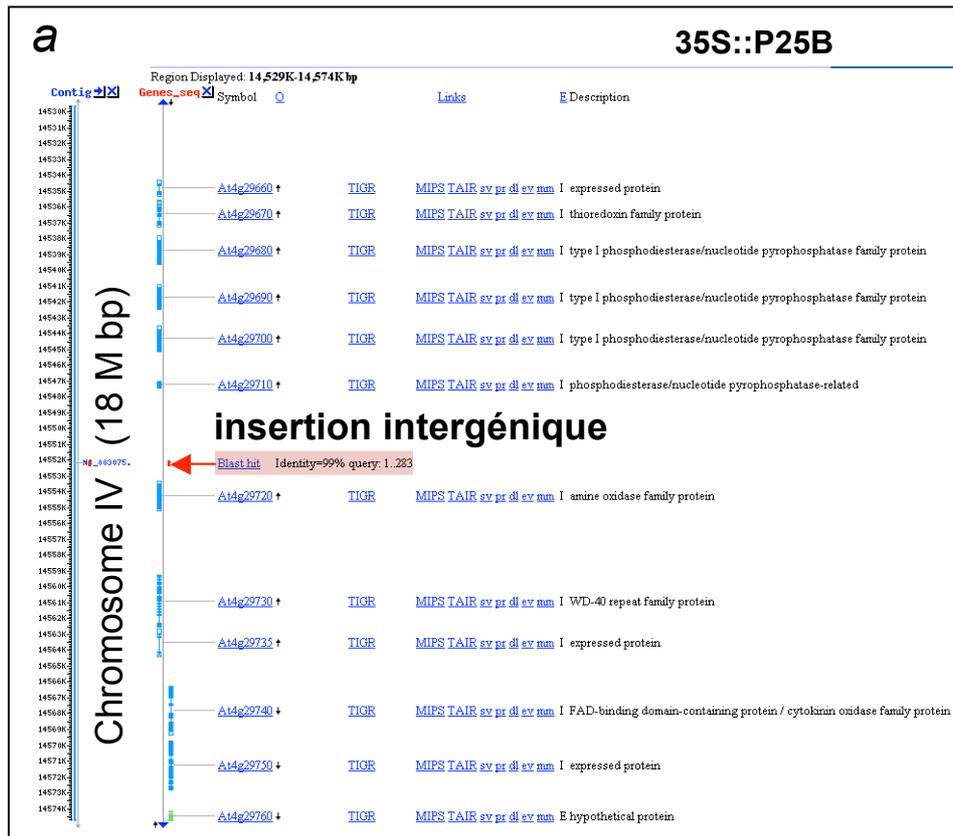


Figure II.13 : Localisation du site d'insertion du T-DNA des lignées monocopies 35S::P25B et 35S::P25E. (a) Localisation du transgène dans le génome des plantes de la lignée 35S::P25B au niveau d'une région intergénique (1452 Kpb) du chromosome IV. (b) Localisation du transgène dans le génome des plantes de la lignée 35S::P25E au niveau de la partie 3' terminale du gène At5g46550 (18901 Kpb) du chromosome V. Le site d'insertion est précisé par une flèche rouge.

aux 300 premiers nucléotides de la séquence de la protéine p25 permet de révéler spécifiquement la première catégorie de produits de digestion (figure **M.M.4a**, §4.2 du chapitre Matériel et Méthode).

La deuxième expérience (figure **II.12b**) a été réalisée après la digestion totale de l'ADN génomique par l'enzyme *Bam*HI. Deux sites spécifiques de cette enzyme de restriction sont contenus dans la séquence du T-DNA. Le premier est présent en amont du site d'initiation de la traduction de la protéine p25 et le second à la position 303 de la séquence codante de la protéine p25. La digestion totale génère, en plus d'un fragment interne de 300 pb non détecté sur gel, deux fragments constitués comme précédemment des bordures gauches ou droites du T-DNA flanqués de séquences d'ADN génomique. Dans cette expérience, la présence du transgène est révélée par une sonde spécifique de la partie 3' de la séquence de la protéine p25 (figure **M.M.4b**, §4.2 du chapitre Matériel et Méthode). Les tailles des fragments de restriction obtenus dépendent de la position du site d'insertion par rapport aux sites de restriction présents sur l'ADN génomique et de la sonde utilisée pour les révéler. L'analyse des résultats présentés sur la figure **II.12** permet de constater que seules les plantes des lignées *35S::25B*, *35S::25E* et *35S::25T* (pistes 1 à 3, figure **II.12a** et figure **II.12b**) ne possèdent qu'une seule copie du transgène puisqu'un seul fragment de restriction est révélé par la sonde utilisée. De plus, l'insertion du T-DNA dans ces trois lignées ne s'est pas effectuée au même endroit puisque les fragments de restriction obtenus sont de taille distincte. Ces trois lignées monocopies sont celles qui expriment la protéine p25 (B, E, T, figure **II.11**). A l'inverse, les lignées qui n'expriment pas la protéine p25 (D, R, S, figure **II.11**) renferment toutes plusieurs copies du T-DNA. En effet, au moins trois à quatre fragments de restriction majeurs sont révélés pour les plantes n'exprimant pas la protéine. C'est le cas des lignées *35S::25D*, *35S::25R*, *35S::25S* (pistes 4, 5 et 7, figure **II.12a** et figure **II.12b**) et des lignées *35S::25H* et *35S::25Q* (pistes 6 et 8, figure **II.12**) qui n'expriment pas la protéine p25 (non montré). La présence d'un nombre trop important de copies du transgène peut conduire à la surexpression de messagers qui vont déclencher un mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle spécifique du transgène (PTGS), empêchant ainsi toute synthèse de la protéine correspondante.

Des plantes au génotype stabilisé, c'est à dire homozygotes, ont ensuite été sélectionnées à partir des lignées monocopies *35S::25B*, *35S::25E* et *35S::25T*. Pour cela, nous avons analysé la ségrégation du T-DNA portant le gène de résistance à la kanamycine après autofécondation des plantes T3 monocopies et germination de différents lots de graines sur milieu sélectif enrichi en kanamycine. La germination de 75% des graines indique une

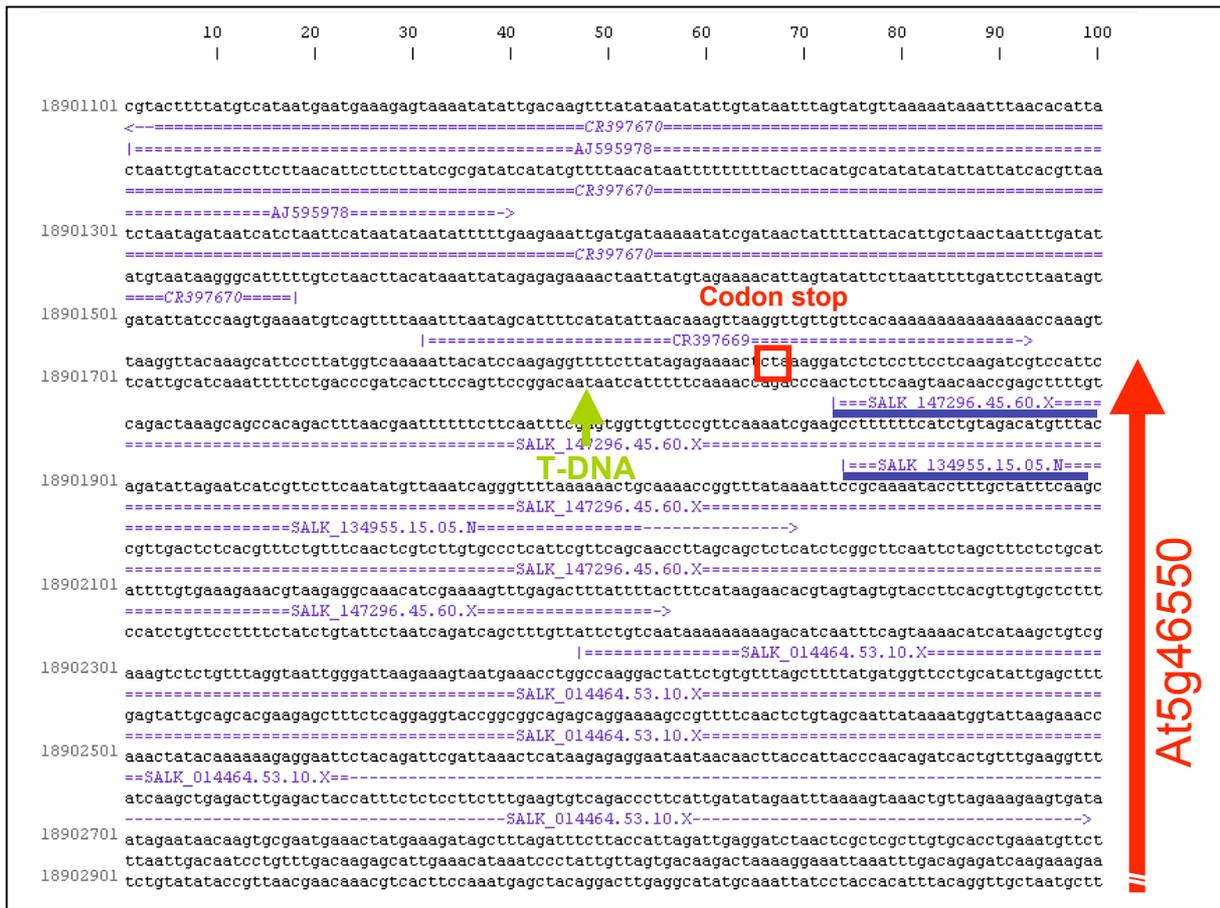


Figure II.14 : L'insertion du T-DNA de la lignée 35S::P25E est localisée dans la séquence 3' du gène codant pour une "DNA-binding bromodomain-containing protein" (gène At5g46550 - flèche rouge). La flèche verte indique la position de l'insertion, 79 nucléotides en amont du codon stop (cadre rouge). Deux des mutants d'insertion de T-DNA SALK (soulignés en bleu) peuvent être utilisés comme contrôles pour des analyses comparatives ultérieures.

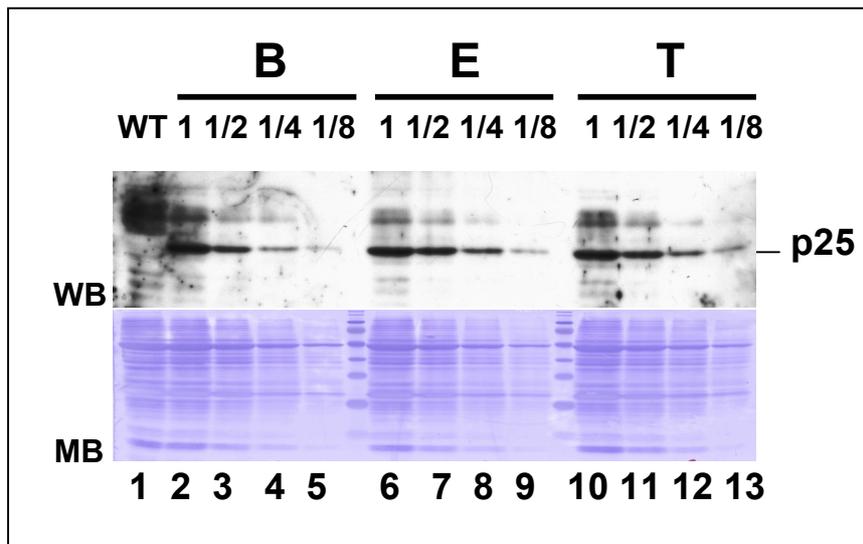


Figure II.15 : Comparaison des niveaux d'expression de la protéine p25 entre les trois lignées *A. thaliana* 35S::P25B (B), 35S::P25E (E) et 35S::P25T (T) monocopies. Des dilutions en cascade (1, 1/2, 1/4 et 1/8) d'extraits protéiques, issus de quantités identiques de feuilles (20 µg) broyées dans 100 µl de tampon d'extraction, sont séparées sur gel (MB), puis analysées par western blot (WB). La piste 1 correspond à un extrait de feuilles d'*A. thaliana* sauvages (WT) et constitue le témoin négatif.

ségrégation provenant de l'autofécondation d'un individu hétérozygote monocopie. A l'inverse, la germination de 100% des graines sur milieu sélectif représente une ségrégation provenant de l'autofécondation d'un individu homozygote. Ainsi, les lignées 35S::25B3.8, 35S::25E2.1 et 35S::25T4.1 ont été sélectionnées et utilisées pour perpétuer les trois lignées indépendantes monocopies homozygotes étudiées par la suite.

Le site d'insertion du transgène dans ces trois lignées 35S::25B, 35S::25E et 35S::25T a été recherché par des expériences de PCR inverse ou "iPCR" (figure **M.M.5**, §4.3 du chapitre Matériel et Méthode). Pour cela, nous avons choisi de digérer l'ADN génomique de plantes issues des trois lignées par l'enzyme de restriction *AccI*, afin d'obtenir des fragments de restriction de taille relativement faible (environ 2 kb). Ces fragments ont ensuite été soumis à une ligation intramoléculaire. Certains des produits de ligation obtenus sont constitués de la séquence d'ADN génomique située en amont de la bordure gauche du T-DNA et de la partie du T-DNA qui contient la séquence codante de la protéine p25 située en amont du site de restriction *AccI*. La taille de ces fragments a pu être estimée grâce à l'expérience de Southern blot (figure **II.12a**). Après amplification spécifique par PCR, les fragments d'intérêt sont purifiés puis séquencés. La séquence correspondant à la partie d'ADN génomique est ensuite recherchée dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>) puis l'insertion confirmée par PCR en utilisant des amorces spécifiques. Nous n'avons pas pu caractériser le site d'insertion du T-DNA dans le génome de la lignée 35S::25T. Par contre, le site d'insertion du T-DNA de la lignée 35S::25B a pu être localisé avec précision dans une région intergénique du chromosome IV (figure **II.13a**) et celui de la lignée 35S::25E dans la région 3' terminale non codante du gène At5g46550 présent sur le chromosome V (figure **II.13b et II.14**). Si l'insertion du transgène des plantes 35S::25B n'interrompt pas la synthèse de gène, celui des plantes 35S::25E peut affecter l'expression du gène codant pour une "DNA binding bromodomain-containing protein". La fonction putative d'activateur de l'apoptose associée aux protéines comportant un tel domaine nous indique que les résultats obtenus à l'aide des plantes 35S::25E devront être interprétés avec prudence.

Nous avons ensuite caractérisé le phénotype des plantes issues des trois lignées transgéniques, mais avant, confirmé l'expression stable de la protéine p25 dans ces plantes et recherché sa localisation subcellulaire par immuno-localisation et microscopie électronique.

3.1.2. Confirmation de l'expression stable et ubiquitaire de la protéine p25

Dans un premier temps, nous avons vérifié s'il existait une variation du taux d'expression de la protéine p25 dans les trois lignées 35S::P25. Des dilutions en cascade

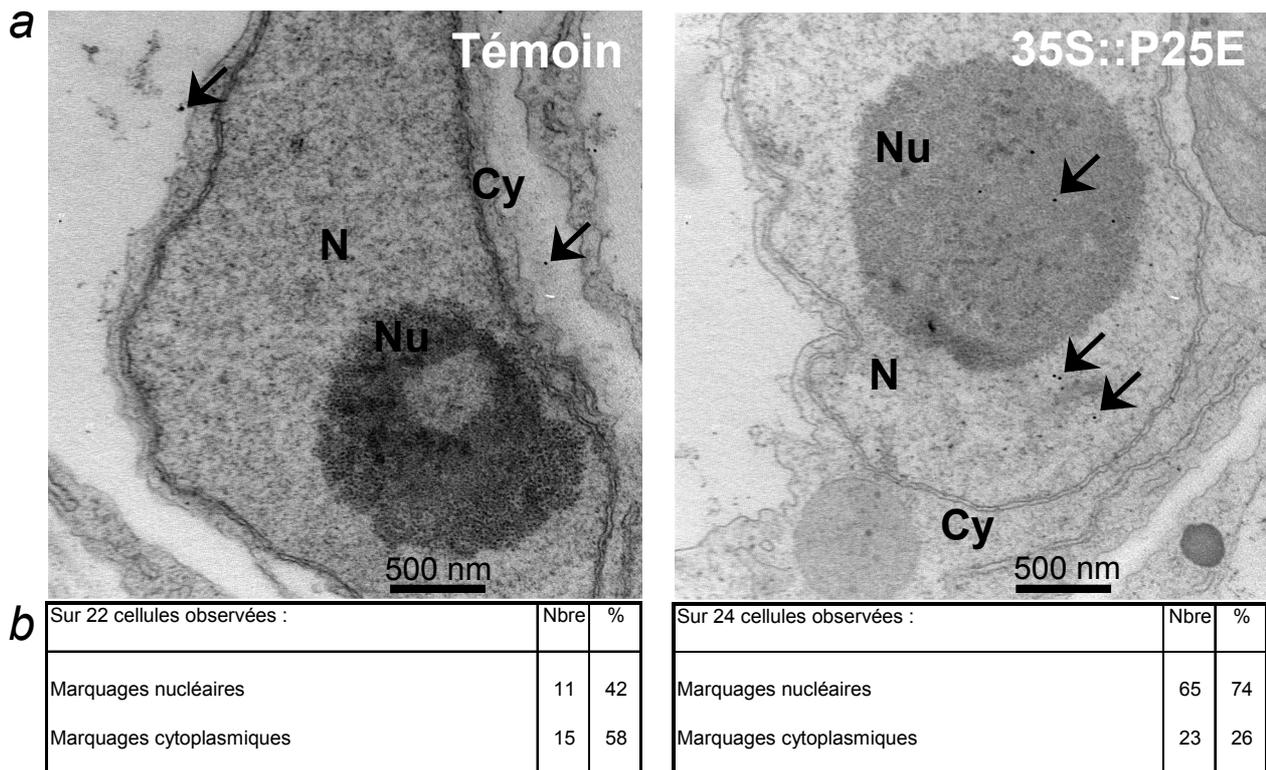


Figure II.16 : Recherche de la localisation subcellulaire de la protéine p25 dans les cellules racinaires d'*A. thaliana* de la lignée 35S::P25E. (a) analyse comparative d'immuno-marquages obtenus sur cellules de racines de plantes contrôles (Témoin) et de plantes exprimant constitutivement la protéine p25. Les flèches noires indiquent la position des billes d'or colloïdal. N : noyau ; Nu : nucléole ; Cy : cytoplasme. (b) Analyse statistique effectuée sur l'ensemble des coupes analysées.

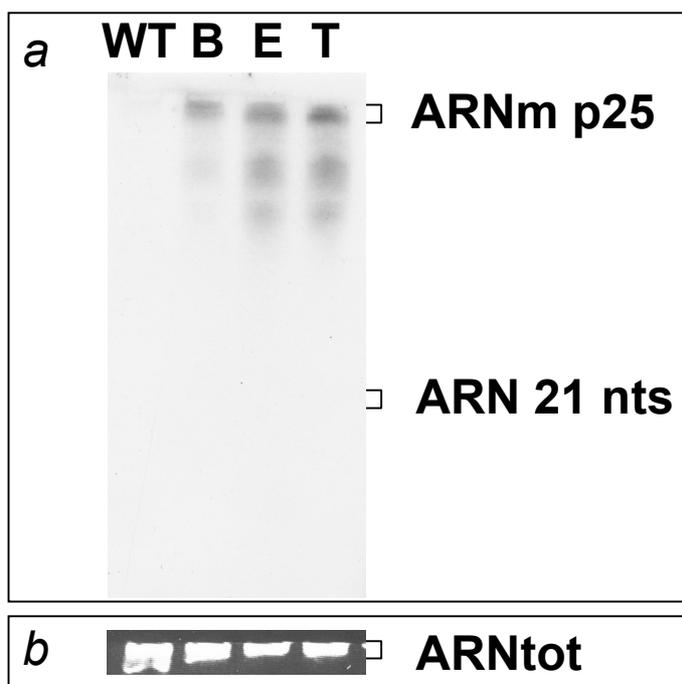


Figure II.17 : Détection par Northern blot des siRNA ciblant les messagers codant pour la protéine p25 dans les feuilles d'*Arabidopsis* sauvages et transgéniques. Des quantités similaires d'ARN totaux (~20 µg) de feuilles de plantes sauvages (WT) et transgéniques issues des lignées 35S::P25B (B), 35S::P25E (E) et 35S::P25T (T) sont analysées par hybridation moléculaire. La sonde spécifique de la séquence codante de la protéine p25 permet de cibler à la fois les siRNA (ARN 21 nts) et les ARN de haut poids moléculaire (ARNm p25). (b) La visualisation des ARN sous UV renseigne sur les quantités d'ARN totaux déposées dans chacune des pistes.

d'extraits de protéines totales, provenant de quantités identiques de feuilles de plantes homozygotes, ont été séparées sur gel SDS-PAGE et analysées par western blot (WB, figure **II.15**). Les signaux obtenus pour les dilutions $\frac{1}{4}$ de chaque lignée permettent de détecter des quantités comparables de protéines totales (figure **II.15**, partie MB, pistes 4, 8 et 12). Si le taux d'expression de la protéine p25 semble être identique dans les plantes *35S::25E* et *35S::25T*, l'expression de la protéine p25 dans les plantes *35S::25B* semble être 1,5 fois plus faible (figure **II.15**, partie WB, pistes 4, 8 et 12). Ainsi l'insertion du transgène dans le génome de ces lignées homozygotes monocopies ne semble pas affecter significativement l'expression de la protéine p25.

Nous avons ensuite caractérisé la localisation subcellulaire de la protéine p25 dans les plantes des lignées *35S::25B* et *35S::25E*. Une approche par microscopie électronique réalisée après immuno-marquages spécifiques de coupes de feuilles et de racines a été choisie. Nous avons utilisé comme contrôle lors de ces expériences des plantes contenant un ou plusieurs T-DNA sans insert. Dans les cellules des plantes témoins, le dénombrement des billes d'or colloïdal révèle la présence de bruit de fond aspécifique uniforme entre le compartiment nucléaire et cytoplasmique de la cellule (Témoin, figure **II.16**). A l'inverse, la même expérience effectuée sur les coupes de tissus provenant de la lignée transgénique *35S::25E* présente un marquage nucléaire significatif de l'ordre de 75% (*35S::P25E*, figure **II.16**). Ces observations permettent de conclure que la localisation subcellulaire de la protéine p25, est comparable à celle retrouvée en contexte viral (Haeberlé and Stussi-Garaud, 1995 ; Vetter *et al.*, 2004) et en expression transitoire dans les cellules BY-2 de tabac (Vetter *et al.*, 2004).

Nous avons recherché la présence de petits ARN du type siRNA ("short interfering RNA") caractéristiques de l'induction d'un mécanisme de "silencing" ou PTGS, mais aussi du type miRNA ("microRNA"), qui pourraient cibler et dégrader les messagers codant pour la protéine p25 et donc modifier l'expression de la protéine. Leur présence pourrait participer à des dérèglements biologiques indépendants de l'expression de la protéine p25. Pour cela, des quantités équivalentes (20 μ g) d'ARN totaux de feuilles d'*Arabidopsis* sauvages (WT), et transgéniques (*35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T*), séparées sur gel de polyacrylamide dénaturant et visualisées sous UV (figure **II.17b**) ont été analysées par Northern blot à l'aide d'une sonde spécifique de la séquence de la protéine p25 (figure **II.17a**). Aucun si/miRNA de 21 à 23 nucléotides n'a été détecté dans nos expériences. Seuls les transcrits de haut poids moléculaire correspondant aux messagers codant pour la protéine p25 sont visualisés (figure **II.17a**, ARNm p25). Ainsi, la présence de transcrits provenant du transgène p25 ne semble pas interférer directement sur un mécanisme de régulation de l'expression des gènes par

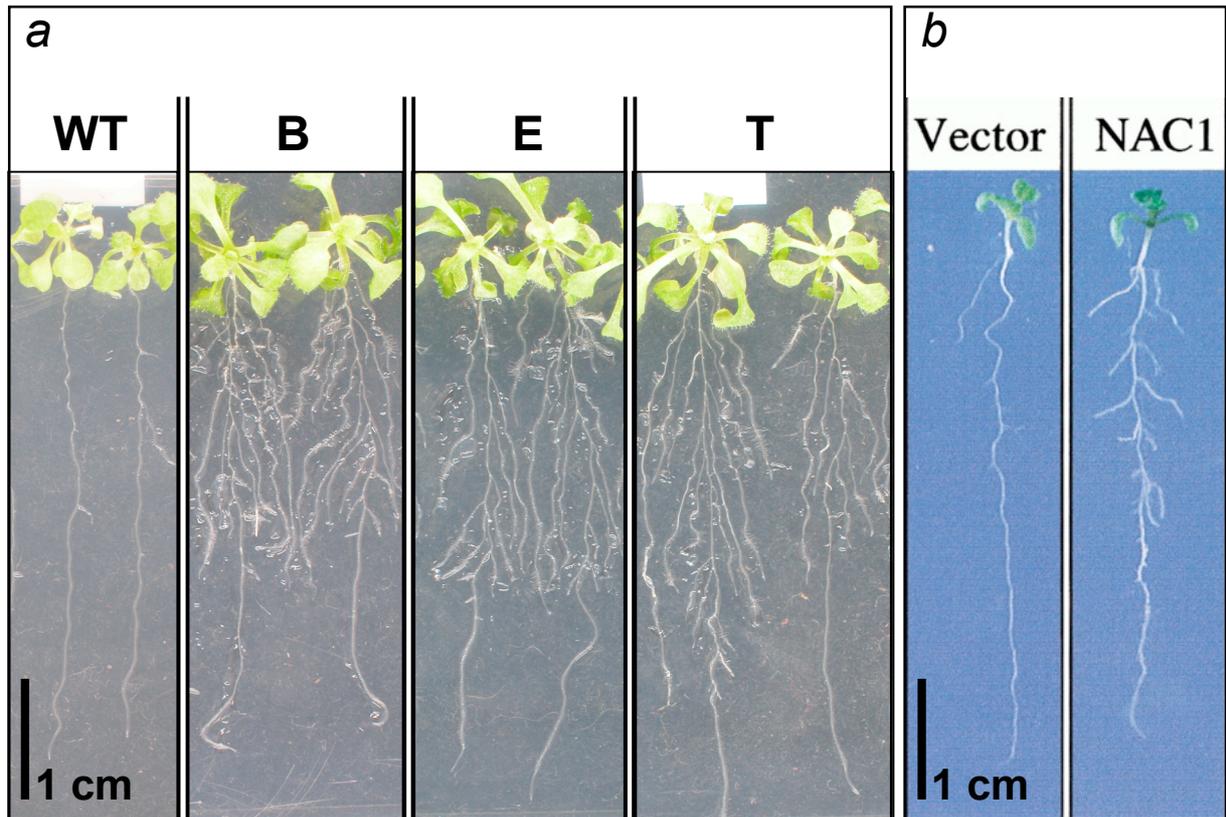


Figure II.18 : Les plantes exprimant constitutivement la protéine p25 ont un développement racinaire anormal similaire à celui des plantes qui surexpriment le gène *NAC1*. (a) Comparaison phénotypique des *Arabidopsis* sauvages (WT) et transgéniques issues des lignées 35S::P25B (B), 35S::P25E (E) et 35S::P25T (T) après 17 jours de culture *in vitro* (voir aussi figure II.34b). Les plantes issues des trois lignées transgéniques possèdent des racines secondaires plus nombreuses et plus longues que celles des plantes sauvages. (b) Les plantes qui surexpriment le gène *NAC1* (NAC1) présentent un nombre de racines secondaires beaucoup plus important que les plantes témoins (Vector). D'après Xie *et al.*, 2000.

PTGS ou miRNA (pour revue, Bartel, 2004). De cette manière, nous nous sommes assurés que les perturbations physiologiques et biochimiques observées dans les plantes *35S::P25* peuvent être attribuées à l'expression exclusive de la protéine p25 du BNYVV.

3.2. Caractérisation phénotypique des *Arabidopsis* transgéniques *35S::P25*

3.2.1. Phénotype foliaire et racinaire des *Arabidopsis 35S::P25*

Les phénotypes foliaires et racinaires de plantes sauvages (WT) et transgéniques monocopies homozygotes (*35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T*) ont été comparés pour identifier de possibles perturbations occasionnées par l'expression de la protéine p25. Dans un premier temps, nous avons pu constater des différences de germination des graines d'un même lot, ce qui rend difficile les comparaisons phénotypiques des plantes puisqu'elles présentent des stades de croissance distincts. De plus, nous avons remarqué que les plantes *35S::P25* présentent une croissance légèrement plus rapide que celles des plantes témoins (non montré). Pour remédier à ces problèmes, nous avons effectué des germinations différentielles de différents lots de graines afin de prélever des plantules de tailles identiques à des stades très précoces de croissance (après 5 jours de croissance). Les germinations ont été effectuées sur milieu non sélectif positionné verticalement. Après sélection, les plantules ont été repiquées sur un deuxième milieu également non sélectif. Après 12 jours de croissance dans les boîtes stériles positionnées horizontalement, les plantules sont prélevées et leurs phénotypes sont comparés (figure **II.18a**). L'observation des parties aériennes des plantes permet de constater que les plantes issues des trois lignées *35S::P25* (B, E et T) sont plus grandes que les plantes témoins (WT). Elles possèdent un nombre plus important de feuilles (8 feuilles contre 6 pour les plantes témoins) qui sont plus larges et plus étendues. Du point de vue racinaire, les plantes *35S::P25* possèdent des racines secondaires beaucoup plus nombreuses et plus longues que les plantes sauvages. Ce phénotype racinaire très marqué est constant pour les trois lignées distinctes (B, E et T, figure **II.18a**). Il rappelle dans une moindre mesure le phénotype racinaire de betteraves rhizomaniées pour lequel le rôle prépondérant de la protéine p25 a été supputé (Tamada *et al.*, 1999).

Ce phénotype racinaire se rapproche fortement de celui développé par des plantes transgéniques d'écotype Landsberg qui surexpriment le facteur de transcription NAC1 (figure **II.18b** ; Xie *et al.*, 2000). Cette protéine à domaine NAM ("no apical meristem") dont l'expression est dépendante de la cascade de signalisation de l'auxine, est impliquée dans la formation des racines latérales. La surexpression de *NAC1* conduit à la production d'un plus

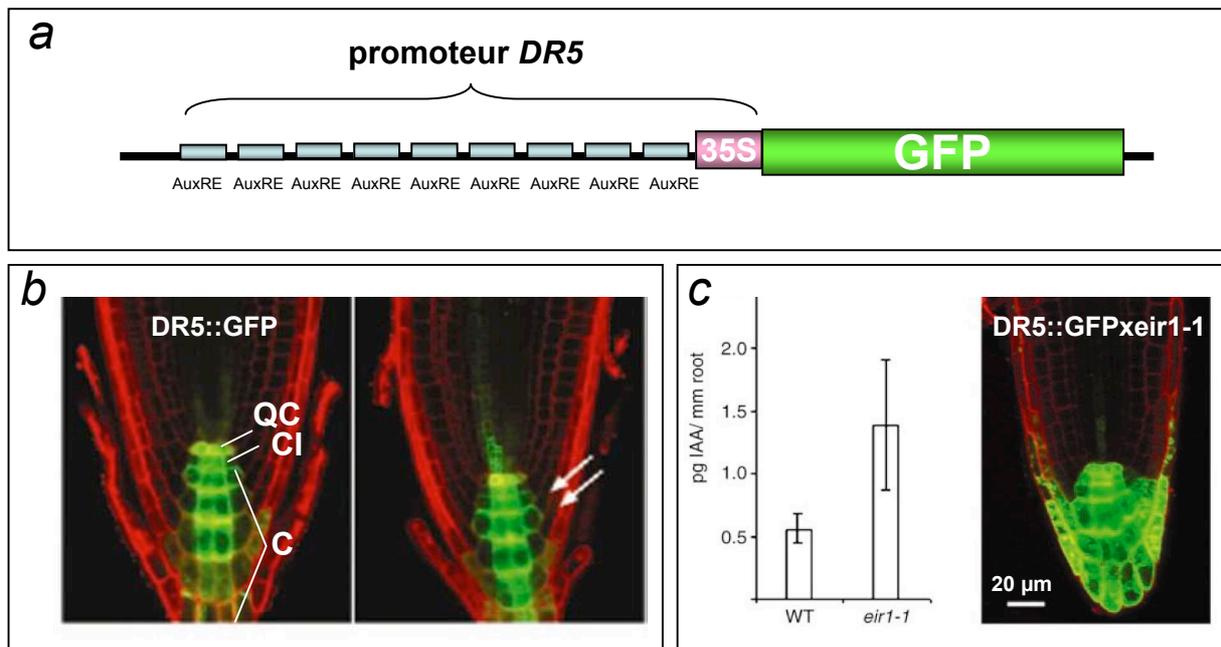


Figure II.19 : Caractéristiques d'une lignée d'*A. thaliana* exprimant le gène rapporteur GFP sous la dépendance d'un promoteur sensible à l'auxine d'après Ottensschläger *et al.*, 2003. (a) Représentation schématique de la construction *DR5::GFP*. La séquence codante de la protéine GFP est placée sous contrôle du promoteur DR5 composé de 9 répétitions de l'élément TGTCTC appelé "auxin-responsive element" (AuxRE) placées en amont du promoteur minimal 35S du CaMV. (b) Observation par microscopie confocale des apex racinaires de plantes *DR5::GFP* en réponse à l'auxine. La localisation de la fluorescence essentiellement au niveau des partie QC ("quiescent center"), CI ("columella initial") et C ("columella") des racines placées verticalement, est légèrement modifiée (flèches blanches) après 1h30 de gravistimulation. (c) Détermination par spectrométrie de masse (partie gauche) des taux d'IAA ("indol-3-acetic acid") contenus dans les apex racinaires des plantes sauvages (WT) ou mutantes (*eir1-1*) touchées dans le transport de l'auxine. Cette augmentation du taux d'auxine est confirmée par l'analyse de l'expression du gène rapporteur dans les lignées *DR5::GFP* \times *eir1-1* (partie droite).

grand nombre de racines latérales comme on peut le voir sur la figure **II.18b**. A l'inverse, l'extinction de son expression empêche le développement des racines latérales (Xie *et al.*, 2000). L'inhibition de la formation des racines latérales est également décrite dans le cas des mutants *axr1*, *axr4* ou *aux1* ("auxin-résistant", Hobbie and Estelle, 1995, Timpote *et al.*, 1995), et en particulier le mutant *tir1* ("transport inhibitor response 1", Ruegger *et al.*, 1998), tous affectés dans la réponse à l'auxine. L'expression du gène *NAC1* est sous la dépendance de l'activation du récepteur à l'auxine TIR1, qui contrôle l'activation des gènes *AUX/IAA*. Les *AUX/IAA* sont des facteurs de transcription qui vont réguler, entre autres, l'expression de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. Ainsi, la synthèse de la protéine *NAC1* induite au niveau des cellules du péricycle des racines primaires, conduit à l'émergence de primordia de racines latérales à partir de cette couche cellulaire très spécialisée.

Nous avons donc supposé que la voie de signalisation de l'auxine pouvait être affectée par l'expression constitutive de la protéine p25 dans les plantes *35S::P25*.

3.2.2. Phénotype racinaire des *Arabidopsis DR5::GFP* x *35S::P25*

En parallèle aux approches décrites plus loin dans ce chapitre, nous avons cherché à confirmer que le phénotype observé sur les plantes transgéniques homozygotes *35S::P25* est dû à la seule expression de la protéine p25 et non à la présence d'une mutation présente dans la lignée sauvage Col-0 qui a servi à la transformation. Habituellement, une expérience de rétro-croisement ("back-cross") de la lignée à tester avec une plante sauvage permet de caractériser le phénotype des plantes hétérozygotes de la génération F1 obtenues après croisement ou éventuellement celui de plantes homozygotes de la génération F2. La conservation du phénotype renseigne sur le caractère dominant ou récessif de la modification génétique étudiée et confirme le rôle direct du transgène dans les phénotypes observés.

Dans notre cas, nous avons choisi d'effectuer un rétro-croisement avec des *Arabidopsis* transgéniques (Col-0) comportant le transgène *DR5::GFP*. Ces plantes *DR5::GFP* expriment la protéine GFP sous le contrôle du promoteur artificiel *DR5* qui dirige l'expression du gène en réponse à l'auxine (figure **II.19a**). Ce promoteur comporte la séquence minimale de 46 pb du promoteur *35S* du CaMV ainsi que neufs répétitions en tandem de l'élément TGTCTC appelé "auxin-responsive element" (AuxRE) (Ulmasov *et al.*, 1997b). Cet élément est habituellement retrouvé dans les promoteurs des gènes de réponse à l'auxine ("auxin response genes" ou "AuxRE genes") (Ulmasov *et al.*, 1995) placés sous le contrôle transcriptionnel des facteurs ARF et *AUX/IAA* (Ulmasov *et al.*, 1997a, Ulmasov *et al.*, 1999, Hagen and

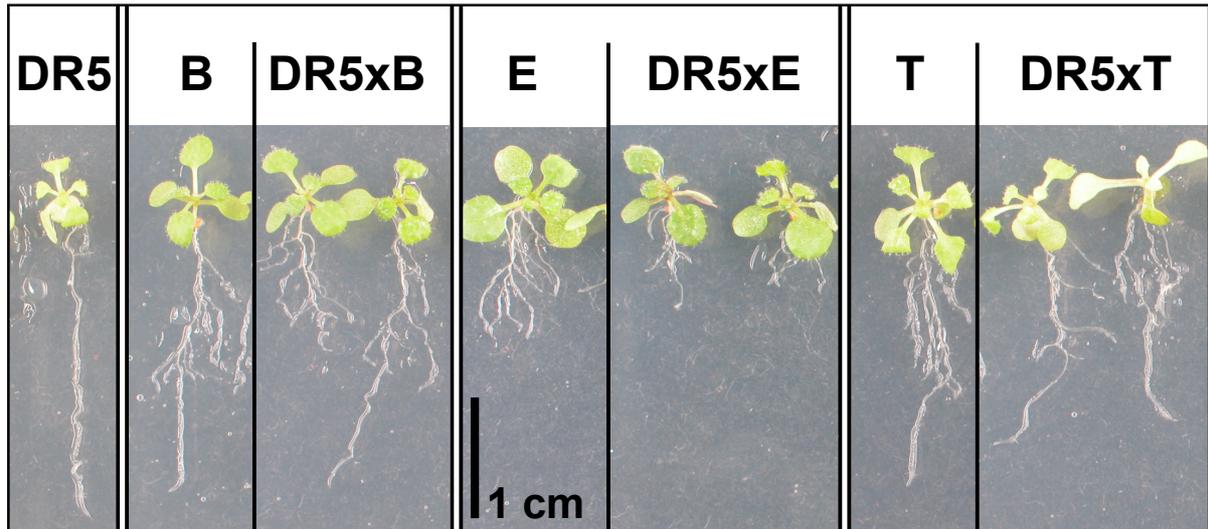


Figure II.20 : Comparaison phénotypique des *Arabidopsis* transgéniques homozygotes DR5::GFP (DR5), 35S::P25B (B), 35S::P25E (E) et 35S::P25T (T), et des plantes hétérozygotes DR5::GFPx35S::P25B (DR5xB), DR5::GFPx35S::P25E (DR5xE) et DR5::GFPx35S::P25T (DR5xT) obtenues par rétro-croisements. Les plantes sont comparées après 14 jours de croissance sur milieu kanamycine, à l'exception des plantes DR5::GFP. Toutes les plantules 35S::P25 possèdent des racines secondaires plus nombreuses et plus longues que celles des plantes parentales DR5::GFP.

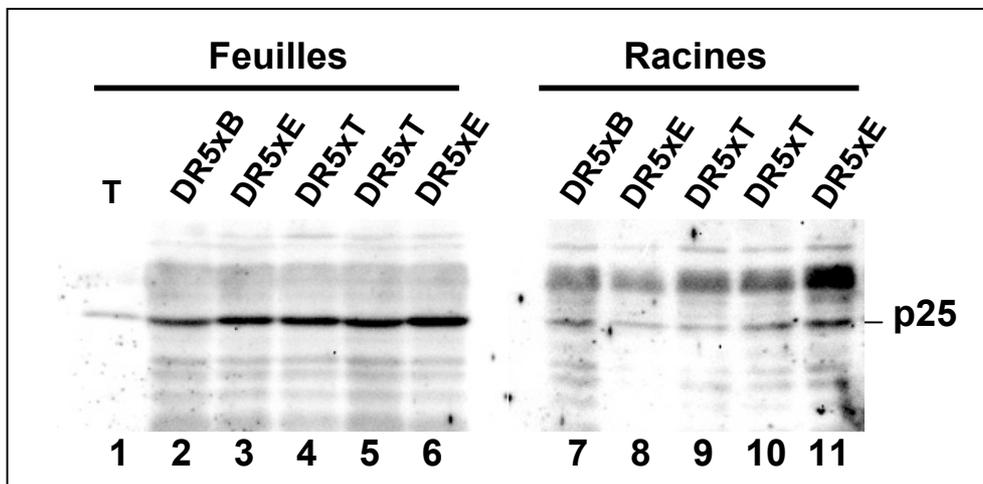


Figure II.21 : La protéine p25 est retrouvée dans les extraits de feuilles et de racines des plantes hétérozygotes DR5::GFPx35S::P25B (DR5xB) ou DR5::GFPx35S::P25E (DR5xE) ou DR5::GFPx35S::P25T (DR5xT). Des quantités similaires d'extraits protéiques, issus de plantes âgées de 14 jours sont analysées par western blot. Les plantes transgéniques expriment la protéine p25 à des taux comparables. Un extrait de feuilles de plantes 35S::P25T (T) non équilibré avec les autres échantillons constitue le témoin positif.

Guilfoyle, 2002). L'expression du gène rapporteur *GUS* (β -glucuronidase) sous le contrôle du promoteur *DR5* permet de localiser précisément après coloration la réponse de l'auxine dans les différents compartiments cellulaires des racines (Sabatini *et al.*, 1999). Les modifications dans l'accumulation ou le transport de l'auxine peuvent ainsi être étudiées après divers traitements des plantes par des inhibiteurs du transport, exposition des plantes à des taux différents d'auxine exogène ou d'analogues de l'auxine, ou même après croisement avec des mutants touchés dans la réponse à l'auxine. De la même façon, la construction *DR5::GFP* permet, sans aucun traitement, simplement par observation des plantes par microscopie à épifluorescence ou microscopie confocale, de visualiser la distribution de l'auxine dans les différents types cellulaires des racines. Les plantes *DR5::GFP* permettent par exemple d'étudier la localisation de la réponse à l'auxine dans les apex racinaires (partie gauche, figure **II.19b**) et d'observer le transport différentiel de l'auxine dans ces apex impliqué dans la régulation du gravitropisme (partie droite, flèches blanches, figure **II.19b**, Ottensschläger *et al.*, 2003). De plus, le croisement de ces plantes *DR5::GFP* avec d'autres plantes transgéniques permet d'estimer les taux d'auxine des racines de ces dernières. Par exemple, le croisement des plantes *DR5::GFP* avec le mutant *eir1-1*, touché dans le transport de l'auxine allant de l'apex racinaire vers la zone plus haute d'élongation racinaire, permet de visualiser une fluorescence plus importante (partie droite, figure **II.19c**), synonyme d'une augmentation des taux d'auxine dans les racines du mutant *eir1-1* de l'ordre de 2,5 (graphique, figure **II.19c**, Ottensschläger *et al.*, 2003). Dans notre cas, le croisement des plantes *DR5::GFP* avec les plantes *35S::P25*, puis l'observation de la fluorescence des plantes résultantes, pouvait nous renseigner sur les modifications induites par l'expression de la protéine p25 du BNYVV dans l'accumulation de l'auxine et surtout dans son transport différentiel au niveau des apex racinaires.

Les rétro-croisements effectués entre la lignée *DR5::GFP* et les plantes *35S::P25* issues des trois lignées indépendantes (*35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T*) nous ont permis d'obtenir des plantes hétérozygotes de la génération F1. Ces plantes (*DR5xB*, *DR5xE* et *DR5xT*, figure **II.20**) cultivées sur milieu enrichi en kanamycine présentent un phénotype racinaire comparable à celui des plantes *35S::P25* parentales (B, E et T, figure **II.20**), puisque nous observons la présence d'un nombre plus important de racines secondaires mais aussi la croissance plus rapide de ces plantes par rapport aux plantes témoins (*DR5*, figure **II.20**). Nous avons recherché la présence de la protéine p25 dans ces plantes issues de la génération F1. L'expression de la protéine p25 est détectable à des taux d'expression comparables, que

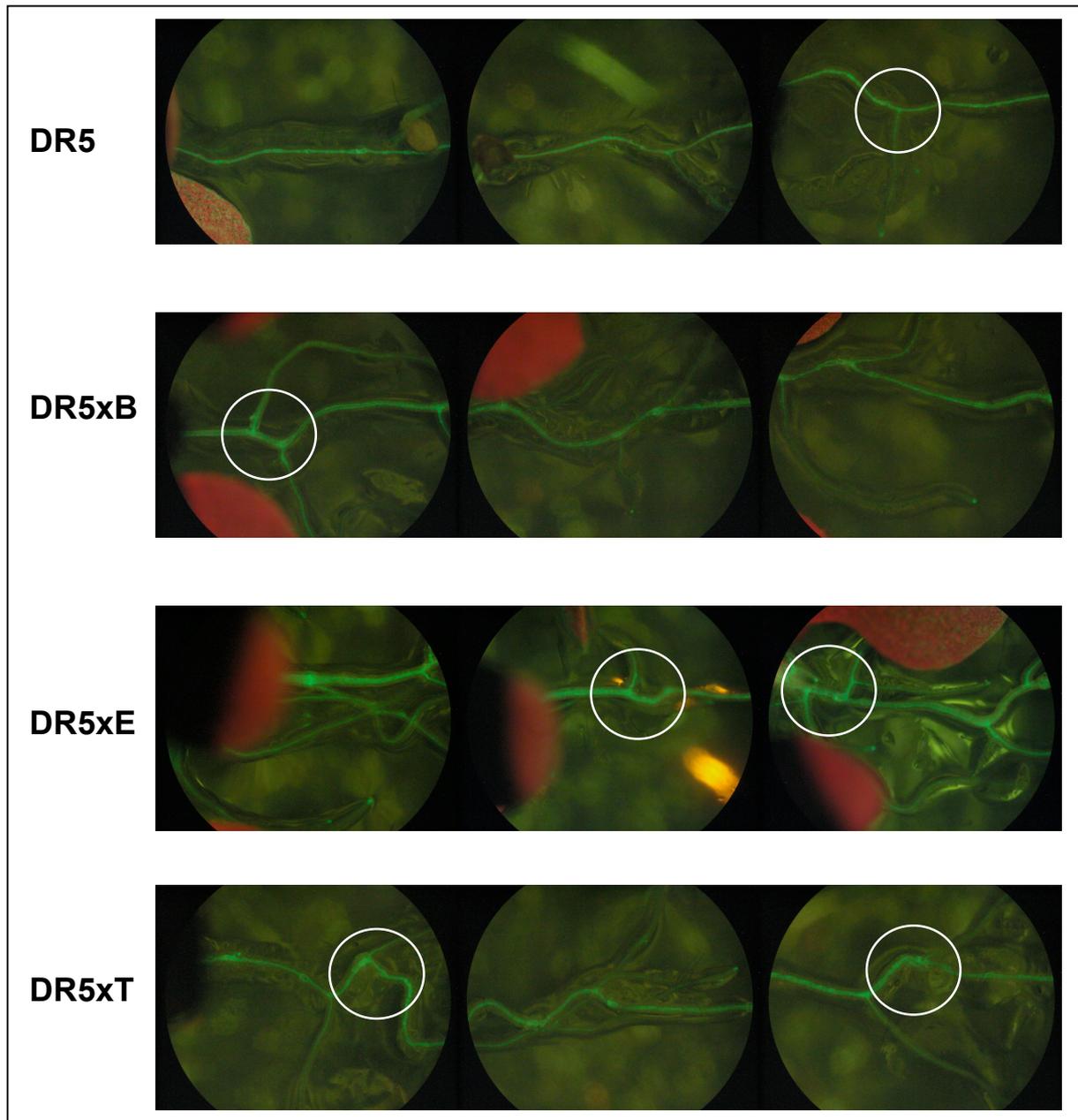


Figure II.22 : Les plantes hétérozygotes DR5::GFPx35S::P25B (DR5xB) ou DR5::GFPx35S::P25E (DR5xE) ou DR5::GFPx35S::P25T (DR5xT) expriment toutes la protéine GFP. La fluorescence liée à l'expression de la GFP est visualisée dans les racines des plantules de ces trois lignées transgéniques sous une loupe binoculaire à épifluorescence (grossissement x5) et comparée à celle des plantes homozygotes DR5::GFP (DR5). Les cercles blancs indiquent les zones de branchement entre la racine primaire et les racines secondaires, plus fluorescentes pour les plantes issues des croisements (DR5xB, DR5xE et DR5xT) que pour les plantes parentales DR5::GFP. Les prises de vues ont été réalisées dans les mêmes conditions.

ce soit dans les feuilles ou les racines (figure **II.21**). En conclusion, ces résultats nous renseignent sur le phénotype dominant apporté par l'expression de la protéine p25. Nous avons donc cherché à obtenir des plantes *DR5::GFP-35S::P25* de la génération F2 homozygotes pour les deux insertions, pour pouvoir comparer visuellement les profils d'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur *DR5* en présence ou en absence de la protéine p25 dans ces plantes.

Avant l'obtention des plantes homozygotes *DR5::GFP-35S::P25*, nous avons réalisé une étude comparative préliminaire de plantes *DR5::GFP-35S::P25* hétérozygotes issues de la génération F1 et de plantes *DR5::GFP* homozygotes. Rappelons que le phénotype de croissance racinaire exacerbée des plantes *DR5::GFP-35S::P25* hétérozygotes rappelle celui des plantes *35S::P25* homozygotes. Nous avons sélectionné des plantes cultivées sur kanamycine qui présentaient un stade de développement similaire, et nous les avons observées à l'aide d'une loupe binoculaire à épifluorescence. Grâce à cette approche, nous avons d'une part confirmé l'expression de la protéine GFP dans l'ensemble des plantes *DR5::GFP-35S::P25*, et d'autre part visualisé la présence d'un signal fluorescent plus intense dans le cas de ces plantes hétérozygotes (figure **II.22**). Ainsi, un signal fluorescent est visible tout au long du système racinaire et cette fluorescence est trouvée dans le système vasculaire et dans les cellules du péricycle des racines. L'expression est plus forte dans les racines des plantes *DR5::GFP-35S::P25E* (*DR5xE*, figure **II.22**). Un fort signal fluorescent est également détecté au niveau des zones de branchement entre les racines primaires et les racines latérales (figure **II.22**, cercles blancs). Cette fluorescence est à nouveau plus intense dans le cas des plantes hétérozygotes *DR5::GFP-35S::P25E*.

Ces résultats préliminaires ne nous permettent pas pour le moment de conclure avec certitude quant à un réel effet de l'expression de la protéine p25 sur la stimulation de la signalisation de l'auxine conduisant à une augmentation de l'expression de la protéine GFP. En effet, les plantes contrôles (*DR5::GFP*) utilisées lors de ces observations sont homozygotes, alors que les plantes *DR5::GFP-35S::P25* de la génération F1 sont quant à elles hétérozygotes. L'obtention de plantes *DR5::GFP-35S::P25* homozygotes issues de la génération F2 reste donc nécessaire pour comparer au plus juste les taux d'expression de la GFP en réponse à l'auxine et à l'expression de la protéine p25. La localisation de l'expression de la GFP dans ces plantules homozygotes pourra être étudiée par microscopie confocale, plus particulièrement au niveau des apex racinaires en croissance.

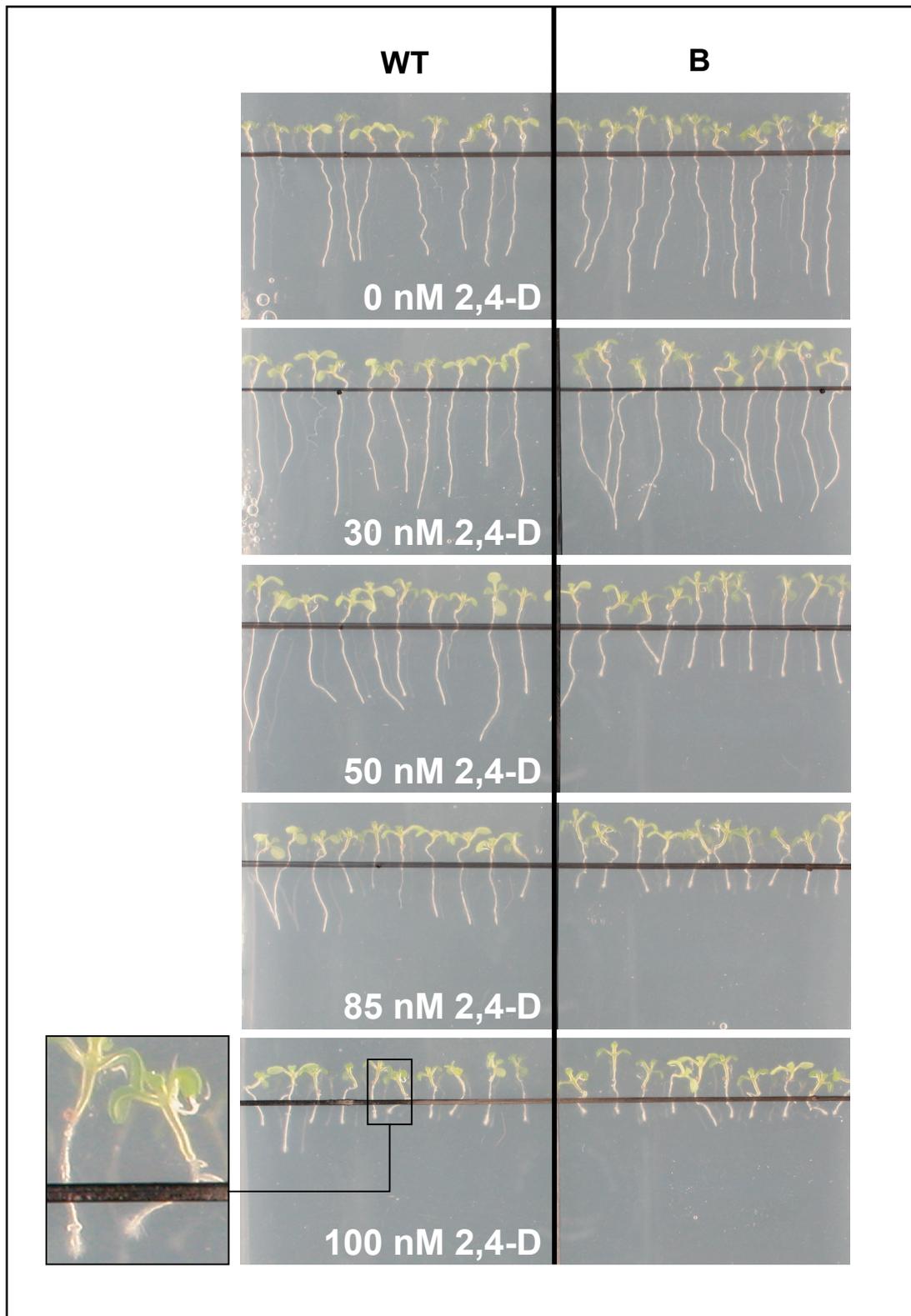


Figure II.23 : L'expression de la protéine p25 augmente la sensibilité des plantes au 2,4-D ("2,4-dichlorophenoxy acetic acid), un analogue de l'auxine. Analyse comparative de la croissance verticale d'*Arabidopsis* sauvages (WT) et transgéniques de la lignée 35S::P25B (B) sur milieu ne contenant pas (0 nM) ou contenant des concentrations croissantes de 2,4-D (30 , 50 , 85 et 100 nM). Dix plantules âgées de 5 jours, de tailles identiques, de chaque génotype WT et B ont été repiquées et leur apex racinaires alignés (lignes noires). Après 6 jours de croissance verticale, l'inhibition de l'élongation racinaire par le 2,4-D est estimée par rapport à la croissance normale des plantes témoins (0 nM). La présence de 2,4-D à une concentration de 100 nM induit une très forte inhibition de la croissance des racines primaires mais active la croissance de racines latérales ou adventives et des poils racinaires (WT, 100 nM, détail).

4. Réponse des *Arabidopsis 35S::P25* à différentes hormones végétales

4.1. Croissance racinaire en présence de 2,4-D

Le phénotype racinaire, retrouvé de façon systématique au niveau des lignées *Arabidopsis 35S::P25* homozygotes, marqué par une émergence de racines latérales plus importante que chez les plantes sauvages, suggère que la voie de signalisation de l'auxine peut être constitutivement activée dans ces plantes transgéniques. En effet, l'auxine est une hormone impliquée dans le développement des plantes, en particulier dans la croissance racinaire. Cette hormone appliquée de façon exogène inhibe fortement la croissance de la racine primaire, et favorise l'émergence et la croissance des racines latérales.

Pour vérifier l'effet de l'expression de la protéine p25 sur les voies de signalisation de l'auxine, nous avons testé l'effet inhibiteur d'un apport exogène de 2,4-D ("2,4-dichlorophenoxy acetic acid") sur la croissance racinaire de jeunes plantules *Arabidopsis* sauvages et *35S::P25* homozygotes (lignées *35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T*). Le 2,4-D est un analogue de l'auxine plus stable que l'IAA ("indole acetic acid") photosensible. Lorsqu'il est utilisé à fortes doses, le 2,4-D constitue un herbicide puissant.

Des plantules de 5 jours, dont la germination a été initiée sur milieu non sélectif, ont été sélectionnées pour équilibrer leur taille puis ont été déposées sur différents milieux contenant des concentrations croissantes en 2,4-D (0 nM, 30 nM, 50 nM, 85 nM et 100 nM) en prenant soin d'aligner leurs apex racinaires. Après 6 jours de croissance verticale sur ces milieux contenant ou pas l'analogue de l'auxine, l'élongation des racines primaires des plantes transgéniques a ensuite été systématiquement comparée à celle des racines des plantes sauvages (WT). Les résultats obtenus sont similaires quelque soit la lignée *35S::P25* utilisée et sont illustrés sur la figure **II.23** qui présente l'une des expériences. Dans ce cas, la croissance des plantes sauvages (WT, partie gauche, figure **II.23**) et des plantes de la lignée *35S::P25B* (B, partie droite, figure **II.23**) est analysée. Comme on peut le voir au niveau des plantes sauvages (WT), plus la concentration en 2,4-D est élevée, plus la croissance racinaire est inhibée. En présence de 100 nM de 2,4-D, la croissance de la racine primaire est quasiment stoppée. De plus, la croissance de racines latérales ou adventives est favorisée, tout comme l'émergence des poils racinaires à l'extrémité de la racine principale (WT, 100 nM, figure **II.23**, détail). Dans le cas des plantes *35S::P25B*, cette inhibition est observée en présence de concentrations plus faibles en 2,4D (B, 50 nM, 85 nM, figure **II.23**, flèches noires). Ce résultat, obtenu également pour les plantes *35S::P25E* et *35S::P25T*, suggère que

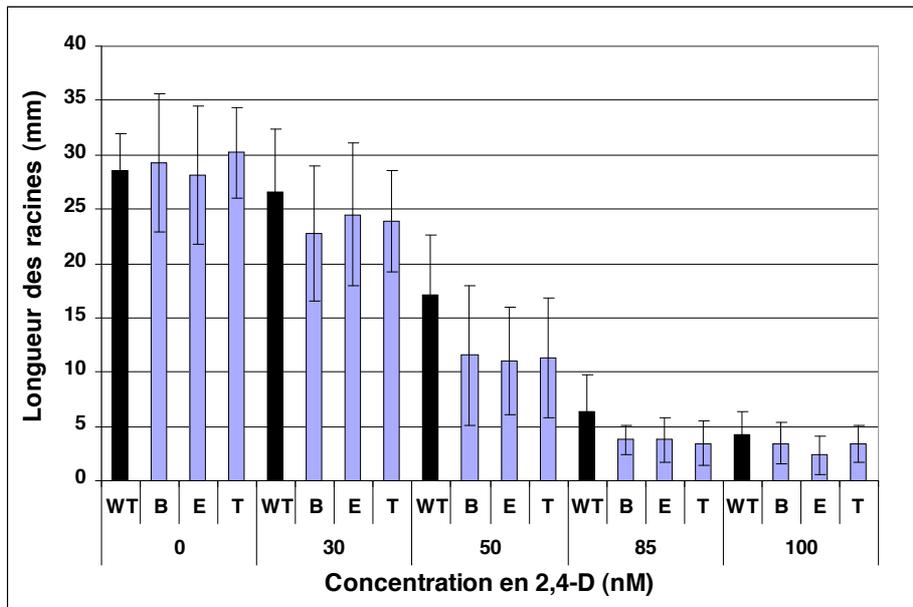


Figure II.24 : Représentation graphique de l'effet inhibiteur du 2,4-D sur la croissance racinaire des plantules. Les moyennes des tailles sont calculées sur 60 racines de plantules sauvages (WT) ou 20 racines de plantules issues de chacune des trois lignées transgéniques 35S::P25B (B), 35S::P25E (E), ou 35S::P25T (T) après 11 jours de croissance verticale sur milieu ne contenant pas (0 nM) ou contenant différentes concentration de 2,4-D (30, 50, 85 ou 100 nM). Les barres d'erreur représentent les écart-types calculés pour chaque lot de plantes.

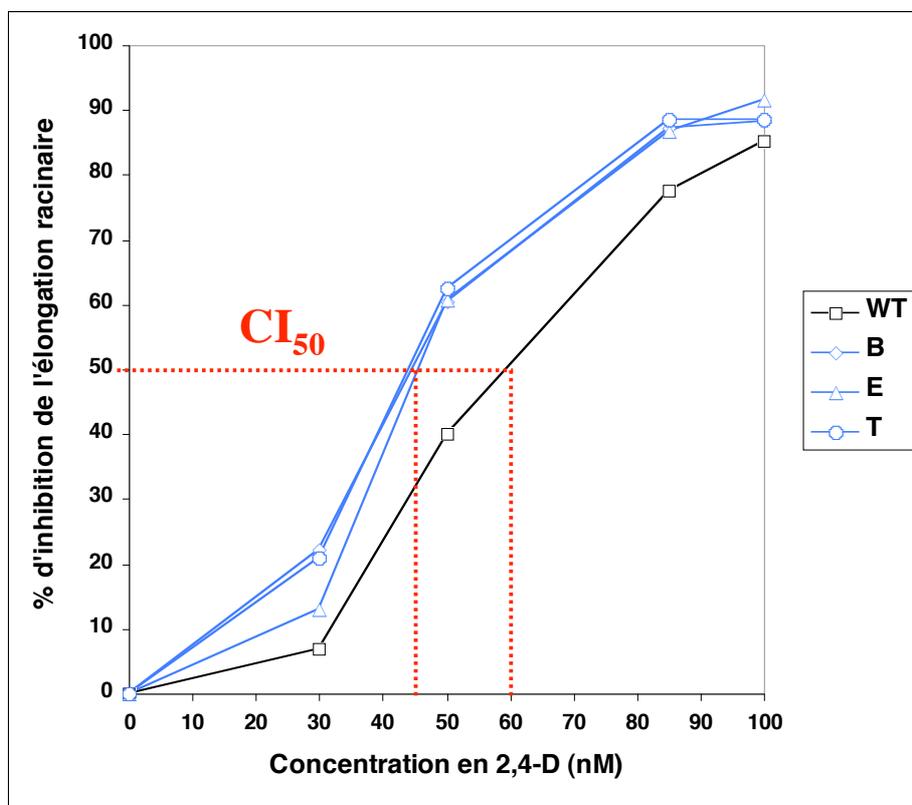


Figure II.25 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de l'élongation racinaire des *Arabidopsis* en fonction des concentrations en 2,4-D. Les pourcentages d'inhibition sont calculés à partir des données représentées dans la figure II.24 comme suit : $\%inh = 100 \times [(moyenne\ taille\ 0\ nM - moyenne\ taille = f(nM\ 2,4-D)) / (moyenne\ taille\ 0\ nM)]$. La valeur CI_{50} permet de visualiser les concentrations en 2,4-D nécessaires pour atteindre 50% d'inhibition de la croissance racinaire.

les plantes qui expriment la protéine p25 du BNYVV sont plus sensibles à l'apport exogène d'auxine que les plantes sauvages.

Une deuxième série d'expériences a été réalisée en mesurant cette fois les racines après 11 jours de croissance verticale sur des lots de 20 plantules représentant chaque lignée transgénique et 60 plantules pour la lignée sauvage. Les moyennes des longueurs et les écarts-types ont été déterminés et représentés graphiquement (figure **II.24**), puis les pourcentages d'inhibition de l'élongation racinaire ont été calculés et représentés en fonction de la concentration en 2,4D (figure **II.25**).

En absence de 2,4-D (0 nM, figure **II.24**), on constate que les racines des plantes *35S::P25* se sont mieux développées que celles des plantes sauvages durant les 11 jours de croissance verticale. Cette observation est en accord avec la croissance rapide des plantes *35S::P25* déjà observée et décrite précédemment (§3.2.1). La représentation graphique des pourcentages d'inhibition (figure **II.25**) permet de s'abroger de cette légère différence de croissance. Ainsi, en présence de l'analogue de l'auxine, un effet inhibiteur sur les racines est observé même pour de faibles concentrations (30 nM de 2,4-D, figure **II.25**). Si l'élongation de la racine primaire des plantes sauvages (WT) est inhibée à 5% en présence de 30 nM de 2,4-D, celle des plantes *35S::P25* est affectée de 12 à 20%, soit deux à quatre fois plus fortement. Cette inhibition devient beaucoup plus marquée pour les concentrations en 2,4-D plus fortes (50 nM et 85 nM de 2,4-D, figure **II.25**), puis n'est plus observable en présence de 100 nM de 2,4-D, puisque quelque soit la lignée, l'élongation racinaire est presque nulle (100 nM de 2,4-D, figure **II.24**) ce qui correspond à une inhibition presque totale de l'élongation (100 nM de 2,4-D, figure **II.25**). On atteint ainsi un maximum de saturation des plantes en hormone, au-delà duquel les plantes présentent toutes le même phénotype quelque soit leur origine. Si la représentation graphique des pourcentages d'inhibition de l'élongation racinaire permet de confirmer la sensibilité accrue au 2,4-D des plantes transgéniques, il permet aussi de déterminer la concentration inhibitrice 50% en 2,4-D (CI_{50} , pointillés rouges, figure **II.25**). La CI_{50} est atteinte avec 60 nM de 2,4-D pour les plantes sauvages et seulement avec 45 nM de 2,4-D pour les plantes *35S::P25*, ce qui traduit leur plus forte sensibilité. Enfin, la comparaison des courbes obtenues avec les plantes issues des trois lignées *35S::P25*, et présentées sur la figure **II.25**, apporte également des précisions biologiques sur le rôle de la protéine p25 dans la sensibilité de ces plantes au 2,4-D. En effet, si le génotype des trois lignées transgéniques utilisées est distinct (sites d'insertion différents), ces plantes expriment

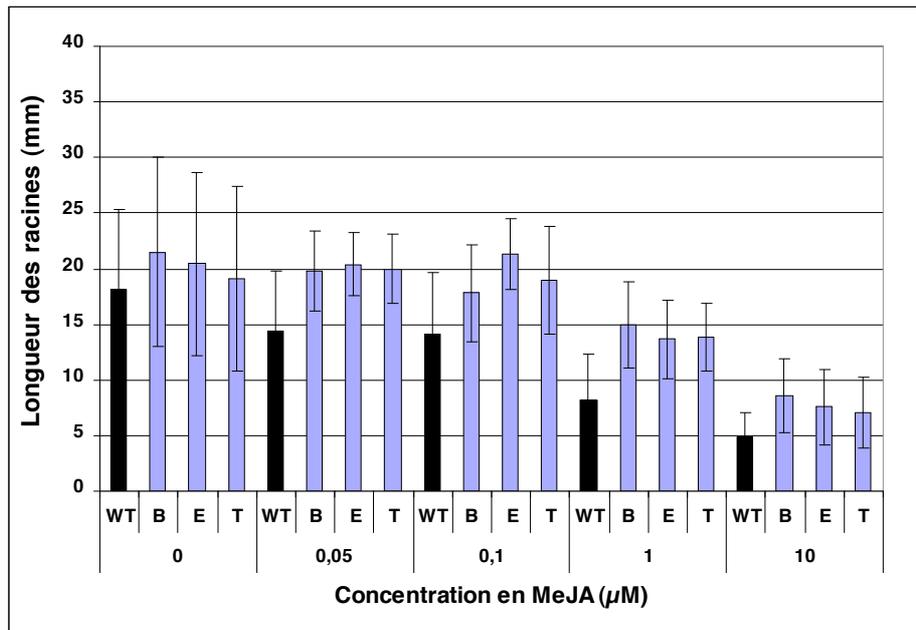


Figure II.26 : Représentation graphique de l'effet inhibiteur du MeJA ("methyl jasmonate") sur la croissance racinaire des plantules. Les moyennes des tailles sont calculées sur 60 racines de plantules sauvages (WT) ou 20 racines de plantules issues de chacune des trois lignées transgéniques 35S::P25B (B), 35S::P25E (E), ou 35S::P25T (T) après 11 jours de croissance verticale sur milieu ne contenant pas (0 µM) ou contenant différentes concentrations de MeJA (0.05, 0.1, 1 ou 10 µM). Les barres d'erreur représentent les écart-types calculés pour chaque lot de plantes.

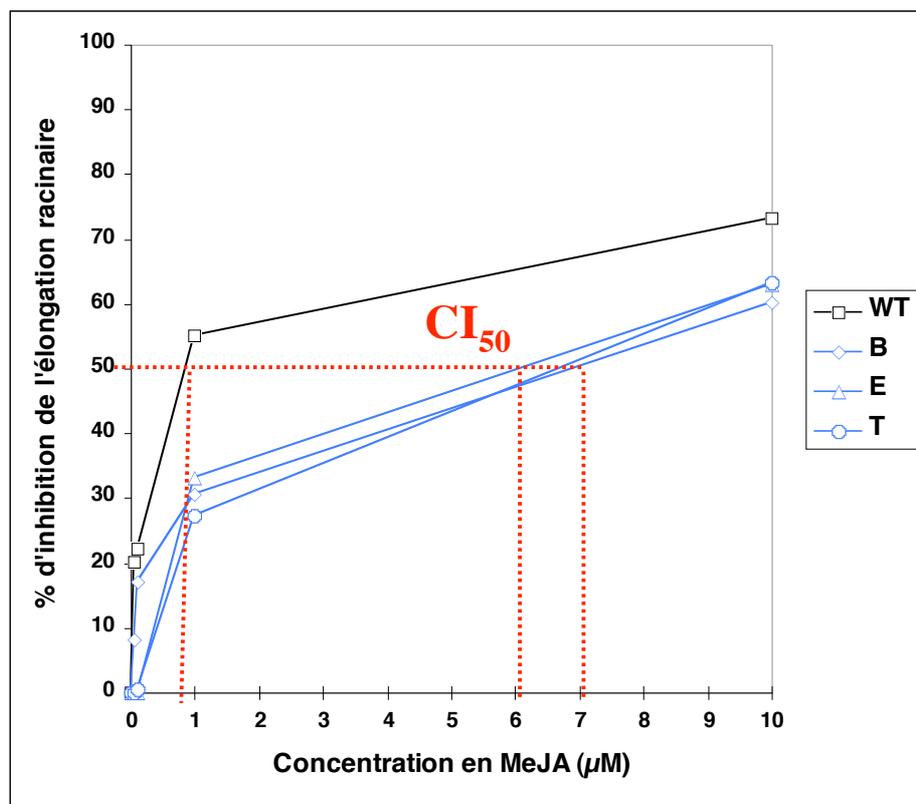


Figure II.27 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de l'élongation racinaire des *Arabidopsis* en fonction des concentrations en MeJA. Les pourcentages d'inhibition sont calculés à partir des données présentées sur la figure II.26 comme suit : $\%inh = 100 \times [(moyenne\ taille\ 0\ \mu M) - (moyenne\ taille\ =\ f(\mu M\ MeJA))] / (moyenne\ taille\ 0\ \mu M)$. La valeur CI_{50} permet de visualiser les concentrations en MeJA nécessaires pour atteindre 50% d'inhibition de la croissance racinaire.

toutes la protéine p25 et répondent toutes de manière remarquablement identique au 2,4-D (courbes bleues, figure **II.25**).

Nous pouvons ainsi envisager plusieurs hypothèses pour expliquer la sensibilité accrue des lignées *35S::P25* au 2,4-D et établir un lien entre l'expression de la protéine p25 et la réponse de ces plantes à l'auxine. Premièrement, l'expression de la protéine p25 pourrait induire localement un taux d'auxine plus important dans ces plantes en activant sa biosynthèse ou en modifiant son transport. Deuxièmement, la protéine p25 pourrait activer constitutivement la cascade de signalisation de cette hormone en agissant comme un agoniste des récepteurs de l'auxine. Enfin, la protéine virale pourrait activer directement ou indirectement l'expression des gènes habituellement placés sous le contrôle transcriptionnel des facteurs de transcription régulés par l'auxine (NAM, AUX/IAA, ...) impliqués dans la morphogénèse des racines. Avant d'explorer ces voies de biosynthèse et de signalisation, nous avons étudié l'effet d'une autre hormone végétale, le jasmonate, sur l'élongation racinaire.

4.2. Croissance racinaire en présence de MeJA

Nous avons réalisé les mêmes expériences que celles décrites précédemment en observant cette fois l'effet inhibiteur d'un apport exogène de MeJA ("methyl jasmonate") sur l'élongation racinaire des lignées *Arabidopsis* sauvages et *35S::P25*. Ce composé proche de l'acide jasmonique (JA), une hormone impliquée dans les voies de signalisation activées en réponse aux pathogènes ou à la blessure, exerce également un effet inhibiteur sur la croissance racinaire (Staswick *et al.*, 1992). L'effet d'un apport exogène de MeJA (0,05 μM , 0,1 μM , 1 μM et 10 μM) a été estimé sur des lots de 20 plantules représentant chaque lignée transgénique (*35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T*) et 60 plantules pour la lignée sauvage (WT), après 11 jours de croissance verticale. La figure **II.26** résume les résultats obtenus. La croissance légèrement plus rapide des racines des plantes *35S::P25* est à nouveau observée en absence d'hormone (0 μM , figure **II.26**). De plus, comme on peut le voir pour les plantes sauvages (WT, figure **II.26**), plus la concentration en MeJA est élevée, plus la croissance racinaire est inhibée. Par contre, cette inhibition de l'élongation racinaire paraît limitée pour les plantes *35S::P25* (B, E et T, figure **II.26**). La représentation graphique des pourcentages d'inhibition de l'élongation racinaire en fonction de la concentration en MeJA (figure **II.27**) rend compte d'une plus faible sensibilité des plantes *35S::P25* au jasmonate. Cette perte de sensibilité n'est pas liée au génotype des plantes *35S::P25*, mais bien à l'expression constitutive de la protéine p25 du BNYVV, puisque les trois lots de plantes issus de lignées

transgéniques indépendantes répondent de manière remarquablement identique. Ainsi, la CI_{50} est proche de $0,8 \mu\text{M}$ de MeJA pour les plantes sauvages et est 8 à 9 fois plus importante avec 6 à $7 \mu\text{M}$ de MeJA pour les plantes *35S::P25* (CI_{50} , pointillés rouges, figure II.27). Cette différence de sensibilité est également visible lorsque l'on compare le comportement des plantes en présence d' $1 \mu\text{M}$ de MeJA : l'ensemble des plantes *35S::P25* issues des trois lignées distinctes présente une inhibition de la croissance racinaire d'environ 30%, qui est deux fois plus faible que celle de 56% observée pour les plantes sauvages.

Un phénotype de résistance modérée au MeJA est également retrouvé dans le cas du mutant *jar1* ("methyl-jasmonate resistant 1" ; Staswick *et al.*, 1992, 2002) qui présente 20 à 30% d'inhibition de sa croissance racinaire en présence de $1 \mu\text{M}$ de MeJA et 30 à 40% d'inhibition avec $10 \mu\text{M}$ de MeJA (Staswick and Tiryaki, 2004). Une résistance beaucoup plus élevée est constatée pour le mutant *coi1* ("coronatine insensitive 1" ; Feys *et al.*, 1994 ; Xie *et al.*, 1998), qui montre uniquement 6% d'inhibition de sa croissance racinaire en présence de $1 \mu\text{M}$ de MeJA et seulement 20% d'inhibition avec $10 \mu\text{M}$ de MeJA (Xiao *et al.*, 2004). Le gène *COI1* code pour une protéine à motif F-box interagissant avec les protéines CULLIN1, RBX1 et les protéines ASK1 ou ASK2 pour former le complexe SCF^{COI1} intervenant dans la dégradation d'un certain nombre de répresseurs de la transcription des gènes en réponse au jasmonate (Xie *et al.*, 1998 ; Xu *et al.*, 2002). Les différents mutants *coi1* sont tous résistants à l'effet de jasmonate exogène et présentent une perte de résistance face à l'infection par les pathogènes (McConn *et al.*, 1997 ; Vijayan *et al.*, 1998 ; Stintzi *et al.*, 2001).

Nous avons ainsi conclu que l'expression de la protéine p25 rend les plantes résistantes à un apport exogène de jasmonate. La protéine p25, rappelons le, est responsable de la symptomatologie foliaire et racinaire induite par le BNYVV. Cette protéine virale pourrait jouer un rôle de facteur de pathogénicité en réduisant la cascade de signalisation du jasmonate impliquée dans l'induction des réactions de défense des plantes. Le jasmonate n'est pourtant pas la seule hormone intervenant dans ces réactions de défense. D'autres hormones sont également à l'origine de cascades de signalisation et d'activation de gènes qui sont plus ou moins interconnectées entre-elles. Il s'agit de l'acide salicylique (SA pour "salicylic acid") et de l'éthylène (ET) impliqués dans l'induction des réactions de défense aux pathogènes, mais aussi de l'acide abscissique (ABA ou "abscissic acid") intervenant dans la croissance et le développement des plantes et dans la réponse à différents stress biotiques et abiotiques.

Nous avons donc poursuivi notre étude en observant la croissance et le développement des plantes *35S::P25* en présence de ces différentes hormones ou de leur précurseur.

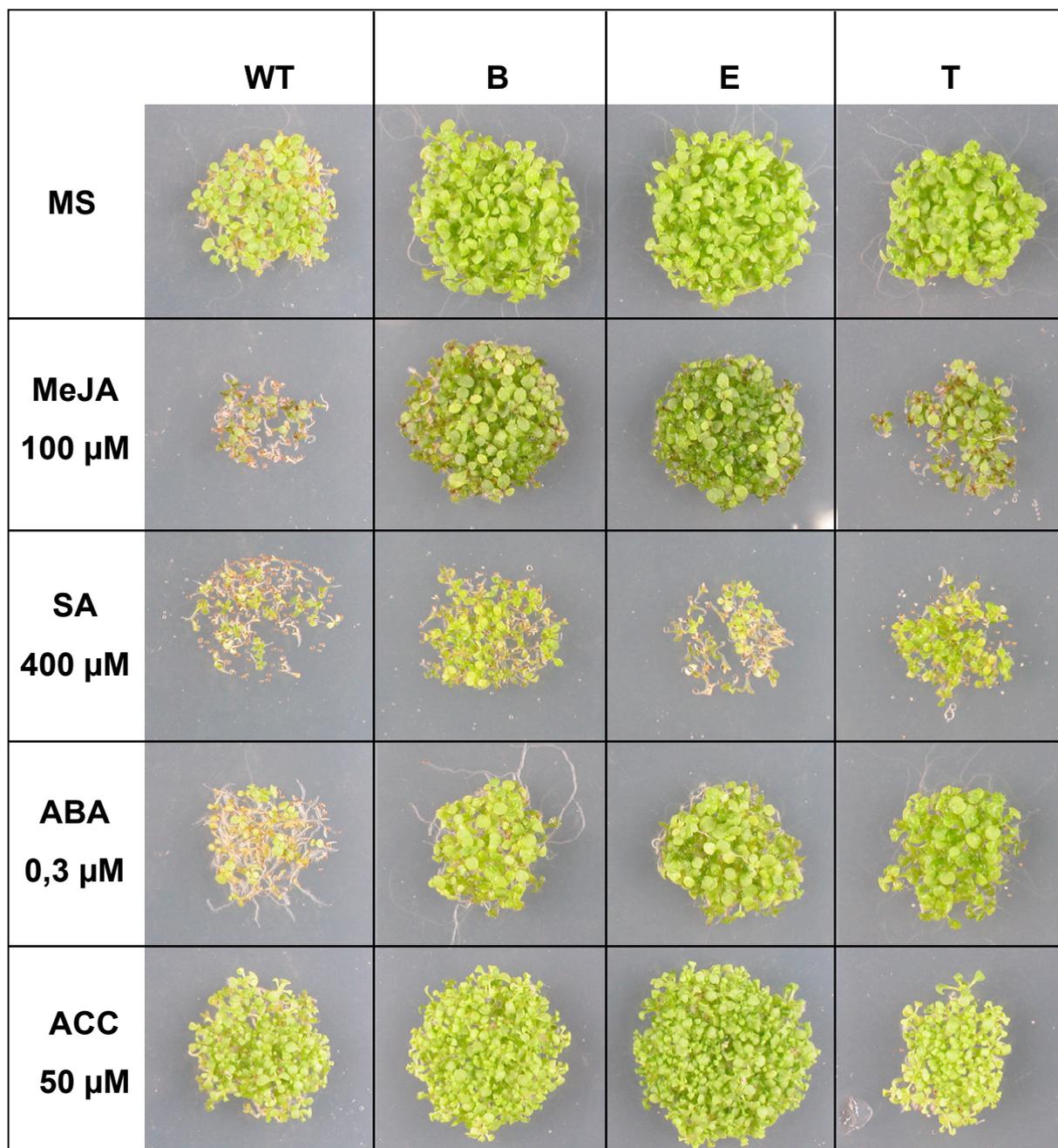


Figure II.28 : Effet de l'apport exogène d'hormones ou de leur précurseur sur la croissance des plantes sauvages (WT) et exprimant la protéine p25 (B, E et T). L'effet inhibiteur de 100 μ M de MeJA (méthyl jasmonate), ou 400 μ M de SA (acide salicylique), ou 0,3 μ M d'ABA (acide abscissique), ou 50 μ M d'ACC ("1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid") sur la germination des graines et la croissance des plantules est analysé après 14 jours de culture. L'aspect général de l'ensemble des plantules en amas est comparé.

4.3. Germination et croissance en présence de MeJA, SA, ABA, ACC

Nous avons analysé l'effet de plusieurs hormones végétales sur la germination et la croissance des plantes : le MeJA impliqué, tout comme le jasmonate (JA), dans la réponse à la blessure et à l'attaque des pathogènes nécrotrophes, l'acide salicylique (SA) sous forme de salicylate de sodium, une hormone impliquée dans la réponse aux pathogènes biotrophes, et l'acide abscissique (ABA) impliqué dans les situations de stress essentiellement abiotiques mais agissant également lors des réactions de défense aux pathogènes de façon plutôt antagoniste au jasmonate. Nous avons également testé l'effet de l'ACC ("1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid"), le précurseur de l'éthylène (ET), une hormone intervenant dans la réponse aux pathogènes et agissant de façon synergique avec le jasmonate. Pour cela, des quantités similaires de graines de plantes sauvages (WT) ou transgéniques (*35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T*) ont été déposées sur milieu MS simple ou contenant 100 μ M de MeJA, 400 μ M de SA, 0,3 μ M d'ABA ou 50 μ M d'ACC. Après 14 jours de culture, la germination et la croissance des plantules ont été comparées (figure **II.28**). Sur la boîte contrôle, nous avons pu observer à nouveau une croissance plus rapide des plantes *35S::P25*, quelque soit leur génotype (B, E et T : MS, figure **II.28**). Par ailleurs, les concentrations en MeJA, SA et ABA utilisées dans ce test sont connues pour inhiber la germination des graines et ralentir la croissance des plantes. Si cet effet inhibiteur est bien visible sur la croissance des plantes sauvages (WT : MeJA 100 μ M, ABA 0,3 μ M, figure **II.28**), il l'est beaucoup moins dans le cas des trois lignées de plantes *35S::P25*. Celles-ci se comportent sensiblement de la même manière et restent capables de germer et de se développer (B, E, T : MeJA 100 μ M, ABA 0,3 μ M, figure **II.28**). Par contre, en présence de 400 μ M de SA, leur germination et leur croissance est affectée (B, E, T : SA 400 μ M, figure **II.28**) mais plus faiblement que pour les plantes WT (WT : SA 400 μ M, figure **II.28**). Enfin, aucune différence de croissance n'a été détectée en présence d'ACC (WT, B, E, T : ACC 50 μ M, figure **II.28**).

Ces résultats suggèrent que les plantes exprimant la protéine p25 sont particulièrement résistantes à l'action des hormones JA, ABA et dans une moindre mesure SA. Ainsi, la protéine p25 du BNYVV pourrait être considérée comme un facteur de virulence ayant un rôle perturbateur central dans l'ensemble des voies de signalisation induites par le jasmonate, l'acide salicylique et l'acide abscissique, pour ainsi limiter l'activation des réactions de défense et favoriser la mise en place de la maladie. Le développement des symptômes de prolifération

racinaire serait, en effet, bénéfique à la multiplication virale et à la transmission, en raison de la forte division cellulaire et la différenciation tissulaire observées sur betteraves infectées.

5. Mise en évidence des différences d'expression des gènes candidats sous le contrôle transcriptionnel de l'auxine et du jasmonate

5.1. Analyse de l'expression de gènes candidats par RT-PCR semi-quantitative

Nous avons choisi de rechercher les différences d'expression de gènes exprimés spécifiquement en réponse à l'auxine ou au jasmonate et déjà caractérisés chez *Arabidopsis*. L'analyse des différences d'expression de ces gènes candidats a été effectuée par RT-PCR semi-quantitative à partir d'ARN totaux de racines provenant de la lignée sauvage (WT) et de la lignée *35S::P25B* (B). Cette lignée a été choisie car le site d'insertion du transgène a été localisé dans une région intergénique et aucun gène cellulaire n'est altéré par l'insertion du transgène. Comme précédemment, des plantules de 5 jours ont été équilibrées en taille et en nombre, puis repiquées et cultivées sur milieu non sélectif pendant 7 jours. Les quantités d'ARN totaux de racines (RNeasy® Plant Mini Kit-QIAGEN®) ont d'abord été équilibrées grâce à la visualisation sur gel des expressions stables des gènes codant pour l'actine et pour le facteur d'élongation de la traduction EF1 α . Nous avons ensuite comparé les niveaux d'expression des gènes *TIR1*, *NAC1*, *AIR3* et *VSP1* (<http://www.arabidopsis.org/>).

Le gène *TIR1* code pour un récepteur de l'auxine très étudié chez *Arabidopsis*. C'est une protéine à domaine F-box qui interagit avec la culline (AtCUL1), la protéine RBX1, et les protéines ASK1 et ASK2 (Ruegger *et al.*, 1998). Ces interactions induisent la formation d'un complexe SCF^{TIR1} (Gray *et al.*, 1999, 2002) qui dégrade par ubiquitinylation les facteurs AUX/IAA (Gray *et al.*, 2001 ; Tiwari *et al.*, 2001 ; Zenser *et al.*, 2001). L'interaction des AUX/IAA avec les facteurs ARF ("Auxin-response factor") empêche les ARF de se fixer aux éléments TGTCTC appelé "auxin-responsive element" (AuxRE). La dégradation par le protéasome des AUX/IAA permet ainsi l'activation transcriptionnelle des gènes de réponse à l'auxine ("auxin response genes" ou "AuxRE genes") par les facteurs ARF.

Le gène *NAC1*, activé par la voie de signalisation de l'auxine, est le seul de la famille des gènes *NAC* à être exprimé préférentiellement dans les racines (Xie *et al.*, 2000). *NAC1* est un facteur de transcription impliqué dans l'induction de l'initiation et le développement des racines latérales en réponse à l'auxine. Son expression est placée sous le contrôle de *TIR1* (Xie *et al.*, 2000) et est régulée par le microRNA miR164 (Guo *et al.*, 2005). Ce facteur de

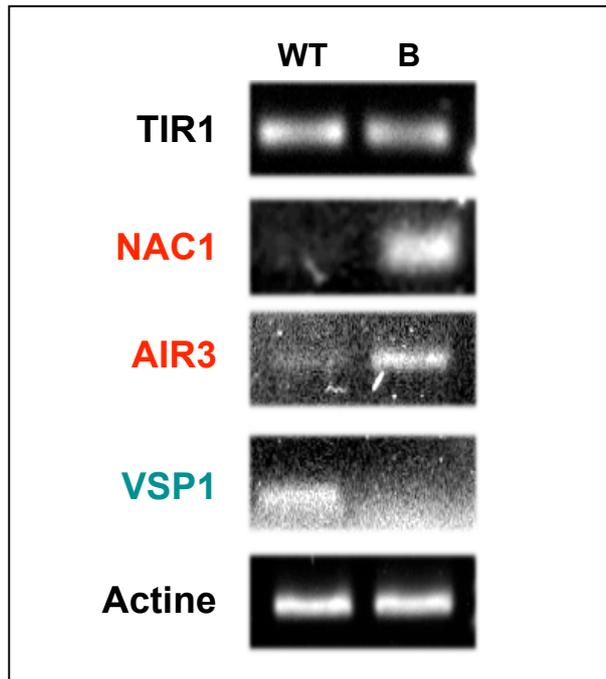


Figure II.29 : Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des gènes candidats TIR1, NAC1, AIR3 et VSP1 effectuée sur les ARN totaux de racines d'*Arabidopsis* sauvages (WT) ou transgéniques de la lignée 35S::P25B (B) récoltées après 12 jours de croissance. Les profils d'expression des gènes candidats sont analysés après normalisation des quantités d'ARN totaux sur le taux d'expression du gène de l'actine.

transcription, relativement instable, est dégradé par la voie du protéasome grâce à l'action de la protéine SINAT5, une E3 ligase (Xie *et al.*, 2002). Cette régulation fine permet une action de l'auxine très transitoire et localisée, nécessaire à l'émergence contrôlée des racines latérales. La dégradation des messagers de NAC1 par miR164, agissant en parallèle, permet la disparition encore plus rapide de la protéine NAC1 en ciblant son messenger. L'expression de miR164 est elle aussi sous le contrôle de l'auxine, ce qui démontre que des mécanismes d'autorégulation très précis sont induits par cette hormone.

NAC1 active la transcription du gène *AIR3* ("auxin-responsive gene") qui code pour une protéase "subtilisin-like" et qui intervient dans le relâchement des connections intercellulaires facilitant l'émergence des racines latérales (Neuteboom *et al.*, 1999a, 1999b).

Enfin, le gène *VSP1* ("vegetative storage protein 1") est activé par la voie de signalisation du jasmonate, tout comme *VSP2*, le deuxième représentant de la famille des gènes *VSP* (Utsugi *et al.*, 1998). En effet, les mutants *jar1*, *coi1*, *jin1* et *jin4* touchés dans la voie de transduction et de signalisation du jasmonate présentent tous une baisse importante de leur accumulation en protéines VSP (Staswick *et al.*, 1992 ; Benedetti *et al.*, 1995 ; Berger *et al.*, 1996). L'expression de *VSP1* placée sous le contrôle de *COI1*, est fortement activée par le jasmonate, mais peut être également régulée négativement par l'éthylène (Rojo *et al.*, 1999 ; Ellis and Turner, 2001). L'expression des gènes *VSP* est activée en réponse au MeJA, aux sucres libres comme le saccharose, à la lumière et au phosphate (Berger *et al.*, 1995), en réponse aux blessures mécaniques (Utsugi *et al.*, 1998 ; Rojo *et al.* 1999) ou induite par les insectes herbivores (Stotz *et al.*, 2000 ; Berger *et al.*, 2002). Ces gènes sont également induits en réponse à des stress oxydatifs qui dégradent sensiblement les protéines, comme les traitements par le cuivre, l'ozone ou H_2O_2 , ou lors de la sénescence des feuilles (Mira *et al.*, 2002). L'accumulation des protéines VSP constituerait un mécanisme d'adaptation au stress qui favoriserait la formation de réserves en acides aminés directement mobilisables pour la synthèse de nouvelles protéines nécessaires à la croissance ou la reconstruction des tissus suite à la blessure (Staswick, 1990, 1994).

La figure **II.29** résume les résultats que nous avons obtenus par RT-PCR semi-quantitative. L'expression constitutive de la protéine p25 ne semble pas moduler l'accumulation des messagers de TIR1 puisque aucune différence de signal n'est observée et que le profil d'expression est comparable à celui du messenger de l'actine. Par contre, l'analyse des taux d'expression des gènes *NAC1* et *AIR3* révèle une accumulation préférentielle des messagers codant pour l'activateur de transcription et pour la protéase dans les racines des

plantes *35S::P25B*. De plus, nous avons remarqué une inhibition de l'expression des messagers du gène *VSP1* dans ces plantes. Ces résultats semblent confirmer que la voie de signalisation de l'auxine est effectivement activée dans les plantes exprimant la protéine p25 du BNYVV. L'absence d'activation du gène *TIR1* suggère une intervention de la protéine p25 en aval ou en parallèle à l'action de la protéine TIR1. En ce qui concerne l'inhibition de l'expression de *VSP1*, nos résultats ne nous permettent pas encore de conclure sur un rôle direct ou plutôt indirect de la protéine p25 sur l'inhibition de la voie de signalisation du jasmonate. En effet, l'existence d'interconnexions entre les voies de signalisation du jasmonate, de l'éthylène et de l'acide abscissique pourrait en partie expliquer cette baisse d'expression (Anderson *et al.*, 2004 ; Devoto *et al.*, 2005). De plus, il ne faut pas oublier que l'expression des gènes *VSP* est aussi affectée par d'autres facteurs comme les stress oxydatifs, les sucres, le phosphate ou encore la lumière (Berger *et al.*, 1995 ; Mira *et al.*, 2002).

Si la régulation de la fonction du produit d'un gène dépend de son accumulation et des régulations post-traductionnelles, nous avons visualisé dans nos expériences uniquement l'activation transcriptionnelle et la stabilité des messagers. Pour compléter cette dernière approche, nous avons analysé le taux d'expression de miRNA régulant entre autres l'expression des messagers du facteur de transcription NAC1.

5.2. Recherche des miRNA contrôlant la voie de signalisation de l'auxine

Les miRNA sont des petits ARN non codants de 20 à 24 nucléotides qui régulent l'expression de gènes impliqués dans le développement. Initialement découverts chez *C. elegans*, ils sont aujourd'hui étudiés dans beaucoup d'autres organismes eucaryotes et en particulier chez les plantes. A partir des gènes miRNA situés dans les parties intergéniques du génome ou même au niveau des introns, l'ARN polymérase II génère un ARN précurseur appelé Pri-miRNA possédant une structure en épingle à cheveu. Chez les plantes, ce précurseur est clivé par DCL1 ("Dicer-like") ou son équivalent chez *Arabidopsis* appelé CARPEL FACTORY ou CAF (Reinhart *et al.*, 2002), puis est inclus dans le complexe RISC ("RNA-induced silencing complex"). Ce dernier agit en clivant spécifiquement les messagers comportant une séquence quasi-complémentaire à celle du miRNA (pour revue, Carrington and Ambros, 2003 ; Bartel, 2004). De nombreux miRNA ont été caractérisés chez les plantes et plus particulièrement chez *Arabidopsis* (Park *et al.*, 2002 ; Rhoades *et al.*, 2002 ; Bartel and Bartel, 2003). Parmi eux, miR164 cible les messagers du gène *NAC1* (Guo *et al.*, 2005). Toutes les études montrent que miR164 est un régulateur négatif du développement des

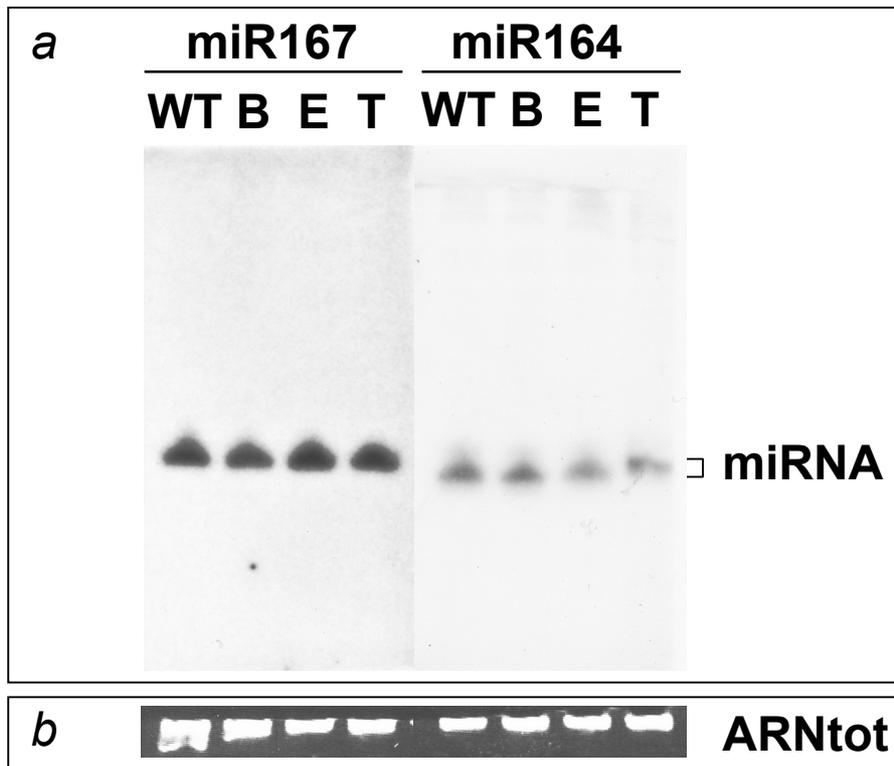


Figure II.30 : L'expression de la protéine p25 n'affecte pas l'accumulation de miR167 et 164. (a) Détection par Northern blot des microRNA nommés miR164 et miR167 ciblant respectivement les messagers du gène NAC1 et les messagers des gènes ARF6/ARF8 dans les feuilles d'*Arabidopsis* sauvages et transgéniques. Des quantités similaires d'ARN totaux (~20 µg) de feuilles de plantes sauvages (WT) et transgéniques issues des lignées 35S::P25B (B), 35S::P25E (E) et 35S::P25T (T) sont analysées par deux expériences indépendantes d'hybridation moléculaire. Les miRNA sont révélés par des sondes complémentaires à la séquence de 21 nucléotides des miR164 ou miR167. (b) Visualisation sous UV des quantités d'ARN totaux déposées.

racines secondaires en contrôlant le taux de messagers du gène *NAC1*. Les plantes transgéniques exprimant un gène *NAC1* muté dans la partie reconnue par miR164 présentent un phénotype racinaire marqué par des racines latérales plus nombreuses (Guo *et al.*, 2005). De la même façon, les mutants touchés dans la synthèse de miR164 présentent un taux de messagers du gène *NAC1* plus important et développent beaucoup plus de racines latérales que la normale. Ce phénotype racinaire n'est pas sans rappeler celui observé sur les plantes *35S::P25*.

L'expression de la protéine p25 pourrait empêcher la synthèse de miR164, empêchant alors la dégradation des messagers du gène *NAC1* et ainsi accentuer la réponse à l'auxine normalement fortement régulée. Pour tester cette hypothèse, nous avons estimé par Northern blot les quantités relatives de miR164 exprimées dans les plantes sauvages (WT) et transgéniques issues des trois lignées (*35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T*) cultivées en terre pendant six semaines. Des quantités similaires (20 μ g) d'ARN totaux extraits par PURESCRIPT RNA Isolation Kit (GENTRA Systems) ont été analysées par Northern blot après séparation sur gel de polyacrylamide dénaturant et transfert sur membrane. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure **II.30**. L'analyse sous UV des ARN de haut poids moléculaire colorés au BET permet d'estimer les quantités déposées (figure **II.30b**). Les miR164 sont révélés par hybridation moléculaire (figure **II.30a**, partie droite) en utilisant une sonde désoxyribonucléotidique de 21 nucléotides radiomarquée en 5' et de séquence complémentaire à celle des miR164 (Reinhart *et al.*, 2002 ; Rhoades *et al.*, 2002 ; Bartel and Bartel, 2003). Aucune différence de signal n'est détectée entre les plantes sauvages et *35S::P25*. Ce résultat permet donc de conclure que l'activation de l'expression du gène *NAC1* par la protéine p25 ne provient pas de l'inhibition de la transcription de miR164.

Nous n'avons cependant pas restreint notre recherche au seul miR164 mais également à miR167. En effet, ce microRNA intervient également dans la cascade de signalisation de l'auxine en régulant l'expression des facteurs de transcription ARF6 et ARF8 (Bartel, 2004). Après dégradation des répresseurs AUX/IAA par le protéasome en réponse à l'auxine, les protéines ARF6 et ARF8 sont capables de se fixer sur les éléments "auxin-responsive element" (AuxRE) des promoteurs des gènes et activer leur transcription. Comme dans le cas du gène *NAC1*, cette cascade d'activation des gènes en réponse à l'auxine fait appel à un mécanisme de contrôle par l'intermédiaire de miR167 qui dégrade spécifiquement les messagers des gènes ARF6 et ARF8. Comme pour miR164, aucune différence

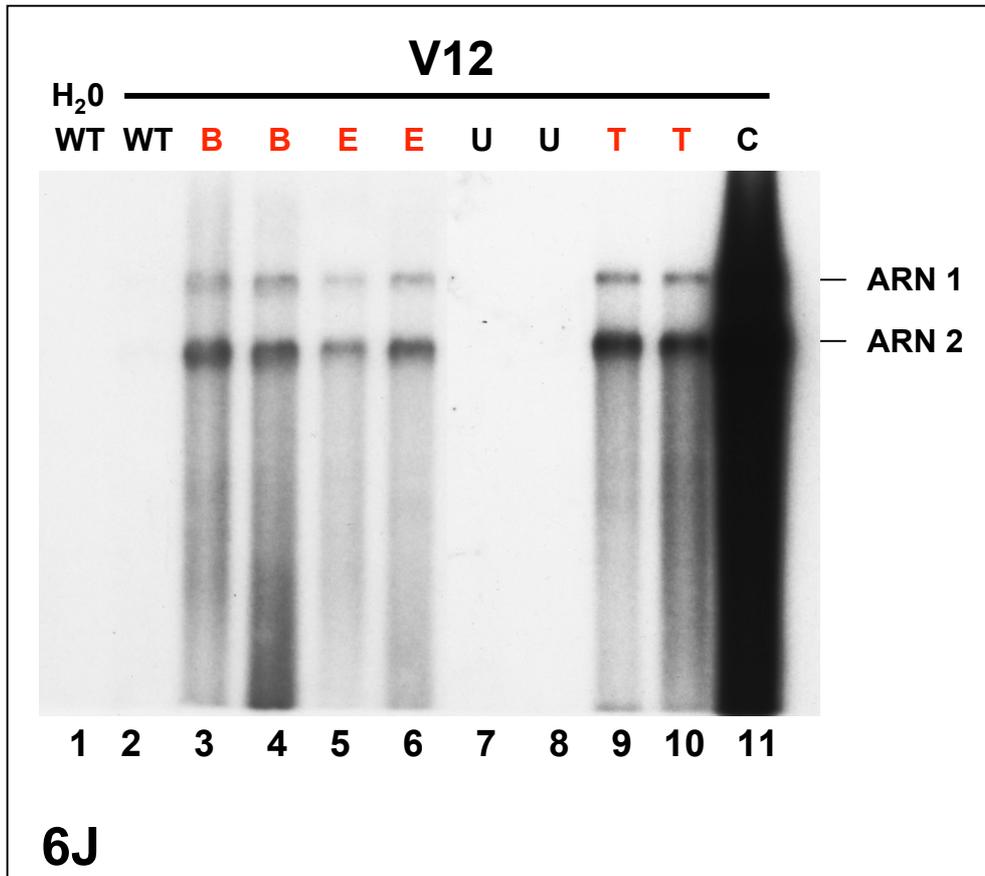


Figure II.31 : L'expression de la protéine p25 dans *Arabidopsis thaliana* rend la plante compatible à l'infection par le BNYVV. Détection par Northern blot des ARN 1 et 2 du BNYVV dans des feuilles d'*A. thaliana* sauvages et transgéniques 6 jours après inoculation. L'inoculum est constitué de virus contenant uniquement les ARN 1 et 2. Des quantités similaires d'ARN totaux (5 µg) de feuilles d'une plante sauvage (WT) ou de deux plantes transgéniques issues de chacune des lignées 35S::P25B (B), 35S::P25E (E) et 35S::P25T (T) exprimant la protéine p25 du BNYVV, ou 35S::P25U (U) n'exprimant pas la protéine p25 sont analysées par hybridation moléculaire à l'aide de sondes complémentaires à l'extrémité 3' de l'ARN 1 et à une séquence interne de l'ARN 2. La piste 1 correspond à une plante sauvage non inoculée par le virus (H₂O WT) et constitue le témoin négatif. La piste 11 correspond aux ARN extraits à partir d'une lésion locale obtenue sur feuille de *C. quinoa* infectée (C) et constitue le témoin positif de l'expérience.

d'accumulation de miR167 n'est détectée entre les plantes sauvages et les plantes *35S::P25* (figure **II.30a**, partie gauche).

Si la voie de signalisation de l'auxine est activée en réponse à l'expression de la protéine p25 du BNYVV, il reste néanmoins à découvrir les facteurs cellulaires ciblés. En effet, nos résultats démontrent que l'activation du gène *NAC1* par la protéine p25 utilise une voie distincte des miRNA (miR164 et miR167) qu'il nous reste à déterminer. De la même façon, le mode de répression des voies de signalisation du jasmonate et de l'acide salicylique dans ces plantes reste également à être caractérisé.

6. Réponse des *Arabidopsis 35S::P25* à l'infection par le BNYVV

Arabidopsis thaliana n'est pas décrite comme plante hôte du BNYVV. Les résultats que nous avons obtenus grâce aux lignées *35S::P25* nous renseignent sur le rôle de la protéine p25 dans les voies de signalisation de l'auxine et d'autres hormones qui sont impliquées dans la mise en place des mécanismes de défense des plantes (JA, SA, ABA et récemment auxine). Nous avons ainsi cherché à savoir si l'expression constitutive de la protéine p25 chez *Arabidopsis thaliana* peut rendre cette plante compatible à une infection par le BNYVV. Nous avons effectué plusieurs tests d'infection par différentes combinaisons d'inoculum viral pour étudier la susceptibilité des *Arabidopsis* sauvages et *35S::P25* au BNYVV.

Dans un premier temps, nous avons infecté des feuilles d'*Arabidopsis* sauvages (WT) et transgéniques provenant des trois lignées monocopies *35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T* (lignées B, E et T respectivement) ou d'une lignée multicopie *35S::P25U* n'exprimant pas la protéine (lignée U), par un isolat artificiel de BNYVV constitué des ARN 1 et 2 encapsidés. Six jours après inoculation, aucun symptôme apparent n'est visible sur les feuilles (non montré). Les ARN totaux des feuilles inoculées ont été extraits par TRIZOL® Reagent (Invitrogen™) et les ARN viraux recherchés par Northern blot. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure **II.31**. Aucune hybridation n'est détectée dans les feuilles non inoculées (piste 1), tout comme dans les feuilles de plantes sauvages (piste 2), et celles des plantes transgéniques de la lignée *35S::P25U* qui, rappelons le, n'expriment pas la protéine p25 (pistes 7 et 8, figure **II.31**). A l'inverse, les trois lignées transgéniques exprimant la protéine p25 (lignées B, E et T) renferment les ARN 1 et 2 viraux (pistes 3 à 6 et 9 à 10, figure **II.31**) de taille comparable à celle des ARN du contrôle (piste 11) provenant de lésions locales de *C. quinoa*. Cette première analyse montre que la réplication du virus semble possible uniquement

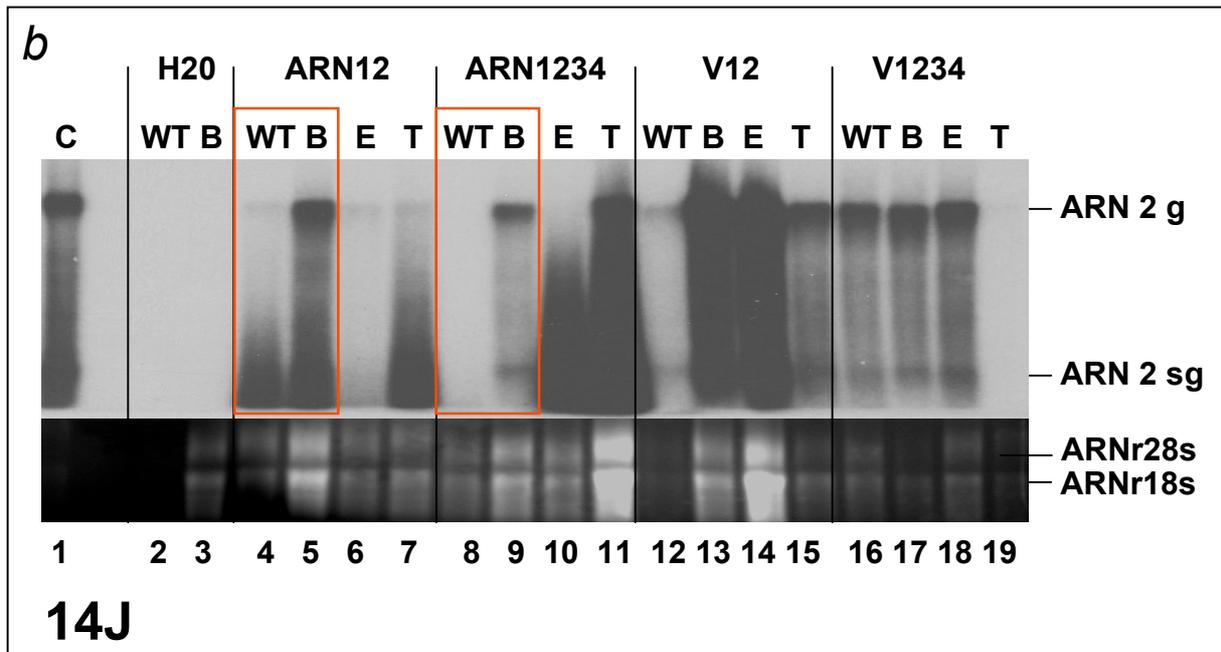
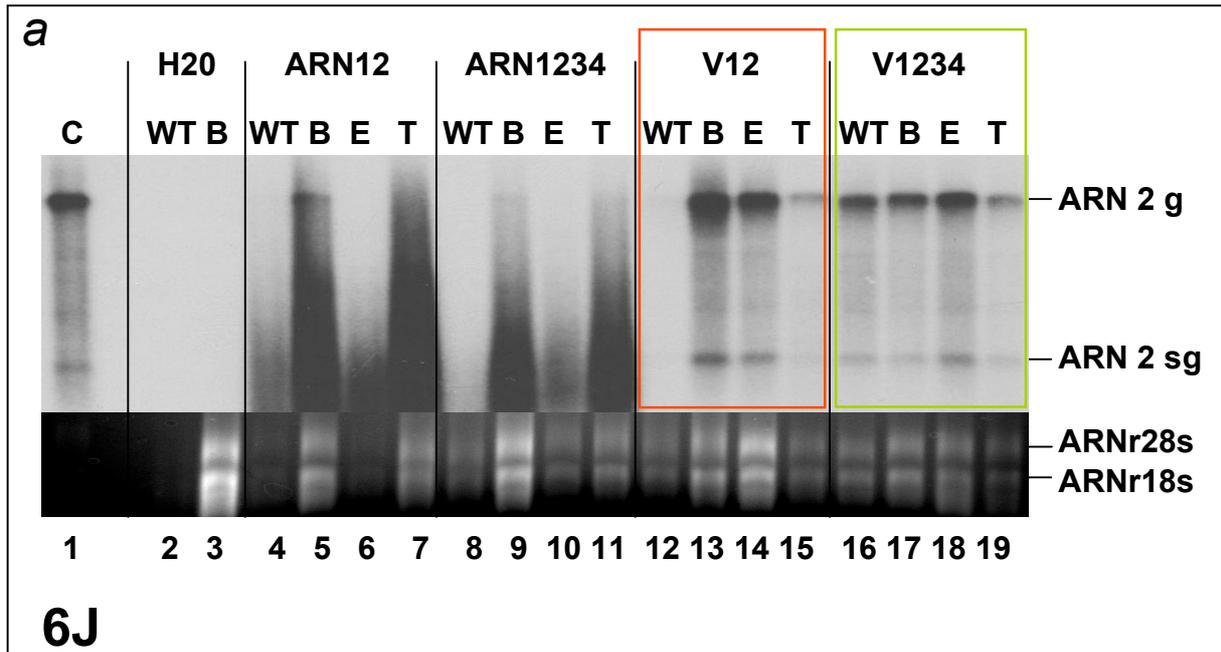


Figure II.32 : Analyse par Northern blot de la multiplication du BNYVV dans les feuilles d'*A. thaliana* exprimant ou pas la protéine p25. Seuls l'ARN 2 et l'ARN 2 subgénomique sont recherchés 6 jours (a) ou 14 jours (b) après inoculation par les transcrits des ARN génomiques 1 et 2 (ARN12) ou des quatre ARN génomiques (ARN1234) synthétisés *in vitro*, ou par du virus contenant les ARN 1 et 2 seuls (V12) ou les quatre ARN génomiques (V1234). Les ARN totaux (5 µg) de feuilles de 6 plantes sauvages (WT) ou de 6 plantes transgéniques des lignées 35S::P25B (B), 35S::P25E (E) et 35S::P25T (T) sont analysés par hybridation moléculaire. La sonde utilisée est complémentaire à une séquence interne de l'ARN 2. La piste 1 correspond aux ARN extraits d'une lésion locale de *C. quinoa* (C) inoculée par un isolat témoin contenant les 5 ARN du BNYVV. Les pistes 2 et 3 correspondent aux ARN totaux de feuilles de plantes sauvages (H₂O WT) ou 35S::P25B (H₂O B) non inoculées et constituent les témoins négatifs de l'expérience. La visualisation sous UV des ARN totaux (ARNr28s et ARNr18s) permet d'estimer les quantités déposées dans chaque piste.

dans les plantes *Arabidopsis* exprimant la protéine p25, puisqu' aucun ARN viral n'est détecté dans les feuilles des plantes sauvages et des plantes *35S::P25U*.

Pour s'assurer que le signal observé ne corresponde pas à l'inoculum de départ, stabilisé par l'expression de la protéine p25, nous avons reproduit l'expérience et recherché la présence d'ARN subgénomiques de l'ARN 2 considérés comme marqueurs de la réplication virale. Cette seconde expérience a été conduite à l'aide d'un plus grand nombre de plantes sauvages et transgéniques (lignées *35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T*), et en utilisant un inoculum constitué soit d'un isolat viral renfermant comme précédemment les ARN 1 et 2 (V12) ou les 4 ARN viraux (V1234), soit des transcrits correspondant aux ARN 1 et 2 (ARN12) ou les ARN 1 à 4 (ARN1234) synthétisés *in vitro*. Pour cela, six plantes de chaque lignée sauvage (WT) ou *35S::P25* ont été inoculées. Les ARN totaux des feuilles inoculées ont été extraits six jours après inoculation comme précédemment, puis quatorze jours après inoculation. La présence des ARN viraux a été recherchée par Northern blot à l'aide d'une sonde complémentaire à la partie interne de l'ARN 2 pour révéler d'une part sa présence et d'autre part détecter l'un des ARN subgénomiques colinéaires à la partie 3' de l'ARN 2 du BNYVV. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure **II.32**. L'utilisation de l'inoculum V12 permet la réplication des ARN uniquement dans les plantes *35S::P25* puisque l'ARN 2 et l'ARN 2 subgénomique sont détectés (pistes 12 à 15, cadre rouge, figure **II.32a**) tout comme pour le témoin (piste 1, figure **II.32a**). A l'inverse, ces deux types d'ARN ne sont pas détectés dans les plantes sauvages (piste 12, figure **II.32a**), ce qui confirme les résultats obtenus lors de la première expérience (figure **II.31**). Un résultat identique est obtenu après 14 jours de virose mais avec un signal beaucoup plus fort, ce qui confirme que le virus est amplifié dans les feuilles inoculées (pistes 12 à 15, figure **II.32b**). Les résultats obtenus après inoculation des transcrits des ARN 1 et 2 obtenus *in vitro* (ARN12) sont un peu décevant en raison de la forte dégradation des ARN observée dans le bas du gel et qui gêne la détection de l'ARN 2 subgénomique (pistes 5 et 7, figure **II.32a**). Cependant, si aucun signal n'est détecté dans les feuilles de plantes sauvages (piste 4, figure **II.32a**), la présence de l'ARN 2 est détectée dans les feuilles de la lignée *35S::P25B*, ce qui suggère qu'il est répliqué (piste 5, figure **II.32a**). Ce résultat se confirme à 14 jours (piste 5, cadre rouge, figure **II.32b**). L'utilisation de l'inoculum V1234 apporte des résultats complémentaires. Nous avons pu observer dans ce cas la multiplication du BNYVV six et quatorze jours après inoculation, non seulement dans les feuilles des plantes *35S::P25* mais aussi dans les feuilles des plantes sauvages (pistes 16 à 19, cadre vert, figures **II.32a** ; pistes 16 à 18, figure **II.32b**). Ici encore, l'efficacité de réplication

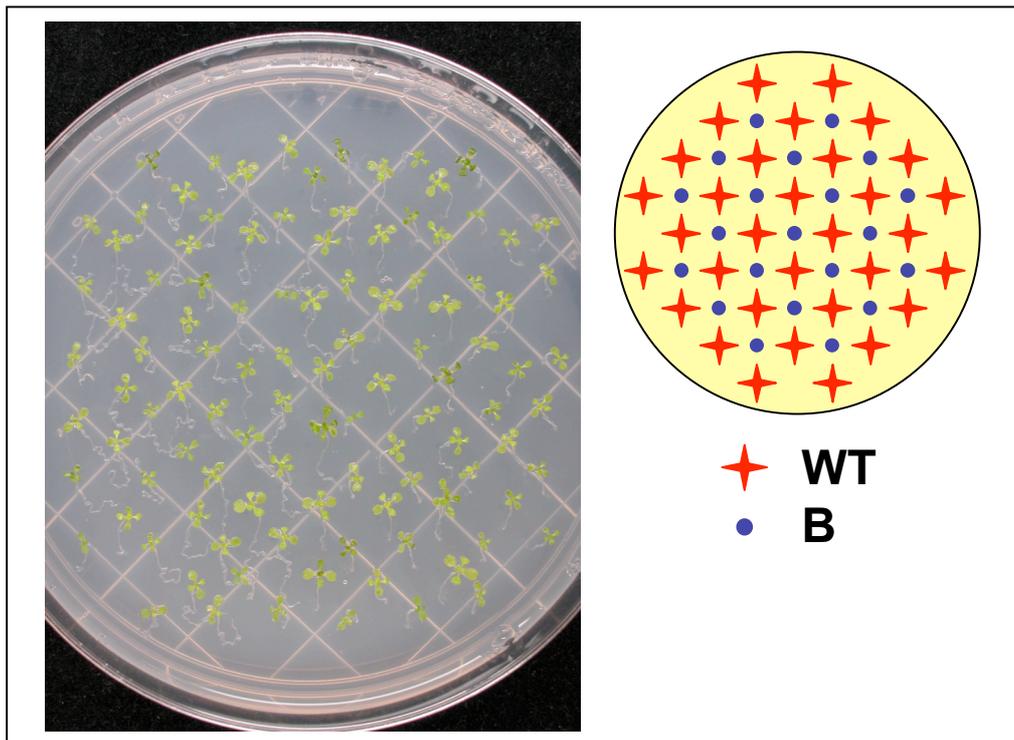


Figure II.33 : Visualisation de la méthode utilisée pour produire *in vitro* des plantules de tailles standardisées et comparables. Les plantes sauvages (WT, étoiles rouges) et transgéniques (B, ronds bleus) ont été équilibrées en taille puis repiquées selon le schéma présenté sur la partie droite de la figure. L'écartement entre chaque plante est de 1 cm. Trois cent plantules de chaque lignée ont ainsi été cultivées pour réaliser une analyse comparative de leur transcriptome par "cDNA microarray".

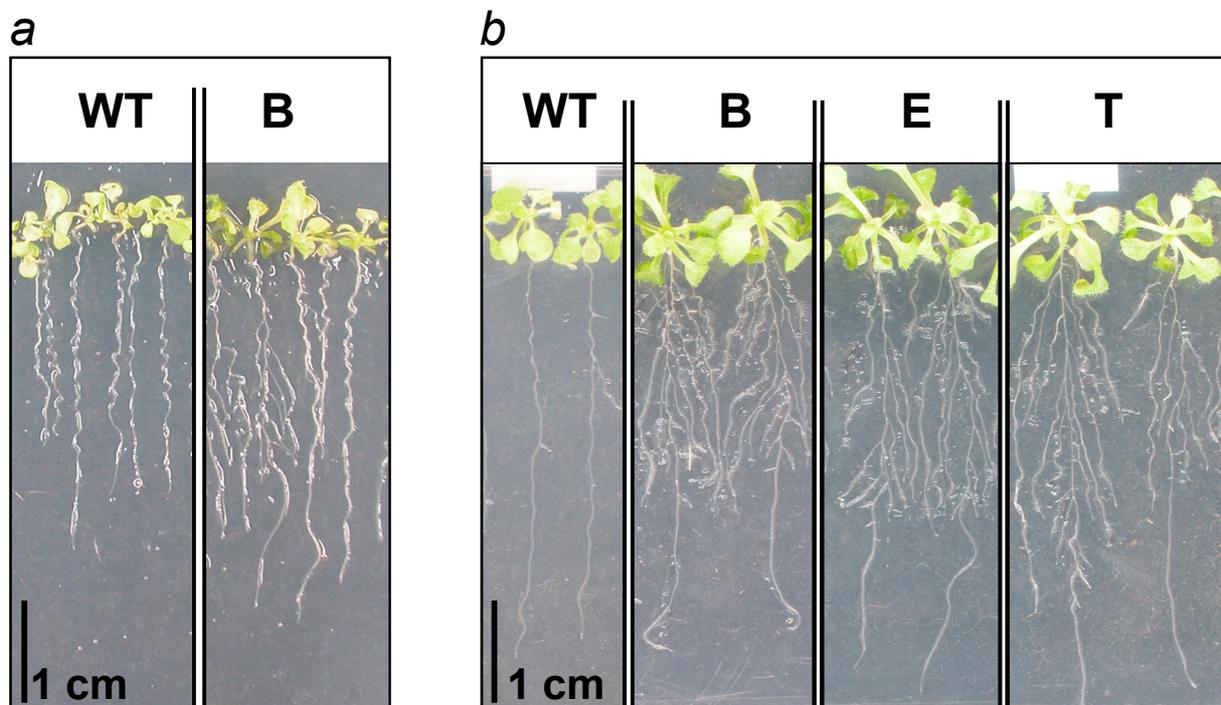


Figure II.34 : Comparaisons phénotypiques des *Arabidopsis* sauvages et transgéniques après 5 jours de culture sur milieu non sélectif puis repiquage et culture sur milieu positionné horizontalement pendant 7 jours (a : WT et B) ou pendant 12 jours (b : WT, B, E et T). Les plantes exprimant la protéine p25 possèdent toutes des racines secondaires plus nombreuses et plus longues que celles des plantes sauvages.

est démontrée sans ambiguïté lors de l'utilisation d'un inoculum V1234, mais dans une moindre mesure pour l'inoculum ARN1234, constitué des quatre ARN obtenus *in vitro* (pistes 8 à 11, figures **II.32a** et **II.32b**). Ainsi, la présence de virions permettant l'expression de la protéine p25 dans les cellules infectées favoriserait l'infection, même dans des *Arabidopsis* sauvages réputées pourtant non permissives à l'infection par le BNYVV.

L'ensemble de ces résultats suggère ainsi le rôle primordial de l'expression de la protéine p25 dans l'établissement de l'infection d'*A. thaliana*. Cette protéine virale, apportée en "*trans*" par le biais de son expression constitutive dans les plantes 35S::P25, ou en "*cis*" par l'ARN 3 du BNYVV, favorise la mise en place de l'infection. Cette infection est plus efficace lorsque l'inoculum est constitué de virus. Ce résultat peut s'expliquer par la plus grande stabilité des messagers viraux encapsidés et/ou par une action synergique de la protéine de capsidite lors de la mise en place de l'infection.

Nous avons donc démontré que les plantes 35S::P25, qui semblent affectées dans les voies de signalisation des hormones impliquées dans l'induction des mécanismes de défense des plantes contre les pathogènes (JA, SA, ABA), sont plus sensibles à l'infection par le BNYVV, et en particulier par un virus constitué des ARN 1 et 2 portant uniquement les fonctions de base de réplication, d'encapsidation et de mouvement de cellules à cellules.

Pour mettre en évidence des différences d'expression des gènes qui pourraient expliquer la susceptibilité des plantes 35S::P25 à l'infection par le BNYVV, nous avons effectué une analyse globale du transcriptome de ces plantes par "cDNA-microarray".

7. Analyse globale du transcriptome au niveau des racines d'*Arabidopsis* 35S::P25

7.1. Culture standardisée d'*Arabidopsis* sauvages et transgéniques 35S::P25

Pour mettre en évidence les gènes cellulaires dérégulés en réponse à l'expression constitutive de la protéine p25 dans *Arabidopsis*, nous avons choisi d'effectuer une analyse comparative par "cDNA-microarray" entre le transcriptome de racines de plantes sauvages (WT) et celui de racines de plantes transgéniques 35S::P25.

La technologie des puces à ADN ou "cDNA microarray" est une méthode très sensible, fiable et reproductible qui permet l'analyse globale de l'expression des gènes. Ces propriétés impliquent donc la comparaison d'échantillons provenant de lots suffisamment représentatifs de plantes cultivées dans des conditions extrêmement standardisées et comparables d'une lignée à une autre, ou d'une expérience à une autre. Ainsi, pour s'affranchir

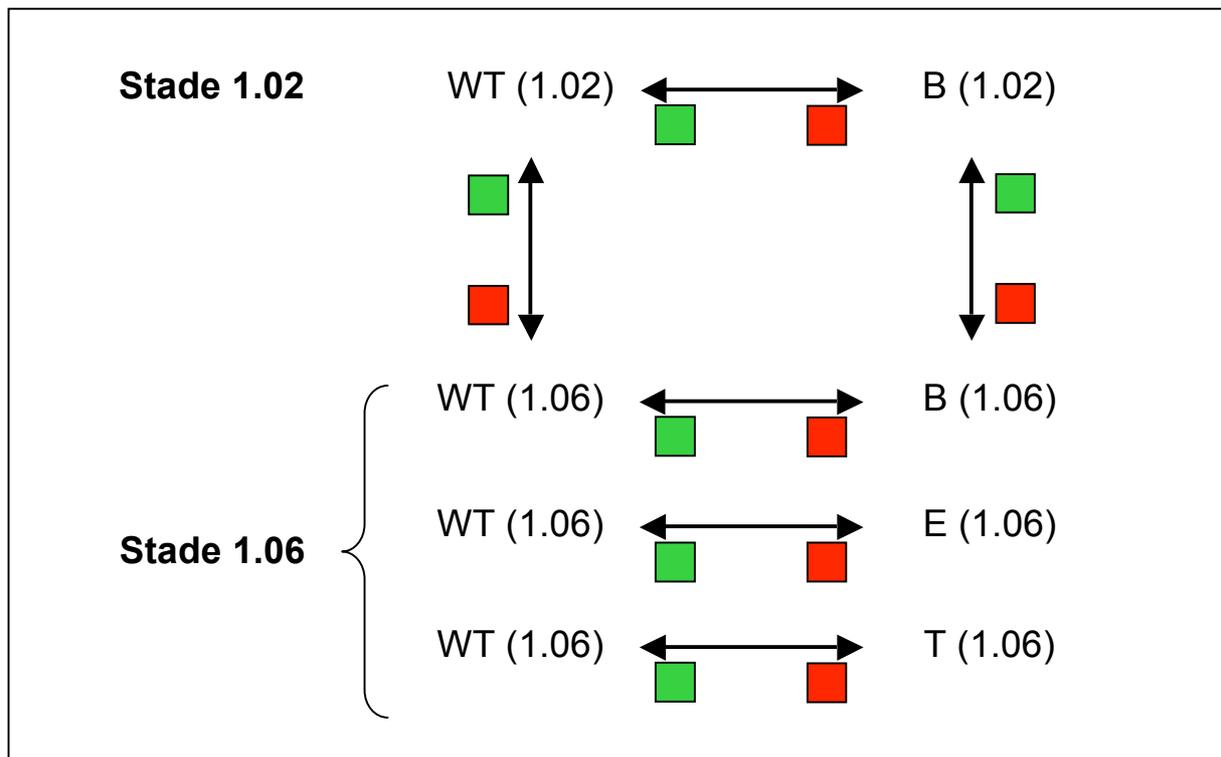


Figure II.35 : Représentation schématique des analyses comparatives effectuées par "cDNA microarray". Les comparaisons des transcriptomes ont été effectuées à partir des ARN totaux isolés de racines d'*Arabidopsis* sauvages (WT) et transgéniques de la lignée 35S::P25B (B), récoltées au stade 1.02 et au stade 1.06 ou de plantes WT et transgéniques des lignées 35S::P25E (E) et 35S::P25T (T) récoltées au stade 1.06 (flèches horizontales). Une seconde expérience a consisté à comparer les transcriptomes de plantes de génotype identique (WT ou B) aux stades 1.02 et 1.06. (comparaisons verticales).

totalemment des problèmes de germination ou de croissance pouvant exister entre les plantes, nous avons tout d'abord cultivé des plantules sauvages et *35S::P25B* pendant cinq jours sur milieu non sélectif, puis nous les avons sélectionnées pour équilibrer leur taille avant de les déposer sur un nouveau milieu non sélectif. Comme le montre la figure **II.33**, les plantes sauvages et transgéniques ont été réparties de façon extrêmement homogène (1 cm d'écartement et en alternance). Cette disposition a été choisie pour éviter un éventuel effet de masse des racines et des feuilles qui pourrait induire des différences d'environnement et influencer l'expression des gènes. Ces plantes ont été observées après prélèvement pour déterminer leur stade de croissance. Comme on peut le voir sur la figure **II.34a**, les plantes sauvages (WT) possèdent majoritairement 2 feuilles matures correspondant au stade 1.02 décrit par Boyes *et al.* (2001) pour des plantes Col-0 cultivées pendant 10 jours en milieu stérile. Par comparaison, les plantes transgéniques *35S::P25B* (B) possèdent entre 2 et 4 feuilles correspondant aux stades 1.02 à 1.04. Deux lots distincts de 300 racines de plantules sauvages (WT) et *35S::P25B* (B) ont été utilisés pour produire les lots d'ARN totaux (RNeasy® Plant Mini Kit-QIAGEN®). Ces ARN ont ensuite servi à une première analyse par "cDNA microarray".

Une deuxième expérience a été effectuée pour pouvoir comparer le transcriptome de racines de plantes issues des trois lignées transgéniques (lignées *35S::P25B*, *35S::P25E*, et *35S::P25T*). L'approche expérimentale utilisée est similaire à celle décrite précédemment. Après 5 jours de croissance, repiquage puis culture pendant 12 jours sur milieu non sélectif, les plantes ont été prélevées soigneusement, et observées (figure **II.34b**). Les plantes sauvages (WT) possèdent 6 feuilles matures correspondant au stade 1.06 décrit par Boyes *et al.* (2001) pour des plantes cultivées pendant 18 jours en milieu stérile. A nouveau, les plantes transgéniques issues des trois lignées *35S::P25B*, *35S::P25E* et *35S::P25T* (B, E, T respectivement) présentent une croissance plus rapide et certaines possèdent déjà 8 feuilles correspondant au stade 1.08. Trois séries de deux lots distincts de 300 racines de plantules sauvages et transgéniques ont été utilisées pour produire des ARN totaux (PURESCRIPT RNA Isolation Kit - GENTRA Systems). Ces ARN ont ensuite servi pour effectuer une deuxième série d'analyses par "cDNA microarray", en comparant l'expression des gènes des plantes de chaque lignée transgénique (B, E ou T) avec celle des plantes sauvages contrôles leur correspondant (WT1, WT2 ou WT3).

7.2. Analyse du transcriptome par "cDNA-microarray" (CATMA)

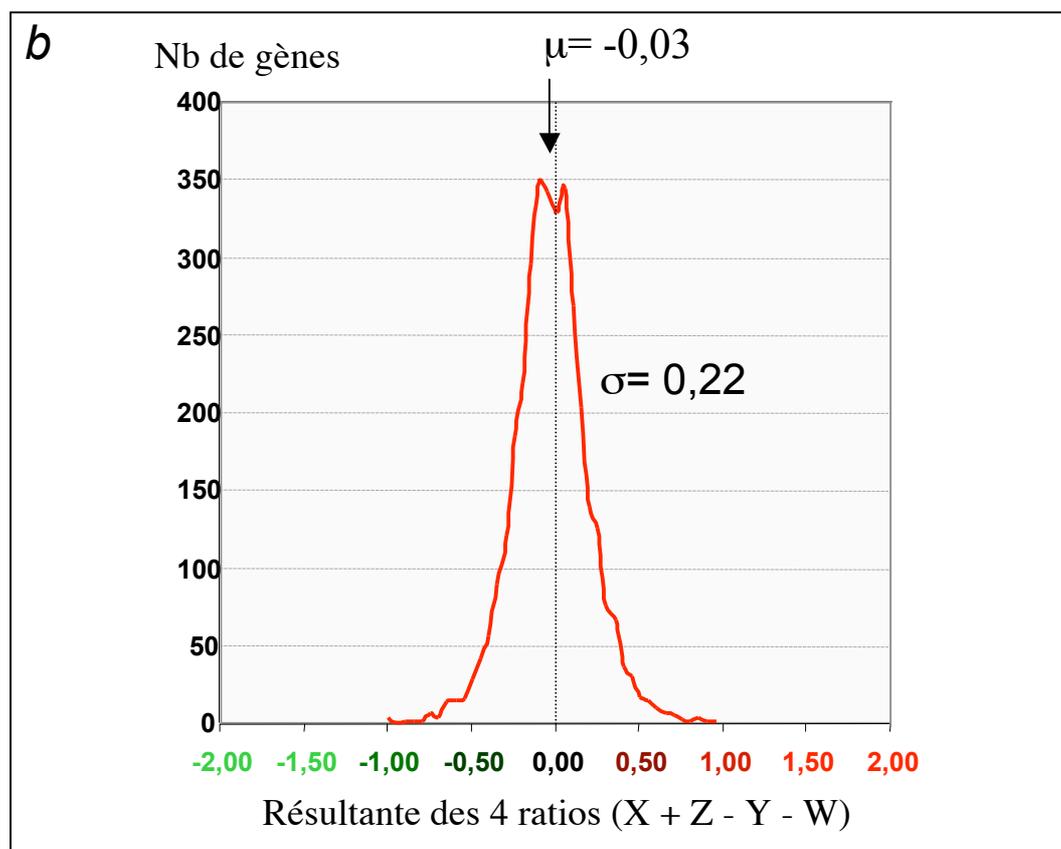
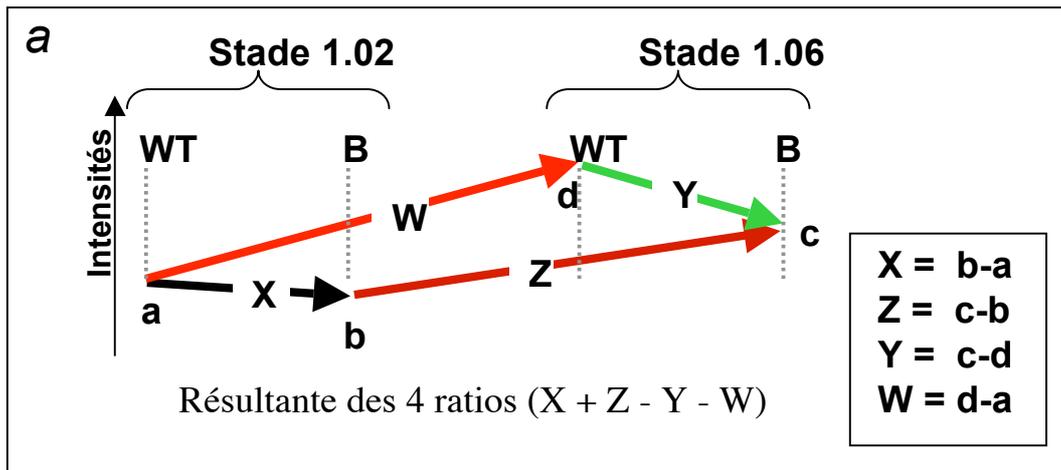


Figure II.36 : L'analyse CATMA effectuée est reproductible. (a) Représentation schématique du calcul de circularisation des données effectué sur les analyses comparatives de transcriptomes de plantes sauvages (WT) et transgéniques 35S::P25B (B) aux deux stades de croissance (stade 1.02 et 1.06). Les flèches représentent la vectorisation des log ratio mesurés entre les plantes WT et B aux stades 1.02 (X) et 1.06 (Y), et de ceux mesurés aux deux stades de développement, pour les plantes sauvages (W) ou B (Z). Dans le cas d'une circularisation parfaite, la résultante des quatre ratio $X+Z-Y-W$ doit tendre vers zéro. **a**, **b**, **c** et **d** représentent les intensités normalisées et visualisées sur les lames après hybridation des ADNc marqués par les fluorochromes Cy5 ou Cy3. (b) Analyse statistique effectuée sur l'ensemble des 3500 gènes qui présentent une expression différentielle dans au moins une des analyses comparatives effectuées. Les valeurs des résultantes des quatre ratio ($X+Z-Y-W$) ont été déterminées (voir partie a) puis la moyenne μ et l'écart-type σ calculés. La moyenne des log ratio tend vers zéro comme le montre le graphique qui représente le nombre de gènes dérégulés en fonction de la résultante calculée ($X+Z-Y-W$).

7.2.1. Méthode d'analyse comparative utilisée

L'analyse globale du transcriptome a été réalisée sur puces CATMA ("complete *Arabidopsis* transcriptome microarray") de la plateforme de l'URVG à Evry (Dr. J.P. Renou). Nous avons comparé les profils d'expression des messagers racinaires des plantes *35S::P25B*, *E* et *T* à ceux de plantes sauvages cultivées dans des conditions strictement identiques (voir §7.1). Nous avons analysé les profils d'expression de la lignée *35S::P25B* aux stades 1.02 et 1.06 et ceux des lignées *35S::P25E* et *T* au stade 1.06 uniquement. Les résultats obtenus sont très satisfaisants. Les moyennes des signaux d'hybridation obtenus pour les 23 315 gènes ciblés sont quasiment identiques et reflètent une hybridation homogène des cibles sur les puces qui, rappelons-le, a été effectuée lors de deux expériences indépendantes. Les résultats deviennent donc comparables entre eux.

Nous avons réalisé une deuxième analyse pour effectuer un test de circularisation en comparant les profils d'expression des messagers racinaires de plantes de même lignée à deux stades différents de développement WT(1.02)/WT(1.06) et B(1.2)/B(1.06). Cette approche de circularisation est schématisée sur la figure **II.35**. Parmi l'ensemble des gènes analysés pour les trois lignées, 3 525 gènes apparaissent exprimés de façon différentielle au moins une fois (non montré). Dans le cas d'une circularisation parfaite des données mesurées, la résultante des quatre ratio $X+Z-Y-W$ doit tendre vers zéro (WT/B+B/B-WT/B-WT/WT ; figure **II.36a**). Un tel calcul effectué sur l'ensemble des 3 525 gènes (figure **II.36b**) permet de constater que la moyenne des données μ est égale à $-0,03 \pm 0,22$, ce qui reflète l'excellente circularisation de l'expérience.

L'expression des gènes varie, d'une part en fonction du génotype de la plante analysée (*35S::P25B*, *E* ou *T*, stade 1.06), et d'autre part pour un même génotype (*35S::P25B*) analysé à deux stades de développement distincts (1.02 et 1.06). Ces différences d'expression sont respectivement illustrées par un cadre bleu et un cadre jaune dans l'exemple présenté sur le tableau **II.1**. Ce tableau résume l'ensemble des gènes constitutivement dérégulés dans les trois lignées *35S::P25*. De telles variabilités sont dues à l'expression différentielle de gènes régulés au cours de la croissance des plantes. Ainsi, les différences de log ratio entre les plantes des trois lignées peuvent provenir d'une part de leur stade de développement qui peut être différent, et d'autre part de l'effet positionnel du transgène. Pour simplifier notre analyse et limiter l'effet de la croissance des plantes, nous avons calculé la différence des taux d'expression de chacun des gènes en soustrayant les log ratio obtenus pour les plantes sauvages (W, figure **II.36a**) à ceux obtenus pour les plantes de la lignée *35S::P25B* (Z, figure

			wt/B		wt/E	wt/T		wt/wt	B/B	$\Delta B/wt$
			1.02	1.06	1.06	1.06	1.02 vs 1.06	1.06		
1	AT3G55910	expressed protein	No classification	2,13	1,12	1,10			-0,88	-0,89
2	AT3G30720	expressed protein	No classification		-1,41	-1,27	-1,40			-0,69
3	AT4G27340	Met-10+ like family protein	biological_process unknown	0,80	1,05	0,69	0,92	2,14	2,06	-0,08
4	AT5G35935	copia-like retrotransposon family	DNA recombination	-2,82	-2,80	-2,28				0,09
5	AT3G55920	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative/cyclophilin /rotamase	protein folding	3,57	4,36	4,06	3,67			0,73
6	AT1G07740	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	biological_process unknown	-0,90	0,92	0,94	0,99		1,12	1,47
7	AT1G12560	expansin, putative (EXP7)	cell wall modification during cell expansion		0,91	0,81	1,12		1,72	1,51
8	AT1G62980	expansin, putative (EXP18)	cell wall modification during cell expansion		1,12	1,13	0,88		1,89	1,57
9	AT5G15120	expressed protein	No classification		0,79	0,78	1,76	1,43	3,05	1,63
10	AT1G05250	peroxidase, putative	response to oxidative stress	-0,96	0,74	0,76	1,31		1,87	1,81
11	AT5G07580	ethylene-responsive element-binding family protein	regulation of transcription, DNA-dependent		1,06	0,71	1,15		1,96	2,16
12	AT1G02140	mago nashi family protein	sex determination	-1,50	0,76	0,77	1,30		2,23	2,44
13	AT5G64460	expressed protein	metabolism	-1,98	0,88	0,80	1,20		2,29	2,78
14	AT5G19120	expressed protein	biological_process unknown	-1,63	1,32	1,27	1,79		2,15	2,79
15	AT5E05240	eugene prediction	No classification	-1,81	1,24	1,85	1,63	-1,16	1,81	2,96
16	AT1G70330	equilibrative nucleoside transporter family protein	transport	-1,84	0,99	0,89	1,91		2,36	3,02
17	AT4G34290	SWIB complex BAF60b domain-containing protein	biological_process unknown	-2,12	0,94	0,78	2,11		2,51	3,03
18	AT2G02180	tobamovirus multiplication protein 3 (TOM3)	viral replication complex formation and maintenance	-2,07	1,17	0,91	1,10		2,74	3,14
19	AT2G46930	pectinacetyltransferase, putative	response to oxidative stress	-1,57	0,84	0,79	1,66		3,08	3,15
20	AT2G40010	60S acidic ribosomal protein P0 (RPP0A)	translational elongation	-2,28	1,18	0,77	1,68		2,79	3,22
21	AT2G10410	expressed protein	No classification	-1,92	1,26	1,32	2,11		3,34	3,77
22	_	kanamycin:neomycin phosphotransferase	_	2,73	3,68	3,07	1,73			0,61

	a	b	c	d	e	f	g
-2,5							
-1,5							
-1							
non diff							
0,00							
1							
1,5							
2,5							

Tableau II.1 : Certains gènes sont retrouvés dérégulés dans les racines des plantes 35S::P25B (B), 35S::P25E (E) et 35S::P25T (T). La première colonne représente un numéro de ligne arbitraire utilisé dans le texte. Les trois colonnes suivantes renseignent sur l'identifiant, le nom et la fonction du gène. Les valeurs des log ratio mesurées entre les plantes sauvages et transgéniques wt/B (colonnes a et b), wt/E (colonne c), wt/T (colonne d), ou entre les plantes de même fond génétique mais de stade différent wt/wt (colonne e) et B/B (colonne f) sont présentées à droite du tableau. La valeur $\Delta B/wt$ (colonne g) correspond à la différence d'expression du gène entre la lignée 35S::P25B (colonne f) et WT (colonne e). Cette valeur correspond à la différence des vecteurs Z-W présentés sur la figure II.36a et permet de limiter l'effet du développement des plantes. Le code couleur utilisé correspond aux valeurs de log ratio de la légende au bas du tableau (log en base 2). Les cadres jaune et bleu illustrent des variations liées au développement et au génotype. L'expression des gènes surlignés en gris n'est pas considérée comme différentielle car la résultante $\Delta B/wt$ tend vers 0.

II.36a). Cette opération est illustrée sur le tableau **II.1** par la colonne g ($\Delta B/wt$). Le marqueur "kanamycin" (n°22, tableau **II.1**) présent sur les puces permet de valider cette approche. En effet, ce gène est retrouvé très fortement exprimé dans chacune des plantes transgéniques et à tous les stades (tableau **II.1**, ligne n°22, colonnes a, b, c et d). Par contre, l'analyse de son expression dans les plantes WT et *35S::P25B* aux deux stades de développement ne révèle pas de différence significative (tableau **II.1**, ligne n°22, colonnes e et f, valeurs respectives de -0,34 et +0,27 ; non montré). De plus, la valeur $\Delta B/wt$ permet de définir le différentiel de log ratio de 0,6 qui permet d'estimer une marge d'erreur liée à la croissance des plantes.

7.2.2. Identification de gènes dérégulés dans les trois lignées *35S::P25*

Avant de décrire globalement les données obtenues, nous avons remarqué l'expression de 21 gènes retrouvés dans les trois lignées et présentés dans le tableau **II.1**. Le calcul de la différence des log ratio ($\Delta B/wt$) permet de constater que deux de ces gènes voient leur expression activée de manière identique dans les plantes WT et B (tableau **II.1**, lignes grises n°3 et 4). Les différences tendent vers 0, ce qui permet d'éliminer ces gènes candidats. Les 19 gènes candidats restants sont classés sur la base des différences de log ratio croissantes (colonne g, tableau **II.1**). La recherche des éléments *cis* présents dans les séquences promotrices de ces gènes est en cours pour déterminer s'il existe un motif commun qui pourrait être reconnu et ainsi expliquer leur expression dans les plantes transgéniques. On trouve parmi ces 19 candidats, des gènes de fonction inconnue (lignes n°1, 2, 6, 9, 12 à 15, 17 et 21), des protéines impliquées dans des régulations de l'expression d'autres gènes (facteur de transcription, ligne n°11 ou facteur d'élongation de la traduction, ligne n°20) ou de l'activité enzymatique (lignes n°5, 16 et 19) mais aussi deux gènes codant pour les expansines EXP7 et EXP18 (lignes n°7 et 8). Ces deux gènes sont impliqués dans la formation des poils racinaires chez *Arabidopsis* (Cho and Cosgrove, 2002). Enfin, on remarque également la surexpression du gène codant pour TOM3 (ligne n°18) impliqué dans la multiplication des *Tobamovirus* dans les plantes (Yamanaka *et al.*, 2000, 2002 ; Asano *et al.*, 2005). L'incidence de l'activation des candidats *EXP* et *TOM* est précisée dans le paragraphe 7.2.3.5.

7.2.3. Identification de gènes dérégulés dans la lignée *35S::P25B* : analyse globale préliminaire

Nous avons analysé les différences de log ratio ($\Delta B/wt$) pour l'ensemble des 3 525 gènes identifiés lors de cette analyse globale CATMA puis éliminé les gènes dont les valeurs $\Delta B/wt$ étaient proches de 0 en utilisant comme limites supérieure et inférieure la marge

d'erreur déterminée pour le gène "kanamycine" (-0,6/+0,6). Le nombre de gènes candidats est ainsi réduit à 2 159, dont 354 sont réprimés d'un facteur 1.5 à 3 fois ($-1.6 < \log \text{ratio} < -0.6$) et 200 surexprimés dans les plantes transgéniques d'un facteur 4 à 25 fois ($2 < \log \text{ratio} < 4,6$). Parmi ces gènes, nombreux sont ceux qui présentent des fonctions biologiques complètement inconnues. Tous les autres, correspondant à des protéines de fonction connue, sont décrits ci-dessous en fonction de leurs propriétés générales.

7.2.3.1. Signalisation de l'auxine

Le phénotype racinaire des plantes *35S::P25B* et leur différence de sensibilité au 2,4-D nous ont conduit à nous intéresser aux variations d'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'auxine. Parmi les 21 gènes identifiés (non montré), on retrouve des gènes codant pour des protéines exprimées en réponse à l'auxine ("auxin responsive protein"), deux ARF, une GH3, des AUX/IAA, des expansines (voir §7.2.3.5), des "endo-xyloglucane transférases", des pompes H⁺ATPase mais aussi une "serine/threonine protein phosphatase 2A" (*PP2A*), un régulateur négatif des réponses de défense aux pathogènes (He *et al.*, 2004). Ce dernier candidat code pour une phosphatase qui est impliquée dans la déphosphorylation des MAPK ("mitogen activated protein kinase") et de leurs substrats. Dans notre situation, ce gène est surexprimé d'un log ratio de 2.27, soit presque cinq fois plus que dans les plantes WT. Cette différence d'expression pourrait en partie expliquer la sensibilité des plantes *35S::P25* à l'infection par le BNYVV.

Il faut noter ici que l'expression du gène *NAC1* n'est pas révélée par cette approche puisque l'oligonucléotide utilisé sur les puces cible deux gènes, ce qui explique l'absence de signal différentiel.

7.2.3.2. Transduction de signal et facteurs de transcription

Des dérégulations de cascades de signalisation, comme celle de l'auxine, peuvent s'expliquer également par des variations d'expression de récepteurs, de protéines impliquées dans la transduction de signal, ou encore des facteurs de transcription. Leur nombre est très important et leurs fonctions très variées (non montré).

Nous avons remarqué parmi ces gènes fortement exprimés, le gène *ROC3* codant pour une "peptidyl-prolyl cis-trans isomerase" impliquée dans la modification de résidus prolines des protéines IAA/AUX (Dharmasiri *et al.*, 2003 ; Oh *et al.*, 2003), le gène *SCL5* ("scarecrow-like transcription factor 5"), et environ trente gènes codant pour des protéines à

domaine F-box, ainsi que 31 autres gènes constitutifs ou régulateurs du protéasome ("ubiquitin", ...).

7.2.3.3. Protéines de stress de type HSC/HSP, peroxydases et oxydoréductases

C'est parmi cette catégorie de gènes que nous avons retrouvé ceux les plus fortement activés. On peut citer les gènes *HSC70-3*, *BiP-2* et *HSC70-1* dont les différences de log ratio ($\Delta B/wt$) sont respectivement de 4.63, 4.55 et 3.10 représentant une expression de 8.6 à 24.8 fois plus importante que dans les plantes WT. On retrouve également les gènes de nombreuses peroxydases, oxydoréductases et Cytochrome P450 qui sont fortement activés (non montré). L'expression des protéines "heat shock", des oxydoréductases et des peroxydases est apparentée à la récupération des cellules face à des situations de stress oxydatifs qui visent à restructurer les protéines endommagées et à lutter contre l'augmentation de molécules réactives de l'oxygène produites lors des mécanismes de réaction de défense des cellules. Directement ou indirectement, l'activation de ces gènes cellulaires tend à contrer les mécanismes d'induction de mort cellulaire. Leur expression induite par la protéine p25 pourrait entre autre expliquer la perte de sensibilité des plantes *35S::P25* aux traitements hormonaux inducteurs de la réponse aux stress biotiques et abiotiques, mais aussi la sensibilité de ces plantes à l'infection.

7.2.3.4. Voie de l'apoptose

La sensibilité des plantes transgéniques à l'infection virale nous a conduit à nous intéresser aux gènes impliqués dans les voies de défense aux pathogènes. Les résultats de l'analyse CATMA démontrent sans ambiguïté l'activation d'un gène impliqué dans l'inhibition de l'apoptose, *BI-1* ("Bax inhibitor-1", Bolduc and Brisson, 2002 ; Bolduc *et al.*, 2003). Par contre, on remarque surtout l'inhibition de la transcription, d'un facteur proche de deux fois, de nombreux gènes de défense comme *EDS1* et d'autres gènes activateurs d'apoptose qui codent pour des protéines à domaine TIR-NBS-LRR. Cette modulation, directe ou indirecte, par la protéine p25 de l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux pathogènes, pourrait limiter l'effet d'une protéine impliquée dans la reconnaissance du BNYVV ou d'un produit de l'un de ses gènes. Dans des conditions normales, une telle reconnaissance induirait la mort cellulaire de la cellule primoinfectée et bloquerait la multiplication du BNYVV. Une telle réaction de résistance extrême expliquerait ainsi la réaction incompatible entre *A. thaliana* Col-0 et le BNYVV. Il faut également préciser que la

mort cellulaire programmée est un mécanisme de régulation qui est également impliqué dans le développement et la différenciation chez les plantes (pour revue Kuriyama and Fukuda, 2002). Ainsi, cette dérégulation de voies de l'apoptose pourrait aussi expliquer la sensibilité des plantes 35S::P25 au BNYVV mais aussi la dérégulation des voies de signalisation hormonales.

7.2.3.5. Autres candidats

Nous avons mis en évidence une surexpression de gènes candidats de fonction démontrée dans des mécanismes de régulation de la croissance racinaire. Nous avons aussi trouvé deux gènes nécessaires à la mise en place de l'infection d'*A. thaliana* par les *Tobamovirus*. Il s'agit des gènes *TOM1* et *TOM3* codant pour des protéines impliquées dans la réplication du TMV chez *Arabidopsis* (Yamanaka *et al.*, 2000, 2002) et chez le tabac (Asano *et al.*, 2005).

On retrouve également une forte expression des gènes *EXP6*, *EXP7* et *EXP18* qui codent pour des expansines impliquées dans l'élongation cellulaire, un mécanisme gouverné par l'auxine. Des gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés et des protéines de fonction H⁺ATPase sont également fortement activés. Les transporteurs d'acides aminés pourraient intervenir directement dans la voie de signalisation de l'auxine (import exagéré de tryptophane, un précurseur de l'auxine). Les pompes à protons (H⁺ATPases) pourraient quant à elles agir indirectement, par acidification de l'espace pariétal et activation des expansines qui vont s'intercaler entre les molécules de xyloglucane et de cellulose, pour favoriser la croissance cellulaire. Ce mode d'action est aussi favorisé par les "endo-xyloglucanes transférases" (dont plusieurs gènes sont surexprimés dans les lignées 35S::P25) qui vont allonger les chaînes de xyloglucanes. L'ensemble de ces mécanismes d'expansion et de croissance des cellules correspond à l'une des actions de l'auxine, notamment responsable de la croissance racinaire.

8. Discussion

Nous avons montré que l'expression constitutive de la protéine p25 chez *Arabidopsis thaliana* induit un phénotype racinaire caractérisé par la présence d'un plus grand nombre de racines latérales et qui s'accompagne d'une sensibilité accrue des plantes à un apport exogène d'un analogue de l'auxine. En absence de traitement, les plantes 35S::P25 présentent une seconde particularité phénotypique qui se caractérise par leur germination et leur

développement plus rapide que pour les *A. thaliana* sauvages. Ce second caractère phénotypique peut être corrélé à une modulation de la voie de signalisation auxine car cette hormone joue un rôle clé dans le développement et la croissance des tissus végétaux.

La faible sensibilité des plantes *35S::P25* aux apports exogènes d'hormones comme le jasmonate (JA) et l'acide abscissique (ABA) nous a conduit à tester la sensibilité de ces plantes aux pathogènes en commençant par le BNYVV. Cette approche nous a permis de constater que les plantes qui expriment la protéine p25 deviennent sensibles à l'infection par le BNYVV.

L'analyse globale et comparative du transcriptome racinaire de ces plantes *35S::P25* avec celui des plantes sauvages (Col-0 WT) met en lumière un nombre considérable de gènes dont l'expression est dérégulée. Parmi ces gènes, certains ne sont retrouvés que dans une ou deux des trois lignées et pourraient donc être modulés à la fois par l'expression de la protéine p25 et par des gènes cellulaires exprimés à des stades très précis du développement des plantes. Ce développement n'étant pas complètement identique pour les trois lignées, il est très difficile de distinguer l'effet de l'expression de la protéine p25 à celui du développement. Nous avons donc choisi de restreindre notre analyse à la lignée B, dont l'insertion du T-DNA est située dans une région intergénique. Les analyses comparatives par circularisation (figure **II.36a**), effectuées aux deux stades de développement 1.02 et 1.06, nous ont permis de minimiser l'effet de la croissance des plantes. Il faut garder à l'esprit que nous n'avons analysé ici que deux temps, ce qui peut biaiser les résultats. Une étude cinétique plus précise sur les lignées *35S::P25* ou l'obtention de lignées exprimant la protéine p25 sous contrôle d'un promoteur inductible permettront d'effectuer des analyses plus fines, notamment sur la recherche des éléments *cis* impliqués dans la modulation du transcriptome dès le début de l'expression de la protéine p25.

L'expression de la protéine p25 dans les lignées *35S::P25* est constitutive. Ainsi, l'ensemble des gènes dérégulés qui sont mis en évidence par cette approche CATMA correspond à une cascade d'événements transcriptionnels qui ne sont pas tous directement attribuables à la présence de la protéine p25 dans les cellules racinaires. Si cela apparaît comme un inconvénient majeur pour une analyse ciblée, l'expression constitutive permet toutefois de se rapprocher des conditions d'infection systémique des plantes par des agents telluriques qui sont présents dès la germination de la graine. Lors de l'infection systémique d'une plante par le BNYVV, une grande majorité des cellules devient infectée par le virus.

Ces cellules produisent toutes la protéine p25, ce qui conduit à une situation presque comparable à l'expression constitutive dans les *Arabidopsis 35S::P25*.

Les gènes retrouvés surexprimés dans les trois lignées (tableau **II.1**) pourraient être directement affectés par la présence de la protéine p25. Rappelons que cette protéine virale est capable d'activer la transcription en système hétérologue (levure). Nous avons donc initié une analyse des éléments *cis* présents dans les 1000 pb situées en amont des séquences des messagers pour tenter d'identifier un motif commun. Si un tel motif existe, il pourra être placé en amont d'un gène rapporteur dont l'activation sera analysée *in vivo* (cellules BY-2) en présence de la protéine p25 ou de ses nombreuses formes mutées disponibles au laboratoire. Cette étude pourra être effectuée également en système hétérologue simple hybride (levure) ou *in vitro* par gel retard.

Nous avons mis en évidence des gènes dérégulés qui peuvent être classés d'une part dans la voie de signalisation à l'auxine (comme par exemple *ABP*, *AUX/IAA*, *ARF*, *GH3*, *H+ATPase*, *EXP*, *PP2A*, *ROC*) et d'autre part dans les voies de réponse aux pathogènes, aux stress et dans les voies de l'apoptose (comme par exemple *PP2A*, *HSP70*, *P450*, oxydoréductases, peroxydases, *BI-1*, *TIR-NBS-LRR*). Enfin, une troisième classe peut être définie par les deux gènes *TOM1* et *TOM3* qui codent pour des protéines impliquées dans la formation du complexe de réplication des *Tobamovirus* et qui assurent son maintien au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique grâce à leurs 7 domaines transmembranaires et leurs interactions avec la protéine 126K (Yamanaka *et al.*, 2000, 2002). Une corrélation entre les fonctions de ces gènes et les caractéristiques phénotypiques et biologiques des plantes *35S::P25* est envisageable en restant toutefois prudent.

A la vue de l'ensemble de nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que la protéine p25 est capable d'induire une modification du transcriptome qui va moduler la réponse des cellules à l'auxine mais aussi induire l'expression de protéines qui vont favoriser la multiplication du virus. Ces protéines pourraient être directement impliquées dans la formation du complexe de réplication, comme les protéines TOM1 et TOM3, ou agir indirectement en inhibant l'apoptose, comme la protéine anti-apoptotique BI-1.

Parallèlement, on assiste à la répression de gènes codant pour des protéines à domaine TIR-NBS-LRR. Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de reconnaissance des pathogènes comme le produit du gène N, le gène de résistance au TMV chez le tabac (Whitham *et al.*, 1994). L'élicitation du produit de ce gène de résistance conduit à des cascades de signalisation qui d'une part, activent des MAPK (Yang *et al.*, 2001 ; Zhang and

Liu, 2001 ; Jin *et al.*, 2003 ; Kim and Zhang, 2004 ; Liu *et al.*, 2004), et d'autre part, favorisent le recrutement des protéines EDS1, RAR1, SGT1, le protéasome et deux éléments du signalosome COP9 (Liu *et al.*, 2002a, 2002b, 2004, Peart *et al.*, 2002a, 2000b). De plus, les hormones JA, SA et l'éthylène sont impliquées dans cette signalisation. L'activation des voies de défense par le TMV conduit à la mise en place d'une réaction dite hypersensible (HR) qui conduit à la mort cellulaire programmée, à des modifications de flux ioniques qui s'accompagnent par l'apparition de formes activées de l'oxygène et l'induction d'un grand nombre de gènes de défense (Hammond-Kosack and Jones, 1996 ; Richberg *et al.*, 1998 ; Dempsey *et al.*, 1999). Les MAPK activées lors de stress biotiques ou abiotiques conduisent à la phosphorylation des facteurs de transcription WRKY qui vont participer à l'induction de la mort cellulaire, comme cela a été démontré chez le tabac (Menke *et al.*, 2005).

Dans notre situation, nous constatons une diminution de l'expression des gènes codant pour des protéines TIR-NBS-LRR, mais aussi la protéine EDS1 et sept facteurs de transcription WRKY. L'activation du gène *PP2A* pourrait conduire à la déphosphorylation des MAPK et de leurs substrats et ainsi limiter la cascade de signalisation de cette voie de défense. Parallèlement, nous observons l'activation de gènes codant pour des protéines impliquées dans les détoxifications, en particulier dans la neutralisation de l'effet des formes actives de l'oxygène (oxydoréductase, ...) et dans la renaturation des protéines suite à des stress oxydatifs (HSC/HSP).

L'ensemble des modifications de l'expression de ces gènes peut expliquer la sensibilité des plantes *35S::P25* à l'infection par le BNYVV, mais nous ne pouvons pas encore conclure sur le rôle direct de la protéine p25. En effet, lors de la mise en place de la relation compatible entre *Pseudomonas syringae* et *Arabidopsis thaliana*, une augmentation des taux d'auxine libre a pu être observée (O'Donnel *et al.*, 2003). De plus, l'effecteur de type-III AvrRpt2 exprimé constitutivement chez *A. thaliana* induit des phénotypes racinaires comparables à ceux observés chez des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la voie de signalisation à l'auxine. Les plantules exprimant la protéine AvrRpt2 présentent une racine primaire plus longue, de nombreuses racines secondaires, sont plus sensibles à un apport exogène de 2,4-D mais aussi à l'infection par le pathogène (Kunkel *et al.*, 2003). Seule une série de mutants affectés dans la voie de signalisation à l'auxine présente une sensibilité accrue à l'infection par *P. syringae*, ce qui laisse penser que la virulence ne dépend que d'une partie des gènes spécifiquement induits par l'auxine.

Si les pathosystèmes *Arabidopsis*-TMV ou *Arabidopsis*-*P. syringae* permettent d'apporter un poids supplémentaire à nos résultats, des expériences complémentaires devront être effectuées pour déterminer la fonction exacte de la protéine p25 dans ce mécanisme de levée des voies de défense chez *A. thaliana*.

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les résultats qui sont rapportés dans ce mémoire de thèse concernent l'analyse globale de transcriptomes, d'une part de systèmes racinaires de betteraves saines et infectées, et d'autre part de systèmes racinaires d'*Arabidopsis thaliana* sauvages et exprimant constitutivement la protéine virale p25 suspectée d'être responsable de la prolifération racinaire lors de la rhizomanie. L'analyse comparative du transcriptome de betterave saines et infectées nous a permis d'identifier des gènes candidats dont le niveau de transcription était dérégulé par l'infection. Ces gènes présentaient pour certains la particularité d'être impliqués de près ou de loin dans la morphogenèse racinaire (AAP, H⁺/ATPase, ABP1, EXP6, ...) ou dans les réactions de défenses ou liées aux stress (HSC70, UBI, GST, ...). Malheureusement, nous avons été confronté à de grandes difficultés pour confirmer leur réelle expression différentielle dans les racines de betteraves.

L'obtention de lignées *Arabidopsis* transgéniques 35S::P25 exprimant constitutivement la protéine p25 a permis de prouver le rôle de cette protéine virale dans la prolifération racinaire. En effet, l'expression constitutive de la protéine p25 induit l'apparition de racines secondaires plus nombreuses que chez les plantes sauvages. Nous avons montré que ce phénotype racinaire est bien lié à l'expression de la protéine p25 puisque :

- Premièrement, le phénotype est dominant sur plantes hétérozygotes obtenues après rétro-croisement.
- Deuxièmement, nous n'avons pas pu détecter de siRNA issus des messagers codant pour la protéine p25, ce qui indique que le phénotype n'est pas lié à un phénomène d'interférence par l'ARN.

- Troisièmement, nous avons montré que les taux d'expression des microRNA miR164 et miR167 ne sont pas modifiés. Ces deux miRNA sont impliqués dans la modulation de l'expression de gènes régulant le développement racinaire.

Nous avons montré que la protéine p25 est retrouvée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules de la lignée *35S::P25E*, c'est à dire au même endroit que la protéine exprimée en contexte viral (Haeberlé and Garaud, 1995 ; Vetter *et al.*, 2004), et qu'elle possède une taille identique à celle exprimée en contexte viral. Les plantes *35S::P25* présentent une sensibilité accrue à l'auxine, et sont résistantes à des hormones de signalisation de stress biotiques et abiotiques. De plus, l'expression de la protéine p25 rend *Arabidopsis* sensible à une infection par le BNYVV. L'analyse globale du transcriptome racinaire de ces plantes nous a permis de constater que certains gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'auxine, du jasmonate et de l'éthylène sont affectés par l'expression de la protéine p25. D'un autre côté, nous avons observé une inhibition de nombreux gènes pro-apoptotiques dont certains codent soit pour des récepteurs de produits de gènes d'avirulence, soit pour des enzymes impliquées dans la transduction des signaux de défense. Parallèlement, l'inhibiteur d'apoptose BI-1 est surexprimé, tout comme des protéines de détoxification habituellement exprimées pour stopper l'action de formes actives de l'oxygène. Enfin, deux gènes codant pour des protéines impliquées dans l'ancrage membranaire du complexe de réplication des *Tobamovirus* (virus à ARN+) sont surexprimés.

Cette première analyse globale du transcriptome met en lumière certains gènes candidats que nous avons détectés chez la betterave en utilisant l'approche RFDD-PCR. On peut citer les gènes codant pour une HSC70, un transporteur d'acides aminés du type AAP, la protéine ABP1, une pompe H⁺ATPase, et enfin une protéine de la famille des expansines. Il faut préciser que le gène *AtEXP6*, retrouvé surexprimé par l'approche CATMA, présente de fortes identités de séquence avec le gène trouvé surexprimé par RT-PCR dans les racines de betteraves infectées. De la même façon, la surexpression dans les *Arabidopsis 35S::P25* de nombreux gènes codant pour des AUX/IAA ou des gènes de réponse à l'auxine, en corrélation avec la sensibilité accrue de ces plantes à l'auxine, est en adéquation avec la surexpression des gènes *ABP1* ou *H⁺ATPase* dans les betteraves infectées. Le profil d'expression de ces gènes, tout comme les taux d'IAA élevés détectés dans les racines de betteraves rhizomaniées, indique que les voies de signalisation ou de transport de l'auxine sont impliquées dans ces dérèglements racinaires. Si les résultats CATMA demandent encore à être étudiés en détail, en particulier en regroupant plus précisément les gènes par fonction biologique et en effectuant

un travail de "clustering" bioinformatique, les données seront utilisées pour caractériser l'expression de gènes orthologues dans les betteraves sensibles et résistantes au virus. Nous raisonnons ici essentiellement sur la base d'identités de séquences nucléotidiques ou protéiques. Il faut cependant moduler cette interprétation, puisque les deux plantes comparées ici ne sont pas identiques, tant au niveau de leur taille que de leur système racinaire. Une situation idéale serait de retrouver des éléments *cis* communs dans les séquences promotrices de ces gènes dans les deux types de plantes ; ces gènes pouvant être similaires mais pas obligatoirement identiques. Un travail bioinformatique préliminaire a été initié à l'IBMP, en collaboration avec V. Cognat. Cette étude consiste à rechercher des éléments *cis* dans les séquences promotrices des gènes retrouvés dérégulés dans les trois lignées *Arabidopsis* 35S::P25 (tableau II.1, §7.2.2. du chapitre II). Si de tels éléments *cis* sont identifiés puis confirmés par la suite, par exemple par gel retard à l'aide de protéines p25 purifiées, nous pourrions alors rechercher leur présence dans les bases de données de séquences de betterave, si cela est possible.

Quoiqu'il en soit, nos résultats démontrent que l'arabette peut servir de modèle pour étudier l'incidence de l'expression de la protéine p25 sur un ensemble de propriétés biologiques générales de la plante. De plus, la sensibilité des plantes 35S::P25 à l'infection par le BNYVV va permettre de répondre à la question initialement posée : « quels sont les gènes dérégulés lors de l'infection virale ? ». Pour y répondre, il nous suffira de comparer le transcriptome de feuilles de plantes 35S::P25 inoculées par le BNYVV à celui de feuilles non inoculées. De plus, nous pourrions étendre une telle analyse en modulant la composition de l'inoculum. Cela nous permettra de rechercher l'incidence sur le transcriptome de l'expression des protéines virales exprimées par les ARN 3 à 5. Nous comptons déterminer la sensibilité des plantes 35S::P25 vis-à-vis de l'infection par d'autres pathogènes. Nous allons tester leur sensibilité à des agents pathogènes cellulaires (bactéries, champignons) ou subcellulaires (virus, viroïdes). Si la sensibilité de nos plantes vis-à-vis d'agents biotiques s'avère large, les *A. thaliana* 35S::P25 devraient permettre de préciser certaines fonctions biologiques de pathogènes incapables de se répliquer sur *Arabidopsis* comme par exemple le PCV ou *Peanut Clump virus*. Ainsi, à plus ou moins long terme, ces plantes transgéniques pourraient devenir un outil de choix en pathologie végétale, en particulier celles de la lignée 35S::P25B qui ne sont pas considérées comme des mutants puisqu'aucun gène cellulaire n'est touché par l'insertion du T-DNA.

Compte tenu des résultats similaires obtenus dans le cas du pathosystème *A. thaliana*-*P. syringae* (Kunkel *et al.*, 2003), la dérégulation de la voie de signalisation de l'auxine pourrait être responsable à elle seule de l'apparition de sensibilité au BNYVV. Pour le vérifier, nous allons effectuer des tests d'infection par le BNYVV de lignées *A. thaliana* affectées dans cette voie de signalisation. Par exemple, nous pourrions rechercher la capacité du BNYVV à infecter le mutant *aux1* ("auxin-résistant"), un mutant affecté dans le transport de l'auxine qui présente un nombre réduit de racines secondaires (Marchant *et al.*, 2002), ou les mutants *sur1* ou *sur2* ("superroot"), deux mutants produisant un très grand nombre de racines secondaires (Delarue *et al.*, 1998 ; Barlier *et al.*, 2000). Nous pourrions également effectuer des croisements entre ces mutants et les plantes *35S::P25* pour caractériser d'une part leur phénotype racinaire et d'autre part leur sensibilité au BNYVV ou à d'autres pathogènes.

Comme nous l'avons cité précédemment, l'obtention de lignées exprimant la protéine p25 sous le contrôle d'un promoteur inductible permettra d'identifier les éléments *cis* reconnus par la protéine p25. Un travail de "clustering" des profils d'expression permettra d'identifier plus précisément les gènes induits précocement ou plus tardivement. Ainsi, de telles lignées inductibles devraient permettre d'étudier en partie les cascades d'expression de gènes liées à la voie de signalisation de l'auxine mais aussi, peut être, d'identifier des passerelles de régulation ("cross talk") existant entre les différentes voies de signalisation de l'auxine, du jasmonate, de l'ABA, de l'acide salicylique, de l'éthylène. Nos données CATMA rendent compte de l'existence de telles passerelles mais ne permettent pas encore de les préciser.

La confirmation par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de certains candidats est également en cours. Nous allons pouvoir vérifier l'incidence de l'inactivation par PTGS de certains gènes sur l'infection virale. Par exemple, l'inactivation des gènes *TOM1* et *TOM3* dans *B. vulgaris* pourra être effectuée par agroinfiltration foliaire de constructions en tige-boucle ("hairpin") induisant des siRNA ciblant les messagers de ces deux gènes. Après extinction de l'expression de *TOM1* et/ou *TOM3* dans les feuilles de betteraves, celles-ci seront ensuite inoculées par un isolat viral et nous analyserons la capacité du virus à se multiplier. Ainsi, nous pourrions déterminer si ces deux protéines transmembranaires sont impliquées dans la formation d'un complexe de réplication avec les protéines non structurales codées par l'ARN 1 du BNYVV. L'inactivation de l'expression de ces deux gènes est sans effet sur la croissance d'*A. thaliana* (Yamanaka *et al.*, 2002). Si tel est le cas chez la

betterave, l'inactivation de ces deux gènes pourrait permettre d'inhiber complètement la réplication du BNYVV et peut être d'autres virus à ARN+ comme le BSBMV ou le BSMV. Ceci implique bien entendu l'obtention de betteraves transgéniques.

Le rôle de la protéine p25 dans l'exacerbation de la croissance et la sensibilité des plantes au BNYVV va également être transposée à deux autres plantes "modèles". Le tabac et le pétunia vont servir à exprimer cette protéine virale, mais aussi certaines de ses formes mutées, pour visualiser l'effet de leur expression sur la croissance et le développement racinaire de ces plantes. L'effet de la protéine étant dominant, l'analyse de lignées hétérozygotes exprimant la protéine pourra être entreprise relativement rapidement.

Nous n'avons abordé ici qu'une partie de la biologie de la protéine p25. En effet, si son expression agit sur le transcriptome de la cellule hôte, nous ne disposons d'aucune information sur les protéines cellulaires pouvant interagir avec elle. Des approches de co-immunoprécipitation sont envisagées pour identifier certaines protéines jouant un rôle de partenaire cellulaire de la protéine p25. La grande majorité de protéines virales possèdent plusieurs fonctions biologiques. Il est fort probable que la protéine p25 réponde à ce critère. Ses fonctions pourraient être modulées par des modifications post-traductionnelles. En effet, les analyses préliminaires effectuées au laboratoire indiquent que cette protéine est phosphorylée. La protéine p25 est retenue par affinité à l'aide d'anticorps dirigés contre des résidus serine/thréonine phosphorylés, le remplacement T164A inhibe l'adressage nucléaire de la protéine GFP::P25 qui n'est pas affecté par un remplacement T164D mimant l'état phosphorylé (Vetter, Thèse de Doctorat 2003, Université Louis Pasteur Strasbourg). Enfin, l'analyse par western blot effectuée sur des protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle laisse apparaître quatre signaux alignés pouvant correspondre respectivement à des formes non-, mono-, bi- et triphosphorylées de la protéine (A. Schirmer et D. Gilmer, communication personnelle). Le mimétisme de ces états phosphorylés par des aspartates ou le remplacement des résidus phosphorylables par des alanines seront introduits dans la séquence de la protéine p25 qui sera exprimée en contexte viral ou encore dans *A. thaliana*. Nous espérons ainsi obtenir des protéines p25 mutées dont les fonctions seront inhibées ou au contraire constitutivement activées. Là encore, une approche d'analyse globale du transcriptome ou du protéome pourra être mise en œuvre pour élucider le mécanisme d'action de cette protéine bien particulière.

Une partie de ces perspectives de recherche seront mises en pratique dans le cadre d'une nouvelle convention CIFRE établie avec la société SESVanderHave.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal, méthodes de culture et d'infection

1.1. Matériel végétal

1.1.1. Les plantes hôtes du BNYVV

Le BNYVV est un virus qui infecte principalement les plantes de la famille des Chénopodiacées. Trois plantes hôtes du BNYVV ont principalement été utilisées au laboratoire pour les travaux décrits dans ce mémoire : *Beta vulgaris*, *Beta macrocarpa* et *Chenopodium quinoa*.

Ces plantes sont généralement cultivées dans des pots individuels de diamètre 13 cm contenant du terreau horticole (Fruhstorfer Erde® type T de pH 5,5-6,5, composé de 50% de tourbe blonde, 35% d'argiles et 15% d'humus à base d'écorces) et conservées en serre sous 16 h/j de lumière (10000 lux), 50% d'humidité minimum, à une température de 22°C le jour et 18°C la nuit.

1.1.1.1. La betterave sucrière (*Beta vulgaris*)

La betterave sucrière, plante bisannuelle, est une dicotylédone de la famille des Chénopodiacées, du genre *Beta*, espèce *Beta vulgaris*. Cette espèce se divise en trois sous-espèces : les formes cultivées (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) qui regroupent le cultivar Altissima (betterave sucrière), le cultivar Crassa (betterave fourragère), et le cultivar Conditiva (betterave potagère), les formes sauvages (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) que l'on trouve le long des côtes, et les betteraves rudérales ou adventices vivant dans les champs ou les talus.

La betterave *Beta vulgaris* qui est l'hôte naturel du BNYVV présente une infection systémique depuis les racines colonisées par le vecteur virulifère *P. betae* jusqu'aux feuilles. Par contre, l'inoculation mécanique de feuilles par des isolats artificiels du BNYVV provoque l'apparition de lésions locales chlorotiques vertes, jaunes, voire nécrotiques suivant l'isolat viral. Dans ces conditions d'inoculation, l'infection systémique de la plante est rare.

1.1.1.2. La betterave sauvage (*Beta macrocarpa*)

La betterave sauvage, plante annuelle, est une dicotylédone de la famille des Chenopodiacees, du genre *Beta*, espèce *Beta macrocarpa*. L'inoculation mécanique d'isolats artificiels du BNYVV contenant les ARN 1 et 2 provoque l'apparition de lésions chlorotiques vertes et l'infection reste limitée aux feuilles inoculées. L'infection par un isolat viral contenant au moins les ARN 1, 2 et 3 du BNYVV provoque l'apparition de lésions chlorotiques jaunes sur les feuilles inoculées. L'infection progresse ensuite au niveau des feuilles apicales et des racines (système).

1.1.1.3. *Chenopodium quinoa*

Cette plante, couramment utilisée au laboratoire pour l'étude du BNYVV, répond à l'infection virale uniquement par l'apparition de lésions locales chlorotiques vertes (avec un isolat artificiel contenant les ARN 1 et 2 du BNYVV), jaunes (avec les ARN 1 à 3 du BNYVV) ou même nécrotiques (avec les ARN 1 à 5 du BNYVV) sur les feuilles inoculées.

1.1.1.4. La tétragone (*Tetragonia expansa*)

La tétragone (*Tetragonia expansa*) ou épinard de Nouvelle-Zélande est une dicotylédone de la famille des Tétragoniacées. Elle répond à l'infection virale par l'apparition de lésions locales visibles uniquement sous UV (avec un isolat artificiel contenant les ARN 1 et 2 du BNYVV), jaunes (avec les ARN 1 à 3 du BNYVV), ou nécrotiques (avec les ARN 1 à 5 du BNYVV) sur les feuilles inoculées.

1.1.2. L'arabette (*Arabidopsis thaliana*) écotype Columbia (Col-0)

L'arabette (*Arabidopsis thaliana*) est une dicotylédone de la famille des Brassicacées. Cette plante modèle est couramment utilisée et possède un génome d'environ 125.10⁶ pb réparti sur cinq chromosomes complètement séquencés. Sa petite taille (30 à 40 cm de haut à l'âge adulte), son cycle de développement très court (deux mois en conditions optimales), son mode de reproduction (principalement par autofécondation offrant plusieurs dizaines de

milliers de graines) et la facilité d'obtention de mutants (insertion de T-DNA ou EMS) facilitent la caractérisation des gènes et l'étude de leur expression.

1.1.2.1. Culture *in vitro* d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines sont tout d'abord incubées pendant 10 min dans l'éthanol 70% pour favoriser l'hydratation, puis elles sont stérilisées pendant 20 min dans la javel (solution d'hypochlorite de sodium à 2,6% de chlore actif). Après quatre lavages dans l'eau stérile, les graines sont déposées sur boîtes contenant un milieu de culture stérilisé MS (Murashige and Skoog) M0255 (Duchefa) supplémenté de 1% de saccharose (10 g/l) et de 0,7% d'agar (7 g/l) de pH 5,8 ajusté avant autoclavage par addition de KOH 1 M. Après une vernalisation des graines de 96 h effectuée à 4°C à l'obscurité, les boîtes sont placées en logette dans des conditions de 16 h/j de lumière (8000 lux), 70% d'humidité, à une température de 21°C le jour et 17°C la nuit.

Pour l'observation des phénotypes racinaires, les plantules en cours de germination sont déposées sur boîtes gélosées incubées verticalement.

Pour la sélection de plantes transgéniques, 50 µg/ml de kanamycine sont ajoutés au milieu de culture après autoclavage.

Pour l'étude de la réponse des plantes à différentes hormones végétales, les graines ou les plantules sont déposées sur divers milieux de culture enrichis en hormones de nature et de concentration différentes. L'auxine ou IAA (indole-3-acetic acid), son analogue le 2,4-D (2,4 dichloroacetic acid), l'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) ou l'acide abscissique ou ABA (abscisic acid), sont toutes des hormones disponibles sous forme de poudre et des solutions mères de 1 M, 100 mM, 10 mM et 1 mM sont préparées dans l'éthanol 100%. L'acide salicylique est disponible sous forme de poudre de salicylate de sodium (Sigma) et une solution mère de 1 M est préparée dans l'eau stérile. Le méthyl jasmonate (MeJA) est commercialisé en solution concentrée (4,5 M) dans l'éthanol 100%. Des dilutions extemporanées de ces solutions mères sont ajoutées aux milieux de culture à la concentration finale désirée après stérilisation et refroidissement.

1.1.2.2. Culture d'*Arabidopsis thaliana* en terre

Après 21 à 28 jours de culture *in vitro*, les plantules sont transférées dans des pots individuels de diamètre 8 cm contenant du terreau horticole LAT-Terra® Standard P (Lauterbacher Kultursubstrat) de pH 5,5-6,5, composé de 82% de tourbe blonde et 18% d'argiles volcaniques. Les plantes sont placées une semaine en atmosphère confinée (mini-

serres, 12 h/j de lumière ~3000 lux), puis transférées en logette (12 h/j de lumière ~6000 lux), 50% d'humidité, à une température de 20°C le jour et 18°C la nuit (des conditions de jours courts qui favorisent la croissance des feuilles et limitent fortement la floraison). Pour favoriser la montée rapide en graines, les plantes sont cultivées en condition de jours longs, sous 16 h/j de lumière ~10000 lux, 50 à 70% d'humidité, à une température de 22°C le jour et 18°C la nuit. Après la floraison (15 à 20 jours), l'arrosage est supprimé et les graines séchées à température ambiante.

1.2. Infection virale, agroinfiltration et transformation des plantes

1.2.1. Multiplication du BNYVV sur *Chenopodium quinoa*

Les isolats artificiels du BNYVV sont obtenus par inoculation de feuilles de *Chenopodium quinoa* par des ARN infectieux synthétisés *in vitro* à partir d'ADNc complets correspondant aux ARN 1, 2, 3 et 4 du BNYVV (Quillet *et al.*, 1989). L'isolat d'origine ayant permis le clonage des ADNc complets est l'isolat F2 provenant de betteraves virosées de la région de Muret (Putz and Kuszala, 1978).

1.2.1.1. Synthèse d'ARN infectieux du BNYVV par transcription *in vitro*

La transcription est réalisée à partir d'ADN plasmidique recombinant possédant les séquences promotrices des bactériophages T3 ou T7 situées en amont du fragment d'ADNc. Ainsi, en utilisant l'ARN polymérase T3 ou T7 selon le plasmide utilisé, il est possible d'obtenir l'ARN complémentaire à l'un ou l'autre des brins de l'insert. Pour limiter la transcription à l'insert uniquement, l'ADN plasmidique est linéarisé au préalable par une enzyme de restriction dont le site unique se trouve directement en aval du fragment d'ADN à transcrire.

La transcription est réalisée en présence de m⁷GpppG, un analogue de la coiffe (cap). Afin de favoriser l'incorporation de ce groupement en 5' des transcrits synthétisés, le GTP est utilisé en faible concentration en début de réaction. Celle-ci s'effectue dans les conditions suivantes :

1,5 µg d'ADN linéarisé ; 20 µl de tampon de transcription x 5 (HEPES-KOH 400 mM pH 7,5 ; MgCl₂ 120 mM ; DTT 200 mM ; spermidine 10 mM) ; 7,5 µl de rATP (100 mM) ; 7,5 µl de rCTP (100 mM) ; 7,5 µl de rUTP (100 mM) ; 0,3 µl de rGTP (100 mM) ; 20 µl de m⁷GpppG (15 mM) ; 10 µl de RNA polymérase (T3 ou T7) (50 U/µl) ; eau stérile qsp 100 µl.

Après 30 min d'incubation à 37°C, 7,5 µl de rGTP (100 mM) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après deux heures d'incubation à 37°C, les transcrits sont soumis à une extraction phénolique (phénol-eau), suivie d'une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique, précipités à l'éthanol en présence d'acétate d'ammonium 4 M, lavés à l'éthanol 70%, séchés et repris dans l'eau stérile.

1.2.1.2. Obtention des isolats artificiels du BNYVV

Pour l'inoculation mécanique de plantes *Chenopodium quinoa* âgées de 6 à 8 semaines, chaque feuille est saupoudrée de cébite, puis frottée délicatement avec 25 µl de solution d'inoculation (10 µg de transcrits ; 100 µg d'ARN total de levure ; tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5 ; macaloïd 0,05% ; eau stérile qsp 200 µl). Après 6 à 8 jours de virose, les feuilles inoculées sont récoltées et broyées pour en extraire les ARN totaux. Ces ARN sont conservés à -20°C et utilisés pour l'inoculation mécanique d'autres plantes.

1.2.2. Infection systémique de *Beta macrocarpa* par le BNYVV

L'infection des plantes s'effectue au stade deux feuilles, par inoculation mécanique d'isolats artificiels du BNYVV. Une feuille de *B. macrocarpa* est saupoudrée d'abrasif (cébite), puis frottée avec 10 µl de solution d'inoculation (1 µg d'ARN totaux de feuilles de *C. quinoa* infectées comportant les ARN 1 et 2 du BNYVV supplémentés ou non des transcrits correspondant aux ARN 3 et 4) ; tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5 ; macaloïd 0,05% ; eau stérile qsp 100 µl). Treize jours après l'infection, les betteraves sont récoltées, les racines lavées, pressées contre des membranes pour être analysées par immuno-empreinte, puis les racines sont congelées et conservées à -80°C.

1.2.3. Infection naturelle de racines de *Beta vulgaris* par le BNYVV

Des graines de betteraves *B. vulgaris* ssp. *vulgaris* sont semées dans des bacs de terreau de 20 litres additionnés de 10% de terre infestée par le protozoaire vecteur *Polymyxa betae* contenant ou pas le BNYVV. Les terres infestées par *P. betae* virulifère proviennent de régions françaises fortement touchées par la rhizomanie (Aisne, Loiret), et la terre contenant *P. betae* avirulifère, qui sert de contrôle dans l'ensemble de nos expériences, provient d'Angleterre. Après deux mois de culture, les betteraves saines ou infectées par le virus sont récoltées, et les racines sont récupérées, lavées puis broyées dans l'azote liquide pour être ensuite réduites en poudre et conservées à -80°C.

1.2.4. Infiltration de bactéries *Agrobacterium* dans les feuilles de betteraves (Voinnet *et al.*, 1998)

Les agrobactéries sont cultivées pendant 20 h à 28°C dans 10 ml de milieu sélectif LB liquide (bactotryptone 1% ; extrait de levure 0,5% ; NaCl 0,5% ; pH 7,4) additionné de rifampicine (100 µg/ml) ainsi que de l'antibiotique permettant la sélection du plasmide binaire (kanamycine 50 µg/ml). Les bactéries sont sédimentées par une centrifugation de 15 min à 5 000 g, puis reprises dans le milieu d'infiltration (MgCl₂ 10 mM ; acétylsyringone 200 µM). La suspension bactérienne est ajustée à une DO_{600nm} égale à 1, puis incubée à température ambiante pendant 3 h.

Les plantes sont infiltrées au stade deux feuilles suivant la méthode de Schob *et al.* 1997. Après une petite incision au scalpel, les faces inférieures des feuilles sont infiltrées de solution bactérienne à l'aide de seringues sans aiguille.

1.2.5. Transformation d'*Arabidopsis thaliana* par "floral dip" (Clough and Bent, 1998)

La première hampe florale d'*A. thaliana* en floraison est coupée pour favoriser le développement des hampes secondaires plus nombreuses et les plantes sont placées en conditions de jours longs.

Une préculture d'agrobactéries est cultivée pendant 24 h dans 10 ml de milieu sélectif LB liquide additionné de rifampicine (100 µg/ml) et de kanamycine (50 µg/ml) dont la moitié est utilisée pour inoculer 500 ml du même milieu. Après une incubation pendant 18 h à 28°C (0,8 < DO_{600nm} < 1,2), les bactéries sont centrifugées à 1500 g à température ambiante et le culot remis en suspension dans 500 ml de milieu d'infiltration contenant 1/2 milieu MS (Murashige and Skoog) M0255 (Duchefa) supplémenté de 5% de saccharose, 0,05% de Silvet L-77 (adjuvant hyper mouillant) (Agridyne), et 200 µM d'acétylsyringone.

Les hampes florales sont immergées pendant une à deux minutes dans la suspension bactérienne et les plantes placées à l'obscurité pendant 48 h dans des mini-serres fermées pour éviter la déshydratation. Après la floraison (15 à 20 jours), l'arrosage est supprimé et les graines séchées à température ambiante.

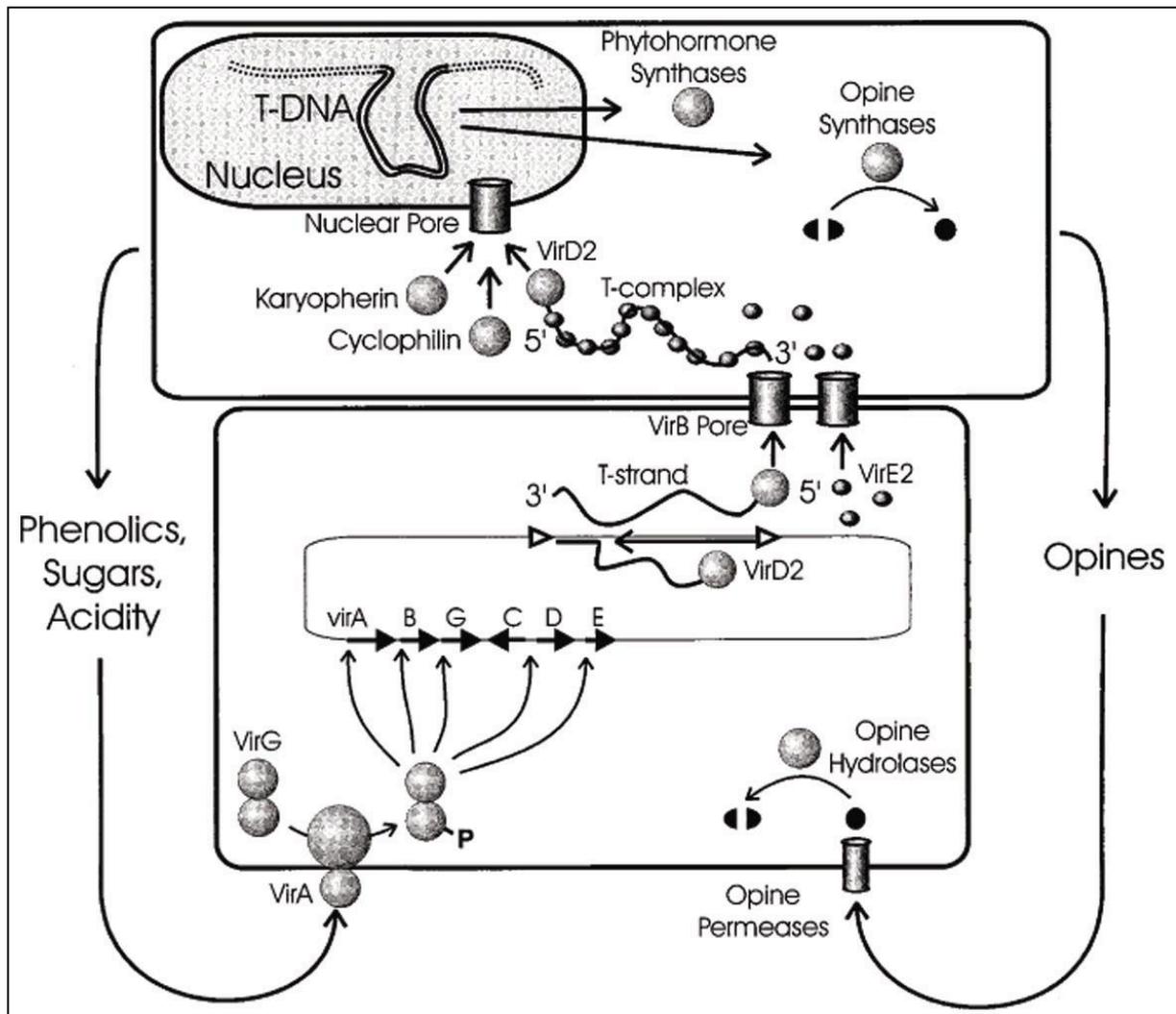


Figure M.M.1 : Représentation schématique des échanges existant entre la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (en bas) et la cellule végétale infectée (en haut). Les signaux chimiques excrétés par la cellule végétale blessée (composés phénoliques, sucres, etc.) sont détectés par les protéines VirA à VirG qui activent la transcription de l'ensemble des gènes *vir*. Le T-DNA (T-strand) est excisé et transporté à l'intérieur du cytoplasme de la cellule végétale grâce aux protéines VirD2 et VirE2 à travers un canal formé par les différentes protéines VirB (VirB Pore). Le complexe T-DNA/VirD2/VirE2 (T-complex) est transporté à l'intérieur du noyau grâce aux protéines de la cellule hôte (karyopherin), puis le T-DNA est inséré dans le génome. Le T-DNA code pour des gènes de synthèse d'hormones végétales comme l'auxine ou la cytokinine (phytohormone synthases) et code pour des gènes de synthèse des opines (opine synthases) qui sont des sources d'azote et de carbone pour la bactérie. Les gènes de perméases (opine permeases) permettent à la bactérie de récupérer ces opines libérées par la cellule végétale qui sont métabolisées grâce aux gènes de catabolisme (opine hydrolases). D'après Zhu *et al.*, 2000.

2. Souches bactériennes et vecteurs de clonage

2.1. Souches bactériennes et milieux de culture

2.1.1. *Escherichia coli* de souche XL1 Blue

La souche XL1 Blue de génotype *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F' [proAB⁺ lacIq lacZΔM15 Tn10 (tet^R)]* est utilisée pour réaliser l'amplification des plasmides. Elle permet l' α -complémentation et la sélection de clones recombinants basée sur la couleur des colonies, en présence d'un inducteur (IPTG) et d'un substrat de la β -galactosidase (X-Gal) devenant bleu une fois métabolisé. Les bactéries sont cultivées à 37°C en milieu LB liquide ou solide additionné ou non d'antibiotique pour sélectionner les bactéries recombinantes.

2.1.2. *Agrobacterium tumefaciens* de souche GV3101

Cette bactérie phytopathogène infecte principalement les plantes dicotylédones et entraîne une prolifération anormale des cellules végétales qui se manifeste par la formation de tumeurs appelées galles du collet ("crown gall"). L'infection par *Agrobacterium* donne lieu à un processus de transgénèse naturelle dans lequel la bactérie transforme génétiquement les cellules végétales grâce à la présence d'un plasmide de grande taille (environ 200 kb) appelé Ti ("Tumour-inducing") (Zaenen *et al.*, 1974). Ce processus (figure **M.M.1**) fait intervenir les gènes *chv* ("chromosomal virulence") présents sur le chromosome bactérien et permettant la fixation de la bactérie aux cellules végétales, et les gènes *vir* ("virulence") localisés sur le plasmide Ti, induits par des composés phénoliques comme l'acétosyringone, et qui permettent le transfert et l'intégration dans le génome des cellules hôtes d'un fragment d'ADN (T-DNA) flanqué de deux séquences de 25 pb en répétition directe nommées RB ("Right Border") et LB ("Left Border") (Yadav *et al.*, 1982, pour revue : Gelvin, 2000 ; Zupan *et al.*, 2000). Dans la nature, le T-DNA code pour des gènes de synthèse d'hormones végétales comme l'auxine (gènes *iaaM* et *iaaH*), la cytokinine (comme le gène *ipt*), des oncogènes (comme le locus *tml* appelé également gène *6b*) et des gènes de synthèse des opines (comme les gènes *ocs*, octopine synthase, ou *nos*, nopaline synthase) qui sont des sources d'azote et de carbone pour les agrobactéries. Les gènes de perméases (du type *agt*, agropine permease, ou *occ*, octopine permease) et les gènes de catabolisme (du type *aga* ou *moc*) portés par le plasmide Ti permettent aux agrobactéries de métaboliser ces opines (pour revue : Zhu *et al.*, 2000).

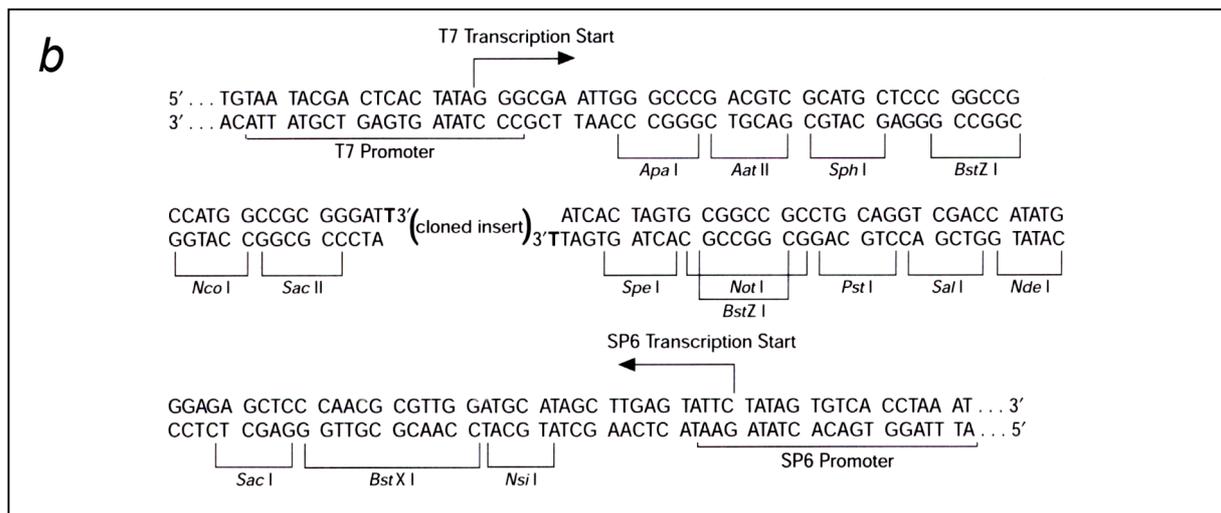
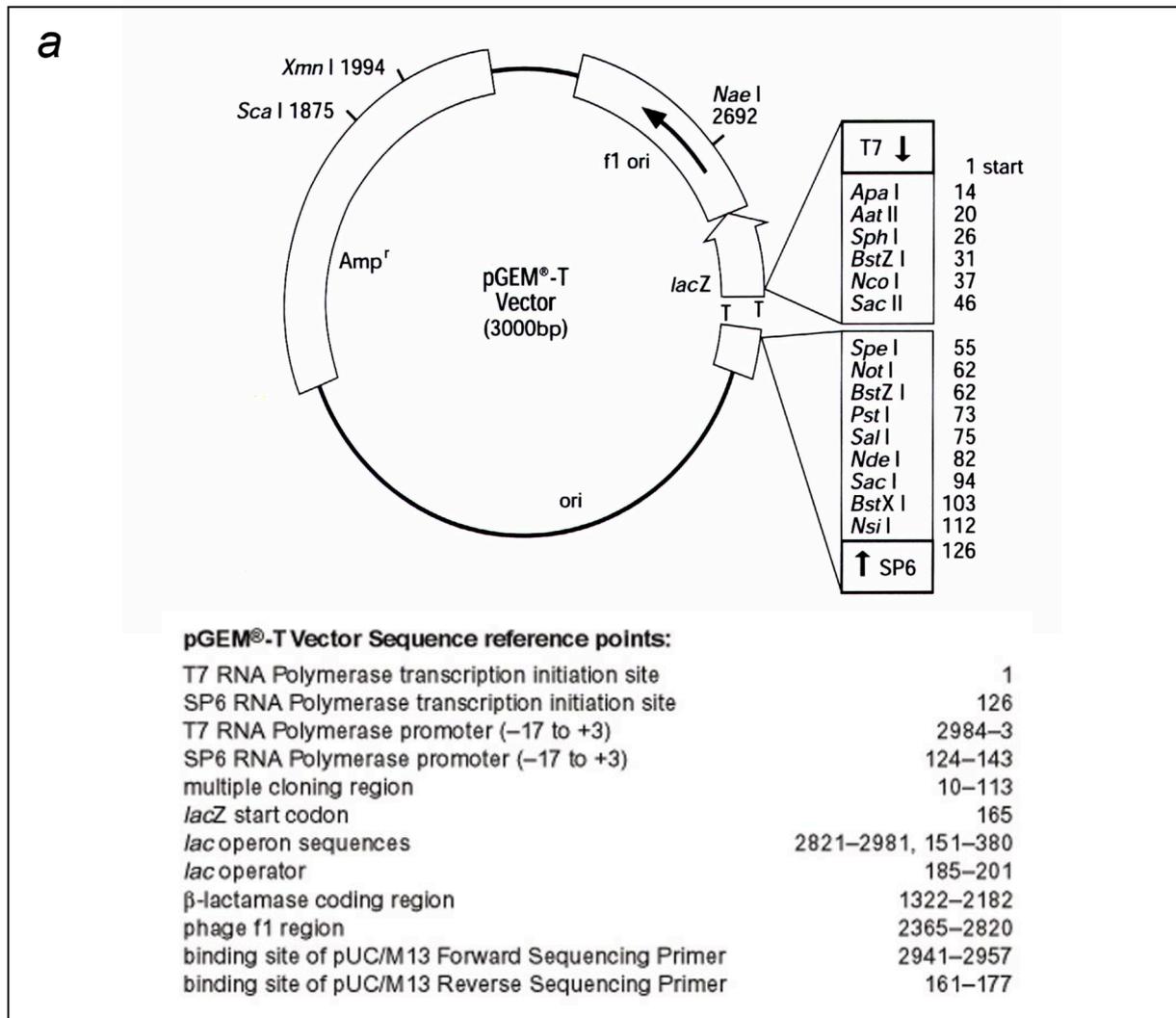


Figure M.M.2 : (a) Représentation schématique du vecteur pGEM[®]-T (Promega). La position des sites de restriction de la cassette de clonage (multiple cloning region), des promoteurs de transcription T7 et SP6, et des différents gènes, est précisée sur la figure. Les thymidines ajoutées au niveau des extrémités 3' du vecteur linéarisé apparaissent en gras. **ori** : origine de réplcation ; **f1 ori** : région intergénique du phage f1 ; **lacZ** : fragment α du gène de la β -galactosidase permettant une α complémentation ; **Amp^r** : gène de la β lactamase conférant la résistance à l'ampicilline. (b) Description des séquences promotrices de transcription des phages T7 et SP6, et des différents sites de restriction de la cassette de clonage. D'après pGEM[®]-T Vector System Technical Manual (Catalog n° TM042) (Promega).

Ce mécanisme a été détourné dans un but de transgénèse en remplaçant les gènes portés par le T-DNA par un gène d'intérêt accompagné d'un gène de sélection. Les dernières techniques de transgénèse utilisées aujourd'hui consistent à combiner un plasmide Ti désarmé, c'est-à-dire dépourvu de T-DNA, de bordures RB et LB et d'oncogènes, mais possédant encore les gènes *vir* permettant le transfert en *trans* d'un fragment d'ADN inséré entre les deux bordures RB et LB dans un autre plasmide binaire nommé pBin ("Binary plasmid") plus facile à manipuler.

La souche d'agrobactéries GV3101 (Holsters *et al.*, 1980) est dérivée de la souche C58C1 qui possède sur son chromosome le gène de résistance à la rifampicine et contient un plasmide Ti désarmé portant le gène de résistance à la tétracycline. Cette souche, transformée par un vecteur binaire (pBin 61), est utilisée au laboratoire pour l'infiltration de feuilles de betteraves *Beta vulgaris* ou la transformation d'*Arabidopsis thaliana* par "floral dip". Les bactéries sont cultivées à 28°C en milieu LB supplémenté de rifampicine (100 µg/ml) et de kanamycine (50 µg/ml). Cette souche d'*A. tumefaciens*, ainsi que les bactéries transformées sont stockées à -80°C en présence de 50% de glycérol.

2.2. Vecteurs de clonage

2.2.1. Le plasmide pGEM®-T

Le plasmide pGEM®-T (Promega) (figure **M.M.2**) est un plasmide pGEM®-5Zf(+) linéarisé au niveau de la cassette de clonage par l'enzyme de restriction *EcoRV* et auquel a été ajoutée une thymidine aux extrémités 3'-OH. Ce vecteur est utilisé pour le clonage de produits PCR comportant une désoxyadénosine aux extrémités 3'-OH, introduite par l'enzyme Taq polymérase lors de l'amplification de l'ADN. Ce plasmide possède une origine de répllication bactérienne, un gène de résistance à l'ampicilline, la région intergénique du phage f1, et le gène *lacZ* codant pour le peptide α de la β -galactosidase dans lequel est insérée la cassette de clonage. Les séquences promotrices de transcription des phages T7 et SP6, situées de part et d'autre de la cassette de clonage, permettent de synthétiser les ARN dérivant de l'un des deux brins du fragment PCR inséré au niveau du site *EcoRV*.

2.2.2. Le plasmide pBin 61 (Voinnet *et al.*, 2000)

Ce vecteur est dérivé du plasmide pBin19 (Bevan, 1984). Il possède une origine de répllication peu spécifique (Broad Host Range) fonctionnant à la fois dans *E. coli* et dans *A. tumefaciens*, et les séquences bordantes appelées RB et LB qui permettent l'excision du gène

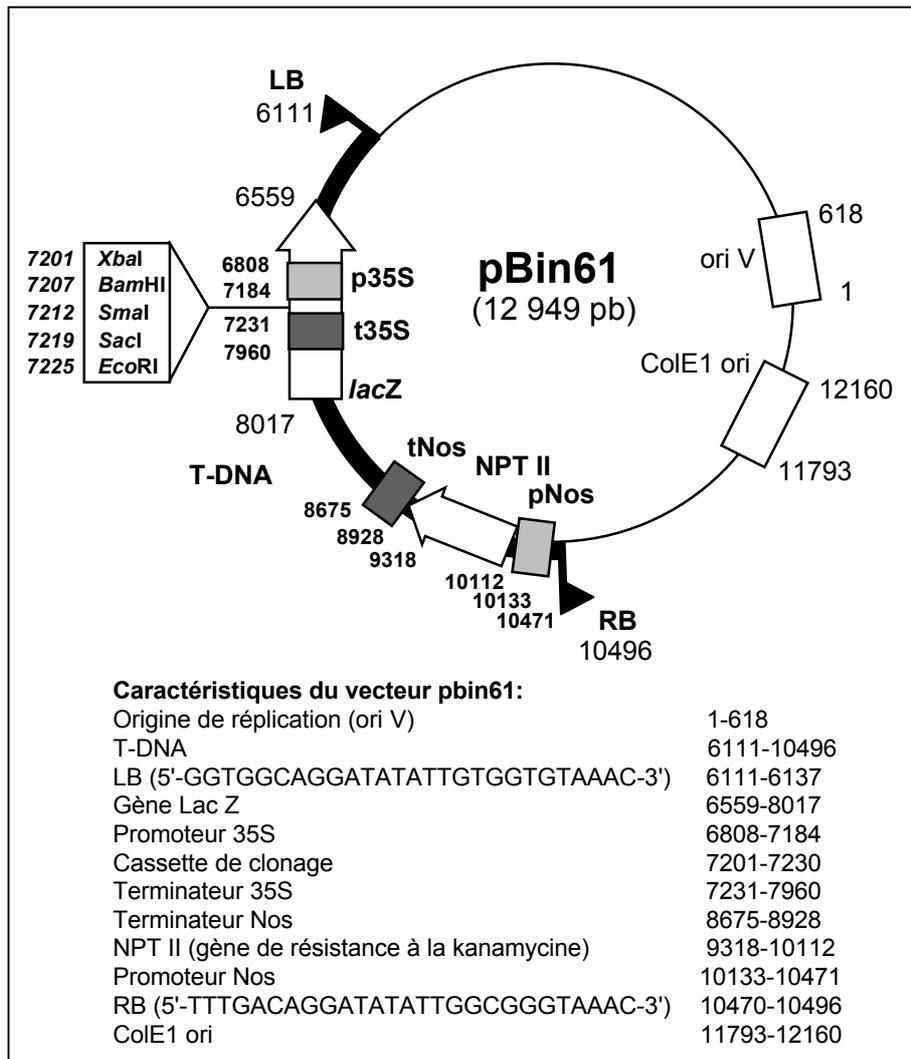


Figure M.M.3 : Représentation schématique du vecteur pBin61 (Voinnet *et al.*, 2000) dérivé du vecteur pBin19 (Bevan, 1984). La position des différents gènes et des sites de restriction de la cassette de clonage est précisée sur la figure. Seule la partie T-DNA représentée par la partie noire entre la bordure gauche (LB) et la bordure droite (RB) est intégrée au génome de la plante lors de l'infection par *Agrobacterium tumefaciens*. La séquence codante de la protéine p25 du BNYVV a été insérée au niveau du site de restriction *Sma*I de la cassette de clonage.

d'intérêt et son intégration dans le génome des cellules végétales (figure **M.M.3**). Entre ces deux bordures se situent le gène de résistance à la kanamycine et une cassette de clonage flanquée du promoteur 35S du CaMV et du terminateur 35S du CaMV.

3. Analyse des ARN

3.1. Extraction et purification d'ARN totaux de plantes

3.1.1. Extraction d'ARN totaux par RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN®)

Parmi les nombreuses méthodes utilisées pour extraire les ARN à partir de racines de betteraves, seul RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN®) permet d'obtenir des ARN suffisamment purs pour être utilisés lors d'expériences de RT-PCR. Les ARN sont purifiés à partir de 100 mg de racines de betteraves selon les recommandations du fournisseur, en incluant une étape d'incubation à la DNase I. Après élution, les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie.

3.1.2. Extraction d'ARN totaux par TRIZOL® Reagent (Invitrogen™) (Chomezynski and Sacchi, 1987)

Les tissus racinaires ou foliaires (50 mg) sont broyés dans 500 µl de TRIZOL® Reagent (thiocyanate de guanidine 0,8 M ; thiocyanate d'ammonium 0,4 M ; acétate de sodium 0,1 M pH 5 ; phénol 38% ; glycérol 5%) jusqu'à complète homogénéisation. Le broyat est centrifugé pendant 10 min à 12000 g pour sédimenter les débris cellulaires, les membranes, l'essentiel des polysaccharides et l'ADN de haut poids moléculaire. La fraction soluble est incubée pendant 5 min à température ambiante pour permettre la dissociation des complexes nucléo-protéiques. Après addition de 200 µl de chloroforme, le mélange est agité vigoureusement à la main et incubé pendant 2 min à température ambiante. Une séparation de phase est effectuée par centrifugation à 4°C pendant 10 min à 12000 g, puis les ARN contenus dans la phase aqueuse sont précipités 10 min à température ambiante par addition d'un volume d'isopropanol, lavés à l'éthanol 70%, séchés, et enfin repris dans 10 à 50 µl d'eau bidistillée stérile puis quantifiés par spectrophotométrie.

3.1.3. Extraction d'ARN totaux par PURESCRIPT RNA Isolation Kit (GENTRA Systems)

Les ARN sont purifiés à partir de 100 mg de racines de betteraves saines ou infectées selon les recommandations du fournisseur. Les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie.

3.1.4. Extraction d'ARN totaux dans le tampon "polysomes" (Jackson and Larkins, 1976)

L'équivalent d'1 cm² de feuille de betterave est broyé au froid dans 200 µl de tampon "polysomes" (Tris-HCl 200 mM pH 9 ; KCl 400 mM ; EGTA 25 mM ; MgCl₂ 35 mM ; saccharose 200 mM). La forte force ionique, le pH alcalin et la présence d'EGTA, un chélateur spécifique des cations divalents, permettent de garder des ARN intacts et en particulier les ARN viraux non encapsidés. Le broyat est immédiatement soumis à une extraction au phénol-Tris, suivie d'une extraction au phénol-Tris/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Les acides nucléiques totaux sont précipités par deux volumes d'éthanol 100%, puis repris dans 200 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,6 pour solubiliser préférentiellement l'ADN et les petits ARN (ARNt et ARNr 5s). Les ARN insolubles sont récupérés par centrifugation, lavés à l'éthanol 70% et repris dans 10 µl d'eau bidistillée stérile.

3.1.5. Purification des ARN messagers par NucleoTrap® mRNA Mini Kit (Macherey-Nagel)

L'utilisation de billes de latex liées de manière covalente à des résidus oligo(dT) permet de retenir les ARN messagers par leur séquence poly(A) située en 3', et ainsi les séparer des ARN ribosomiques et des ARNt présents dans les échantillons d'ARN totaux. Les hybrides A-(dT) formés dans des conditions de fortes concentrations en sels, sont déstabilisés à des concentrations ioniques plus basses, permettant l'élution des ARN poly(A) purifiés. Les quantités d'ARN poly(A) récupérées représentent généralement 1 à 5% des ARN totaux utilisés au départ. Cette purification est principalement menée afin de réduire le bruit de fond lors d'expériences de Northern blot ou Northern inverse.

Les ARN totaux (200 µg) sont mis en suspension dans un volume total de 300 µl d'eau bidistillée puis additionnés de 300 µl de tampon RM0. Après ajout de 30 µl de solution de billes de latex (billes oligo(dT)-latex 50 mg/ml ; Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; NaCl 100 mM ; SDS 0,1% ; NaN₃ 0,05%), le mélange est agité vigoureusement, incubé pendant 5 min à 68°C pour désorganiser les structures secondaires et pendant 10 min à température ambiante pour favoriser la fixation des ARN poly(A) sur les billes. Après une centrifugation pendant 2 min à 11000 g, le surnageant est délicatement éliminé par pipetage. Le culot de billes de latex est ensuite remis en suspension dans 600 µl de tampon RM2, et le mélange déposé sur la colonne

a. Séquences <i>Beta vulgaris</i>	Amorces sens	L (pb) Tm (°C)	Amorces antisens	L (pb) Tm (°C)
PR-2	5'-CACAAATTGGCGTATGTAACGGG-3'	23 64.3	5'-GGGTAATGTTGGCTAACAAAGG-3'	23 60.2
PR-3	5'-GAGTCAAGCATTCTTTGATGGG-3'	22 59.0	5'-CAAGACCATCAAATCCAATCGC-3'	22 61.9
HSC70	5'-TGCTTACTCCTCTTTCTCTGG-3'	22 56.1	5'-CCTTCTCTTGTGCTCCTCATCC-3'	23 62.0
AAP	5'-TTCGGGCTCCAAATATTTGAC-3'	22 61.1	5'-ATAGCCGTCATGCTTATAGACG-3'	22 57.1
GLP	5'-GGATTTCCATTTCAAGGGC-3'	20 58.7	5'-CTGAAATAGGTGGCTCAGTCCCG-3'	23 64.9
G6PDH	5'-CGACTGTACAAAGTGAAGTGG-3'	21 53.1	5'-TAGGAGGAATCCAGATATAGCC-3'	22 55.1
ATPase	5'-GTGATGTACCCAAATCAGCGC-3'	21 60.4	5'-GCAGCAAGGAGAAGTACATGC-3'	21 57.6
ABP1	5'-ACAGGCACTCATGCGAAGAGG-3'	21 62.5	5'-TCATGGGCTAATGATGTCACATTAC-3'	25 60.9
Extensine	5'-GGAAATTTGGGCGAGCATGGCC-3'	22 69.4	5'-CCTGTTTATCCATCTTTGACCTC-3'	23 60.2
Expansine	5'-CACTTTTTATGGTGGCTCTGACG-3'	23 61.6	5'-CGAAAGGAGAGTACTGACCAACC-3'	24 64.1
Ubiquitine	5'-CTTTGTGAAAACCTAACTGGG-3'	22 58.5	5'-GCCATAGTAAAACAGCTTCTGTTC-3'	24 57.7
L11 ribo	5'-TCCGTCTTCGGTATCAGACG-3'	21 62.3	5'-GCTCGAGCACAAACGTAGAAGTCC-3'	23 63.1

b. Séquences Protéine p25 BNYVV	Amorces sens	L (pb) Tm (°C)	Amorces antisens	L (pb) Tm (°C)
ARN3 BNYVV (645 pb)	5'-GGTGATATATTAGGCGCAG-3'	19 50.9	5'-ATCAACACCGTCAGGGGCTTG-3'	21 64.4
ARN3 BNYVV (376 pb)	5'-AGCTGAATTCGCGGATCCTACCAGACTCGACAG-3'	33 78.5	5'-AGCGGTGACCTAATCATCATCAACACCG-3'	32 77.4

c. Séquences <i>Arabidopsis</i>	Amorces sens	L (pb) Tm (°C)	Amorces antisens	L (pb) Tm (°C)
TIR1	5'-TTCATCGGGAAGTCTACGC-3'	20 61.1	5'-TGAGAGACTTGAGATTGGGACACC-3'	24 62.1
NAC1	5'-TCAGATTTACCCGAAGGACG-3'	21 62.3	5'-GGAATACCCTACACAAGACCCAGTC-3'	25 62.4
AIR3	5'-GTCGGAGAGATAACAGAAGATGCC-3'	24 61.4	5'-CCAAATGGAAGAGGAAGGAACG-3'	22 62.7
VSP1	5'-TTTCACTTCTCTTGGTCTTGGGC-3'	23 62.5	5'-CACACGGTTTTGGAGTCGTATTG-3'	23 62.1
Actine	5'-GGCGATGAAGCTCAATCCAAACG-3'	23 67.8	5'-GGTCACGACCAGCAAGATCAAGACG-3'	25 69.0

d. Séquences T-DNA-P25	Amorces sens	L (pb) Tm (°C)	Amorces antisens	L (pb) Tm (°C)
25sens428-449	5'-CGACTGTCTTTTCGTGGTCTGG-3'	22 64.2		
T-DNApp35S			5'-GCCATCGCCCTGATAGACG-3'	19 61.1
T-DNALB			5'-AAGCGTCAATTTGTTTACACCAC-3'	23 59.0

Tableau M.M.1 : (a) Récapitulatif des amorces sens et antisens utilisées pour l'analyse de l'expression de gènes candidats chez *Beta vulgaris* par RT-PCR ou RT-PCR semi-quantitative. (b) Récapitulatif des différentes amorces utilisées pour cibler la séquence codante de la protéine p25 située sur l'ARN 3 du BNYVV. (c) Récapitulatif des amorces sens et antisens utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes chez *Arabidopsis thaliana* par RT-PCR semi-quantitative. (d) Récapitulatif des amorces utilisées pour l'identification par PCRi du site d'insertion du T-DNA dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques exprimant la protéine p25 du BNYVV. Les températures d'hybridation théoriques de chaque amorce (TM) sont estimées grâce au serveur Launch NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>) (PREMIER Biosoft International).

NucleoTrap® microfilter. Après une centrifugation pendant 2 min à 11000 g, l'éluat est éliminé. Les ARN poly(A) fixés aux billes de latex sont retenus sur le filtre de cette colonne qui est rincé deux fois avec du tampon RM3. Finalement, après addition de 60 µl d'eau bidistillée stérile et incubation de la colonne pendant 7 min à 68°C, les ARN poly(A) sont élués par centrifugation pendant 1 min à 11000 g.

3.2. Analyse des ARN par RT-PCR

3.2.1. Transcription inverse des ARNm

Les ARN traités à la DNase et purifiés sont soumis à une transcription inverse pendant une heure à 42°C dans le milieu réactionnel suivant :

1 µg d'ARN totaux ; 1 µl d'amorces oligo(dT)₂₅ (100 µM) ; 5 µl de tampon RT x 5 (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 ; KCl 375 mM ; MgCl₂ 15 mM) ; 2,5 µl de dNTP (10 mM) ; 2,5 µl de DTT (100 mM) ; 0,5 µl d'inhibiteur de ribonucléases (40 U/µl) ; 1 µl de Superscript™ II Reverse Transcriptase de MoMuLV (200 U/µl) (Invitrogen™) ; eau stérile qsp 20 µl.

3.2.2. Amplification des ADNc par PCR

Le milieu réactionnel de synthèse des ADNc est directement utilisé pour effectuer l'amplification par PCR dans le mélange suivant :

1 à 9 µl d'ADNc issu de transcription inverse dilué au dixième ; 2,5 µl d'amorces sens (1 µM) ; 2,5 µl d'amorces antisens (1 µM) ; 2,5 µl de tampon PCR x 10 (Tris HCl 200 mM pH 9 ; KCl 100 mM ; (NH₄)₂SO₄ 100 mM ; MgSO₄ 20 mM ; Triton X-100 Buffer 0,1%) ; 0,75 µl de dNTP (10 mM) ; 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM) ; 1,25 µl de BSA (2 mg/ml) ; 0,5 µl de Taq DNA polymerase recombinante (5 U/µl) (Invitrogen™) ; eau stérile qsp 25 µl.

Ce mélange est soumis à 29 cycles composés d'une étape de dénaturation de 15 s à 94°C, d'une étape d'hybridation des amorces pendant 30 s à 50°C, et d'une étape d'élongation d'1 min à 72°C. Les produits PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

Le tableau **M.M.1** résume les caractéristiques des différentes amorces utilisées pour les analyses effectuées sur betteraves (tableau **M.M.1a** et **M.M.1b**) ou sur *Arabidopsis thaliana* (tableau **M.M.1c**).

3.2.3. Conditions de RT-PCR semi-quantitative

Cette technique consiste à équilibrer les quantités d'ADNc issus de RT (voir §3.2.1.), par dilution différente des échantillons à comparer, de manière à visualiser par PCR (voir

§3.2.2.) une expression constante d'un gène choisi comme référence et d'expression stable et ubiquitaire. Ces échantillons équilibrés servent ensuite à amplifier par PCR des gènes candidats (voir §3.2.2.) et ainsi visualiser et comparer leurs différences d'expression.

Le tableau M.M.1a résume les caractéristiques des différentes amorces utilisées.

3.3. Analyse des ARNm par "differential display reverse transcription PCR" (DDRT-PCR)

Cette technique dont le principe est présenté dans le chapitre I (voir §1.5.1) et résumé sur la figure I.6 repose sur l'analyse de fragments d'amplification obtenus à partir d'ADNc issus des ARN messagers de cellules ou tissus à comparer (Liang *et al.*, 1995).

3.3.1. Transcription inverse des ARNm

Les quatre réactions de transcription inverse sont effectuées chacune en utilisant une des amorces T₁₂VN suivantes, V étant la base dégénérée (A, G ou C):

T₁₂VA : 5'-TTT TTT TTT TTT VA-3'

T₁₂VT : 5'-TTT TTT TTT TTT VT-3'

T₁₂VG : 5'-TTT TTT TTT TTT VG-3'

T₁₂VC : 5'-TTT TTT TTT TTT VC-3'

Les ARN totaux ajustés à une concentration de 0,1 µg/µl sont soumis à une transcription inverse en utilisant le kit "Titan One Tube RT-PCR System™" (Roche Molecular Biochemicals) :

2 µl d'ARN totaux (0,1 µg/µl) ; 2 µl d'amorces T₁₂VN (10 µM) ; 4 µl de tampon RT-PCR x 5 ; 1,6 µl de dNTP (250 µM) ; 2 µl de DTT (100 mM) ; 0,5 µl d'inhibiteur de RNase (25 U/µl) ; 0,5 µl du mélange d'enzymes Roche contenant l'AMV reverse transcriptase ; eau stérile qsp 20 µl.

Les tubes sont placés dans le "thermocycler" programmé comme suit : une étape de dénaturation 5 min à 65°C après laquelle sont ajoutés la reverse transcriptase et l'inhibiteur de RNase, suivie d'une étape d'élongation de 60 min à 37°C, puis une étape de dénaturation de 5 min à 95°C.

3.3.2. Amplification par PCR de l'extrémité 5' des ADNc

Cinq réactions indépendantes de PCR sont réalisées sur chaque transcription inverse, en utilisant pour chacune la même amorce T₁₂VN précédemment utilisée combinée à l'un des décimères suivants :

O1 : 5'-AGCCAGCGAA-3'

O2 : 5'-GACCGCTTGT-3'

O3 : 5'-AGGTGACCGT-3'

O4 : 5'-GGTACTCCAC-3'

O5 : 5'-GTTGCGATCA-3'

Le milieu réactionnel de synthèse des ADNc est directement utilisé pour effectuer l'amplification par PCR en utilisant le kit "Titan One Tube RT-PCR System™" :

2 µl d'ADNc issu de transcription inverse ; 2 µl d'amorces T₁₂VN (10 µM) ; 2 µl de décamères (2 µM) ; 2 µl de tampon PCR x 10 ; 1,6 µl de dNTP (25 µM) ; 1 µl de [α -³³P] dCTP (2500 Ci/mmol) (10 µCi/µl) (Amersham Biosciences) ; 1 µl de Taq Polymerase ; eau stérile qsp 20 µl.

Ce mélange est soumis à 40 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 sec à 94°C, d'une étape d'hybridation des amorces pendant 2 min à 37°C, et d'une étape d'élongation des amorces à 72°C pendant 30 sec.

3.3.3. Séparation des produits PCR sur gel de polyacrylamide dénaturant

Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide 6% (rapport acrylamide-bisacrylamide 19/1) dénaturant (urée 8 M) appelé "gel de séquence".

Le gel est soumis à une pré électrophorèse d'une heure à 60 W. Puis, 3,5 µl de produits PCR sont dénaturés par addition de 2 µl de tampon de charge (formamide 95% ; EDTA 20 mM ; bleu de bromophénol 0,05% ; bleu de xylène cyanol 0,05%), chauffés 5 min à 95°C, et refroidis dans la glace. Les échantillons sont ensuite chargés sur gel et soumis à une électrophorèse effectuée à 60 W dans du tampon TBE x 0,5 (Tris-borate 50 mM ; EDTA 1 mM), jusqu'à ce que le bleu de xylène cyanol atteigne le bas du gel (~3 h). Le gel est séché à 80°C sous vide sur papier Whatman 3MM et les fragments sont visualisés par autoradiographie.

3.3.4. Isolement, réamplification et purification des ADNc d'intérêt

Les bandes d'intérêt sont localisées puis découpées du gel. Les fragments d'ADNc contenus dans le gel sont élués dans 100 µl d'eau bidistillée stérile ou 50 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM) par chauffage de 15 min à 95°C. Après sédimentation des débris de gel et de papier par centrifugation, le surnageant est récupéré et précipité à -80°C pendant 30 min par 4,5 volumes d'éthanol absolu, en présence d'acétate de sodium 300 mM et de 50 µg de glycogène. Après centrifugation et lavage à l'éthanol 70%, le culot est séché et repris dans 10 µl d'eau stérile. L'ADNc est ensuite réamplifié par PCR avec

la même combinaison d'amorces dans des conditions proches de celles présentées précédemment. La réaction PCR est réalisée dans le mélange suivant :

4 µl d'ADNc purifié ; 4 µl d'amorces T₁₂VN (10 µM) ; 4 µl de décamères (2 µM) ; 5 µl de tampon PCR x 10 (Tris-HCl 200 mM pH 8,4 ; KCl 500 mM) (Invitrogen™) ; 4 µl de dNTP (250 µM) ; 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM) ; 2,5 µl de BSA (2 mg/ml) ; 0,1 µl de Taq DNA polymerase recombinante Invitrogen™ (5 U/µl) ; eau stérile qsp 50 µl.

Ce mélange est soumis à 40 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 sec à 94°C, d'une étape d'hybridation des amorces de 2 min à 37°C, et d'une étape d'élongation des amorces de 30 sec à 72°C. Finalement, une étape d'élongation de 5 min à 72°C permet à la polymerase d'ajouter une adénosine aux extrémités 3'-OH facilitant par la suite le clonage dans le vecteur pGEM®-T.

Le milieu réactionnel est ensuite extrait au phénol/chloroforme et l'ADNc est précipité à l'éthanol 100% en présence de chlorure de sodium 200 mM final. Après centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70%, séché, et repris dans 10 µl d'eau stérile.

3.4. Analyse globale des ARNm par "restriction fragment differential display PCR" (RFDD-PCR)

Le principe de cette technique est présenté dans le chapitre I (voir §1.7.) et résumé sur la figure I.8.

3.4.1. Synthèse et préparation des ADNc

3.4.1.1. Transcription inverse des ARNm et synthèse d'ADN double brin

Les ARN totaux extraits par kit RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN®), et traités à la DNase, sont ajustés à une concentration de 0,1 µg/µl, puis les réactions de transcription inverse s'effectuent pendant 2 h à 42°C suivant les instructions du kit displayPROFILE™ Expression Profiling Kit (Qbiogen) à raison de :

10 µl d'ARN totaux (0,1 µg/µl) ; 1,5 µl d'amorces T₂₅V (12,5 µM) ; 2,5 µl de tampon "10 x cDNA Buffer 1" (500 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 800 mM KCl ; 100 mM MgCl₂ ; 40 mM DTT) ; 5 µl de dNTP Mix (5 mM chacun) ; 1 µl de transcriptase inverse "display THERMO-RT (100 U/µl) ; eau stérile qsp 25 µl.

La production d'ADNc double brin est effectuée pendant 2 h à 16°C après ajout de 7,5 µl de tampon "10 x cDNA Buffer 2" (350 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 40 mM MgCl₂ ; 10 mM

(NH₄)₂SO₄ ; 30 mM DTT) ; 2,5 µl de dNTP Mix (5 mM chacun) ; 1,2 µl de DNA polymérase I (10 U/µl) ; 0,8 µl de RNase H (1 U/µl) ; eau stérile qsp 50 µl

Les ADNc double brin sont purifiés par une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique, précipités à l'éthanol, lavés et remis en suspension dans 20 µl d'eau stérile.

3.4.1.2. Fragmentation des ADNc et ligation d'adaptateurs

Les ADNc purifiés sont soumis à une digestion de 2 h à 37°C par l'enzyme de restriction *TaqI* dans le mélange réactionnel suivant :

10 µl d'ADNc purifié ; 2 µl de tampon "10 x displayPROFILE Buffer" (100 mM Tris-acétate pH 7,5 ; 100 mM Magnésium-acétate ; 500 mM Potassium-acétate) ; 0,5 µl d'enzyme *TaqI* (10 U/µl) ; eau stérile qsp 20 µl.

La ligation des adaptateurs se fait pendant 3 h à 37°C en ajoutant le mélange suivant à chaque échantillon :

0,75 µl de tampon "10 x displayPROFILE Buffer" ; 0,75 µl de "Adaptor mix" (15 µM) ; 1,25 µl d'ATP (10 mM) ; 0,30 µl de T4 DNA ligase (1 U/µl) ; eau stérile qsp 7,5 µl.

La ligation des deux adaptateurs contenus dans l'échantillon "Adaptor mix" est aléatoire. Ces adaptateurs correspondent à un "adaptateur standard" (5'-GCGATGAGTCCTGAC-3' - brin sens et 5'-CGGTCAGGACTCAT-3' - brin antisens) et à un "adaptateur EP" (5'-ACTGGTCTCGTAGACTGCGTACC-3' - brin sens et 5'-PO₄-CGGGTACGCAGTddC-3' - brin antisens). La présence du didésoxynucléotide ddC à l'extrémité 3' du brin inférieur, appelé epg (Extension Protection group), empêche l'élongation complète du premier brin d'ADN néosynthétisé lors de la première étape PCR. Ainsi, l'amplification par PCR des fragments d'ADNc n'est possible que si ces derniers possèdent à leur extrémité un adaptateur standard et un adaptateur EP.

3.4.2. Préparation des amorces radiomarquées par phosphorylation de l'extrémité 5'

Le marquage radioactif de l'amorce "0-extension Primer" est réalisé pendant 30 min à 37°C grâce à la T4 polynucléotide kinase qui catalyse le transfert du phosphate [γ -³³P] de la molécule d'ATP radioactive sur l'extrémité 5'-OH de l'amorce. La phosphorylation est effectuée sur une quantité d'amorce "0-extension Primer" suffisante pour réaliser par la suite 18 à 20 réactions PCR à la fois. La réaction se déroule pendant 30 min à 37°C dans les conditions suivantes :

2 µl de tampon "10 x displayPROFILE Buffer" ; 8 µl de "0-extension Primer" (10 µM) ; 10 µl de [γ -³³P]-ATP (3000 Ci/mmol ; 10 mCi/ml) (Perkin Elmer) ; 0,4 µl de T4 polynucléotide kinase (5 U/µl).

L'amorce radiomarquée est directement utilisée dans la réaction d'amplification par PCR.

3.4.3. Amplification des ADNc par PCR radioactive sélective

L'amplification sélective et aléatoire d'un sous-groupe d'ADNc est menée en présence d'amorces radiomarquées "0-extension Primer" spécifiques des adaptateurs EP et d'amorces "displayPROBE" spécifiques des adaptateurs standards possédant 3 nucléotides supplémentaires reconnaissant sur la séquence d'ADNc les 3 bases adjacentes au site *Taq I*.

Le milieu réactionnel de ligation des ADNc avec les adaptateurs est directement utilisé pour effectuer l'amplification par PCR dans le mélange suivant :

0,2 µl d'ADNc issus de ligation ; 1 µl d'amorces radiomarquées "0-extension Primer" (4 µM) ; 4 µl d'amorces "displayPROBE" (1 µM) ; 2 µl de tampon display TAQ FL 10 x Reaction Buffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 500 mM KCl ; 15 mM MgCl₂) ; 0,8 µl de dNTP Mix (5 mM chacun) ; 0,3 µl de displayTAQ FL Polymerase ; eau stérile qsp 20 µl.

Ce mélange est soumis à une dénaturation pendant 1 min à 94°C, puis à 10 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 sec à 94°C, d'une étape d'hybridation des amorces de 30 sec à 60°C avec décroissance de 0,5°C à chaque cycle jusqu'à 55°C, et d'une étape d'élongation des amorces d'1 min à 72°C. Le mélange est ensuite soumis à 25 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 sec à 94°C, d'une étape d'hybridation de 30 sec à 55°C, et d'une étape d'élongation d'1 min à 72°C.

3.4.4. Séparation des produits PCR sur gel de polyacrylamide dénaturant

Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide 6% dénaturant comme décrit précédemment (voir §3.3.3)

3.4.5. Isolement, réamplification et purification des ADNc d'intérêt

Les bandes d'intérêt sont localisées puis découpées du gel. Les fragments d'ADNc contenus dans le gel sont purifiés comme décrit précédemment (voir §3.3.4) et réamplifiés dans les conditions suivantes :

5 µl de surnageant avec l'ADNc ; 0,8 µl d'amorces "0-extension Primer" non radiomarquées (10 µM) ; 8 µl d'amorces "displayPROBE" (1 µM) ; 4 µl de tampon display TAQ FL

10 x Reaction Buffer (100 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 500 mM KCl ; 15 mM MgCl₂) ; 1,6 µl de dNTP Mix (5 mM chacun) ; 0,6 µl de displayTAQ FL Polymerase ; eau stérile qsp 40 µl.

Le mélange est soumis à 30 cycles composés d'une étape de dénaturation de 30 sec à 94°C, d'une étape d'hybridation de 30 sec à 55°C, et d'une étape d'élongation d'une min à 72°C. Finalement, une étape d'élongation de 5 min à 72°C permet à la polymérase d'ajouter une adénosine aux extrémités 3'-OH facilitant ainsi le clonage dans le vecteur pGEM®-T.

Après extraction phénolique et précipitation, les produits PCR sont repris dans 10 µl d'eau stérile. La taille des fragments et la quantité d'ADN sont estimées en analysant 1/10^e des produits PCR par électrophorèse en gel d'agarose 1,5%.

3.5. Clonage et séquençage des ADNc d'intérêt

3.5.1. Phosphorylation des produits PCR

La phosphorylation est réalisée pendant 1 h à 37°C grâce à la T4 polynucléotide kinase qui catalyse le transfert du phosphate γ de l'ATP sur l'extrémité 5'-OH d'une molécule d'ADN. Les 9 µl de produits PCR restants sont phosphorylés dans un volume de 20 µl, en présence d'ATP 2 mM, de tampon PNK A x 1 (Tris-HCl 70 mM pH 7,6 ; MgCl₂ 10 mM ; DTT 5 mM), et de 10 U de T4 polynucléotide kinase. Après purification, l'ADN est repris dans 10 µl d'eau stérile.

3.5.2. Purification d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose LMP

Les produits PCR sont purifiés après électrophorèse en gel d'agarose LMP ("Low Melting Point)" 2%. La migration s'effectue à 50 V dans du tampon TBE x 0,5, puis le gel est coloré au BET (0,5 µg/ml). Les bandes identifiées sous UV sont découpées à l'aide d'un scalpel et chauffées pendant 10 min à 70°C dans 400 µl de tampon LMP (Tris-HCl 200 mM pH 8 ; EDTA 1 mM). L'ADN est purifié à chaud par une extraction phénolique (phénol-Tris), puis une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique suivie d'une précipitation à l'éthanol effectuée en présence de 200 mM de NaCl, 5 µg de glycogène et de 2 volumes d'éthanol 100%. L'ADN est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 5 µl d'eau stérile.

3.5.3. Ligation des ADNc dans le vecteur pGEM®-T

Les fragments d'ADN purifiés sont insérés dans le vecteur pGEM®-T en utilisant le kit basé sur le système de clonage T/A (Promega).

La réaction de ligation est effectuée pendant 1 h à température ambiante :

2 µl de produits PCR ; 1 µl de vecteur pGEM®-T (50 ng) ; 5 µl de tampon x 2 (Tris-HCl 60 mM pH 7,8 ; MgCl₂ 20 mM ; DTT 20 mM ; ATP 2 mM ; PEG 10%) ; 1 µl d'ADN ligase du bactériophage T4 (3 Unité Weiss) ; eau stérile qsp 10 µl.

L'enzyme est ensuite éliminée par une extraction au phénol/chloroforme. Les produits de ligation sont précipités à l'éthanol 100% et repris dans 10 µl d'eau stérile.

3.5.4. Transformation bactérienne par la technique d'électroporation

1 µl de produit de ligation est mis en présence de 30 µl de bactéries XL1 Blue compétentes, puis l'ensemble est transféré dans une cuve à électrodes espacées de 2 mm et soumis à une impulsion électrique d'une capacité de 25 µF, de résistance 200 Ω sous une tension de 2,5 kV/cm. Les bactéries peuvent être incubées pendant 30 min à 37°C dans 1 ml de milieu LB pour permettre la régénération de leur paroi et l'expression de leur gène de résistance. Elles sont ensuite étalées sur milieu sélectif en présence d'IPTG et X-Gal afin de visualiser les clones recombinants, après une incubation d'une nuit à 37°C.

3.5.5. Préparation d'ADN plasmidique (mini-préparation)

Les colonies bactériennes sont cultivées pendant 12 h à 37°C dans 2 ml de milieu sélectif LB liquide. Les bactéries sont sédimentées puis l'ADN plasmidique est obtenu par "mini-préparation" selon la technique de la lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989).

L'ADN plasmidique est ensuite analysé par digestion enzymatique grâce à l'endonucléase de restriction *PvuII* qui reconnaît spécifiquement deux sites encadrant l'insert sur le vecteur pGEM®-T. La digestion enzymatique est réalisée pendant 1 h à 37°C :

2 µl d'ADN plasmidique (0,15 µg/µl) ; 1 µl de tampon "REACT 6" x 10 (Invitrogen™ Life Technologies®) (Tris-HCl 500 mM pH 7,4 ; MgCl₂ 60 mM ; NaCl 500 mM ; KCl 500 mM) ; 0,5 µl de BSA (2 mg/ml) ; 0,2 µl d'enzyme *PvuII* (10 U/µl) ; eau stérile qsp 10 µl.

La totalité du milieu de digestion est analysée par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

3.5.6. Analyse de l'ADN plasmidique par séquençage automatique

L'analyse par séquençage d'ADN est basée sur la méthode de synthèse interrompue (Sanger *et al.*, 1977), méthode qui a été modifiée pour la Taq DNA polymerase (Murray, 1989) et adaptée à l'utilisation de didésoxynucléotides terminateurs de chaînes (ddNTP) couplés à des fluorochromes différents (Smith *et al.*, 1986).

3.5.7. Analyses bioinformatiques

Les analyses de séquences nucléotidiques et protéiques sont réalisées à l'aide d'approches algorithmiques complémentaires, BLASTX, TBLASTN ou TBLASTX (Altschul *et al.*, 1997), du programme "Translating BLAST" disponible sur le serveur du NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Les alignements de séquence sont jugés significatifs et validés avec un "e-value" inférieur à 0,001.

Les séquences EST de betterave (*Beta vulgaris*) sont obtenues grâce aux banques de données disponibles sur le serveur GABI (<http://gabi.rzpd.de/>).

Les acquisitions d'images ont été effectuées par PhosphorImager BAS1000 System (FUJI) et les signaux quantifiés par le logiciel MacBAS Software, ou encore par ChemiDoc™ XRS System (Biorad) en utilisant le logiciel Quantity One® Software. Le logiciel ImageJ (v 1.32J ; URL au 01/09/2005 : <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) a également été utilisé pour la quantification de signaux.

3.6. Analyse des ARN par Northern blot

3.6.1. Séparation des ARN sur gel d'agarose dénaturant et transfert sur membrane

Les ARN totaux, en suspension dans le tampon de charge et de dénaturation, à raison de 4 volumes de tampon pour 1 volume d'ARN (HEPES-KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM ; formamide 50% ; formaldéhyde 6% ; bleu de bromophénol 0,005% ; BET 0,001%), sont chauffés à 65°C pendant 5 min, refroidis dans la glace puis déposés sur gel dénaturant (agarose 1% ; HEPES-KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM ; formaldéhyde 6%). Ils sont séparés par électrophorèse réalisée à 100 V dans du tampon HEPES (HEPES-KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM). Les ARN totaux renferment des ARN ribosomiques 18S et 28S qui, grâce au BET présent dans les échantillons, peuvent être visualisés sous UV et permettent ainsi d'estimer les quantités d'ARN déposées, avant et après le transfert sur membrane.

Les ARN sont transférés par capillarité sur une membrane de nitrocellulose (BA 85 0,45 µm) (Schleicher et Schuell) préalablement hydratée puis équilibrée pendant 1 h dans du tampon SSC x 20 (NaCl 3 M ; citrate de sodium 300 mM) ou une membrane de nylon Hybond™-NX (Amersham Biosciences). Après transfert salin dans du tampon SSC x 20 durant toute la nuit, les ARN sont fixés par irradiation aux UV (254 nm, 120 microjoules/cm²) dans un appareil Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene).

3.6.2. Synthèse des sondes ribonucléiques

Les sondes ARN antisens sont obtenues par transcription en présence de [α - 32 P] rUTP. La transcription est réalisée selon un protocole similaire à celui décrit dans le §1.2.1.1 dans les conditions suivantes :

1 μ l d'ADN linéarisé (1 mg/ml) ; 2,5 μ l de tampon x 10 (Tris-HCl 400 mM pH 8 ; MgCl₂ 100 mM ; DTT 100 mM ; NaCl 100 mM ; spermidine 40 mM) ; 1,25 μ l d'un mélange rA/rC/rGTP (12,5 mM) ; 1,25 μ l de rUTP (0,5 mM) ; 2 à 4 μ l de [α - 32 P] rUTP (3000 Ci/mmol ; 10 μ Ci/ μ l) (Amersham Biosciences) ; 1 μ l de BSA (2 mg/ml) ; 0,5 μ l d'inhibiteur de RNase (40 U/ μ l) ; 1 μ l de RNA polymérase (50 U/ μ l) ; eau stérile qsp 25 μ l.

Après une heure d'incubation à 37°C, l'ADN matrice est éliminé par addition de la DNase RQ 1 (1 U) dépourvue de RNases (Promega) pendant 30 min à température ambiante. Après extraction au phénol/chloroforme, précipitation à l'éthanol en présence d'acétate d'ammonium 2 M final et centrifugation, le culot est repris dans 50 μ l d'eau stérile.

3.6.3. Visualisation des ARN viraux par hybridation moléculaire

Pour neutraliser les sites d'adsorption aspécifique et limiter le bruit de fond, la membrane de nitrocellulose est incubée 1 h à 60°C dans 10 ml de tampon de préhybridation (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM pH 6,5 ; formamide 50% ; SSC x 5 ; solution Denhardt x 8 [BSA 0,1% ; polyvinylpyrrolidone 0,1% ; ficoll 0,1%] ; SDS 0,1% ; ADN de sperme de hareng 250 μ g/ml ; ARN de levures 500 μ g/ml) sous agitation dans un four à hybrider. Les sondes radioactives ribonucléiques sont ajoutées (2.10⁶ cpm) au milieu de préhybridation. Après une nuit d'incubation à 55°C, l'excès de sonde et les hybridations aspécifiques sont éliminés par trois lavages de 15 min à 65°C en SSC x 2 SDS 0,1% puis deux lavages de 15 min à 65°C en SSC x 0,2 SDS 0,1%. La membrane est séchée et les hydrides sont visualisés par autoradiographie ou par PhosphorImager (FUJI BAS1000).

3.6.4. Visualisation des ARNm par hybridation moléculaire

La membrane de nylon est préhybridée pendant 1 h à 65°C dans 14 ml de tampon commercial PerfectHybTM Plus (Sigma-Aldrich). La sonde radioactive ADN synthétisée par kit Prime-a-gene[®] Labeling Systeme (Promega) (voir §3.8.2.), dénaturée pendant 5 min à 95°C et refroidie immédiatement est ajoutée au milieu de préhybridation. Après une nuit à 65°C, la membrane est lavée trois fois 15 min à 65°C en SSC x 2 SDS 0,1% puis deux fois 15 min à 65°C en SSC x 0,2 SDS 0,1%. La membrane est séchée et révélée par autoradiographie.

3.7. Analyse de l'expression de séquences d'intérêt par Northern inverse

3.7.1. Migration des produits PCR sur gel d'agarose et transfert sur membrane

Chaque séquence d'intérêt est amplifiée par PCR, en utilisant comme matrice l'ADN plasmidique du clone bactérien originel, avec les amorces spécifiques des séquences SP6 et T7 situées de part et d'autre de l'insert sur le plasmide pGEM®-T. L'amplification par PCR se déroule dans les conditions décrites précédemment (voir §3.2.2.). L'ADNc obtenu est ensuite purifié par extraction phénolique et précipitation, puis repris dans 15 µl d'eau stérile.

La totalité des produits PCR purifiés est d'abord additionnée de 3 µl de tampon de charge (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; EDTA 100 mM ; LMP agarose 0,04% ; glycérol 10% ; bleu de bromophénol 0,05%), puis 8 µl sont déposés deux fois, chaque dépôt s'effectuant sur une moitié d'un gel d'agarose 2% préparé dans du tampon TBE x 0,5. Après électrophorèse, la coloration du gel au BET permet de visualiser et quantifier les fragments d'ADN obtenus. Le gel est ensuite incubé deux fois 15 min dans une solution de dénaturation (NaCl 1,5 M ; NaOH 0,5 M) puis deux fois 10 min dans une solution de neutralisation (Tris-HCl 0,5 M pH 7 et NaCl 3 M) et enfin 20 min dans du SSC x 20 (NaCl 3 M et Citrate triNa 0,3 M).

Les fragments d'ADN sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane de nylon Hybond™-NX (Amersham Biosciences) dans du tampon SSC x 20 pendant une nuit. Après transfert, l'ADN est fixé sur la membrane par irradiation aux UV (254 nm, 120 microjoules/cm²) dans un appareil Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene).

3.7.2. Préparation des ADNc radiomarqués

Chaque sonde correspond à un ensemble de séquences ADNc radiomarquées synthétisées à partir des ARN totaux issus des échantillons à comparer.

Les ARN totaux, traités à la DNase et purifiés, sont d'abord ajustés à une concentration de 5 µg/µl, puis les réactions de transcription inverse sont menées dans le milieu suivant : 1 µl d'ARN (5 µg/µl) ; 2,5 µl d'amorces oligo(dT)₂₅ (12,5 µM) ; 6 µl de tampon RT x 5 (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 ; KCl 375 mM ; MgCl₂ 15 mM) ; 3 µl d'un mélange dATP, dGTP, dTTP (10 mM) ; 1 µl de dCTP (1 µM) ; 5 µl de [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol ; 10 mCi/ml) ; 2 µl de DTT (100 mM) ; 2 µl d'inhibiteur de RNase (25 U/µl) ; 1 µl de Superscript™ II Reverse Transcriptase de MoMuLV (200 U/µl) (Invitrogen™) ; eau stérile qsp 30 µl.

Les tubes sont placés dans le "thermocycler" programmé comme suit : une étape de dénaturation 5 min à 65°C après laquelle sont ajoutés la reverse transcriptase et l'inhibiteur de

RNase, suivie d'une étape d'élongation pendant 60 min à 42°C, puis une étape de dénaturation 5 min à 95°C.

3.7.3. Révélation des différences d'expression par hybridation moléculaire

La membrane est préhybridée 30 min à 60°C (solution Denhardt x 8 [BSA 0,1% ; polyvinylpyrrolidone 0,1% ; ficoll 0,1%] ; SSC x 6 ; SDS 2%). La sonde dénaturée 5 min à 95°C et immédiatement refroidie est ajoutée au milieu de préhybridation qui est incubé une nuit à 60°C. La sonde en excès est éliminée par deux lavages successifs de 15 min en SSC x 2 SDS 0,1% à 60°C suivie de deux lavages de 15 min en SSC x 0,2 SDS 0,1% à 60°C. La membrane est séchée et révélée par autoradiographie.

3.8. Analyse des siRNA et miRNA (Hamilton and Baulcombe, 1999)

Cette technique est utilisée pour visualiser les ARN de 21 à 23 nucléotides appelés siRNA générés lors du phénomène de PTGS. Cette méthode permet également de visualiser les miRNA.

3.8.1. Séparation des ARN sur gel de polyacrylamide dénaturant et transfert sur membrane

Les ARN totaux extraits par PURESCRIPT RNA Isolation Kit (GENTRA Systems) sont d'abord ajustés à une concentration de 1 µg/µl. Puis 20 µg d'ARN sont mis en suspension dans 5 µl de tampon de charge x 4 (Tris-HCl 50 mM pH 7,7 ; EDTA 5 mM ; glycérol 50% ; bleu de bromophénol 0,03%), chauffés à 95°C pendant 5 min, et refroidis dans la glace pendant 10 min avant d'être déposés sur gel.

Ces ARN sont séparés sur gel de polyacrylamide 17,5% (rapport acrylamide-bisacrylamide 19/1 ; urée 7 M ; TBE x 0,5) préalablement soumis à une pré électrophorèse de 30 min à 80 V en tampon TBE x 0,5.

Les ARN sont électrotransférés à 80 V sur une membrane HybondTM-NX (Amersham Biosciences) en système Mini-Protean/Trans-Blot (Biorad) pendant 1h à 4°C en tampon TBE x 0,5. La membrane est équilibrée en SSC x 2 pendant 15 min sur papier Whatmann 3MM puis les ARN sont fixés par irradiation aux UV (254 nm, 120 microjoules/cm²) dans un appareil Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene).

3.8.2. Préparation d'une sonde ADN spécifique des siRNA

La sonde radiomarquée est synthétisée à partir d'une séquence amplifiée par PCR et spécifique du gène ciblé par PTGS.

25 ng d'ADN sont dénaturés par une incubation de 2 min à 100°C suivie immédiatement d'une incubation dans la glace, pour être ensuite additionnés au milieu de synthèse Prime-a-gene® Labeling System (Promega) suivant :

10 µl de Tampon x 5 (Tris-HCl 250 mM pH 8 ; MgCl₂ 25 mM ; DTT 10 mM ; HEPES 1 M pH 6.6 ; random hexadeoxyribonucleotides) ; 2 µl d'un mélange dATP, dGTP, dTTP (500 µM) ; 2 µl de BSA, 5 µl de [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol ; 10 mCi/ml) ; 1 µl de DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (5 U/µl) ; eau stérile qsp 50 µl.

Le milieu de synthèse est incubé 1 h à température ambiante, puis la réaction arrêtée en chauffant 5 min à 100°C. La sonde est ensuite purifiée sur colonne Microcon® YM-30 (Millipore) et remise en suspension dans 200 µl de TE.

3.8.3. Préparation d'une sonde ADN spécifique des miRNA

La sonde spécifique d'un miRNA correspond à une amorce de séquence identique radiomarquée en 5' lors d'une réaction de phosphorylation effectuée pendant 1 h à 37°C selon le protocole suivant :

2 µl d'amorces (10 µM), 2 µl de tampon PNK A x 10 (Tris-HCl 700 mM pH 7,6 ; MgCl₂ 100 mM ; DTT 50 mM) ; 5 µl de [γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mmol ; 10 mCi/ml) ; 10 U de T4 polynucléotide kinase ; eau stérile qsp 20 µl.

L'amorce radiomarquée est additionnée de 40 µl d'eau stérile et purifiée sur colonne Microspin™ G-25 (Amersham Biosciences).

3.8.4. Détection de siRNA ou miRNA par hybridation moléculaire

La membrane est préhybridée à 42°C pendant 1 h dans 14 ml de tampon commercial PerfectHyb™ Plus (Sigma-Aldrich) puis la sonde dénaturée pendant 5 min à 100°C et refroidie immédiatement est ajoutée au milieu de préhybridation. Après une nuit à 42°C, la membrane est lavée deux fois 20 min à 50°C en SSC x 2 SDS 2% puis 20 min à 50°C en SSC x 1 SDS 1%. La membrane est séchée et révélée par autoradiographie.

4. Analyse de l'ADN génomique

4.1. Extraction d'ADN génomique de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

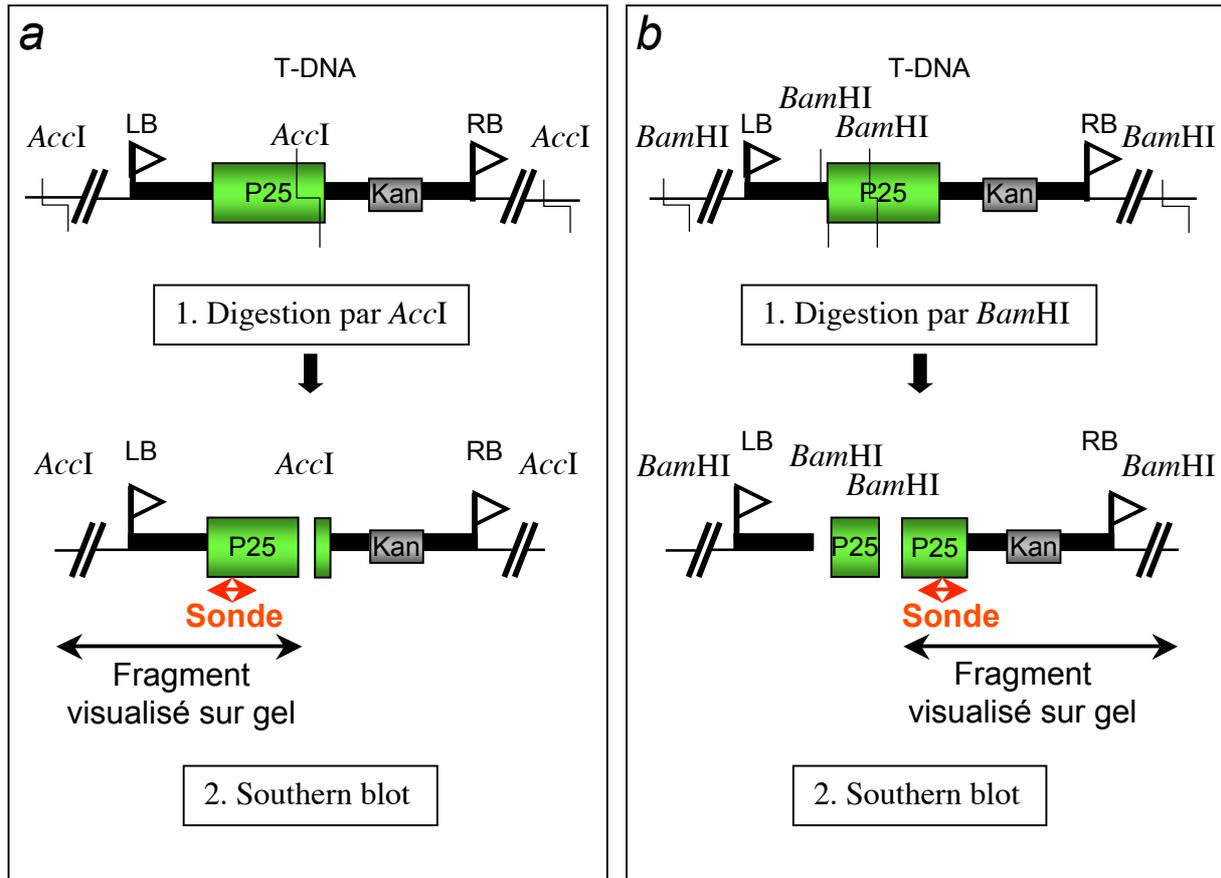


Figure M.M.4 : Principe des deux expériences de Southern blot réalisées sur l'ADN génomique de plantes transgéniques *Arabidopsis thaliana* exprimant la protéine p25 du BNYVV. (a) Description de la première expérience réalisée après digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction *AccI* qui ne coupe qu'une seule fois au niveau du T-DNA. Le fragment de restriction comportant la bordure gauche LB du T-DNA est révélé par hybridation moléculaire en utilisant une sonde spécifique de la partie 5' terminale de la séquence codante de la protéine p25. (b) Description de la seconde expérience réalisée après digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction *BamHI* qui coupe deux fois au niveau du T-DNA. Le fragment de restriction comportant la bordure droite RB du T-DNA est révélé par hybridation moléculaire en utilisant une sonde spécifique de la partie 3' terminale de la séquence codante de la protéine p25. La partie noire entre la bordure gauche LB et la bordure droite RB représente le T-DNA. Le rectangle vert représente la séquence du transgène codant pour la protéine p25 du BNYVV et le rectangle gris représente la séquence codante du gène de résistance à la kanamycine.

Des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (500 mg) sont réduits en fine poudre dans l'azote liquide, broyées et homogénéisées dans deux fois 700 μ l de tampon d'extraction (Tris-HCl 200 mM pH 7,5 ; NaCl 250 mM ; SDS 0,5% ; 25 mM EDTA pH 8). Le mélange est directement purifié par une extraction au phénol-Tris/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) permettant d'éliminer la majeure partie des protéines. Les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse sont ensuite précipités par addition d'un volume d'isopropanol en présence de 300 mM d'acétate de sodium et incubés pendant 10 min à température ambiante. Après une centrifugation à 4°C de 10 min à 15 000 g, le culot est lavé avec 800 μ l d'éthanol 70%, séché, puis repris dans 50 μ l de TE-RNase (Tris 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM ; RNase 10 μ g/ml). Les échantillons sont incubés pendant 10 min à 37°C, ce qui facilite la solubilisation de l'ADN génomique, mais aussi favorise la dégradation des ARN par la RNase. La concentration en ADN est estimée par spectrophotométrie et ajustée à 3 μ g/ μ l.

4.2. Analyse de l'ADN génomique par Southern blot (Southern, 1975)

Pour déterminer le nombre de copies du T-DNA contenant la séquence codante de la protéine p25 du BNYVV (transgène) dans les lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*, nous avons mené deux expériences indépendantes de Southern blot utilisant des enzymes de restriction différentes (*AccI* ou *BamHI*) et des sondes radiomarquées différentes (partie 5' terminale ou 3' terminale de la séquence codante de la protéine p25 (figure M.M.4).

4.2.1. Digestion de l'ADN génomique et purification

L'ADN génomique (15 μ g) est digéré une nuit à 37°C dans le mélange suivant : 5 μ l d'ADN (3 μ g/ μ l), 2 μ l d'une enzyme de restriction (10 U/ μ l) (Fermentas) et 10 μ l de tampon x 10 spécifique de l'enzyme utilisée (Fermentas) dans un volume final de 200 μ l. Dans notre cas, la digestion se fait soit avec l'enzyme *AccI* en association avec le tampon B (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 ; MgCl₂ 100 mM ; BSA 1 mg/ml) soit avec l'enzyme *BamHI* en association avec le tampon Y (Tango™) (Tris-acétate 330 mM pH 7,5 ; MgCl₂ 100 mM ; BSA 1 mg/ml).

Les produits de digestion sont purifiés au phénol/chloroforme/alcool isoamylique, précipités à l'éthanol, séchés et remis en suspension dans 10 μ l d'eau stérile.

4.2.2. Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose et transfert sur membrane

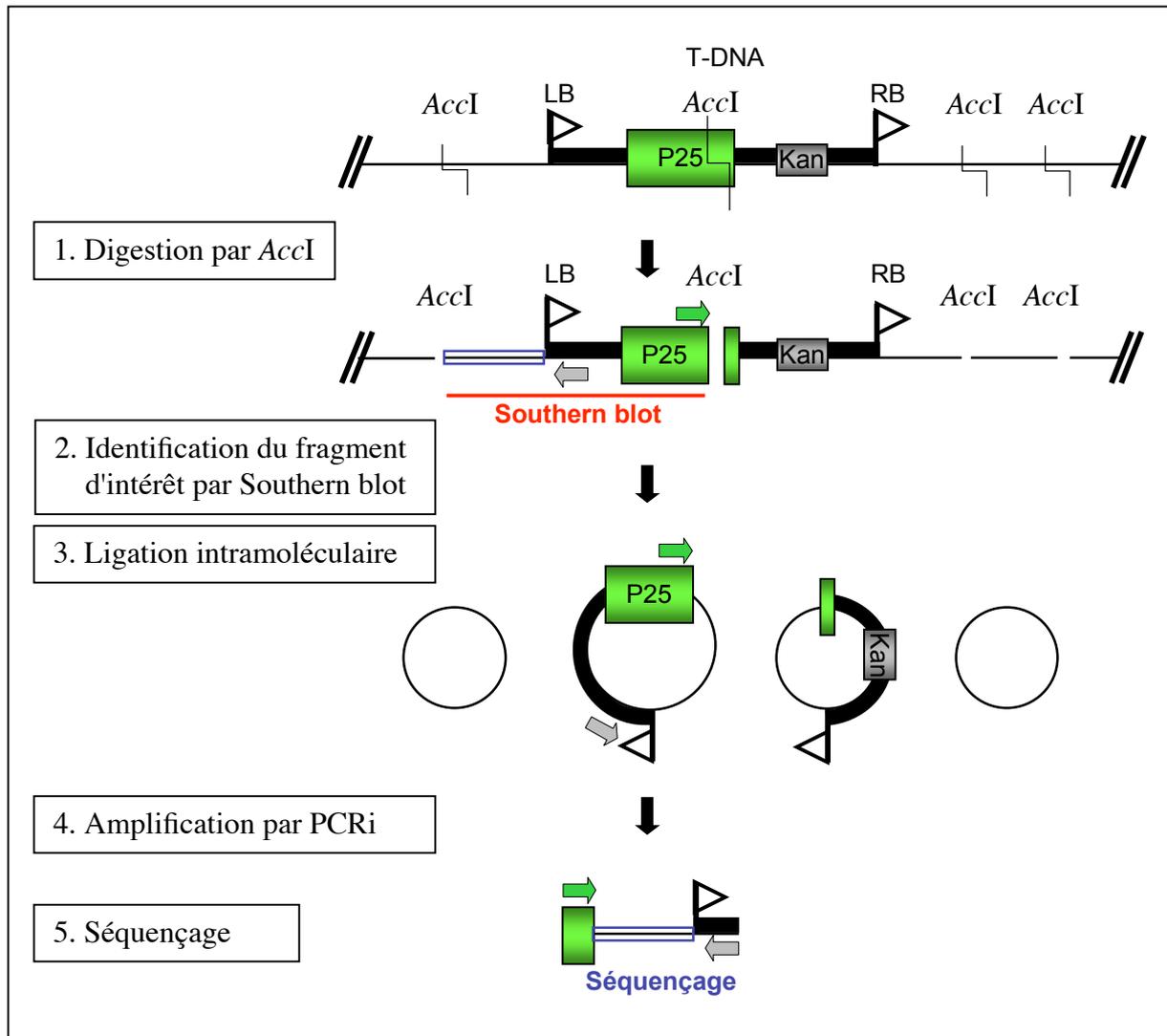


Figure M.M.5 : Principe de la caractérisation du site d'insertion du T-DNA au niveau du génome de plantes transgéniques *Arabidopsis thaliana* exprimant la protéine p25 du BNYVV. Après digestion de l'ADN génomique par une enzyme de restriction qui ne coupe qu'une seule fois au niveau du T-DNA (ici l'enzyme *AccI*), le fragment de restriction comportant la bordure gauche LB du T-DNA est révélé par Southern blot pour estimer sa taille. L'ADN génomique digéré est soumis à une ligation intramoléculaire et le fragment de restriction d'intérêt est ensuite amplifié par PCRi (PCR inverse) à l'aide d'amorces en orientation inverse. Après visualisation et purification sur gel du fragment d'intérêt, la séquence directement en amont de la bordure gauche LB est caractérisée par séquençage et localisée sur le génome grâce aux banques de données (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>). La partie noire entre la bordure gauche LB et la bordure droite RB représente le T-DNA. Le rectangle vert représente la séquence du transgène codant pour la protéine p25 du BNYVV et le rectangle gris représente la séquence codante du gène de résistance à la kanamycine.

La totalité des produits de digestion en solution dans le tampon de charge est déposée sur gel d'agarose 1% préparé dans du tampon TBE x 0,5. Après 10 h d'électrophorèse à 50 V dans du TBE x 0,5, le gel est coloré au BET (0,5 µg/ml) et les fragments d'ADN sont visualisés sous UV. Le gel est ensuite incubé dans une solution de dépurination (0,25 N HCl) pendant 20 min, puis dans une solution de dénaturation (NaCl 1,5 M ; NaOH 0,5 M) pendant 20 min et dans une solution de neutralisation (Tris-HCl 0,5 M pH 7 et NaCl 1,5 M) pendant 20 min et enfin dans du SSC x 20 (NaCl 3 M et Citrate triNa 0,3 M) pendant 10 min.

Les fragments d'ADN sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane de nylon HybondTM-NX (Amersham Biosciences) dans du tampon SSC x 20 pendant une nuit. Après transfert, l'ADN est fixé sur la membrane par irradiation aux UV (254 nm, 120 microjoules/cm²) dans un appareil Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene).

4.2.3. Détection de fragments ADN par hybridation moléculaire

La membrane est préhybridée pendant 1 h à 65°C dans 14 ml de tampon commercial PerfectHybTM Plus (Sigma-Aldrich). La sonde radioactive ADN synthétisée par kit Prime-a-gene® Labeling System (Promega) (voir §3.8.2.), dénaturée pendant 5 min à 95°C et refroidie immédiatement est ajoutée au milieu de préhybridation. Après une nuit à 65°C, la membrane est lavée trois fois 15 min à 65°C en SSC x 2 SDS 0,1% puis deux fois 15 min à 65°C en SSC x 0,2 SDS 0,1%. La membrane est séchée et révélée par autoradiographie.

4.3. Caractérisation du site d'insertion du T-DNA dans les lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*

Pour déterminer le site d'insertion du T-DNA contenant la séquence codante de la protéine p25 du BNYVV, nous avons choisi d'utiliser l'enzyme de restriction *AccI* (figure **M.M.5**). Un seul site de restriction *AccI* est présent au sein du T-DNA, et plus particulièrement sur la séquence codante de la protéine p25. La digestion totale de l'ADN génomique par l'enzyme *AccI* produit des fragments de restriction qui sont ensuite circularisés par ligation intramoléculaire. Une réaction PCR effectuée à l'aide d'amorces en orientation inverse, l'une complémentaire à une séquence située en amont du site *AccI* sur la séquence codante de la protéine p25, l'autre complémentaire à la séquence du promoteur 35S du CaMV ou complémentaire à la séquence de la bordure gauche LB du T-DNA, permet d'amplifier le fragment d'ADN d'intérêt situé en amont du site d'insertion. Ce fragment, dont la taille est préalablement estimée par Southern blot, est visualisé et purifié sur gel, puis séquencé.

4.3.1. Digestion de l'ADN génomique et purification

L'ADN génomique est digéré par l'enzyme de restriction *AccI* dans les conditions identiques à celles décrites précédemment (voir §4.2.1.).

4.3.2. Ligation intramoléculaire des fragments de restriction

Les fragments d'ADN purifiés et ajustés à une concentration de 1 µg/µl sont soumis à une réaction de ligation dans les conditions suivantes favorisant la ligation intramoléculaire : 2 µl d'ADNg digéré (1 µg/µl) ; 100 µl de 10 x Ligation Buffer (Tris-HCl 400 mM pH 7,8 ; MgCl₂ 100 mM ; DTT 100 mM ; ATP 5 mM) ; 20 µl de T4 DNA Ligase (5 U/µl) (Fermentas) ; eau stérile qsp 1 ml.

La ligation est effectuée pendant une nuit à température ambiante, puis l'enzyme est éliminée par une extraction au phénol/chloroforme. Les produits de ligation sont précipités à l'éthanol 100% et repris dans 10 µl d'eau stérile.

4.3.3. Amplification par PCR inverse, purification et séquençage

La réaction de PCR inverse est réalisée dans le mélange suivant : 2,5 µl d'ADNg purifié ; 3 µl d'amorces sens (10 µM) ; 3 µl d'amorces antisens (10 µM) ; 5 µl de PCR x 10 Reaction Buffer (Tris-HCl 200 mM pH 8,8 ; KCl 100 mM ; (NH₄)₂SO₄ 100 mM ; MgSO₄ 20 mM ; Triton X-100 1% ; BSA (1 mg/ml)) ; 1 µl de dNTP (10 mM) ; 1 µl d'enzyme *PfuTurbo*[®] DNA polymérase (2,5 U/µl) (Stratagene[®]) ; eau stérile qsp 50 µl. Le mélange est soumis à 45 cycles composés d'une étape de dénaturation de 10 sec à 94°C, d'une étape d'hybridation des amorces de 10 sec à 60°C, et d'une étape d'élongation de 2 min à 72°C favorisant l'amplification des fragments de grande taille (1 à 4 kb).

Le tableau **M.M.1d** résume les caractéristiques des différentes amorces utilisées. Le milieu réactionnel de synthèse est ensuite purifié par une extraction au phénol/chloroforme et les fragments d'ADN sont précipités à l'éthanol, lavés et repris dans 10 µl d'eau stérile. Les produits PCR sont purifiés par électrophorèse en gel d'agarose LMP (voir §3.5.2) et le fragment de taille désirée est isolé, purifié puis séquencé.

5. Analyse des protéines

5.1. Analyse des protéines par la technique du Western blot

5.1.1. Extraction des protéines totales de plantes

Le matériel végétal (1 à 10 mg de feuilles ou racines) est broyé dans 100 μ l de tampon de dissociation "Laemmli" (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 5% ; glycérol 20% ; β -mercaptoéthanol 5% ; bleu de bromophénol 0,005%) (Laemmli, 1970). Le broyage est effectué à l'aide d'un microbroyeur en microtube de 1,5 ml. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation à 13000 g pendant 5 min, les protéines sont dénaturées par chauffage à 95°C pendant 5 min puis 10 μ l sont déposés sur un gel de polyacrylamide dénaturant pour être analysées par western blot.

5.1.2. Fractionnement des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide, en présence de SDS. La méthode utilisant un système de gels et de tampons discontinus (Laemmli, 1970) permet de concentrer d'abord les échantillons en une fine bande dans un "gel de concentration" puis de séparer les protéines selon leur masse moléculaire dans un "gel de séparation". Le "gel de concentration" est constitué d'acrylamide 4%, de bisacrylamide 0,1%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, TEMED 0,075% et de persulfate d'ammonium 0,05%. Quant au "gel de séparation" selon la résolution souhaitée, il est constitué d'acrylamide 8 à 15%, de bisacrylamide 0,2 à 0,37%, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, TEMED 0,05% et de persulfate d'ammonium 0,05%. Le persulfate d'ammonium et le TEMED, les catalyseurs de la réaction de polymérisation de l'acrylamide avec le bisacrylamide, sont ajoutés extemporanément avant de couler les gels.

Les protéines sont ainsi séparées par électrophorèse en présence de tampon de migration (Tris 25 mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1%) à 100 V pendant 2 heures.

5.1.3. Immunodétection des protéines par la technique du Western blot

Cette technique consiste à séparer sur gel de polyacrylamide les protéines en conditions dénaturantes puis à les transférer sur une membrane ImmobilonTM (PVDF) (Millipore) pour pouvoir révéler les protéines d'intérêt grâce à l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques et d'anticorps secondaires couplés à une enzyme.

L'électrotransfert est effectué à 4°C en système Mini-Protean/Trans-Blot (Biorad) à 80 V pendant 1h30 dans du tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glycine 192 mM. Après transfert, la membrane est lavée pendant 15 min sous agitation dans du tampon PBS-Tween 1% (NaCl 140 mM ; KCl 2,7 mM ; NaHPO₄ 1,8 mM pH 7,3 ; Tween 1%), puis pré-incubée dans du PBS-Tween 1% lait 5%. Les anticorps primaires polyclonaux de lapin sont ajoutés au

milieu de pré-incubation (à la dilution optimale souhaitée) et le tout est incubé la nuit à 4°C sous agitation. Les anticorps en excès sont éliminés par 3 lavages de 15 min sous agitation dans du PBS-Tween 1%. La membrane est ensuite incubée pendant 3 h à température ambiante avec les anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase dilués au 1/10 000ème dans du PBS-Tween 1% lait 5%. Les complexes antigènes/anticorps sont révélés par Chemiluminescence en utilisant le kit "Lumi-light" (Roche). Le kit se compose d'une solution activatrice "Lumi-light Luminol" et d'une solution de peroxyde d'hydrogène "Lumi-light Stable". Après mélange de ces deux solutions, le substrat métabolisé par l'enzyme couplée à l'anticorps secondaire engendre un produit luminescent révélé par autoradiographie.

5.2. Immuno-empreintes de racines de betteraves

Cette technique permet de localiser les zones virosées au niveau des racines de betterave *Beta macrocarpa* inoculées au niveau des feuilles par un isolat artificiel du BNYVV.

Les racines de deux betteraves, l'une aux racines saines (plante inoculée par les ARN 1 et 2) et l'autre aux racines infectées (plante inoculée par les ARN 1 à 4), sont placées sur une membrane de nitrocellulose 13 x 11 cm (BA 85 0,45 µm) (Schleicher et Schuell) et recouvertes d'un film plastique, le tout placé entre deux feuilles de papier Whatmann pour former un « sandwich » qui est comprimé par un cylindre en verre. Cette compression entraîne la libération d'une partie du contenu cellulaire sur la membrane de nitrocellulose. Les racines sont préservées sur le film plastique et congelées à -80°C pour pouvoir en extraire par la suite les ARN totaux.

La membrane de nitrocellulose est traitée comme dans le cas d'un western blot (voir§5.1.3.). Le bruit de fond peut être limité en utilisant des anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline (Goat Anti-Rabbit IgG-AP DAKO A/S Denmark) dilués au 1/10 000ème final. Dans ce cas, après lavage, les complexes antigènes/anticorps sont révélés par chemiluminescence en incubant la membrane pendant 5 min dans 3 ml d'une solution Immun-Star™ Substrate Bio-Rad® (Immun-Star™ Chemiluminescent Protein Detection System). L'empreinte présente sur la membrane peut également servir à détecter les ARN par hybridation moléculaire en utilisant le protocole de Northern blot (voir §3.6.3. ou §3.6.4).

5.3. Immunomarquage de protéines virales et observation par microscopie électronique

5.3.1. Préparation des échantillons

Des morceaux de feuilles ou de racines (1 x 5 mm) sont découpés à l'aide d'une lame de rasoir directement dans la solution fixatrice ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 150 mM pH 7,4 ; Glutaraldéhyde 3%). Après une infiltration sous vide pendant 15 min puis une incubation de 2 h à 4°C, le fixateur est remplacé par une autre solution fixatrice ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 150 mM pH 7,4 ; Glutaraldéhyde 3% ; acide picrique 10%). Les échantillons sont incubés pendant 16 h à 4°C, puis lavés deux fois 15 min à l'eau distillée, et quatre fois 15 min avec du tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 150 mM pH 7,4, puis incubés pendant 2 h dans une solution $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 150 mM pH 7,4 ; OsO_4 0,1%. Après quatre lavages à l'eau distillée de 15 min chacun, les échantillons sont fixés dans l'acétate d'uranyle 2% pendant 16 h à 4°C. Après quatre lavages de 10 min à l'eau distillée, les échantillons sont progressivement deshydratés par différentes incubations dans l'éthanol de plus en plus concentré : 10 min dans l'éthanol 30%, 10 min dans l'éthanol 50%, 10 min dans l'éthanol 70%, puis 20 min dans l'éthanol 80%, 20 min dans l'éthanol 90%, et enfin deux fois 20 min dans l'éthanol 100%. Avant inclusion, les échantillons sont soumis à une incubation de 20 min dans l'oxyde de propylène 100%, à une incubation de 30 min dans l'oxyde de propylène/EPON (1/1), puis à deux incubations chacune d'1 h dans l'EPON 100%. Une pré-inclusion est réalisée dans l'EPON 100% (20 ml de EMbed 812 ; 16 ml de DDSA ; 8 ml de NMA ; 0,77 ml de DMP30) pendant 16 h à 20°C, puis l'inclusion définitive est effectuée pendant 72 h à 60°C.

Des coupes ultra-fines d'une épaisseur de 90 nm sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome Ultracut E Reichert-Jung, récoltées par flottaison sur de l'eau et placées sur des grilles de microscopie électronique recouvertes d'un film de Formvar (0,25% dans du 1,2-dichloroéthane). Les coupes sont ensuite séchées à température ambiante.

5.3.2. Immunomarquage à l'or colloïdal sur des coupes ultra-fines

La mise en évidence de la protéine est réalisée grâce à un sérum dirigé contre la protéine à détecter, puis avec un deuxième sérum anti-IgG couplé à des billes d'or colloïdal de 15 à 25 nm de diamètre. Seuls les antigènes présents à la surface des coupes sont accessibles aux anticorps. Les conditions d'incubation (agent bloquant, température d'incubation) sont choisies de manière à obtenir le meilleur rapport entre le marquage spécifique et le bruit de fond. Les traitements sont effectués par incubation des grilles dans 20 μl de réactif.

Après une hydratation d'une minute dans l'eau distillée, les grilles sont incubées pendant 30 min dans une solution de saturation PBS-BSA 1% (NaCl 140 mM ; KCl 2,7 mM ;

NaHPO₄ 1,8 mM pH 7,3 ; BSA 1%). En parallèle, les anticorps primaires polyclonaux de lapin sont incubés pendant 1 h à 4°C sous agitation en présence de PBS-BSA 1% supplémenté de 50 mg/ml de poudre acétonique d'*A. thaliana*. Cette étape dite "d'épuisement" permet de saturer les sites aspécifiques des anticorps et ainsi limiter la révélation des protéines cellulaires. Après centrifugation, le surnageant contenant les anticorps épuisés est récupéré et utilisé pour y incuber les grilles pendant 2 h à température ambiante (dilution finale des anticorps 1/10 000ème) sous agitation. Les anticorps en excès sont éliminés par 4 lavages de 10 min sous agitation dans du PBS. Les grilles sont ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à des billes d'or colloïdal au 1/50ème dans du PBS-BSA 0,1%. Enfin, les grilles sont soumises à quatre lavages de 10 min dans du PBS, puis trois lavages de 3 min dans l'eau bidistillée avant d'être séchées à température ambiante et observées au microscope.

5.3.3. Observation des coupes

Les observations des échantillons sont effectuées sous une tension d'accélération de 75 kV, avec un microscope électronique à transmission (Hitachi H600).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe H. and Tamada T. (1986) Association of *Beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Polymyxa betae* keskin. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **52**, 235-247.
- Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D., Dubnick M., Polymeropoulos M.H., Xiao H., Merril C.R., Wu A., Olde B., Moreno R.F., Kerlavage A.R., McCombie W.R. and Venter J.C. (1991) Complementary DNA sequencing : expressed sequence tags and human genome project. *Science*, **252**, 1651-1656.
- Adams M.D., Kerlavage A.R., Fleischmann R.D., Fuldner R.A., Bult C.J., Lee N.H., Kirkness E.F., Weinstock K.G., Gocayne J.D., White O. et al. (1995) Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature*, **377**, 3-174.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Miller W. and Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Anderson J.P., Badruzsaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R. and Kazan K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 3460-3479.
- Asano M., Satoh R., Mochizuki A., Tsuda S., Yamanaka T., Nishiguchi M., Hirai K., Meshi T., Naito S. and Ishikawa M. (2005) Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. *FEBS Lett.*, **579**, 4479-4484.
- Asher M.J.C., Chwarszczynska D.M. and Leaman M. (2002) The evaluation of rhizomania resistant sugar beet for the UK. *Ann. Appl. Biol.*, **141**, 101-109.
- Bachem C.W.B., van der Hoeven R.S., de Bruijn S.M., Vreugdenhil D., Zabeau M. and Visser R.G.F. (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.*, **9**, 745-753.
- Bachem C.W.B., Oomen R.J.F.J. and Visser R.G.F. (1998) Transcript imaging with cDNA-AFLP : a step-by-step protocol. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **16**, 157-173.
- Bachem C.W.B., Oomen R.J.F.J., Kuyt S., Horvath B.M., Claassens M.M.J., Vreugdenhil D. and Visser R.G.F. (2000) Antisense suppression of a potato α -SNAP homologue leads to alterations in cellular development and assimilate distribution. *Plant Mol. Biol.*, **43**, 473-482.

- Bachem C.W.B., Horvath B., Trindade L., Claassens M., Davelaar E., Jordi W. and Visser R.G.F. (2001) A potato tuber-expressed mRNA with homology to steroid dehydrogenases affects gibberellin levels and plant development. *Plant J.*, **25**, 595-604.
- Balmori E., Gilmer D., Richards K., Guilley H. and Jonard G. (1993) Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on *Beet necrotic yellow vein virus* RNA 3. *Biochimie*, **75**, 517-521.
- Barlier I., Kowalczyk M., Marchant A., Ljung K., Bhalerao R., Bennett M., Sandberg G. and Bellini C. (2000) The SUR2 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14819-14824.
- Bartel B. and Bartel D.P. (2003) MicroRNAs : at the root of plant development. *Plant Physiol.*, **132**, 709-717.
- Bartel D.P. (2004) MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- Baumberger N., Ringli C. and Keller B. (2001) The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, **15**, 1128-1139.
- Benedetti C.E., Xie D. and Turner J.G. (1995) *Coil1*-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiol.*, **109**, 567-572.
- Berger S., Bell E., Sadka A. and Mullet J.E. (1995) *Arabidopsis thaliana Atvsp* is homologous to soybean *VspA* and *VspB*, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 933-942.
- Berger S., Bell E., Mullet J.E. (1996) Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of *AtVsp* in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.*, **111**, 525-531.
- Berger S., Mitchell-Olds T. and Stotz H.U. (2002) Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.*, **114**, 85-91.
- Bevan M.W. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8711-8721.
- Biancardi E., Lewellen R.T., Biaggi M.D., Erichsen A.W. and Stevanato P. (2002) The origin of rhizomania resistance in sugarbeet. *Euphytica*, **127**, 383-397.
- Bleykasten-Grosshans C., Guilley H., Bouzoubaa S., Richards K. and Jonard G. (1997) Independent expression of the first two triple gene block proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* complement virus defective in the corresponding gene but expression of the third protein inhibits viral cell-to-cell movement. *Mol. Plant Microb. Interact.*, **10**, 240-246.

- Bolduc N. and Brisson L.F. (2002) Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. *FEBS Lett.*, **532**, 111-114.
- Bolduc N., Ouellet M., Pitre F. and Brisson L.F. (2003) Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta* **216**, 377-386.
- Bouzoubaa S., Guilley H., Jonard G., Richards K. and Putz C. (1985) Nucleotide sequence analysis of RNA-3 and RNA-4 of *Beet necrotic yellow vein virus*, isolates F2 and G1. *J. Gen. Virol.*, **66**, 1553-1564.
- Bouzoubaa S., Ziegler V., Beck D., Guilley H., Richards K. and Jonard G. (1986) Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-2. *J. Gen. Virol.*, **67**, 1689-1700.
- Bouzoubaa S., Quillet L., Guilley H., Jonard G. and Richards K. (1987) Nucleotide sequence of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-1. *J. Gen. Virol.*, **68**, 615-626.
- Bouzoubaa S., Niesbach-Klosgen U., Jupin I., Guilley H., Richards K. and Jonard G. (1991) Shortened forms of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 and -4 : internal deletions and a subgenomic RNA. *J. Gen. Virol.*, **72**, 259-266.
- Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K. R. and Grolach J. (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis : a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, **13**, 1499-1510.
- Braselton J.P. (1995) Current status of the plasmodiophorids. *Crit. Rev. Microbiol.*, **21**, 263-275.
- Brenner S., Johnson M., Bridgham J., Golda G., Lloyd D.H., Johnson D., Luo S., McCurdy S., Foy M., Ewan M., et al. (2000a) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 630-634.
- Brenner S., Williams S.R., Vermaas E.H., Storck T., Moon K., McCollum C., Mao J.I., Luo S., Kirchner J.J., Eletr S., et al. (2000b) In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads : physical separation of differentially expressed cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1665-1670.
- Bucher M., Schroeer B., Willmitzer L. and Riesmeier J.W. (1997) Two genes encoding extensin-like proteins are predominantly expressed in tomato root hair cells. *Plant Mol. Biol.*, **35**, 497-508.
- Burketova L., Stillerova K. and Feltlova M. (2003) Immunohistological localization of chitinase and β -1,3-glucanase in rhizomania-diseased and benzothiadiazole treated sugar beet roots. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **63**, 47-54.
- Caderas D., Muster M., Vogler H., Mandel T., Rose J.K.C., McQueen-Mason S. and Kuhlemeier C. (2000) Limited correlation between expansin gene expression and elongation growth rate. *Plant Physiol.*, **123**, 1399-1413.
- Canova A. (1959) On the pathology of sugarbeet. *Informatore Fitopatologico*. **9**, 390-396.

Carpita N.C. and Gibeaut D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, **3**, 1-30.

Carrington J.C. and Ambros V. (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, **301**, 336-338.

Cassab G.I. (1998) Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 281-309.

Catala C., Rose J.K.C. and Bennett A.B. (2000) Auxin-regulated genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth. *Plant Physiol.*, **122**, 527-534.

Chen J.G., Shimomura S., Sitbon F., Sandberg G. and Jones A.M. (2001) The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells. *Plant J.*, **28**, 607-617.

Chen J.G., Ullah H., Young J.C., Sussman M.R. and Jones A.M. (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.*, **15**, 902-911.

Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J.L., Wang X. and Zhu T. (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, **14**, 559-574.

Cheung V.G., Morley M., Aguilar F., Massimi A., Kucherlapati R. and Childs G. (1999) Making and reading microarrays. *Nature Genet.*, **21**, 15-19.

Cho H.T. and Cosgrove D.J. (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 3237-3253.

Chomezynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.

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

Cosgrove D.J., Li L.C., Cho H.T., Hoffmann-Benning S., Moore R.C. and Blecker D. (2002) The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1436-1444.

Coutts R.H.A., Linton D.J. and Bolwell G.P. (1994) Patterns of protein synthesis in infected and stressed sugar beet (*Beta vulgaris* L). *J. Phytopathol.*, **142**, 274-282.

Delarue M., Prinsen E., Onckelen H.V., Caboche M. and Bellini C. (1998) Sur2 mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant J.*, **14**, 603-611.

- Dempsey D.M.A., Shah J. and Klessig D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **18**, 547-575.
- Desprez T., Amselem J., Caboche M., and Höfte H. (1998) Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J.*, **14**, 643-652.
- Devoto A. and Turner J.G. (2005) Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiol. Plantarum.* **123**, 161-172.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Jones A.M. and Estelle M. (2003) Auxin action in a cell-free system. *Curr. Biol.*, **13**, 1418-1422.
- Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D. and Siebert P.B. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **12**, 6025-6030.
- Dilks D.W., Ring R.H., Khawaja X.Z., Novak T.J. and Aston C. (2003) High-throughput confirmation of differential display PCR results using reverse Northern blotting. *J. Neurosci. Methods*, **123**, 47-54.
- Donson J., Fang Y., Espiritu-Santo G., Xing W., Salazar A., Miyamoto S., Armendarez V. and Volkmoth W. (2002) Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol. Biol.*, **48**, 75-97.
- Dubos C. and Plomion C. (2003). Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots. *Plant Mol. Biol.*, **51**, 249-262.
- Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P. and Trent J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genet.*, **21**, 10-14.
- Dunoyer P., Pfeffer S., Fritsch C., Hemmer O., Voinnet O. and Richards K. (2002) Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J.*, **29**, 555-567.
- Durrant W.E., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D.G. (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell*, **12**, 963-977.
- Ellis C. and Turner J.G. (2001) The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell*, **13**, 1025-1033.
- Erhardt M., Morant M., Ritzenthaler C., Stussi-Garaud C., Guilley H., Richards K., Jonard G., Bouzoubaa S. and Gilmer D. (2000) P42 movement protein of *Beet necrotic yellow vein virus* is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctuate bodies associated with plasmodesmata. *Mol. Plant Microb. Interact.*, **13**, 520-528.

- Ewing R.M., Kahla A.B., Poirot O., Lopez F., Audic S. and Claverie J.M. (1999) Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res.*, **9**, 950-959.
- Feys B.J.F., Benedetti C.E., Penfold C.N. and Turner J.G. (1994) Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male-sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, **6**, 751-759.
- Fleming T.M., McCarthy D.A., White R.F., Antoniw J.F. and Mikkelsen J.D. (1991) Induction and characterization of some of the pathogenesis-related proteins in sugar beet. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **39**, 147-160.
- Gelvin S.B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 223-256.
- Gilmer D., Bouzoubaa S., Hehn A., Guilley H., Richards K. and Jonard G. (1992) Efficient cell-to-cell movement of *Beet necrotic yellow vein virus* requires 3' proximal genes located on RNA-2. *Virology*, **189**, 40-47.
- Goldman M.H., Pezzotti M., Seurinck J. and Mariani C. (1992) Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. *Plant Cell*, **4**, 1041-1051.
- Gottschalk T.E., Mikkelsen J.D., Nielsen J.E., Nielsen K.K. and Brunstedt J. (1998) Immunolocalization and characterization of beta-1,3-glucanase from sugar beet, deduction of its primary structure and nucleotide sequence by cDNA and genomic cloning. *Plant Sci.*, **132**, 153-167.
- Gowda M., Jantasuriyarat C., Dean R. and Wang G.L. (2004) Robust-LongSAGE (RL-SAGE) for both gene discovery and transcriptome analysis. *Plant Physiol.*, **134**, 890-897.
- Gray W. M., del Pozo J.C., Walker L., Hobbie L., Risseuw E., Banks T., Crosby W.L., Yang M., Ma H. and Estelle M. (1999) Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, **13**, 1678-1691.
- Gravesen A., Warthoe P., Knochel S. and Thirstrup K. (2000) Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants shows consistent overexpression of a putative β -glucoside-specific PTS system. *Microbiology*, **146**, 1381-1389.
- Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O. and Estelle M. (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, **414**, 271-276.
- Gray W.M., Hellmann H., Dharmasiri S. and Estelle M. (2002) Role of the Arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. *Plant Cell*, **14**, 2137-2144.
- Guo H.S., Xie Q., Fei J.F. and Chua N.H. (2005) MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *Plant Cell*, **17**, 1376-1386.

- Guzzardi P., Genot G. and Jamet E. (2004) The *Nicotiana sylvestris* extensin gene, Ext 1.2A, is expressed in the root transition zone and upon wounding. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1680**, 83-92.
- Haeberlé A.M. and Stussi-Garaud C. (1995) In situ localization of the non-structural protein P25 encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *J. Gen. Virol.*, **76**, 643-650.
- Haeberlé A.M., Stussi-Garaud C., Schmitt C., Garaud J., Richards K., Guilley H. and Jonard G. (1994) Detection by immunogold labelling of P75 readthrough protein near an extremity of *Beet necrotic yellow vein virus* particles. *Arch. Virol.*, **134**, 195-203.
- Habu Y., Fukada-Tanaka S., Hisatomi Y. and Iida S. (1997) Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 516-521.
- Hagen G. and Guilfoyle T. (2002) Auxin-responsive gene expression : genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol.*, **49**, 373-385.
- Hamilton A.J. and Baulcombe D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
- Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, **8**, 1773-1791.
- Harju V.A., Mumford R.A., Bockley A., Boonham N., Clover G.R.G., Weekes R. and Henry C.M. (2002) Occurrence in the United Kingdom of *Beet necrotic yellow vein virus* isolates which contain RNA 5. *Plant Pathol.*, **51**, 811.
- He X., Anderson J.C., del Pozo O., Gu Y.Q., Tang X. and Martin G.B. (2004) Silencing of subfamily I of protein phosphatase 2A catalytic subunits results in activation of plant defense responses and localized cell death. *Plant J.*, **38**, 563-577.
- Hehn A., Fritsch C., Richards K., Guilley H. and Jonard G. (1997) Evidence for in vitro and in vivo autocatalytic processing of the primary translation product of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-1 by papain-like proteinase. *Arch. Virol.*, **142**, 1051-1058.
- Heidel G. and Rush C. (1994) Distribution of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet distortion mosaic virus*, and an unnamed soil-borne sugar beet virus in Texas and New Mexico. *Plant Dis.*, **78**, 603-606.
- Heijbroek W. (1985) De betekenis van rhizomanie voor de bieteteelt. *Gewasbescherming*, **17**, 17-18.
- Heijbroek W., Musters P.M. and Schoone A.H.L. (1999) Variation in pathogenicity and multiplication of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in relation to the resistance of sugarbeet cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.*, **105**, 397-405.
- Hobbie L. and Estelle M. (1995) The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.*, **7**, 211-220.

- Holsters M., Silva B., Van Vliet F., Genetello C., De Block M., Dhaese P., Depicker A., Inze D., Engler G., Villarroel R., Van Montagu M. and Schell J. (1980) The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid*, **3**, 212-230.
- Iqbal M.J., Yaegashi S., Njiti V.N., Ahsan R., Cryder K.L. and Lightfoot D.A. (2002). Resistance locus pyramids alter transcript abundance in soybean roots inoculated with *Fusarium solani* F.sp. *glycines*. *Mol. Genet. Genomics*, **268**, 407-417.
- Jackson A. O. and Larkins B. A. (1976) Influence of ionic strength, pH and chelation of divalent metals on isolation of polyribosomes from tobacco leaves. *Plant Physiol.*, **57**, 7-10.
- Jin H., Liu Y., Yang K.Y., Kim C.Y., Baker B. and Zhang S. (2003) Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant J.*, **33**, 719-731.
- Johansson E. (1985) Rhizomania in sugar beet - a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift*, **95**, 115-121.
- Jones C.S., Davies H.V. and Taylor M.A. (2000) Profiling of changes in gene expression during raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques. *Planta*, **211**, 708-714.
- Jupin I., Guilley H., Richards K. and Jonard G. (1992) Two proteins encoded by *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J.*, **11**, 479-488.
- Kanyuka K., Ward E. and Adams M.J. (2003) *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits : a research challenge. *Mol. Plant Pathol.*, **4**, 393-406.
- Keller B. and Lamb C.J. (1989) Specific expression of a novel cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation. *Genes Dev.*, **3**, 1639-1646.
- Keskin B. (1964) [*Polymyxa betae* n. sp., a parasite in the roots of *Beta vulgaris* Tournefort, particularly during the early growth of the sugar beet. *Arch. Mikrobiol.*, **49**, 348-374.
- Kiguchi T., Saito M. and Tamada T. (1996) Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and the identity of deletion mutant. *J. Gen. Virol.*, **77**, 575-580.
- Kim C.Y., Liu Y., Thorne E.T., Yang H., Fukushige H., Gassmann W., Hildebrand D., Sharp R.E. and Zhang S. (2003) Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell*, **15**, 2707-2718.
- Kim C.Y. and Zhang S. (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J.*, **38**, 142-151.
- Koenig R. and Lennefors B.L. (2000) Molecular analysis of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Arch. Virol.*, **145**, 1561-1570.

- Koenig R., Jarausch W., Li Y., Commandeur U., Burgermeister W., Gehrke M. and Lüddecke P. (1991) Effect of recombinant *Beet necrotic yellow vein virus* with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *J. Gen. Virol.*, **72**, 2243-2246.
- Koenig R., Luddecke P. and Haeblerlé A.M. (1995) Detection of *Beet necrotic yellow vein virus* strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immuno-capture RT-PCR products. *J. Gen. Virol.*, **76**, 2051-2055.
- Koenig R. Haeblerlé A. and Commandeur U. (1997) Detection and characterization of a distinct type of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Arch. Virol.*, **142**, 1499-1504.
- Kruse M., Koenig R., Hoffmann A., Kaufmann A., Commandeur U., Solovyev A.G., Savenkov I. and Burgermeister W. (1994) Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1835-1842.
- Kuhn E. (2001) From library screening to microarray technology : strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Ann. Bot.*, **87**, 139-155.
- Kunkel B.N., Agnew J., Collins J.J., Cohen J. and Chen Z. (2003) Molecular genetic analysis of AvrRpt2 activity in promoting virulence of *Pseudomonas syringae*. *Genomic and Genetic Analysis of Plant Parasitism and Defense*. APS Press. Tsuyumu S., Leach J., Shiraishi T., Wolpert T. editors. (Proceeding of 9th Japan-US Seminar on Plant-Pathogen Interactions, held November 3-7, 2003 in Shizuoka, Japan)
- Kuriyama H. and Fukuda H. (2002) Developmental programmed cell death in plants. *Curr Opin. Plant Biol.*, **5**, 568-573.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lauber E., Guilley H., Tamada T., Richards K. and Jonard G. (1998) Vascular movement of *Beet necrotic yellow vein virus* in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3' sequence domain rather than a gene product. *J. Gen. Virol.*, **79**, 385-393.
- Lee L., Telford E., Batten J., Scholthof G.K.B. and Rush C.M. (2001) Complete nucleotide sequence and genome organization of *Beet soilborne mosaic virus*, a proposed member of the genus *Benyvirus*. *Arch. Virol.*, **140**, 2443-2453.
- Lee D.K., Ahn J.H., Song S.K., Choi Y.D. and Lee J.S. (2003) Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiol.*, **131**, 985-997.
- Lemaire O., Merdinoglu D., Valentin P., Putz C., Ziegler-Graff V., Guilley H., Jonard G. and Richards K. (1988) Effect of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA composition on transmission by *Polymyxa betae*. *Virology*, **162**, 232-235.
- Lennefors B.L., Lindsten K. and Koenig R. (2000) First record of A and B type *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets in Sweden. *Eur. J. Plant Pathol.*, **106**, 199-201.

Liang P. and Pardee A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967-971.

Liang P. and Pardee A.B. (1995) Recent advances in differential display. *Curr. Opin. Immunol.*, **7**, 274-280.

Liang P., Bauer D., Averboukh L., Warthoe P., Rohrwild M., Muller H., Strauss T.M. and Pardee A.B. (1995) Analysis of altered gene expression by differential display. *Methods Enzymol.*, **254**, 304-321.

Lievens S., Goormachtig S. and Holsters M. (2001) A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation : looking back and looking forward. *Nucl. Acids Res.*, **29**, 3459-3468.

Link D., Schmidlin L., Schirmer A., Klein E., Erhardt M., Geldreich A., Lemaire O., and Gilmer D. (2005) Functional characterization of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5-encoded p26 protein : evidence for structural pathogenicity determinants. *J. Gen. Virol.*, **86**, 2115-2125.

Lipshutz R.J., Fodor S.P.A., Gingeras T.R. and Lockhart D.J. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genet.*, **21**, 20-24.

Liu Y., Schiff M., Marathe R. and Dinesh-Kumar S.P. (2002a) Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.*, **30**, 415-429.

Liu Y., Schiff M., Serino G., Deng X.W. and Dinesh-Kumar S. P. (2002b) Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell*, **14**, 1483-1496.

Liu Y., Jin H., Yang K.Y., Kim C.Y., Baker B. and Zhang S. (2003) Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signaling. *Plant J.*, **34**, 149-160.

Liu Y., Schiff M. and Dinesh-Kumar S. P. (2004) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.*, **38**, 800-809.

Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., Follettie M.T., Gallo M.V., Chee M.S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H. and Brown E.L. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.*, **13**, 1675-1680.

Marchant A. and Bennett M.J. (1998) The Arabidopsis AUX1 gene: a model system to study mRNA processing in plants. *Plant Mol. Biol.*, **36**, 463-471.

Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklof J., Casero P.J., Bennett M., Sandberg G. (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *Plant Cell*, **14**, 589-597.

- Matsumura H., Nirasawa S. and Terauchi R. (1999) Transcript profiling in rice (*Oriza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE). *Plant J.*, **20**, 719-726.
- Matsumura H., Reich S., Ito A., Saitoh H., Kamoun S., Winter P., Kahl G., Reuter M., Kruger D.H. and Terauchi R. (2003) Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15718-15723.
- Matz M.V. and Lukyanov S.A. (1998) Different strategies of differential display : areas of application. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 5537-5543.
- McConn M., Creelman R.A., Bell E., Mullet J.E. and Browse J. (1997) Jasmonate is essential for insect defense Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5473-5477.
- Menke F.L., Kang H.G., Chen Z., Park J.M., Kumar D. and Klessig D.F. (2005) Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **18**, 1027-1034.
- Meyers B.C., Galbraith D.W., Nelson T. and Agrawal V. (2004a) Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate. *Plant physiol.*, **135**, 637-652.
- Meyers B.C., Tej S.S., Vu T.H., Haudenschild C.D., Agrawal V., Edberg S.B., Ghazal H. and Decola S. (2004b) The use of MPSS for whole-genome transcriptional analysis in Arabidopsis. *Genome Res.*, **14**, 1641-1653.
- Mira H., Martinez N. and Penarrubia L. (2002) Expression of a vegetative-storage-protein gene from *Arabidopsis* is regulated by copper, senescence and ozone. *Planta*, **214**, 939-946.
- Miyaniishi M., Kusume T., Saito M., Tamada T. (1999) Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA 5. *Arch Virol.*, **144**, 879-892.
- Murray V. (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 8889.
- Neuteboom L.W., Ng J.M., Kuyper M., Clijdesdale O.R., Hooykaas P.J., and van der Zaal B.J. (1999a) Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* **39**, 273-287.
- Neuteboom L.W., Veth-Tello L.M., Clijdesdale O.R., Hooykaas P.J., and van der Zaal B.J. (1999b) A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Res.* **26**, 13-19.
- Niebel A., De Almeida Engler J., Tire C., Engler G., Van Montagu M. and Gheysen G. (1993) Induction Patterns of an Extensin Gene in Tobacco upon Nematode Infection. *Plant Cell*, **5**, 1697-1710.
- Nielsen J.E., Nielsen K.K. and Mikkelsen J.D. (1996) Immunohistological localization of a basic class IV chitinase in *Beta vulgaris* leaves after infection with *Cercospora beticola*. *Plant Sci.*, **119**, 191-202.

- Nielsen K.K., Mikkelsen J.D., Kragh K.M. and Bojsen K. (1993) An acidic class-III chitinase in sugar beet - induction by *Cercospora beticola*, characterization, and expression in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **6**, 495-506.
- Nielsen K.K., Bojsen K., Collinge D.B. and Mikkelsen J.D. (1994) Induced resistance in sugar beet against *Cercospora beticola* - induction by dichloroisonicotinic acid is independent of chitinase and beta-1,3-glucanase transcript accumulation. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **45**, 89-99.
- Niesbach-Klößgen U., Guilley H., Jonard G. and Richards K. (1990) Immunodetection in vivo of *Beet necrotic yellow vein virus*-encoded proteins. *Virology*, **178**, 52-61.
- O'Donnell P.J., Schmelz E.A., Moussatche P., Lund S.T., Jones J.B. and Klee H. J. (2003) Susceptible to intolerance : a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *Plant J.*, **33**, 245-257.
- Oh K.C., Ivanchenko M.G., White T.J., Lomax T.L. (2003) The *diageotropica* gene of tomato encodes a novel player, a cyclophilin, in auxin signalling. *American Society of Plant Biology Conference, 2003*. Abstrac #26003.
- Ottenschläger I., Wolff P., Wolverson C., Bhalerao R.P., Sandberg G., Ishikawa H., Evans M. and Palme K. (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2987-2991.
- Park W., Li J., Song R., Messing J. and Chen X. (2002) Carpel Factory, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr. Biol.*, **12**, 1484-1495.
- Paul H., Henken B. and Alderlieste M.F.J. (1992) A greenhouse test for screening sugar beet (*Beta vulgaris*) for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV). *Neth. J. Plant Pathol.*, **98**, 65-75.
- Peart J.R., Cook G., Feys B.J., Parker J.E. and Baulcombe D.C. (2002a) An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J.*, **29**, 569-579.
- Peart J.R., Lu R., Sadanandom A., Malcuit I., Moffett P., Brice D.C., Schauser L., Jaggard D.A., Xiao S., Coleman M.J., Dow M., Jones J.D., Shirasu K. and Baulcombe D.C. (2002b) Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10865-10869.
- Pfeffer S., Dunoyer P., Heim F., Richards K.E., Jonard G. and Ziegler-Graff V. (2002) P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol.* **76**, 6815-6824.
- Pollini C.P. and Giunchedi L. (1989) Comparative histopathology of sugar beets that are susceptible and partially resistant to rhizomania. *Phytopath. medit.* **28**, 16-21.
- Pollini C.P., Masia A. and Giunchedi L. (1990) Free indole-3-acetic acid in sugar-beet root of rhizomania-susceptible and moderately resistant cultivars. *Phytopath. medit.* **29**, 191-195.

- Putz C. (1977) Composition and structure of beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Virol.*, **35**, 397-401.
- Putz C. and Kuszala M. (1978) La rhizomanie de la betterave sucrière en Alsace. Recherche d'une nouvelle méthode de purification du beet necrotic yellow vein virus. *Annales de phytopathologie*, **10**, 247-262.
- Putz C., Pinck L. and Fritsch C. (1983) Identification of the 3' and 5' ends of Beet necrotic yellow vein virus. Presence of poly(A) sequence. *FEBS Lett.*, **156**, 41-56.
- Qi Y. and Ding B. (2003) Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell*, **15**, 1360-1374.
- Quillet L., Guilley H., Jonard G. and Richards K. (1989) In vitro synthesis of biologically active *Beet necrotic yellow vein virus* RNA. *Virology*, **172**, 293-301.
- Reinhardt D., Wittwer F., Mandel T. and Kuhlemeier C. (1998) Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell*, **10**, 1427-1437.
- Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B. and Bartel D.P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev.*, **16**, 1616-1626.
- Rhoades M.W., Reinhart B.J., Lim L.P., Burge C.B., Bartel B. and Bartel D.P. (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, **110**, 513-520.
- Richard-Molard M.S. (1985) Rhizomania : a world-wide danger to sugar beet. *Span*, **28**, 92-94.
- Richards K., Jonard G., Guilley H., Ziegler V. and Putz C. (1985) In vitro translation of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA and studies of sequence homology among the RNA species using cloned cDNA probes. *J. Gen. Virol.*, **66**, 345-350.
- Richberg M.H., Aviv D.H. and Dangl J.L. (1998) Dead cells do tell tales. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**, 480-485.
- Rojo E., Leon J. and Sanchez-Serrato J.J. (1999) Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **20**, 135-142.
- Ruegger M., Dewey E., Gray B., Hobbie L., Turner J. and Estelle M. (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to the human cell cycle protein SKP2. *Genes Dev.*, **12**, 505-510.
- Rush C.M. (2003) Ecology and epidemiology of benyviruses and plasmodiophorid vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **41**, 567-592.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P. and Scheres B. (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*, **99**, 463-472.

Saha S., Sparks A.B., Rago C., Akmaev V., Wang C.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. and Velculescu V.E. (2002) Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 508-512.

Saito M., Kiguchi T., Kusume T. and Tamada T. (1996) Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA and comparison with European isolates. *Arch. Virol.*, **141**, 2163-2175.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.

Schirmer A., Link D., Cognat V., Moury B., Beuve M., Meunier A., Bragard C., Gilmer D. and Lemaire O. (2005) Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *J. Gen. Virol.*, **86**, 2897-2911.

Schena M., Shalon D., Davis R.W. and Brown P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.

Schirmer A., Link D., Cognat V., Moury B., Beuve M., Meunier A., Bragard C., Gilmer D. and Lemaire O. (2004) Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *J. Gen. Virol.*, **86**, 2897-2911.

Schmidlin L., Link D., Mutterer J., Guilley H., and Gilmer D. (2005) Use of a *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *J. Gen. Virol.*, **86**, 463-467.

Schob H., Kunz C. and Meins F.J. (1997) Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration : a simple, rapid method for investigation of sequence requirements for gene silencing. *Mol. Gen. Genet.*, **256**, 581-585.

Scholten O.E. and Lange W. (2000) Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet : a review. *Euphytica*, **112**, 219-231.

Scholten O.E., Bock T.S.M.D., Klein-Lankhorst R.M. and Lange W. (1999) Inheritance of resistance of *Beet necrotic yellow vein virus* in *Beta vulgaris* conferred by a second gene of resistance. *Theor. Appl. Genet.*, **99**, 740-746.

Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y. and Shinozaki K. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.*, **31**, 279-292.

Shirako Y., Suzuki N. and French R.C. (2000) Similarity and divergence among viruses in the genus *Furovirus*. *Virology*, **270**, 210-207.

Showalter A.M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, **5**, 9-23.

Smith L., Sanders J., Kaiser R., Hughes P., Dodd C., Connell C., Heiner C., Kent S. and Hood L. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, **321**, 674-679.

Sohi H.H. and Maleki M. (2004) Evidence for presence of types A and B of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Iran. *Virus Genes*, **29**, 353-358.

Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.

Staswick P.E. (1990) Novel regulation of vegetative storage protein genes. *Plant Cell*, **2**, 1-6.

Staswick P.E., Su W. and Howell S.H. (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6837-6840.

Staswick P.E. (1994) Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **45**, 303-322.

Staswick P.E., Tiryaki I. and Rowe M.L. (2002) Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell*, **14**, 1405-1415.

Staswick P.E. and Tiryaki I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant cell*, **16**, 2117-2127.

Steven A., Trus B., Putz C. and Wurtz M. (1981) The molecular organization of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Virology*, **113**, 428-438.

Stintzi A., Weber H., Reymond P., Browse J. and Farmer E.E. (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid : the role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12837-12842.

Stotz H.U., Pittendrigh B.R., Kroymann J., Weniger K., Fritsche J., Bauke A. and Mitchell-Olds T. (2000) Induced plant defense responses against gheewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against Egyptian cotton worm but not diamondback moth. *Plant Physiol.*, **124**, 1007-1018.

Suarez M.B., Grondona I., Garcia-Benavides P., Monte E., Garcia-Acha I. (1999) Characterization of beet necrotic yellow vein furovirus from Spanish sugar beets. *Int. Microbiol.*, **2**, 87-92.

Tamada T. and Abe H. (1989) Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.*, **70**, 3391-3398.

Tamada T. and Baba T. (1973) *Beet necrotic yellow vein virus* from rhizomania-affected sugar beet in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **39**, 325-332.

- Tamada T. and Kusume T. (1991) Evidence that the 75K readthrough protein of *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.*, **72**, 1497-1504.
- Tamada T., Shirako Y., Abe H., Saito M., Kiguchi T. and Harada T. (1989) Production and pathogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different numbers of RNA components. *J. Gen. Virol.*, **70**, 3399-3409.
- Tamada T., Kusume T., Uchino H., Kiguchi T. and Saito M. (1996a) Evidence that *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5 is involved in symptom development of sugarbeet roots. In *Proceedings of the 3rd Symposium of the International Working Group on Plant viruses with Fungal Vectors*, American Society of Sugar Beet Technologists, Denvers, 49.
- Tamada T., Schmitt C., Saito M., Guilley H., Richards K. and Jonard G. (1996b) High resolution analysis of the readthrough domain of *Beet necrotic yellow vein virus* readthrough protein : a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.*, **77**, 1359-1367.
- Tamada T., Uchino H., Kusume T. and Saito M. (1999) RNA-3 deletion mutants of *Beet necrotic yellow vein virus* do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology*, **89**, 1000-1006.
- Timpte C., Lincoln C., Pickett F.B., Turner J. and Estelle M. (1995) The *axr1* and *aux1* genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. *Plant J.*, **8**, 561-569.
- Tiwari S.B., Wang X.J., Hagen G. and Guilfoyle T.J. (2001) AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*, **13**, 2809-2822.
- Torrance L. and Mayo M. (1997) Proposed re-classification of furoviruses. *Arch. Virol.*, **142**, 435-439.
- Ulmasov T., Liu Z.B., Hagen G. and Guilfoyle T.J. (1995) Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell*, **7**, 1611-1623.
- Ulmasov T., Hagen G. and Guilfoyle T.J. (1997a) *ARF1*, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, **276**, 1865-1868.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., and Guilfoyle T.J. (1997b) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, **9**, 1963-1971.
- Ulmasov T., Hagen G. and Guilfoyle T.J. (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5844-5849.
- Utsugi S., Sakamoto W., Murata M. and Motoyoshi F. (1998) *Arabidopsis thaliana* vegetative storage protein (VSP) genes : gene organization and tissue-specific expression. *Plant. Mol. Biol.*, **38**, 565-576.

- Vaquero C., Sack M., Schuster F., Finnern R., Drossard J., Schumann A. and Fischer R. (2002) A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. *FASEB J.*, **16**, 408-410.
- Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B. and Kinzler K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*, **270**, 484-487.
- Vera P., Lamb C. and Doerner P.W. (1994) Cell-cycle regulation of hydroxyproline-rich glycoprotein *HRGPNT3* gene expression during the initiation of lateral root meristems. *Plant J.*, **6**, 717-727.
- Vetter G., Hily J.M., Klein E., Schmidlin L., Haas M., Merkle T., and Gilmer D. (2004) Nucleo-cytoplasmic shuttling of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-3-encoded p25 protein. *J. Gen. Virol.*, **85**, 2459-2469.
- Vijayan P., Shockey J., Levesque C.A., Cook R.J. and Browse J. (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7209-7214.
- Voinnet O., Vain P., Angell S. and Baulcombe D.C. (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, **95**, 177-187.
- Voinnet O., Pinto Y.M. and Baulcombe D. (1999) Suppression of gene silencing : a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14147-14152.
- Voinnet O., Lederer C. and Baulcombe D.C. (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, **103**, 157-167.
- Voinnet O. (2001) RNA silencing as plant immune system against viruses. *Trends Genet.*, **17**, 449-459.
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P. and Baulcombe D. (2003) An enhancement transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.*, **33**, 949-956.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., VanDeLee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. (1995) AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 4407-4414.
- Wan J.S., Sharp S.J., Poirier G.M., Wagaman P.C., Chambers J., Pyati J., Hom Y.L., Galindo J.E., Huvar A., Peterson P.A., Jackson M.R. and Erlander M.G. (1996) Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1685-1691.
- Whitham S., Dinesh-Kumar S.P., Choi D., Hehl R., Corr C. and Baker B. (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, **78**, 1101-1115.
- Wilson L.G. and Fry J.C. (1986) Extensin : a major cell wall glycoprotein. *Plant Cell Environ.*, **9**, 239-260.

- Wisler G., Liu H.Y. and Duffus J. (1994) *Beet necrotic yellow vein virus* and its relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. *Plant Dis.* **78**, 995-1001.
- Wroblewski T., Tomczak A. and Michelmore R. (2005) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.*, **3**, 259-273.
- Xiao S., Dai L., Liu F., Wang Z., Peng W. and Xie D. (2004) COS1 : an Arabidopsis coronatine insensitive 1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell*, **16**, 1132-1142.
- Xie D.X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M. and Turner J.G. (1998) COI1 : an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, **280**, 1091-1094.
- Xie Q., Frugis G., Colgan D. and Chua N.H. (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.*, **14**, 3024-3036.
- Xie Q., Guo H.S., Dallman G., Fang S., Weissman A.M. and Chua N.H. (2002) SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signal. *Nature*, **419**, 167-170.
- Xu L., Liu F., Lechner E., Genschik P., Crosby W.L., Ma H., Peng W., Huang D. and Xie D. (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell*, **14**, 1919-1935.
- Yadav N.S., Vanderleyden J., Bennett D.R., Barnes W.M. and Chilton M.D. (1982) Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6322-6326.
- Yamanaka T., Ohta T., Takahashi M., Meshi T., Schmidt R., Dean C., Naito S. and Ishikawa M. (2000) TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10107-10112.
- Yamanaka T., Imai T., Satoh R., Kawashima A., Takahashi M., Tomita K., Kubota K., Meshi T., Naito S. and Ishikawa M. (2002) Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *J. Virol.*, **76**, 2491-2497.
- Yang K.Y., Liu Y. and Zhang S. (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 741-746.
- Zaenen I., van Larebeke N., Teuchy H., van Montagu M., and Schell J. (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.*, **86**, 109-127.
- Zenser N., Ellsmore A., Leasure C. and Callis J. (2001) Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11795-11800.

Zhang S. and Liu Y. (2001) Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *Plant Cell*, **13**, 1877-1889.

Zhu J., Oger P.M., Schrammeijer B., Hooykaas P.J.J., Farrand S.K. and Winans S. C. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.*, **182**, 3885-3895.

Ziegler V., Richards K., Guilley H., Jonard G. and Putz C. (1985) Cell-free translation of beet necrotic yellow vein virus : readthrough of the coat protein cistron. *J. Gen. Virol.*, **66**, 2079-2087.

Zupan J., Muth T.R., Draper O. and Zambryski P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants : a feast of fundamental insights. *Plant J.*, **23**, 11-28.

ANNEXES

ANNEXE 1

Nucleo-cytoplasmic shuttling of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein

Vetter G., Hily J.M., Klein E., Schmidlin L., Haas M., Merkle T., and Gilmer D.

(2004)

J. Gen. Virol., **85**, 2459-2469

**Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-
encoded p25 protein**

Guillaume VETTER, Jean-Michel HILY, Elodie KLEIN, Laure SCHMIDLIN, Muriel HAAS,
Thomas MERKLE and David GILMER

Journal of General Virology, Vol. 2004, N° 85, Pages 2459–2469

Pages 152 - 162 : Annexe 1

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80142-0>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

ANNEXES 2 ET 3

La protéine p26, exprimée à partir de l'ARN 5 du BNYVV présent uniquement dans l'isolat de type P identifié dans la région de Pithiviers (Loiret France) et au Japon, est impliquée dans l'aggravation des symptômes foliaires et racinaires (Tamada *et al.*, 1989). Les travaux menés au laboratoire ont conduit à l'obtention d'un clone ADNc complet et infectieux de l'ARN 5 par les techniques 5' et 3' RACE. Son utilisation a permis d'étudier l'expression de la protéine p26 lors de l'infection virale et de confirmer l'importance de cette protéine dans les symptômes de nécrose observés sur feuilles de *Chenopodium quinoa* (**annexe 2** : Link *et al.*, 2005). Afin de compléter les outils moléculaires nécessaires à l'étude de l'ARN 5, un vecteur d'expression viral a été construit à partir du clone ADNc complet de l'ARN 5, la séquence codante de la protéine p26 étant remplacée par une cassette de clonage. J'ai ainsi participé, parallèlement à mon travail de thèse, à la caractérisation de ce réplicon appelé Rep-5. Nous avons montré que ce réplicon permettait l'expression de protéines hétérologues comme la GFP (green fluorescence protein) à un taux plus faible que le réplicon dérivé de l'ARN 3 du virus, permettant ainsi d'éviter la surexpression et ses possibles effets indésirables sur les cellules. Les analyses par microscopie à épifluorescence ont montré que l'expression de la protéine GFP à partir de ce réplicon pouvait être systémique dans *Beta macrocarpa*, en présence de l'ARN 3. Enfin, l'observation de lésions au microscope confocal a montré que l'utilisation simultanée des deux réplicons dérivés de l'ARN 3 et de l'ARN 5 permettait l'expression de deux protéines fluorescentes distinctes, la GFP et la RFP, dans les mêmes cellules (**annexe 3** : Schmidlin *et al.*, 2005).

ANNEXE 2

***Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus
RNA-5-encoded p26 protein : evidence for structural pathogenicity
determinants***

Link D., Schmidlin L., Schirmer A., Klein E., Erhardt M., Geldreich A.,
Lemaire O., and Gilmer D.

(2005)

J. Gen. Virol., **86**, 2115-2125

Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants

Didier LINK, Laure SCHMIDLIN, Audrey SCHIRMER, Élodie KLEIN, Mathieu ERHARDT, Angèle GELDREICH, Olivier LEMAIRE and David GILMER

Journal of General Virology, Vol. 2005, N° 86, Pages 2115–2125

Pages 175 - 185 : Annexe 2

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80937-0>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

ANNEXE 3

Use of a Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression

Schmidlin L., Link D., Mutterer J., Guilley H., and Gilmer D.

(2005)

J. Gen. Virol., **86**, 463-467

Use of a Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression

Laure SCHMIDLIN, Didier LINK, Jérôme MUTTERER, Hubert GUILLEY and David GILMER

Journal of General Virology, Vol. 2005, N° 86, Pages 463-467

Pages 187 - 191 : Annexe 3

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80720-0>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

ETUDE MOLECULAIRE DES FACTEURS CELLULAIRES ET VIRAUX RESPONSABLES DE LA PROLIFERATION RACINAIRE OBSERVEE SUR PLANTES INFECTEES PAR LE VIRUS DES NERVURES JAUNES ET NECROTIQUES DE LA BETTERAVE (BNYVV)

Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave est responsable de la rhizomanie. L'analyse globale et comparative du transcriptome de racines de betteraves saines et infectées dans des conditions proches de celles retrouvées au champ a été effectuée par la méthode de RFDD-PCR. Cette approche a permis de caractériser un ensemble de gènes cellulaires dérégulés. La confirmation de leurs variations d'expression par diverses méthodes moléculaires s'est révélée très délicate. Une approche par transgénèse a été effectuée sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Cette plante a été choisie pour exprimer la protéine p25 codée par l'ARN 3 du virus. L'expression de la protéine virale conduit à une modification du phénotype racinaire de la plante et de sa sensibilité aux hormones végétales et à l'infection par le BNYVV. Les résultats préliminaires de l'analyse comparative des transcriptomes de plantes sauvages et transgéniques confirment les observations phénotypiques observées.

MOLECULAR STUDY OF CELLULAR AND VIRAL GENES RESPONSIBLE FOR THE ROOT PROLIFERATION INDUCED BY THE BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS

Beet necrotic yellow vein virus is the causal agent of the sugar beet rhizomania, an economically important disease whose molecular basis remains poorly understood. In an attempt to address this issue, an RFDD-PCR approach was used to compare the global gene expression profiles of healthy and infected root systems. This analysis indeed revealed differentially regulated genes, however, confirmation of the observed changes by nucleic acid hybridization methods was difficult, presumably because of the intrinsic complexity of the pathosystem investigated. A more amenable transgenic approach was therefore developed in parallel, in which the RNA-3-encoded p25 protein -the presumed major symptom determinant in rhizomania- was constitutively expressed in *Arabidopsis thaliana*. Detailed phenotypic characterization of established transgenic lines together with hormonal and viral sensitivity assays have provided valuable clues as to how P25 might promote disease development and symptom expression in authentic infection contexts. Furthermore, preliminary interpretation of comparative micro-array analyses carried out with RNAs from roots of wild-type and transgenic plants support our phenotypic observations.