

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I
2007**

THESE

présentée à la

FACULTE DES SCIENCES DE LA VIE

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Domaine : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie

par

Gabrielle HAAS

**ETUDE DE L'IMPORTATION NUCLEAIRE DE LA
PROTEINE P6 DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU CHOU-
FLEUR ET DE SON ROLE DANS LA SUPPRESSION DU RNA
SILENCING ANTIVIRAL**

Soutenue publiquement le 30 Novembre 2007 devant la Commission d'Examen :

**Pr. Mario KELLER
Pr. Anne-Catherine SCHMIT
Dr. Stéphane BLANC
Pr. Thomas HOHN
Dr. Olivier VOINNET**

**Directeur de thèse
Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Invité**

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes
UPR-CNRS 2357

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE **6**

| | | |
|-----------|--|-----------|
| I | Le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) | 7 |
| | I.1. Structure de la particule virale et du génome | 7 |
| | I.2. Expression du génome | 8 |
| | <i>I.2.1 Transcription et épissage alternatif</i> | 8 |
| | <i>I.2.2 La réplication par transcription inverse</i> | 9 |
| | <i>I.2.3 La synthèse des protéines virales</i> | 10 |
| | <i>I.2.3.1. Le saut du ribosome</i> | 11 |
| | <i>I.2.3.2. La réinitiation de la traduction</i> | 12 |
| | I.4. La transmission du CaMV | 12 |
| | I.5. CaMV et pathogenèse | 14 |
| II | Les protéines du CaMV | 15 |
| | II.1 Les protéines de mouvements | 15 |
| | II.2 Les facteurs de la transmission | 16 |
| | II.3 La protéine de capsid | 17 |
| | II.4 Transcriptase inverse, RNase H et protéinase à acide aspartique | 18 |
| | II.5 La protéine P6 | 18 |
| | <i>II.5.1 Spécificité d'hôte et symptômes</i> | 19 |
| | <i>II.5.2 La transactivation traductionnelle</i> | 20 |
| | <i>II.5.3 Les viroplasm</i> | 22 |
| | <i>II.5.4 La protéine P6 est une protéine nucléo-cytoplasmique</i> | 24 |

CHAPITRE I : ETUDE DE L'IMPORTANCE DU TRANSPORT NUCLEO-CYTOPLASMIQUE ET DES VIROPLASMES DENSES POUR L'INFECTIVITE DU CaMV

Introduction **26**

| | | |
|-----------|---|-----------|
| I | Le transport nucléo-cytoplasmique des macromolécules | 27 |
| | I.1 Le pore nucléaire : structure et généralités | 28 |
| | I.2 Les signaux d'import-export | 29 |
| | I.3 L'importation nucléaire des protéines | 31 |
| | <i>I.3.2 Les importines</i> | 31 |
| | I.3.1 Mécanisme général de l'importation nucléaire des protéines | 32 |
| | I.4 L'exportation nucléaire des protéines et des ARN | 33 |
| | <i>I.4.1 L'exportation nucléaire des protéines</i> | 33 |
| | <i>I.4.2 L'exportation nucléaire des snARN U</i> | 33 |
| | <i>I.4.3 L'exportation des sous-unités ribosomiques</i> | 34 |
| | <i>I.4.4 Les voies d'export des ARN messagers</i> | 35 |
| | <i>I.4.4 L'exportation des ARNt</i> | 36 |
| | <i>I.4.4 L'exportation nucléaire des miRNA</i> | 37 |
| | I.5 La régulation du transport nucléo-cytoplasmique | 38 |
| II | Les caractéristiques de l'importation nucléaire de la protéine P6 | 40 |
| | II.1 L'importation nucléaire de P6 | 41 |
| | <i>II.1.1 P6 interagit in vitro avec l'importine α</i> | 41 |
| | <i>II.1.2 Les protéines L13 et L18 contribuent à l'importation nucléaire de P6 et à sa localisation nucléolaire</i> | 42 |
| | <i>II.1.3 Les viroplasmes limitent l'importation nucléaire de P6</i> | 43 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| II.2 | Caractérisation des signaux de localisation nucléaire (NLS) | 43 |
| II.2.1 | Identification d'un NLS basique bipartite | 43 |
| II.2.2 | Identification d'un NLS non conventionnel | 44 |
| II.2.3 | Les séquences NLS permettent l'importation nucléaire d'un rapporteur cytoplasmique | 46 |
| II.2.4 | Le NLS non conventionnel joue un rôle prépondérant | 47 |
| II.2.5 | Les NLS de la protéine P6 contribuent à la formation des viroplasmes | 48 |
| II.2.6 | P6 est probablement importée sous forme de monomère | 49 |
| II.2.7 | L'importation nucléaire de P6 ne serait pas régulée par sumoylation | 51 |
| II.3 | Importance du transport nucléo-cytoplasmique de P6 en contexte viral | 51 |
| II.3.1 | Obtention d'un vecteur viral avec une ORFVI interchangeable | 52 |
| II.3.2 | L'abolition de l'import est délétère pour la multiplication du virus | 52 |
| II.3.3 | Le trafic nucléo-cytoplasmique de P6 est essentiel pour l'infectivité du CaMV | 54 |
| III | Etude de l'importance des viroplasmes denses pour l'infectivité du CaMV | 56 |
| | Publication n°1 : | 57 |
| | Electron-dense Viroplasms of Cauliflower mosaic virus are dispensable for replication and systemic infection of susceptible plants. | |
| | CHAPITRE II : ETUDE DU ROLE DE P6 DANS LA SUPPRESSION DU SILENCING ANTIVIRALE | 72 |
| | Introduction | 72 |
| I | Les bases moléculaires du RNA silencing | 72 |
| I.1 | Induction du RNA silencing par l'ARN double brin | 72 |
| I.2 | Formation des duplexes de sRNA par les protéines Dicer-like | 73 |
| I.3 | Assemblage et activité du complexe RISC | 75 |
| I.4 | Amplification et RDR | 76 |
| I.5 | RNA silencing et mouvement à courte et longue distance | 76 |
| II | Les différentes voies du RNA silencing chez <i>Arabidopsis</i> et leurs fonctions | 77 |
| II.1 | Transgènes et RNA silencing : IR-PTGS et S-PTGS | 78 |
| II.2 | Les <i>micro</i> (mi)-RNA | 78 |
| II.3 | Les trans-acting (ta)-siRNA | 79 |
| II.4 | Les <i>natural-antisense transcript-derived</i> (nat)-siRNA | 80 |
| II.5 | Méthylation de l'ADN et <i>repeat-associated</i> (ra)-siRNA | 81 |
| II.6 | Redondance / compétition | 82 |
| III | Phytovirus et RNA silencing antiviral | 83 |
| III.1 | Les bases moléculaires du RNA silencing antiviral | 85 |
| III.1.1 | Les sources d'ARNdb | 85 |
| III.1.2 | Les DCL impliqués dans le silencing antiviral | 86 |
| III.1.3 | Le complexe RISC | 87 |
| III.1.4 | Amplification et mouvement du signal de silencing dans la défense contre les virus | 88 |
| III.1.5 | Diversité des modes d'action des suppresseurs du RNA silencing | 89 |

| | |
|---|------------|
| III.2 CaMV et RNA silencing | 90 |
| IV Caractéristiques de la suppression du RNA silencing par la protéine P6 du CaMV | 91 |
| Publication n°2 : | 92 |
| Nuclear import of the Cauliflower mosaic virus P6 protein is mandatory for viral replication and for suppression of the silencing component DRB4 | |
| DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 105 |
| MATERIEL ET METHODES | 115 |
| BIBLIOGRAPHIE | 132 |

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

Les phytovirus sont à l'origine de graves difficultés économiques car ils provoquent la destruction de nombreuses plantes cultivées ou les rendent impropres à la consommation. Composés à 95% de virus à ARN, et plus particulièrement à ARN de polarité positive, il existe cependant trois familles de phytovirus ayant un génome à ADN : les *Geminiviridae*, les *Nanoviridae* et les *Caulimoviridae*. Le génome des *Geminiviridae* est formé d'une ou deux molécules d'ADN circulaire simple-brin renfermée(s) dans une double-capside icosaédrique jumelée et celui des *Nanoviridae*, de plusieurs molécules d'ADN circulaire monocaténaire, chaque molécule étant contenue dans une capsidie isométrique. En revanche, l'information génétique des membres de la famille des *Caulimoviridae* est portée par une molécule unique d'ADN circulaire double-brin. Cette dernière est répliquée par la transcription inverse d'un ARN pré-génomique et reste sous forme épisomale dans le noyau de la cellule hôte (quelques cas d'intégration accidentelle dans l'ADN nucléaire ont été décrits ces dernières années (Staginnus et Richert-Poggeler, 2006). Cette caractéristique a amené les *Caulimoviridae* à être classés dans le super-groupe des pararétrovirus, comprenant également les *Hepadnaviridae* spécifiques des animaux (Rothnie *et al.*, 1994).

Les virus de la famille des *Caulimoviridae* ont été classés en six genres par l'ICTV (*International Committee of Taxonomy of Viruses*) : les *Badnavirus*, les *Tungrovirus*, les *Petuvirus*, les *Cavemovirus*, les *Soymovirus* et les *Caulimovirus*. Ils infectent diverses cultures et sont répartis géographiquement dans les zones tempérées. Cependant, les *Tungrovirus* et les *Badnavirus* sont également présents dans les zones tropicales infectant par exemple, les plantations de riz, de bananiers, de cacaoyers ou de cannes à sucre.

Les virus des deux premiers genres possèdent une capsidie balliciforme alors que ceux des quatre autres genres ont une capsidie icosaédrique. Les *Caulimoviridae* présentent des similitudes dans leur organisation génomique bien que le nombre de cadres ouverts de lecture ou ORF (pour *Open Reading Frame*) varie d'un genre à l'autre, les amenant à produire leurs protéines virales matures par des stratégies d'expression différentes.

Les *Badnavirus* dont le membre-type est le virus de la bigarrure jaune de la comméline (ou CoYMV pour *Commelina Yellow Mottle Virus*) et les *Tungrovirus* représentés par le virus balliciforme du tungro du riz (RTBV pour *Rice Tungro Balliciform Virus*) possèdent respectivement trois et quatre ORF. Leurs génomes ne présentent que 20 à 25% d'homologie de séquences. Les *Petuvirus* dont le membre-type est le virus de l'éclaircissement des nervures du pétunia (PVCV pour *Petunia Vein Clearing Virus*), ont un ADN portant un ORF unique alors que les *Cavemovirus*, le représentant est le virus de la mosaïque des nervures du manioc (CVMV pour *Cassava Vein Mosaic Virus*), ont un génome comportant cinq ORF. L'ADN des *Soymovirus* renferme sept ORF ; ce genre

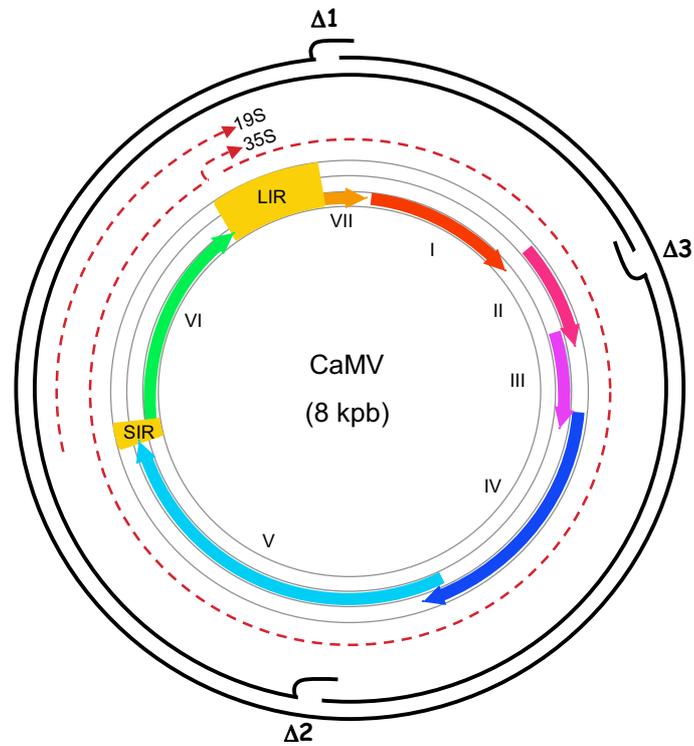


Figure 1 : Structure du génome du CaMV (Souche *Cabb-J1*). Le génome circulaire à ADN double-brin du CaMV est schématisé par deux traits noirs épais à l'extérieur. Les interruptions de séquences (Δ) sont représentées et sont au nombre de 3 pour cette souche de CaMV. Les transcrits 35S et 19S sont en rouge et en pointillés. Au centre, la position des sept ORF du CaMV (I à VII), tous dans la même orientation, sont représentés en fonction de leur phase de lecture et apparaissent sous forme de larges flèches de couleurs. Les boîtes jaunes correspondent à la grande (LIR) et à la petite (SIR) région intergénique.

est représenté par le virus des marbrures chlorotiques du soja (SbCMV pour *Soybean Chlorotic Mottle Virus*). Enfin, le génome des virus du genre *Caulimovirus* dont le membre-type est le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV pour *Cauliflower Mosaic Virus*) compte six ORF.

I Le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV)

Le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) fut le premier phytovirus à ADN découvert (Shepherd *et al.*, 1970) et, à être intégralement séquencé (Franck *et al.*, 1980). Il fut considéré pendant un certain temps comme un vecteur viral prometteur pour l'expression de gènes hétérologues dans les plantes mais il fut vite abandonné d'une part, parce que son génome à ADN double-brin ne tolère que des insertions de petite taille et d'autre part, parce que l'essor de la génétique inverse a permis d'utiliser des virus à ARN comme vecteur d'expression. Néanmoins, le CaMV est toujours d'actualité, notamment grâce à son promoteur 35S qui est très utilisé en recherche fondamentale et appliquée, car il permet une très forte expression tissu-non-spécifique de gènes clonés sous son contrôle.

I.1. Structure de la particule virale et du génome

Le CaMV est constitué d'une capsidie non enveloppée à symétrie icosaédrique de 53 nm de diamètre qui comprend 420 sous-unités protéiques organisées selon une symétrie d'ordre T=7 (Cheng *et al.*, 1992). Son génome à ADN bicaténaire circulaire (Figure 1) a une taille d'environ 8 000 pb (paires de bases) et présente des interruptions de séquences dont le nombre et la position varient d'une souche à l'autre. Le brin (-) en possède une seule alors que le brin (+) en renferme jusqu'à trois (Hull et Covey, 1983). Ces discontinuités appelées Δ forment des structures triple-brins dont l'extrémité 5' commence par une séquence ribonucléotidique ; elles sont inhérentes au mode de répllication par rétrotranscription. Elles seront réparées par des enzymes cellulaires dans le noyau de la cellule hôte puis le génome sera associé aux histones cellulaires pour former un minichromosome comprenant 42 ± 1 nucléosomes.

Le génome du CaMV comprend sept cadres ouverts de lecture (ORF I à ORF VII), cependant l'expression de l'ORF VII reste hypothétique dans la mesure où la protéine correspondante n'a jamais été détectée dans les plantes infectées. C'est pourquoi l'ICTV ne considère que six ORF dans l'organisation génétique de l'ADN des *Caulimovirus*. Les ORF sont tous localisés sur le brin (-) de l'ADN, et sont chevauchants ou séparés de quelques nucléotides, exception faite de l'ORF VI. Ce dernier est situé entre deux régions intergéniques longues respectivement de 150 et 700 pb environ qui renferment les séquences régulatrices. Une ou plusieurs fonctions importantes pour la biologie du virus ont été associées aux produits des ORFs I à VI (protéines P1 à P6) et sont présentées brièvement

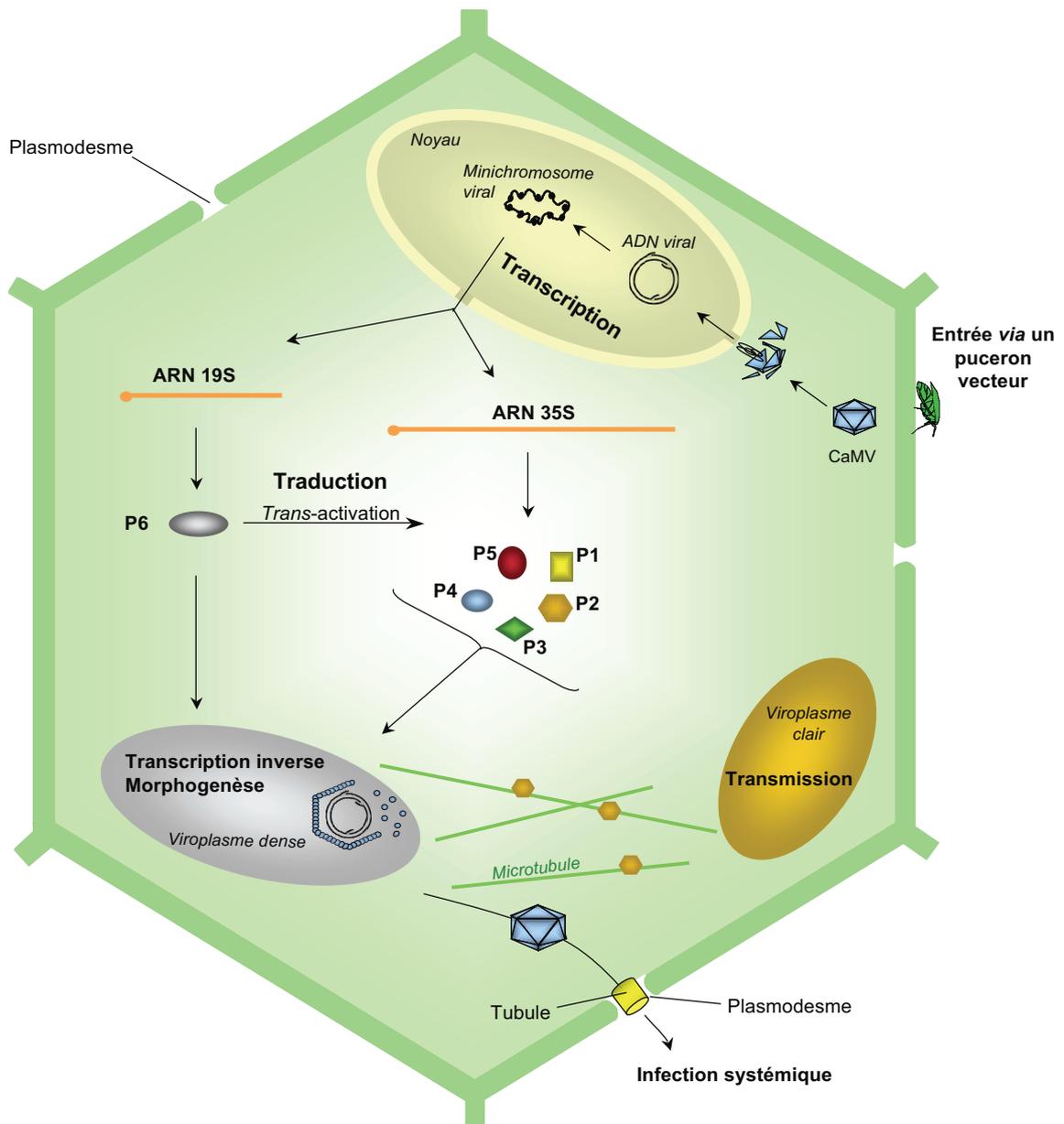


Figure 2. Cycle infectieux du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). La particule virale est introduite dans la cellule hôte par l'intermédiaire d'un puceron vecteur. Après décapsidation, l'ADN viral est importé dans le noyau où il est converti en minichromosome. Il est transcrit par l'ARN polymérase II en un ARN 19S et un ARN 35S qui sont coiffés et polyadénylés. L'ARN 35S est traduit grâce à la protéine P6 qui est exprimée à partir de l'ARN 19S, pour donner naissance aux protéines P1 à P5. La protéine P6 forme des viroplasmes denses où s'effectuent la synthèse de l'ADN par transcription inverse de l'ARN 35S et la morphogenèse des virions. Après migration le long des microtubules depuis les viroplasmes denses, la protéine P2 forme les viroplasmes clairs contenant aussi la protéine P3 et des virions. Les viroplasmes clairs sont impliqués dans la transmission. Les particules virales infectent les cellules adjacentes en traversant des tubules élaborés dans les plasmodesmes, suite à la polymérisation de la protéine P1. Les fonctions associées aux protéines du CaMV sont : P1, mouvement du virus de cellule à cellule ; P2 et P3, transmission du virus de plante à plante par des pucerons ; P3 est également impliquée dans le mouvement ; P4, précurseur de la protéine de capside ; P5, précurseur d'une protéinase à acide aspartique et de la transcriptase inverse ; P6, protéine majeure des viroplasmes denses, *transactivation* de la traduction de l'ARN 35S, spécificité d'hôte et symptomatologie.

dans la légende de la figure 2 qui illustre de manière schématique le cycle de multiplication du CaMV. Les fonctions et le mode d'action des protéines du CaMV seront décrits en détail ultérieurement.

I.2. Expression du génome

I.2.1 Transcription et épissage alternatif

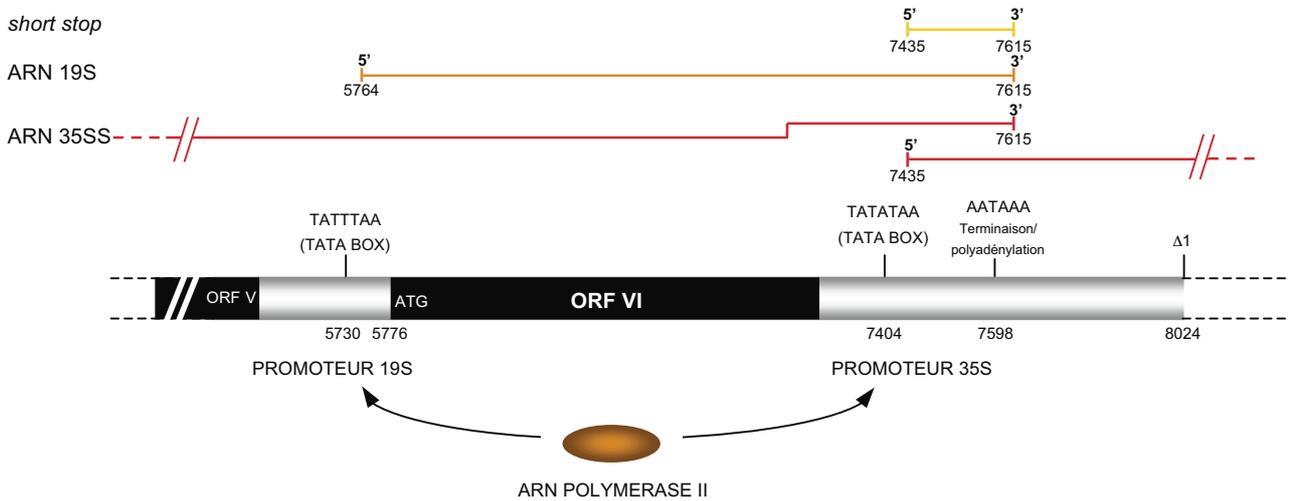
Le brin (-) de l'ADN viral est transcrit dans le noyau par l'ARN polymérase II cellulaire en deux transcrits majeurs coiffés et polyadénylés : l'ARN 35S dit pré-génomique et l'ARN 19S subgénomique. D'autres ARN subgénomiques ont été décrits comme l'ARN 22S qui serait produit par un promoteur putatif localisé dans l'ORF IV ; il servirait à l'expression de l'ORF V, néanmoins sa fonctionnalité n'a pas été démontrée (Plant *et al.*, 1985).

L'ARN 35S est produit à partir du promoteur du même nom présent dans la grande région intergénique (LIR). Le promoteur 35S, fort et constitutif, possède les motifs de reconnaissance typiques de l'ARN polymérase II cellulaire et des séquences «*enhancer*» amplifiant le taux de transcription (Figure 3A). L'ARN 35S correspond à la transcription du génome complet additionné de 180 nucléotides donnant lieu à des extrémités redondantes (R). Cette extension est due à l'ARN polymérase II qui ne s'arrête que lors de son second passage au niveau du site de polyadénylation/d'arrêt de la transcription situé 180 nt (nucléotides) en aval du site d'initiation de la transcription (Sanfacon et Hohn, 1990). Cependant, il arrive que la polymérase s'arrête lors du premier passage produisant un ARN court de 180 nt de long appelé «*short stop*». Le site de polyadénylation comporte la séquence classique AAUAAA et détermine le clivage de l'ARN 35S, 13 nt en aval (Sanfacon *et al.*, 1991).

L'ARN 35S sert de messenger polycistronique pour la synthèse des protéines virales P1 à P5 mais également de matrice pour la répllication par transcription inverse ; c'est pour cette raison qu'il est dit pré-génomique.

L'ARN 35S subit un épissage alternatif (Figure 3B) ; les transcrits épissés représentent plus de 70% des messagers d'origine 35S présents dans une plante infectée. Il possède quatre sites donneurs d'épissage (D1 à D4), un (D1) dans la région 5' non traduite, trois (D2-D4) localisés en 3' de l'ORF I, et un site accepteur unique (Acc) dans l'ORF II (Kiss-Laszlo *et al.*, 1995). Selon l'utilisation des sites donneurs, l'épissage génère des ARN messagers dont l'ORF majeur 5' proximal est l'ORF III ou un ORF résultant de la fusion de la région 5' de l'ORF I avec la région 3' de l'ORF II. L'épissage de l'ARN 35S est primordial car la mutation du site accepteur est létale pour le CaMV. Des études récentes montrent que l'épissage permet en fait de limiter l'expression de l'ORF II, l'accumulation de la protéine P2 étant toxique pour la cellule. La délétion de l'ORF II ou l'expression d'une protéine P2

A



B

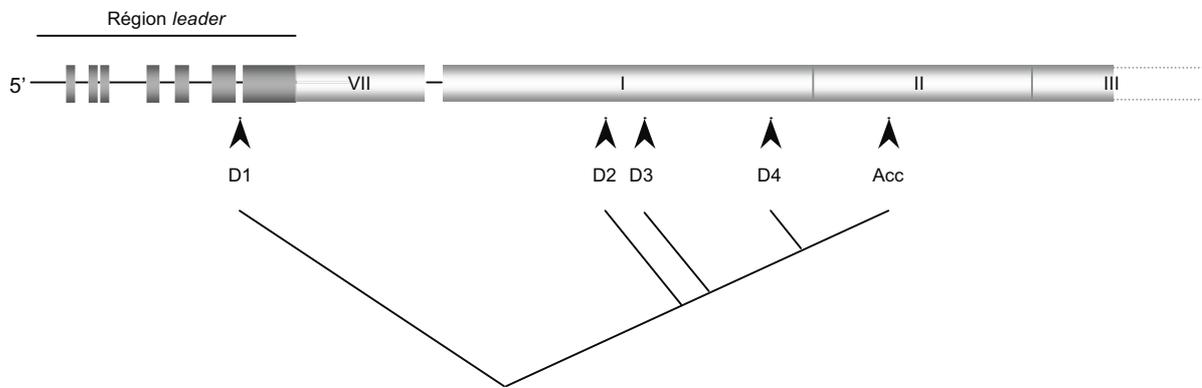


Figure 3 : Représentation schématique des régions régulatrices du génome du CaMV, des transcrits et des sites d'épissage de l'ARN 35S. A. Les régions régulatrices. La portion du génome du CaMV renfermant les deux régions intergéniques sont représentés sous forme d'un rectangle gris. Les ORF inclus dans cette portion sont visualisés par des boîtes noires. Les éléments régulateurs (TATA box et site de terminaison) sont positionnés et la correspondance nucléotidique est numérotée en dessous. Les sites de reconnaissance par l'ARN polymérase II sont représentés par des flèches (Franck *et al.* 1980). La position des extrémités 5' et 3' des transcrits du CaMV (traits colorés) figurent au-dessus de la partie génomique. B. Les sites d'épissage de l'ARN 35S. La moitié 5' de l'ARN 35S est représentée. Les sORF localisées dans la partie 5' non traduite sont en gris foncé, les premiers ORF majeurs en gris clairs. Les quatre sites donneurs (D1 à D4) et le site accepteur (Acc) d'épissage sont représentés par des têtes de flèche.

instable est suffisante pour rétablir l'infectivité du CaMV dont le site accepteur est défectif (Froissart *et al.*, 2004). La stratégie mise en oeuvre par le virus pour réguler l'épissage de l'ARN 35S est encore inconnue à l'heure actuelle. Néanmoins, elle doit être finement régulée car l'ARN 35S doit subsister sous forme intacte pour permettre la synthèse des protéines P1 et P2 et pour jouer son rôle de matrice pour la rétrotranscription. Il n'est pas exclu que le CaMV sauvegarde l'ARN pré-génomique comme les rétrovirus, par le biais d'une protéine virale qui limite l'accessibilité des séquences de reconnaissance par la machinerie d'épissage. L'exemple le mieux connu est celui de la protéine Rev du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1), qui suite à son expression à partir des messagers épissés, se localise au sein du noyau puis interagit au niveau de la séquence RRE (*Rev Recognition Element*) de l'ARN rétroviral empêchant ainsi son épissage. Par ailleurs, la liaison de la protéine Rev favorise également l'exportation nucléaire d'ARN complets et mono-épissés, indispensables pour la synthèse des protéines Gag, Pol et Env. La protéine P6 qui porte des domaines de fixation aux acides nucléiques a récemment été caractérisée comme étant une protéine nucléo-cytoplasmique alors qu'elle avait toujours été considérée comme exclusivement cytoplasmique (Haas *et al.*, 2005). De ce fait, il n'est pas impossible qu'elle exerce une fonction similaire à la protéine Rev.

L'ARN 19S est exprimé grâce au promoteur 19S situé dans la petite région intergénique (SIR), longue de 150 nucléotides. Ce promoteur, faible hors contexte viral, voit son activité amplifiée grâce aux séquences *enhancer* du promoteur 35S de sorte que la quantité d'ARN 19S produite au cours du cycle infectieux est similaire à celle de l'ARN 35S. L'ARN 19S est monocistronique ; il permet la synthèse de la protéine P6. Il est colinéaire à la partie 3' de l'ARN 35S étant donné que l'ARN polymérase II utilise le même signal de polyadénylation que celui dictant l'arrêt de la synthèse de l'ARN 35S.

I.2.2 La réplication par transcription inverse

L'étape de réplication du CaMV se déroule dans le cytoplasme au niveau des viroplasmes denses (Mazzolini *et al.*, 1989) qui sont des corps d'inclusion résultant de l'assemblage de la protéine P6. La réplication par transcription inverse des *Caulimovirus* se déroule durant la phase tardive du cycle viral alors qu'elle a lieu au cours de la phase précoce chez les Rétrovirus (avant la décapsidation du génome).

La transcriptase inverse du CaMV utilise comme amorce l'ARNt^{Mt} initiateur qui s'hybride au niveau du site dit PBS (*Primer Binding Site*) de l'ARN 35S, à environ 600 nucléotides de son extrémité 5' (Figure 4). La synthèse du brin d'ADN de polarité négative (ou brin (-)) s'interrompt en 5' de l'ARN, générant ainsi un segment chimérique formé en 5' de l'ARNt et en 3' d'une séquence d'ADN simple-brin correspondant à la séquence 5' terminale de l'ARN pré-génomique. La séquence

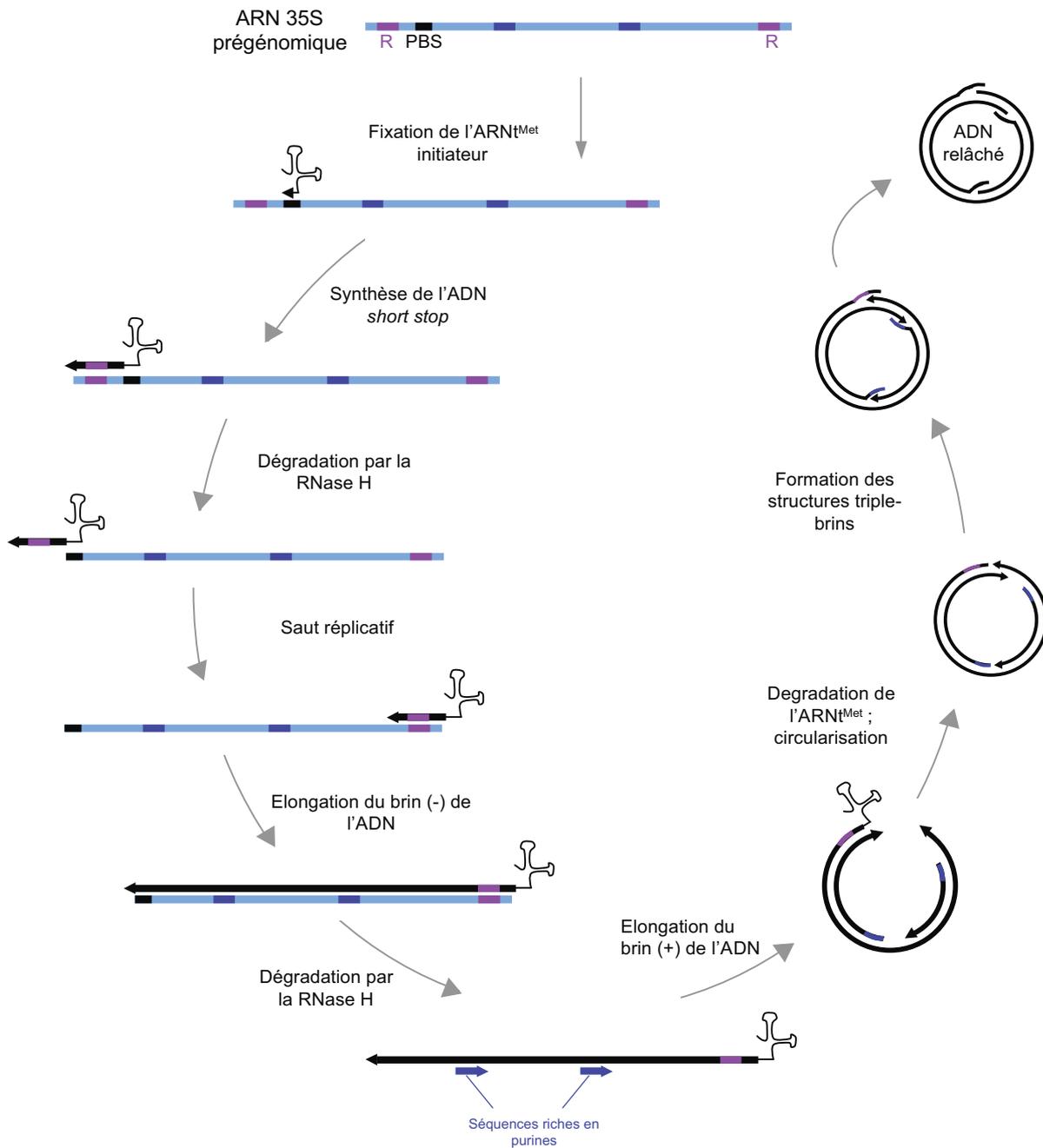


Figure 4 : La réplication de l'ADN du CaMV. L'ARN 35S (trait bleu) sert de matrice pour la transcription inverse et l'ARN^{Met} initiateur d'amorce. Il se fixe au niveau de la séquence PBS (tiret noir) puis l'ADN *strong stop* est synthétisé (trait noir épais). Après sa libération par dégradation de l'ARN complémentaire par la RNase H, l'ADN réalise un saut réplicatif grâce aux séquences redondantes (tirets mauves) en 5' et 3' de l'ARN, ce qui permet la synthèse du brin (-) d'ADN. La RNase H dégrade l'intégralité de l'ARN 35S à l'exception de deux séquences riches en purines. Ces dernières servent d'amorces pour la synthèse des brins (+). La réplication du génome est finalisée après circularisation du brin (-) de l'ADN.

d'ADN est libérée par l'activité RNase H, associée à la transcriptase inverse, qui dégrade le fragment d'ARN auquel elle est appariée. Elle s'apparie ensuite à la séquence redondante R complémentaire en 3' de l'ARN après avoir réalisée un saut réplicatif intra- ou inter-chaîne. Elle sert alors d'amorce pour la synthèse du brin (-) complet. Au cours de la synthèse de ce brin, l'ARN matriciel va être dégradé par la RNase H, à l'exception de séquences riches en purines ; l'ARN des souches Cabb S et Cabb JI en possèdent deux. Ces dernières vont servir d'amorces pour la synthèse des brins d'ADN de polarité positive (brins (+)). L'élongation de l'un des deux brins (+) est bloquée lorsque celui-ci arrive au niveau de l'extrémité 5' du brin (-) et ne pourra se poursuivre qu'après appariement avec la région 3' du brin (-). Ceci conduit à la circularisation de l'ADN viral et à la formation de la première interruption de séquence triple-brins (Δ). La synthèse des deux brins positifs continue jusqu'à ce qu'elle soit arrêtée par le brin situé en amont. Ce dernier est alors déplacé sur une distance de quelques nucléotides conduisant à l'apparition de deux autres structures Δ . Le génome viral, enfermé dans sa capsid, va infecter les cellules adjacentes ou entrer dans le noyau pour démarrer un nouveau cycle viral. En effet, le noyau d'une cellule infectée referme plus d'une centaine de minichromosomes suggérant une réinfection régulière du noyau au cours du cycle infectieux.

I.2.3 La synthèse des protéines virales

L'information génétique portée par les virus est généralement très compacte. Pour exprimer leurs gènes à partir d'ARN polycistroniques, bon nombre de virus dont le CaMV développent des stratégies non canoniques pour initier la synthèse de leurs protéines. Ils doivent aussi entrer en compétition avec la machinerie traductionnelle de l'hôte pour assurer une production optimale de leurs protéines à partir des ARN viraux.

L'initiation de la traduction chez les eucaryotes débute par la reconnaissance d'un codon AUG initiateur suite au balayage (ou *scanning*) linéaire par les ribosomes de l'extrémité 5' non traduite de l'ARN messenger (région *leader*) (Kozak, 1986 ; Kozak, 2002). Brièvement, le complexe d'initiation (43S) comprenant la sous-unité ribosomique 40S associée à l'ARNt^{Met} initiateur et aux facteurs d'initiation de la traduction, se fixe à l'ARNm de manière coiffe-dépendante puis migre le long de la séquence d'ARN jusqu'à rencontrer le premier AUG en contexte favorable. Chez les plantes, ce contexte correspond à la séquence A/GACAAUGGC comprenant une purine en position -3 et une guanine en +4.

L'ARN 35S du CaMV comporte deux éléments inhibiteurs de la traduction : l'organisation structurale de la région 5' non traduite de l'ARN 35S et la présence de plusieurs ORF rendant l'ARN polycistronique. En effet, la région *leader* comprend une tige-boucle très stable ($\Delta G = -67,7$ kCal) jalonnée de 6 à 8 petits ORF (sORF) codant pour des peptides de 3 à 30 acides aminés (Figure 5). La

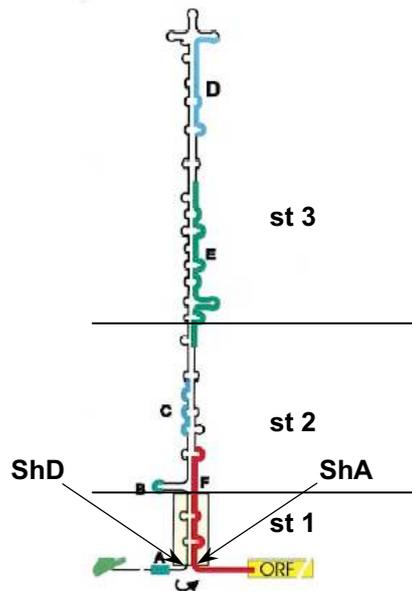


Figure 5 : Organisation de la structure secondaire de la région « leader » de l'ARN 35S du CaMV (d'après Dominguez *et al.*, 1998). La structure en tige-boucle présente dans la séquence *leader* permet de rapprocher le sORF A de l'ORF VII. Elle contient trois sections hélicoïdales (st1 à st3) se différenciant par leur stabilité. Les sites donneur (ShD) et accepteur (ShA) du saut du ribosome sont indiqués. La structure minimale requise pour le saut du ribosome est encadrée.

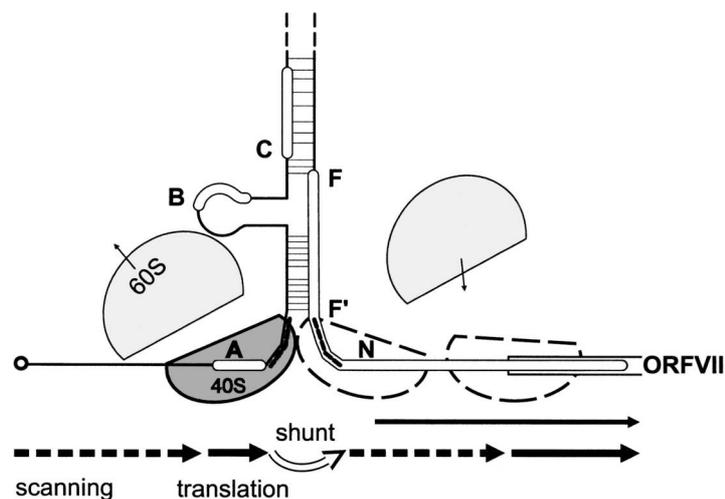


Figure 6 : Modèle du saut du ribosome proposé par Ryabova et Hohn (2000). Seule, la base de la structure secondaire de la séquence « leader » est présentée. Les sites donneur et accepteur du saut sont indiqués par des traits gras à la base de la tige-boucle. La progression du ribosome sur l'ARN 35S est schématisé par des flèches en pointillées pour le « scanning », pleines pour la traduction et blanche, pour le saut. La sous-unité 40S se fixe à l'extrémité coiffée de l'ARN 35S et migre jusqu'au codon d'initiation du sORF A. La traduction de ce dernier produit une sous-unité 40S compétente pour le saut. Une fois, sur le site accepteur du saut, la sous-unité 40S va scanner le messenger jusqu'à ce qu'elle atteigne l'AUG initiateur de l'ORF VII. Certains ribosomes peuvent initier la traduction au niveau de codons non-AUG situés en amont de cet ORF (site noté N), mais ces événements de traduction sont plus rares.

traduction des sORF va conduire au relargage des ribosomes au moment de la terminaison et ainsi limiter leur accès aux ORF majeurs qui sont situés en aval de la tige-boucle. Enfin, l'ARN 35S est polycistronique alors que le système eucaryotique traduit principalement des messagers monocistroniques. Le CaMV lève l'effet inhibiteur de ces deux éléments grâce à deux stratégies : le saut du ribosome ou *ribosomal shunt* et la réinitiation de la traduction (pour revue, Ryabova *et al.*, 2002).

I.2.3.1. Le saut du ribosome

Le saut du ribosome est un mécanisme permettant aux ribosomes de court-circuiter une structure secondaire très stable pour initier la traduction en aval de cette structure. Ce mécanisme a été découvert initialement chez le CaMV (Futterer *et al.*, 1990), mais d'autres pararétrovirus et des virus animaux l'utilisent également comme le virus Sendaï (Latorre *et al.*, 1998), le papillomavirus humain (Remm *et al.*, 1999), les adénovirus (Yueh et Schneider, 2000) ou encore le virus de l'hépatite B du canard (Sen *et al.*, 2004).

Les deux éléments nécessaires au saut du ribosome chez le CaMV et chez d'autres *Caulimoviridae* sont un sORF 5' proximal (sORF A) qui se termine face à la première section (stem 1) de la tige-boucle, et la structure secondaire car elle permet le rapprochement spatial du sORF avec le premier ORF majeur (ORF VII) en aval (Figure 5). Cependant, le deuxième sORF (sORF B), localisé dans la tige-boucle, permet aussi le saut du ribosome (Ryabova *et al.*, 2000). Selon le modèle du saut chez le CaMV proposé par Hohn et ses collaborateurs, le complexe ribosomique 43S d'initiation de la traduction se fixe sur la coiffe en 5' de l'ARN pré-génomique puis migre jusqu'à l'AUG du sORF A où s'effectue la jonction avec la sous-unité 60S du ribosome (Figure 6). Cet sORF (3 codons) est traduit par la majorité des ribosomes. Après relargage du tripeptide, étape indispensable, le ribosome se dissocie, mais des sous-unités 40S restent associées à l'ARN et vont court-circuiter la tige-boucle par un saut et atterrir au niveau d'un site dit accepteur du saut. Il est admis que le temps nécessaire pour l'expression du sORF A est trop court pour que les facteurs d'initiation soient relargués. De ce fait, les sous-unités 40S restent compétentes pour la traduction et réinitieront la traduction du premier ORF majeur (pour revue, Ryabova *et al.*, 2006).

L'efficacité du saut du ribosome est déterminée par la taille du sORF A, la longueur optimale étant comprise entre 2 et 15 codons et, par la distance entre le codon stop du sORF A et la base de la tige-boucle, de 5 à 10 nucléotides (Pooggin *et al.*, 2000 ; Hemmings-Mieszcak *et al.*, 2000).

Il faut signaler que l'efficacité du saut du ribosome est trois fois supérieure en présence de la protéine P6 du CaMV bien qu'on ne connaisse pas encore le mécanisme sous-jacent (Pooggin *et al.*, 2006).

I.2.3.2. La réinitiation de la traduction

L'ARN 35S des virus du genre *Caulimovirus* permet la traduction des ORF I à V voire celle de l'ORF VI, le ribosome pouvant scanner sur une longue distance. L'ARN 19S sert de messenger spécifique pour la protéine P6 vu qu'il ne porte que l'ORF VI. Les études réalisées montrent que l'ARN 35S est traduit *via* un mécanisme de relais (*relay race*) au cours duquel le ribosome ne se dissocie pas complètement de l'ARN après la traduction du premier ORF mais réinitie celle des ORF en aval (Dixon et Hohn, 1984). Dans les protoplastes, la traduction d'une construction bicistronique possédant l'ORF VII suivi de l'extrémité 5' de l'ORF I en phase avec le gène rapporteur de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) ne conduit qu'à une faible synthèse de cette dernière. La séquence de l'ORF I n'est pas en cause car l'activité de CAT reste infime même si elle est remplacée par d'autres séquences virales (ORF II à V). En revanche, la co-expression de l'ORF VI à partir d'un ARN monocistronique permet la traduction des deux ORF de la construction bicistronique. Ce sont ces expériences qui ont mis à jour la fonction de transactivateur traductionnel de la protéine P6 (Bonnevillie *et al.*, 1989 ; Futterer et Hohn, 1991). Le rôle de transactivateur de P6 a été confirmé *in planta*. En effet, une plante transgénique codant pour un ARNm bicistronique exprime les deux protéines lorsqu'elle est infectée par le CaMV ou lorsqu'elle produit P6 à partir d'un second transgène (Zijlstra et Hohn, 1992). Dès lors, de nombreuses études ont été réalisées pour élucider le mode d'action de P6 (voir § II.5.2). Elles ont montré que la protéine virale engage des interactions avec différentes protéines de la machinerie traductionnelle de l'hôte permettant ainsi aux ribosomes de réinitier la traduction d'ARN polycistroniques (pour revue, Ryabova *et al.*, 2002).

Le mécanisme de réinitiation de la traduction de l'ARN 35S est indépendant de la distance entre deux ORF consécutifs. En effet, il s'opère que la distance soit courte (quatre nucléotides) ou longue de 700 nucléotides, bien que les ORF du CaMV soient proches les uns des autres. En revanche, si deux ORF se superposent, la réinitiation n'est efficace que pour un chevauchement court (17 nucléotides), une séquence plus longue, de l'ordre de 130 nucléotides, ayant un effet inhibiteur. Le recul du ribosome vers l'extrémité 5' de l'ARN pour réinitier la traduction est par conséquent très limité (Futterer et Hohn, 1991). Cette contrainte explique sans doute pourquoi les ORF ne sont que faiblement chevauchants.

I.4. La transmission du CaMV

La transmission des virus de plantes s'effectue par le biais d'agents vecteurs : arthropodes (insectes et acariens) pour la partie aérienne de la plante et, nématodes et champignons telluriques pour la partie racinaire. Les virus sont prélevés puis introduits dans la plante au cours de la prise

alimentaire des arthropodes et des nématodes. La transmission des phytovirus par les champignons a lieu grâce aux zoospores contaminés.

Le CaMV est transmis par un aphide, le puceron *Myzus persicae* selon le mode dit non-circulant, c'est-à-dire que les virions restent localisés au niveau du stylet et/ou de l'œsophage du puceron (par opposition au mode circulant, au cours duquel des particules virales traversent le tube digestif du vecteur puis gagnent les glandes salivaires). Dans la nature, aucune transmission par la graine, le pollen ou de propagation par le contact entre plantes n'a jamais été observée pour le CaMV. Cependant, ce dernier peut être inoculé mécaniquement au laboratoire grâce à l'utilisation d'abrasif créant des microlésions sur les feuilles (Matériel et Méthodes).

Bon nombre de virus de plantes utilisent une protéine non-structurale virale (appelée dans ce cas précis *helper*) pour créer un lien moléculaire entre la particule virale et un récepteur cellulaire de l'agent vecteur. Le CaMV est le seul exemple de phytovirus nécessitant deux facteurs viraux pour sa transmission, les protéines P2 et P3 (Leh *et al.*, 1999). Des analyses récentes montrent que la protéine P2 se localise à l'extrémité distale des stylets maxillaires, en dessous de la jonction des canaux alimentaires. De plus, divers traitements chimiques suggèrent très fortement que le récepteur est de nature protéique (Uzest *et al.*, 2007).

Des tests de transmission effectués en faisant ingérer à des pucerons, à intervalles réguliers, des solutions contenant les acteurs de la transmission (P2, P3 et particules virales), seuls ou en combinaison et, en faisant varier l'ordre d'ingestion, ont montré le besoin d'une interaction préalable entre la protéine P3 et la particule virale. En effet, après ingestion de la protéine P2, l'ajout successif de protéine P3 puis de particules virales purifiées ne permet pas la transmission. En revanche, elle est possible si P3 est déjà présente sur la particule virale, rendant la particule virale compétente pour la transmission (Drucker *et al.*, 2002). De plus, les différents composants sont séparés spatialement dans la cellule infectée. La protéine P2 est présente majoritairement dans les viroplasmes clairs qui ne contiennent que 4% de particules virales associées à la protéine P3 ; ces dernières sont localisées dans les viroplasmes denses (Drucker *et al.*, 2002). Les auteurs ont proposé un modèle d'acquisition séquentielle du virus par le puceron (Figure 7). Ainsi, lors d'une première prise alimentaire, le puceron aspire une partie du contenu cellulaire dans son stylet incluant des viroplasmes clairs et/ou denses. Dans le cas d'une absorption de viroplasmes clairs, celui-ci se désintègre libérant P2, P3 et quelques rares complexes P2:P3:virion. La P3 libérée sera ingérée puis perdue tandis que la protéine P2 et les quelques complexes P2:P3:virion seront retenus au niveau de la cuticule du stylet. Lors de la prise alimentaire suivante, les complexes P3:virion pourront être efficacement acquis par le puceron, en interagissant avec la protéine P2 associée à son récepteur.

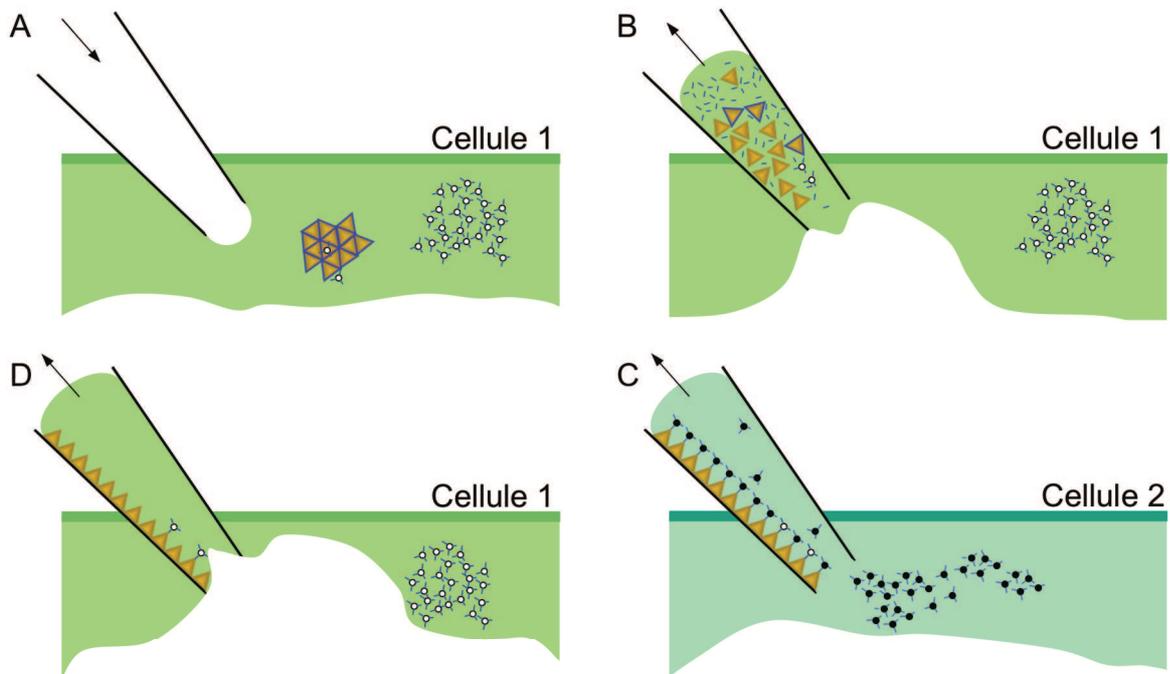


Figure 7 : Mécanisme d'acquisition séquentielle du CaMV par les aphides, d'après Drucker *et al.* 2002.

(A) Dans une cellule de plante infectée, les composants viraux impliqués dans la transmission sont séparés entre les viroplasmes clairs (structure de gauche) et les viroplasmes denses (structure de droite). La plupart des particules virales (sphères blanches) associées à la protéine P3 (traits bleus) sont localisés dans les viroplasmes denses alors que les viroplasmes clairs contiennent la protéine P2 (triangles oranges) associée à la P3 et quelques virions. Lorsque le stylet d'un aphide transperce la membrane cytoplasmique, il injecte de la salive dans la cellule. (B) L'aphide va aspirer une partie du contenu cellulaire incluant des corps d'inclusion viraux. Si un viroplasm clair est ingéré, il va se désagréger libérant ainsi les molécules de P2, de P3 et quelques complexes P2:P3:virion. (C) Si la protéine P3 libérée est perdue, la P2 et les quelques complexes P2:P3:virion vont par contre s'ancrer sur la cuticule du stylet. L'agent vecteur, chargé en P2, est alors compétent pour la transmission et prêt pour l'acquisition de nombreuses particules virales associées à la P3 (sphère noire) de la même cellule ou (D) d'une autre cellule lors d'une nouvelle ponction.

I.5. CaMV et pathogenèse

Le CaMV a une spécificité d'hôte relativement restreinte puisqu'il n'infecte que des plantes de la famille des crucifères à l'exception des souches D4 et W260 du CaMV qui peuvent également infecter des plantes des genres *Datura* et *Nicotiana* appartenant à la famille des *Solanaceae*. Après inoculation, les symptômes apparaissent dans un délai de 2 semaines. Ils sont reconnaissables par l'apparition de chlorose sur les feuilles donnant un aspect de mosaïque jaune-verte, un éclaircissement des nervures, un gaufrage des feuilles et un nanisme de la plante hôte (Figure 8A et B) (Melcher, 1989). La sévérité des symptômes dépend de la nature de la plante hôte, de la souche virale ainsi que des conditions environnementales (Wintermantel *et al.*, 1993). La spécificité d'hôte et la symptomatologie du CaMV ont été attribuées entre-autres à la protéine P6 (voir § II.5.1).

L'infection par le CaMV induit de nombreux mécanismes de défense chez la plante dépendant à la fois de l'hôte et de la souche virale. Par exemple, la souche W260 déclenche une réponse hypersensible (HR) chez *Nicotiana edwardsonii*. Ce mode de défense, commun à plusieurs pathogènes, induit la mort cellulaire des tissus primo-infectés et restreint le pathogène dans cette zone. Pendant une infection par W260 de *Nicotiana clevelandii*, la mort cellulaire est systémique, elle n'apparaît qu'après le développement des symptômes. Elle semble résulter d'une interaction entre P6 et le produit du gène *ccd1* (pour *CaMV Cell Death*) (Kiraly *et al.*, 1999). En revanche, la souche D4 est parfaitement infectieuse chez ces deux solanacées où elle provoque des chloroses foliaires. La réaction d'hypersensibilité à W260 ou l'induction de symptômes pour D4 a été corrélée à la présence de la protéine P6. L'infiltration de feuilles de *Nicotiana clevelandii* par des souches d'*Agrobacterium* portant l'ORF VI de CaMV est suffisante pour induire les réactions propres à chaque souche virale. Ainsi P6 est un éliciteur qui serait reconnu par des facteurs de l'hôte (Palanichelvam *et al.*, 2000).

Plus récemment, Love et ses collaborateurs (2005) ont montré que le CaMV induit trois voies de défenses générales chez *Arabidopsis thaliana*, celle de l'acide salicylique (SA), la réponse à l'éthylène et la voie oxydative (ROS). En utilisant des plantes exprimant un rapporteur sous contrôle du promoteur d'un gène spécifique à chacune de ces voies de signalisation, il a pu être observé que l'infection par le CaMV déclenche les voies de l'éthylène/jasmonate et oxydative deux heures après inoculation du virus. En revanche, la voie de l'acide salicylique n'est induite que huit jours après inoculation et de ce fait, ne jouerait pas de rôle dans la susceptibilité au CaMV. De plus, l'inoculation de l'ADN viral au lieu des particules de CaMV montre un délai de 24 à 48h pour l'activation de ces voies (Love *et al.*, 2005). Selon les auteurs, ceci suggère que la capsid virale pourrait être l'élément inducteur.

Enfin le CaMV induit le RNA silencing, préférentiellement au niveau post-transcriptionnel (PTGS, *Post-transcriptional Gene Silencing*) mais également au niveau transcriptionnel (TGS,

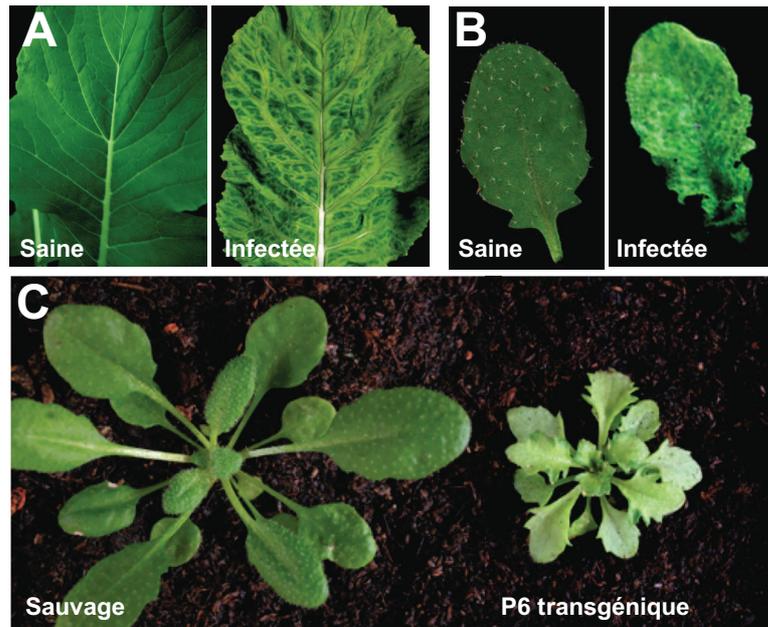


Figure 8 : Symptômes développés par *Arabidopsis thaliana* et le navet au cours de l'infection par le CaMV et par des plantes d'*Arabidopsis* transgénique exprimant P6. A et B. Photographies de feuilles de navet (A) ou d'*Arabidopsis* (B) saines ou infectées par le CaMV. C. Photographie de plantes d'*Arabidopsis* (écotype Columbia) sauvage ou exprimant la protéine P6 à partir d'un transgène. La lignée transgénique a été générée au laboratoire.

Transcriptional Gene Silencing) (Al-Kaff *et al.*, 1998). Ainsi, le transgène rapporteur *gus* (codant pour la β -glucuronidase), sous contrôle des éléments promoteur et terminateur 35S du CaMV, est « silencé » au cours d'une infection par ce virus dans les feuilles systémiques alors qu'il est exprimé dans les feuilles asymptomatiques. L'analyse des feuilles systémiques montre que le silencing du rapporteur se déroule préférentiellement dans les tissus chlorotiques où le génome viral est sous forme super-enroulé, alors que le gène *gus* est moins réprimé dans les portions où le génome est activement transcrit. De plus, le silencing du transgène induit par le CaMV est également transcriptionnel car il cible le promoteur 35S en présence d'un terminateur autre que celui du virus (Al-Kaff *et al.*, 2000). Plus récemment, il a été découvert que l'ARN 35S et principalement, la structure en tige-boucle de la région *leader* du CaMV, est la cible de la machinerie de silencing de l'hôte pour produire des petits ARN viraux (vsRNA) pouvant limiter l'accumulation du virus (Blevins *et al.*, 2006 ; Moissiard et Voinnet, 2006). Ces vsRNA peuvent aussi induire la dégradation séquence-spécifique d'ARN messagers cellulaires (Moissiard et Voinnet, 2006), ce qui expliquerait certaines modifications du transcriptome observées au cours de l'infection par le CaMV (Geri *et al.*, 1999).

II Les protéines du CaMV

Une ou plusieurs fonctions ont été caractérisées pour les protéines du CaMV (protéines P1 à P6) exprimées respectivement à partir des ORF I à VI. La protéine correspondant à l'ORF VII n'a jamais été détectée dans les plantes infectées bien qu'il soit fonctionnel comme l'ont montré des expériences réalisées dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Wurch *et al.*, 1990).

II.1 Les protéines de mouvement

Deux mécanismes distincts sont impliqués dans le mouvement de cellule à cellule des virus. Une ou plusieurs protéines de mouvement (MP) interagissent avec l'ARN ou l'ADN viral et forment un complexe ribonucléoprotéique (RNP) pouvant traverser les plasmodesmes, ou bien la MP polymérise sous forme de tubule à travers le plasmodesme, ce qui permet le passage de particules virales néoformées d'une cellule infectée vers la cellule adjacente. Le CaMV utilise apparemment ce second mécanisme pour son déplacement intercellulaire, des tubules renfermant des virions ayant été visualisés dans des plantes infectées par le virus.

La protéine P1 (40 kDa) est une des deux protéines impliquées dans le mouvement du CaMV ; il est le seul composant viral permettant la formation de tubules (Perbal *et al.*, 1993). Cependant, le fait que P1 interagisse et colocalise sous forme de foci à la périphérie de la cellule avec la protéine MPI7 d'*Arabidopsis thaliana* suggère que des facteurs de l'hôte pourraient également être impliqués

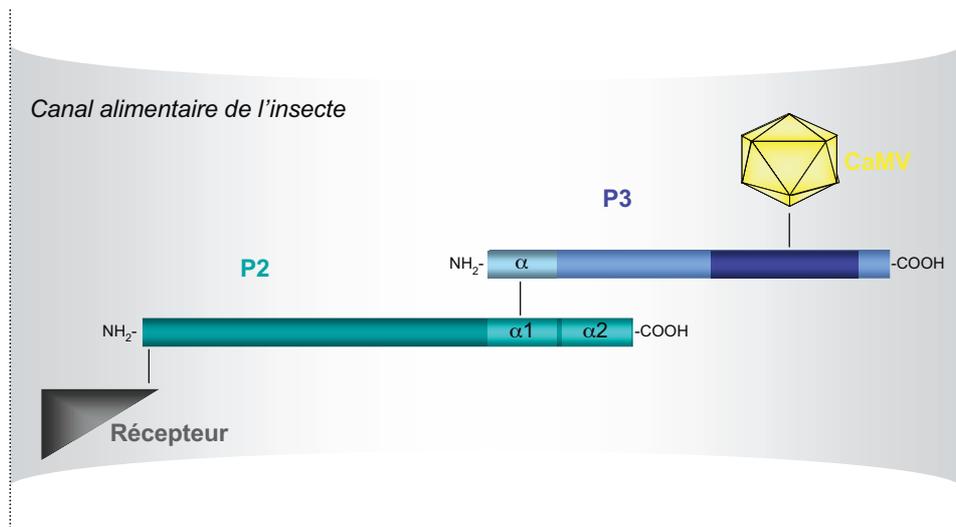
dans le mouvement (Huang *et al.*, 2001). Le mécanisme conduisant à la formation de ces tubules reste à définir bien que l'on connaisse les domaines de P1 nécessaire à ce processus. Un domaine central de P1 permet l'adressage de la protéine à la périphérie de la cellule, alors que l'ensemble de la protéine, à l'exception de l'extrémité N-terminale, est nécessaire à la formation des tubules (Thomas et Maule, 1999). Des analyses structurales à l'aide d'épitopes avec une étiquette ont révélé que les extrémités N- et C-terminales de P1 sont exposées à la surface de la protéine et localisées respectivement à la face externe et interne des tubules (Thomas et Maule, 1995). Par ailleurs, la protéine P1 possède un domaine de fixation aux ARN ; il n'est donc pas improbable qu'elle transporte les ARN 35S et 19S sous forme de complexe et qu'ainsi, le CaMV utilise les deux modes de mouvement à des moments distincts au cours de l'infection virale.

Des études récentes ont montré que la protéine P3, dont le rôle crucial dans la transmission a déjà été évoqué, serait également impliquée dans le mouvement du CaMV. P3 est ancrée dans la capsid virale grâce à son extrémité C-terminale alors que son extrémité N-terminale est exposée à la surface. Cette extrémité est capable d'interagir *in vitro* avec la partie C-terminale de P1 suggérant que P3 lie les particules virales à la protéine P1 pour permettre leurs mouvements intra et/ou intercellulaire (Stavolone *et al.*, 2005). Ce modèle est renforcé par le fait que le virus perd sa capacité d'infecter systématiquement les plantes non seulement lorsque la partie C-terminale de P1 est mutée (Thomas et Maule, 1999), mais également en absence de l'ORF III. De plus, des observations en microscopie électronique montrent que P1 et P3 colocalisent au niveau des plasmodesmes de cellules infectées (Stavolone *et al.*, 2005).

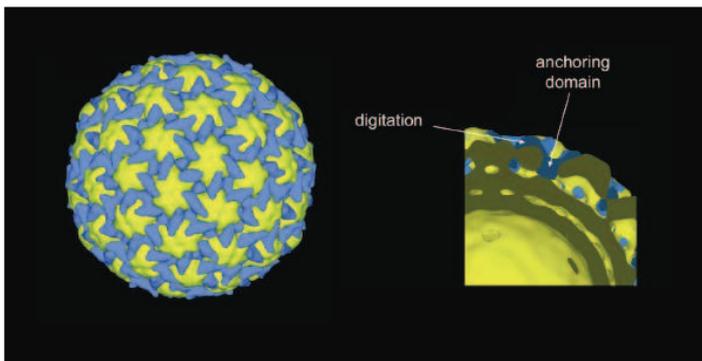
II.2 Les facteurs de la transmission

Les protéines P2 et P3 (ORF II et III) sont les facteurs assistants de la transmission. La protéine P2 (18 kDa) ne semble être impliquée que dans la transmission. En effet, l'absence de l'ORF II n'est pas délétère pour la multiplication du virus (Armour *et al.*, 1983). Elle interagit par le biais des deux hélices α de sa région C-terminale avec l'hélice α présente à l'extrémité N-terminale de P3 (Leh *et al.*, 1999). Ce dimère P2-P3 sert de pont moléculaire reliant les particules virales au stylet de l'insecte vecteur, la partie N-terminale de la protéine P2 étant impliquée dans la liaison du complexe transmissible au récepteur, présent au niveau du stylet du vecteur (Figure 9A). La protéine P2 forme également des corps d'inclusion cytoplasmiques (présentés dans le § II.5.3, Figure 12), peu denses aux électrons en microscopie électronique, aussi appelés viroplasmes clairs au sein desquels on trouve aussi la protéine P3 et environ 4% des particules virales. La composition de ces viroplasmes a amené à les considérer comme le lieu de stockage des complexes de transmission (Drucker *et al.*, 2002). P2 s'assemble en paracrystaux chez la plante (Blanc *et al.*, 1993b) *via* les structures coiled-coil formées

A.



B.



C.

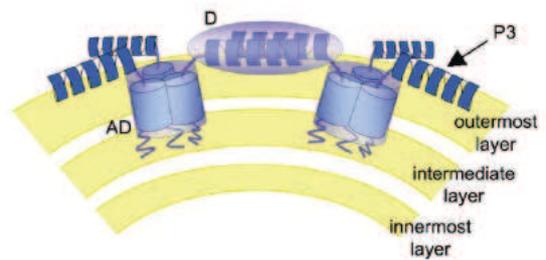


Figure 9 : Le complexe de transmission du CaMV : modèle. A. Représentation schématique du complexe P2:P3:virion ancré dans le canal alimentaire du puceron d'après Leh *et al.*, 1999. Le complexe transmissible interagit avec un récepteur du stylet. Les interactions P2:P3 entre les hélices α des régions C- et N-terminales respectivement de P2 et P3 sont représentées ainsi que celle entre la particule virale et la partie C-terminale de P3. B. Modélisation du complexe P3:virion après des analyses structurales par cryo-électromicroscopie (Plisson *et al.* 2005). A gauche, représentation de la capside (en jaune) décorée par des molécules de P3 (en bleu) organisées autour des capsomères. A droite, coupe transversale montrant le domaine d'ancrage de P3 (*anchoring domain*) enfoui dans la capside et son domaine N-terminal exposé à la surface (*digitation*). C. Modèle de l'interaction de P3 avec la capside. Les couches externe, intermédiaire et interne de la capside (respectivement, *outermost*, *intermediate* et *innermost layers*) sont schématisées. La protéine P3 est sous forme de dimère *via* la région N-terminale lorsqu'elle est associée à la particule virale, formant les digitations de surface (*D domain*). Le domaine d'ancrage (*AD domain*) est formé de l'association de trois monomères de P3. La région C-terminale de P3 pénètre dans la couche intermédiaire de la capside.

grâce à la région C-terminale de la protéine (Hebrard *et al.*, 2001). Cette dernière est également impliquée dans les interactions avec la protéine P3, ce qui suggère que la formation de duplexes P2-P3 ou P2-P2 est régulée. La protéine P2 est la seule protéine virale à ne pas être détectée au niveau des viroplasmés denses formés par la protéine P6, bien qu'ils soient considérés comme le lieu de synthèse de l'ensemble des composants viraux. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que P2 est relarguée immédiatement après sa synthèse puis transportée *via* le réseau microtubulaire pour former les viroplasmés clairs (Martinière *et al.*, 2007).

La protéine P3 (15 kDa) est impliquée à la fois dans la transmission et dans le mouvement du virus (voir § II.1). Sa région C-terminale renferme une séquence riche en prolines ayant la capacité de fixer les acides nucléiques de manière non spécifique (Jacquot *et al.*, 1998). Elle peut s'assembler en tétramère parallèle *in vitro* (Leclerc *et al.*, 1998) et *in vivo* (Tsuge *et al.*, 1999), formant un complexe ressemblant à une baguette. La protéine P3 est souvent extraite des plantes infectées sous une forme protéolysée de 11 kDa. Deux clivages sont réalisés par une protéinase à cystéine (Dautel *et al.*, 1994) au niveau de deux sites proches l'un de l'autre (Jacquot *et al.*, résultats non publiés). Nous ne savons pas à l'heure actuelle si ces clivages ont une fonction biologique ou s'il s'agit d'un processus artefactuel qui a lieu lors de l'extraction de la protéine.

Des données récentes de cryo-électromicroscopie montrent que la protéine P3 associée à la capsid (Figure 9B), forme un réseau de type triskelion entourant les capsomères. La région C-terminale est enfouie dans la capsid protéique du CaMV et interagit avec la couche moyenne de cette coque, alors que la partie N-terminale de P3 est exposée et forme des dimères grâce à des interactions de type coiled-coil (Figure 9C) (Plisson *et al.*, 2005). Ces observations structurales confirment la disponibilité de la région N-terminale de P3 pour engager des interactions avec P2 pour la transmission ou P1 pour le mouvement du virus.

II.3 La protéine de capsid

La protéine P4 (56 kDa) est le précurseur de la protéine de capsid (CP) et correspond à la protéine Gag des rétrovirus. Elle est clivée en plusieurs étapes au niveau de ses extrémités N- et C-terminales par la protéinase à acide aspartique codée par l'ORF V pour donner naissance à trois produits majeurs de 42, 39 et 37 kDa (Torruella *et al.*, 1989). Outre les clivages, deux autres types de modifications post-traductionnelles ont été observés pour la protéine P4 : la glycosylation de la protéine mature et la phosphorylation des extrémités N- et C-terminales de P4 par la protéine CKII cellulaire (*Casein Kinase II*) au niveau de sérines et thréonines ; ces modifications sont essentielles pour l'infectivité du CaMV (Chapdelaine *et al.*, 2002 ; Champagne *et al.*, 2007).

La protéine P4 possède un domaine en doigt à zinc lui permettant d'interagir avec une région riche en purines localisée au niveau de la séquence *leader* de l'ARN pré-génomique du CaMV. Ce domaine qui pourrait servir à l'encapsidation, est très important car sa mutation entraîne une perte de l'interaction avec l'ARN 35S et de l'infectivité du virus (Guerra-Peraza *et al.*, 2000).

Le domaine N-terminal de P4 renferme également un signal de localisation nucléaire (NLS) basique exposé à la surface de la capsid (Leclerc *et al.*, 1999) et reconnu par l'importine α (Karsies *et al.*, 2002). Il semble que le domaine N-terminal et *a fortiori* le NLS soient initialement masqués, maintenant ainsi la protéine dans le cytoplasme afin de promouvoir l'assemblage des particules virales. Cette dernière étape conduit alors à l'exposition du NLS à la surface de la capsid, ce qui permet l'acheminement éventuel des virions matures vers les pores nucléaires (Karsies *et al.*, 2002). Ce modèle est renforcé par l'observation en microscopie électronique, après immunomarquage de la protéine P4, de foci au niveau des pores de l'enveloppe nucléaire (Karsies *et al.*, 2002).

Enfin, P4 interagit *via* un domaine riche en lysines (situé entre les résidus 333 à 411) avec une région en C-terminale de la protéine P6 du CaMV (Himmelbach *et al.*, 1996). Ce domaine de P4 est également impliqué dans les interactions avec l'ARN 35S suggérant que la protéine P6 pourrait promouvoir l'assemblage des particules virales en jouant le rôle de protéine d'échaffaudage.

II.4 Transcriptase inverse, RNase H et protéinase à acide aspartique

La protéine P5 (78 kDa) est une polyprotéine correspondant au produit du gène *pol* des rétrovirus. Elle porte une activité de protéinase à acide aspartique en N-terminale et les activités de transcriptase inverse et de RNase H nécessaires à la réplication du génome dans sa partie C-terminale. P5 subit un auto-clivage grâce à la protéinase à acide aspartique, ce qui libère cette enzyme de la transcriptase inverse associée à la RNase H. Les pararétrovirus, à la différence des rétrovirus, ne codent pas pour une intégrase, leur génome restant sous forme épisomale. Cependant, un motif intégrase a été mis en évidence dans la séquence de la polyprotéine codée par le génome du virus de l'éclaircissement des nervures du pétunia (PVCV) (Richert-Poggeler et Shepherd, 1997).

II.5 La protéine P6

La protéine P6 (62 kDa) encore appelée TAV pour « *transactivator/viroplasm* » est impliquée dans de nombreuses étapes du cycle infectieux du CaMV. Elle détermine la spécificité d'hôte et elle est prépondérante dans l'expression des symptômes de la virose. De plus, P6 forme des corps d'inclusion cytoplasmiques, les viroplasmes denses, où siègent la réplication et l'assemblage des virions. Enfin, elle joue un rôle crucial dans la synthèse des autres protéines virales du CaMV en

activant en *trans* la traduction de l'ARN 35S et de ses versions épissées. Mon travail de thèse ayant porté sur l'étude de nouvelles propriétés et fonctions de P6, les données connues de cette protéine sont détaillées ci-après.

II.5.1 Spécificité d'hôte et symptômes

La protéine P6 est le déterminant majeur de la spécificité d'hôte. La différence majeure entre les souches de CaMV repose essentiellement sur leur capacité ou non à infecter des solanacées (Qiu et Schoelz, 1992). Par exemple, la souche D4 peut infecter systématiquement *Datura stramonium* et *Nicotiana bigelovii*, deux solanacées, tandis que la souche CM1841 provoque une réaction hypersensible sur la première et est sans effet sur la seconde. La substitution de la région 5' de l'ORF VI de CM1841 par celle de l'isolat D4 est suffisante pour permettre au génome de CM1841 d'infecter les deux solanacées. L'expérience inverse conduit à une réaction hypersensible (Schoelz *et al.*, 1986). La partie 5' de l'ORF VI et plus précisément le tiers N-terminal de la protéine a été identifié comme responsable de la spécificité d'hôte (Wintermantel *et al.*, 1993). Cependant, cette propriété n'est pas l'unique apanage de P6 pour toutes les souches de CaMV. En effet, le remplacement de la séquence 5' de l'ORF VI de l'isolat CM1841 par celle de la souche W260 ne permet pas au virus chimérique de développer une infection systémique sur la solanacée *Nicotiana bigelovii*. Le virus nécessite l'ORF VI complet ainsi que les ORF II et IV (Qiu et Schoelz, 1992 ; Wintermantel *et al.*, 1993). Bien que P6 soit le déterminant majeur de la spécificité d'hôte, l'infection de solanacées par certains isolats de CaMV requiert la coopération des produits des gènes II, IV et VI. La région N-terminale de P6 définit aussi le type de réaction de l'hôte à l'infection. Ainsi l'écotype Tsu-0 d'*Arabidopsis* qui est résistant à de nombreuses souches de CaMV ne l'est pas pour W260 ; la région N-terminale de P6 permet de lever cette résistance (Agama *et al.*, 2002).

La protéine P6 est aussi le constituant majeur à l'origine des symptômes de la virose. Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques exprimant le gène de la protéine P6 présentent un phénotype proche (chlorose, nanisme) des symptômes développés au cours de l'infection par le CaMV (Figure 8C) (Cecchini *et al.*, 1997). Ces auteurs ont également montré l'existence d'une corrélation entre le niveau d'expression du transgène et la sévérité des symptômes ; plus la protéine P6 est abondante, plus graves sont les symptômes. De même, la sévérité des symptômes est dépendante de la souche dont est originaire le gène VI. Ainsi pour les 3 isolats testés Bari-1, Cabb-B-JI et Baji-31 (un hybride des deux précédents) dont les symptômes sont respectivement modérés, sévères et très sévères, il a pu être observé que l'expression de l'ORF VI correspondant chez *Arabidopsis*, conférait à la plante transgénique un phénotype dont la sévérité est similaire à celle d'une infection par leur

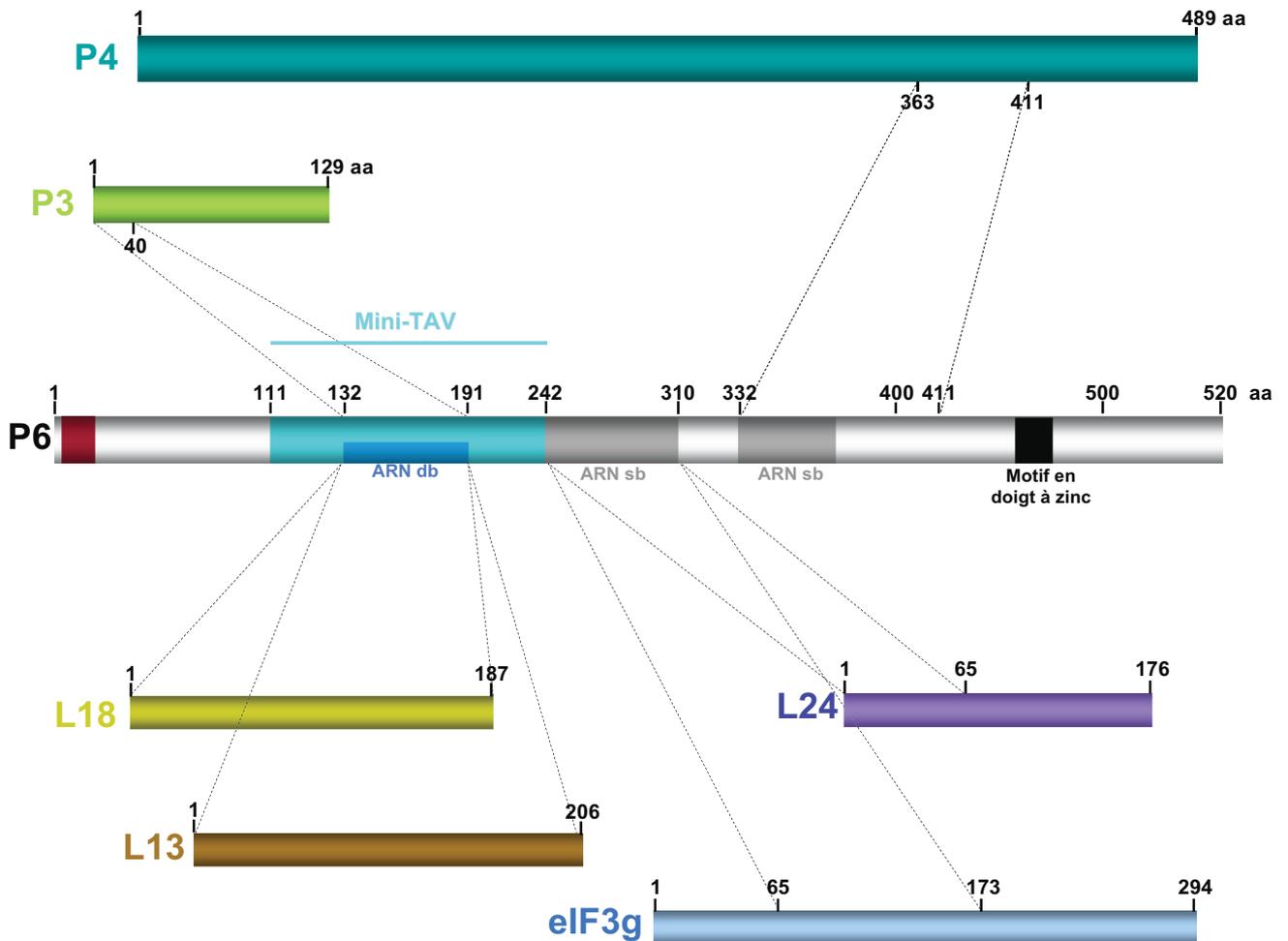


Figure 10 : Représentation schématique des interactions entre la protéine P6 du CaMV et ses partenaires cellulaires (d'après Ryabova *et al.*, 2002). Les protéines ribosomiques L13, L18 et L24, ainsi que eIF3g sont représentés sous la forme de boîtes colorées. Les régions impliquées dans les interactions sont délimitées par des traits en pointillés. Les interactions avec les protéines virales P3 et P4 sont schématisées à titre indicatif bien qu'elles ne soient pas impliquées dans la traduction.

souche d'origine. Aucun domaine précis de P6 n'a pu être cartographié comme responsable des symptômes et par conséquent toute la séquence de la protéine semble requise (Wintermantel *et al.*, 1993).

La protéine P6 semble réguler l'expression de gènes cellulaires. En effet, une étude par *differential display* au cours d'une infection par le CaMV chez *Arabidopsis* montre qu'une trentaine de gènes voit leur expression activée ou réprimée. La même expérience réalisée sur des plantes transgéniques exprimant P6 révèle qu'une bonne partie de ces changements est retrouvée, suggérant fortement que cette protéine virale est à l'origine des modifications du transcriptome (Geri *et al.*, 1999). Actuellement, on ignore si P6 interagit avec des facteurs de régulation de l'expression des gènes ou agit directement au niveau de séquences de régulation. Cependant tous les symptômes visibles au cours de l'infection ne sont pas retrouvés dans les plantes transgéniques, comme le gaufrage des feuilles, suggérant que d'autres facteurs viraux puissent intervenir. Des données récentes montrent que les vsRNA produits par la machinerie de silencing à partir de la région *leader* conduit à une dégradation post-transcriptionnelle de messagers cellulaires (Moissiard et Voinnet, 2006). Un des vsRNA, correspondant à une séquence de 21 nucléotides de long, et validé par les auteurs comme ciblant le messenger du gène *rcc-1*, a la capacité théorique d'induire la dégradation des ARNm d'une centaine de gènes cellulaires, dont beaucoup sont des acteurs du métabolisme cellulaire, notamment chloroplastique (Moissiard et Voinnet, 2006). Ceci suggère que certains symptômes de la virose pourraient être dû à la diminution du niveau d'accumulation des messagers ciblés par les vsRNA du CaMV.

II.5.2 La transactivation traductionnelle

La protéine P6 permet la réinitiation de la traduction des différents ORF localisés sur l'ARN 35S polycistronique. Pour cela, P6 engage des interactions multiples avec les composants de la machinerie traductionnelle de l'hôte (Figure 10).

Deux domaines centraux de P6 sont requis pour sa fonction de transactivateur : la région appelée miniTAV (aa 112-242) et la région adjacente (aa 243-310) appelée MBD (pour *Multiple Binding Domain*). Cette dernière comprend un domaine putatif de fixation aux ARN simple-brin (ssRNABD). Le domaine miniTAV présente des similarités de séquence avec la partie N-terminale de la RNase H1 eucaryotique et est capable de fixer les ARN double-brin et les duplexes ARN-ADN (Cerritelli *et al.*, 1998). Il est essentiel pour la transactivation de la traduction d'ARN polycistroniques dans des protoplastes de plantes (Kobayashi et Hohn, 2003) ; sa surexpression permet de conserver une efficacité de transactivation de 20-25% par rapport à celle de la protéine P6 entière (De Tapia *et*

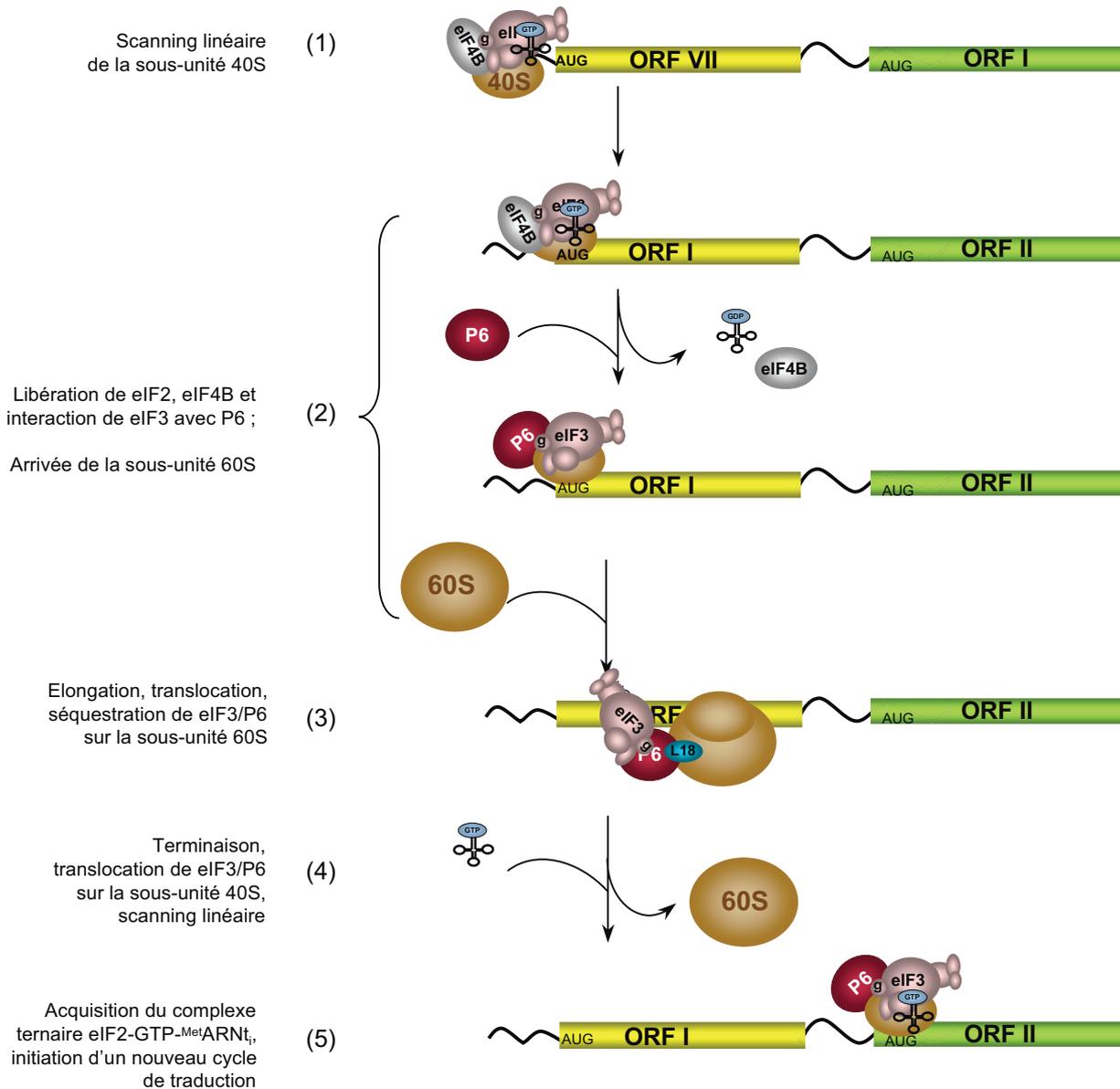


Figure 11 : Modèle proposé pour la réinitiation de la traduction chez le CaMV (d'après Ryabova *et al.*, 2006). La sous-unité 40S associée aux facteurs d'initiation scanne jusqu'au premier AUG (1). Après l'interaction de l'ARNt^{Met} avec le codon AUG, eIF2 puis eIF4B sont libérés, ce qui permet à eIF3g de s'associer à P6 (2). Après la formation du ribosome, eIF3/P6 est transloqué sur la sous-unité 60S via L18 au cours de l'étape d'élongation (3). Lors de la terminaison, le ribosome 80S se dissocie et P6/eIF3 se fixe de nouveau sur la sous-unité 40S (4) pour la maintenir compétente pour l'acquisition du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt_i et la réinitiation d'un nouveau cycle de traduction (5).

al., 1993). La présence du domaine MBD augmente l'efficacité du domaine miniTAV à un niveau de 70-75% confirmant l'importance de ces deux régions de P6 pour la fonction de transactivation.

Le domaine miniTAV interagit avec les protéines ribosomiques L18 (Leh *et al.*, 2000) et L13 d'*Arabidopsis thaliana*, présentes au niveau de la sous-unité 60S du ribosome ; ces deux partenaires entrent en compétition pour se fixer sur la protéine P6 (Bureau *et al.*, 2004). Le domaine MBD interagit lui aussi avec deux protéines : la sous-unité g du facteur d'initiation de la traduction eIF3 et la protéine ribosomique L24 également constitutive de la sous-unité 60S (Park *et al.*, 2001). Des expériences de GST pulldown ont permis de montrer que la protéine P6 permet l'association du facteur eIF3 à la sous-unité 60S, et que ce dernier médie la liaison de P6 à la sous-unité 40S (Park *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'analyse des fractions ribosomiques obtenues par centrifugation de polysomes sur un gradient de saccharose montre que eIF3 est associé aux ribosomes uniquement en présence de P6 (Park *et al.*, 2004). P6 semble prévenir la dissociation de eIF3 et peut-être d'autres facteurs d'initiation et, maintient le ribosome dans un état compétent pour la réinitiation après qu'il ait terminé la traduction d'un ORF. La surexpression de L24 augmente l'efficacité de la traduction P6-dépendante (Park *et al.*, 2001). L24 se localise à la surface interne de la sous-unité 60S au niveau du site de fixation des facteurs principaux de la traduction (Marion et Marion, 1987 ; Ban *et al.*, 2000). L'interaction qu'elle engage avec P6 pourrait avoir un effet inhibiteur pour la fixation des facteurs d'élongation.

La sous-unité g d'eIF3 interagit également avec eIF4B, un autre facteur d'initiation de la traduction ; ce dernier entre en compétition avec P6 car il se fixe sur le même domaine d'eIF3, libre ou complexé à la sous-unité 40S (Park *et al.*, 2004). Le facteur eIF4B interfère probablement avec la formation du complexe P6-eIF3 car sa surexpression en protoplastes régule négativement la transactivation, suggérant que la compétition entre P6 et eIF4B conduirait au relargage du facteur eIF3 de la machinerie traductionnelle.

Un nouveau partenaire de P6 a été identifié récemment chez *Arabidopsis thaliana*. Il s'agit de la protéine appelée RISP (Re*initiation Supporting Protein) qui interagit au niveau de la partie C-terminale du domaine miniTAV. RISP ne présente aucune homologie avec d'autres protéines eucaryotiques et sa fonction naturelle est pour l'instant inconnue. Elle sédimente avec les fractions ribosomiques 60S et 80S sur des gradients de saccharose et sa surexpression en protoplastes stimule fortement la réinitiation traductionnelle médiée par la protéine P6 (Odon Thiébeauld, communication personnelle).*

L'ensemble des données concernant les interactions entre P6 et la machinerie traductionnelle permet de proposer un modèle pour la réinitiation de la traduction P6-dépendante (pour revue, Ryabova *et al.*, 2002) (Figure 11). Le facteur eIF4B, associé à eIF4F (ce dernier comprend les facteurs 4E, 4G et 4A) interagit avec eIF3 associé au complexe de pré-initiation 48S. Pendant l'étape de

reconnaissance codon-anticodon, eIF2 est libéré suite à l'hydrolyse de GTP alors que eIF3 reste associé à la sous-unité ribosomique 40S. Le relargage de eIF4B après l'étape d'initiation coiffe-dépendante permet l'interaction de P6 avec eIF3 *via* la sous-unité g. Selon le modèle proposé par Park et ses collaborateurs (2002), le complexe eIF3/P6 est déplacé lors de la phase d'élongation sur la face arrière de la sous-unité 40S ou sur la sous-unité 60S grâce à l'interaction de P6 avec L18 et/ou L13. Lors de la terminaison de la traduction du premier ORF, le complexe P6/eIF3 serait à nouveau transloqué sur la sous-unité 40S du ribosome, au niveau de son site actif, ce qui favoriserait la réacquisition d'un nouveau complexe ternaire eIF2-GTP-ARNt^{Met} initiateur et la réinitiation de la traduction de l'ORF suivant.

II.5.3 Les viroplasmés

L'infection des plantes par les virus se manifeste par des symptômes macroscopiques au niveau des feuilles ou d'une plante entière mais également dans de nombreux cas, par des modifications cytopathologiques qui sont souvent caractéristiques d'une famille, d'un genre ou d'une espèce virale. Ainsi, les cellules infectées renferment parfois des inclusions cytoplasmiques et/ou nucléaires qui peuvent être cristallines, fibrillaires ou amorphes. Les inclusions cristallines représentent des amas de particules virales nouvellement formées alors que les deux autres types d'inclusion résultent de l'accumulation de protéines codées par le virus. La présence majoritaire de protéines virales au sein des inclusions a conduit à les désigner sous le terme de viroplasmés.

Les corps d'inclusion amorphes sont souvent le site de la réplication et de la morphogénèse virale et pour cette raison, ces structures sont appelées communément « usines à virions ». Ils renferment dans la plupart des cas, l'ensemble des constituants nécessaires à la réalisation de ces deux processus essentiels du cycle infectieux. Cependant, ils peuvent aussi être impliqués dans d'autres étapes, l'exemple le plus connu étant celui des viroplasmés clairs du CaMV qui jouent un rôle déterminant dans la transmission de ce virus par les pucerons (Drucker *et al.*, 2002).

Ces structures sont fréquemment localisées dans la zone périnucléaire où les protéines se sont accumulées soit par diffusion à travers le cytoplasme, soit par transport actif le long des microtubules, sous la forme de complexes ou de petits agrégats. Dans ce dernier cas, on parle plutôt d'agrésome (Kopito, 2000). Ces usines à fabriquer des virions ont été observées dans les cellules infectées par des virus des animaux (*Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*) et par des phytovirus dont les *Caulimovirus* et les *Soymovirus* (Hull, 1970 ; Novoa *et al.*, 2005).

Dans les cellules infectées par le CaMV, on observe la présence de deux types distincts de corps d'inclusion cytoplasmiques : les viroplasmés clairs et les viroplasmés denses, appelés ainsi en fonction de leur différence d'opacité en microscopie électronique (Figure 12). Les viroplasmés clairs sont

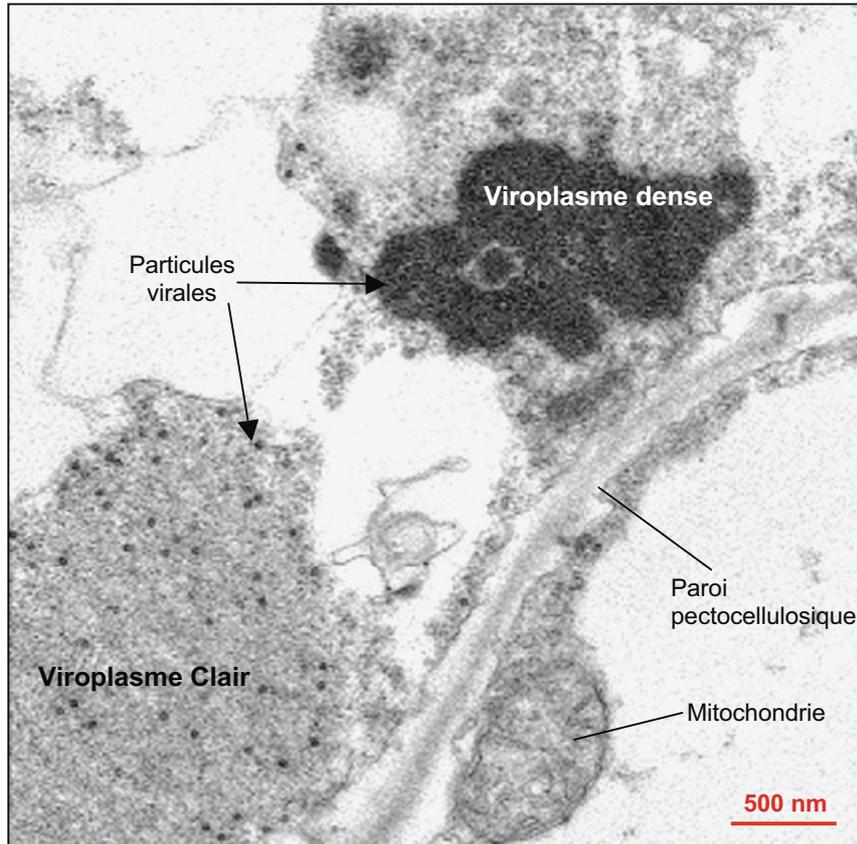


Figure 12 : Viroplasmes denses et clairs dans une cellule de navet infectée par le CaMV (observation en microscopie électronique).

formés presque exclusivement par la protéine P2 du CaMV et sont impliqués comme indiqué précédemment, dans la transmission du virus (§ II.2). Les viroplasmés denses sont définis comme étant les « usines à virus » proprement dits. Ils ne présentent aucune architecture organisée mais apparaissent en microscopie électronique sous une forme amorphe généralement ovoïde. Leur dimension est de l'ordre de 2 à 10 μm de diamètre, dépendant du stade de l'infection, de la souche virale et de la nature de l'hôte (Shalla *et al.*, 1980). Les viroplasmés denses sont des corps d'inclusion dépourvus de membrane, parsemés de corps creux, denses aux électrons en microscopie électronique, à l'intérieur desquels on peut distinguer facilement la présence de particules virales. La protéine P6 est le seul constituant viral à l'origine des viroplasmés. En effet, des corps d'inclusions similaires à ceux observés au cours d'une infection par le CaMV, sont également formés dans des plantes d'*Arabidopsis* transgéniques exprimant la protéine P6 (Cecchini *et al.*, 1997). On peut également les visualiser sous la forme d'amas périnucléaires organisés en « donuts » dans des cellules infectées grâce à la technique d'immunofluorescence et dans des cellules de tabac BY-2, pourtant non hôtes pour le CaMV, lorsqu'elles sont transfectées par une construction exprimant la protéine P6 en fusion à la eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) (Haas *et al.*, 2005).

Les fonctions associées à ces structures sont la réplication par transcription inverse (Mazzolini *et al.*, 1989) ainsi que l'assemblage et le stockage des particules virales (96% d'entre-elles étant estimées présentes dans les viroplasmés denses). Par ailleurs, des expériences d'immunomarquage ont permis de détecter toutes les protéines virales dans les viroplasmés denses, exception faite de la protéine P2 (Drucker *et al.*, 2002). De plus, la présence de polysomes à proximité des viroplasmés laisse supposer que ces derniers jouent un rôle dans la traduction des ARN messagers viraux en servant par exemple de support pour l'attachement des polysomes (pour revue, Rothnie *et al.*, 1994).

Le mécanisme conduisant à la formation des viroplasmés n'est pas encore entièrement élucidé à ce jour. Cependant, les résultats obtenus dans notre laboratoire suggèrent qu'il ne s'agit pas d'une agrégation anarchique due à l'abondance de la protéine P6 mais bien d'un mécanisme d'échafaudage spécifique. En effet, des études d'interaction protéine-protéine *in vitro* ont révélé que la protéine P6 est capable d'interagir spécifiquement avec elle-même, par le biais de son extrémité N-terminale hydrophobe appelée domaine A et correspondant aux résidus 1 à 111. Cette région en hélice α et plus particulièrement la séquence comprenant les 86 premiers résidus, est très conservée chez les différents isolats de CaMV. Cependant, l'expression transitoire de ce domaine en fusion avec la eGFP, dans des cellules BY-2, ne permet pas à lui seul de générer des viroplasmés montrant qu'il n'est pas suffisant et qu'un autre domaine de P6, au moins, est impliqué dans ce processus. En absence du domaine A, la protéine P6 fusionnée à la eGFP est également diffuse ce qui suggère que ce domaine est primordial et qu'il pourrait représenter la séquence initiatrice de l'élaboration des viroplasmés denses (Haas *et al.*, 2005). Li et Leisner (2002) ont montré *in vivo* grâce au système du double-hybride en levure que

plusieurs régions de P6, recouvrant les acides aminés 156 à 253, 249 à 379 et 414 à 520 sont capables d'interagir avec la protéine P6 entière, renforçant l'hypothèse de l'implication de plusieurs domaines répartis le long de la protéine P6, pour former les viroplasmés.

L'observation de cellules de tabac BY-2 bombardées avec une fusion eGFP-P6 en microscopie confocale montre la présence de petits agrégats fluorescents répartis dans tout le cytoplasme et/ou de gros amas périnucléaires formant les viroplasmés proprement-dits, suggérant très fortement que les viroplasmés résultent de l'assemblage de petits agrégats préformés et que le mécanisme sous-jacent pourrait s'apparenter à celui mis en œuvre par les agrésomes (Haas *et al.*, 2005). En d'autres termes, que les petits agrégats de P6 empruntent le cytosquelette de la cellule pour migrer en périphérie du noyau et s'assembler pour y former les viroplasmés. Des expériences récentes réalisées dans notre laboratoire à l'aide de drogues déstabilisant les microtubules semblent toutefois exclure la participation de ce réseau (Mélanie Tanguy, communication personnelle). Des analyses sont actuellement en cours afin de déterminer si les filaments d'actine sont impliqués dans la formation des viroplasmés denses du CaMV.

II.5.4 La protéine P6 est une protéine nucléo-cytoplasmique

Jusqu'en 2005, la protéine P6 était considérée comme une protéine abondante strictement cytoplasmique. Or, il s'avère que P6 est en réalité une protéine nucléo-cytoplasmique (Haas *et al.*, 2005). Elle a été détectée de manière fortuite dans le noyau de cellules BY-2 lors de l'étude de la formation des viroplasmés denses puis, grâce à des expériences d'immunomarquage, dans des noyaux purifiés à partir de feuilles de navet infectées par le CaMV (Figure 13). De masse moléculaire (62 kDa) supérieure à la taille d'exclusion limite des pores nucléaires (environ 50 kDa), P6 ne peut effectuer la navette entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique que par le biais d'un transport actif. Un signal d'export nucléaire ou NES (*Nuclear Export Signal*), riche en leucines, a été identifié à l'extrémité N terminale. Cette séquence permet à la protéine P6 de sortir du noyau *via* la voie d'export CRM-1 (*Chromosome Region Maintenance-1*) (Haas *et al.*, 2005). La présence de P6 dans le compartiment nucléaire suggère très fortement qu'elle y exerce des fonctions indispensables pour le cycle infectieux du CaMV. Plusieurs fonctions sont envisageables.

L'ARN 35S du CaMV subit un épissage alternatif, les transcrits épissés représentant jusqu'à 70% des ARN de type 35S. De ce fait, il est envisageable que la protéine P6 régule, comme la protéine Rev du HIV-1, l'export de l'ARN 35S complet, ce dernier servant de matrice à la transcriptase inverse lors de la réplication du génome du CaMV et de messenger pour la production des protéines P1 et P2.

L'ARN 35S étant de nature polycistronique, il n'est pas exclu qu'il puisse être reconnu par la machinerie du *Non-sense Mediated RNA Decay* (NMD) comme un ARN aberrant possédant des

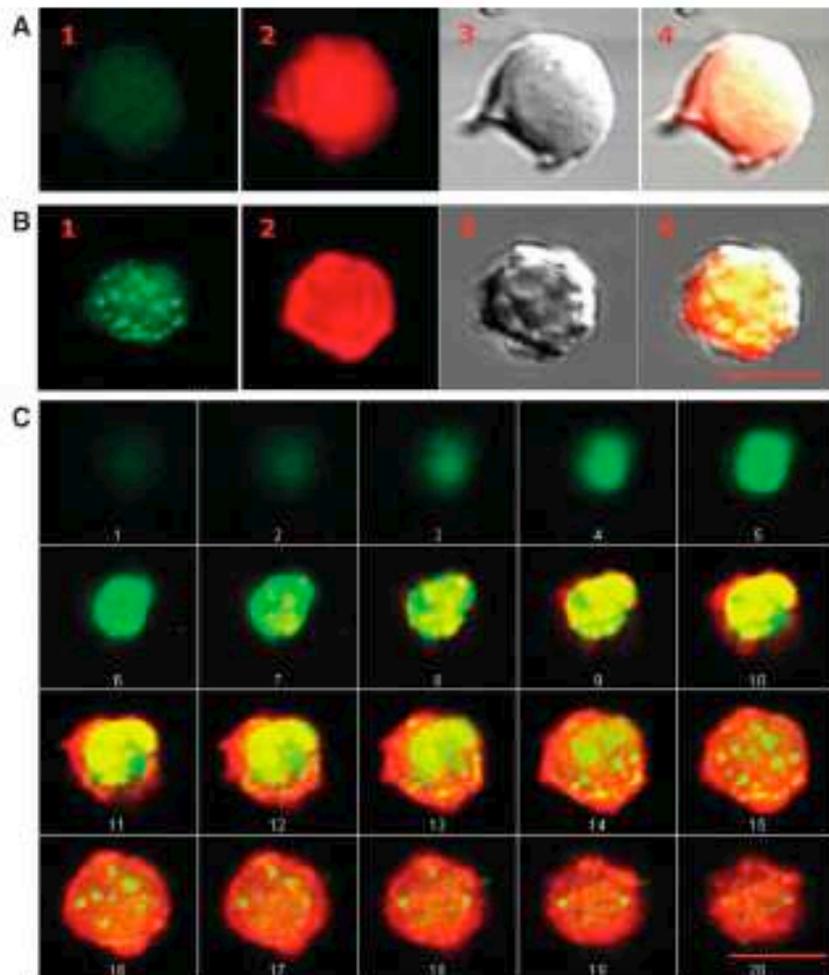


Figure 13 : Immunodétection de la protéine P6 dans des noyaux purifiés extraits de navets infectés par le CaMV (Haas *et al.*, 2005). Immunomarquage réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine P6 et d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (1), sur un noyau de navet sain (A) et de navet infecté par le CaMV (B). Un marquage du noyau à l'iodure de propidium est visible en (2), ainsi que l'image en contraste interférentiel différentiel (3) et l'image composite correspondant à la superposition des trois précédentes (4). Différentes coupes ont été réalisées pour un noyau de navet infecté par le CaMV (C). Les observations ont été faite avec un microscope confocal. La barre représente 5 μ m.

codons-stop prématures, le contrôle de l'intégrité des ARN par le NMD étant notamment couplé à leur épissage. Il est donc envisageable que P6 puisse interférer dans le noyau avec ce système de surveillance pour préserver les messagers viraux de la dégradation.

Geri et ses collaborateurs (1999) ont observé que la protéine P6 exprimée dans une plante transgénique modifie le niveau d'expression de certains messagers cellulaires. Il est donc possible que P6 intervienne directement ou indirectement sur la machinerie transcriptionnelle pour modifier le transcriptome.

Enfin, nous savons que les virus de plantes font l'objet d'une attaque du système RNAi (*RNA interference*) qui dégrade spécifiquement les ARN viraux et que les virus se prémunissent contre cette attaque grâce à des protéines virales dites supprimeurs de silencing. Des études récentes montrent que l'ARN 35S du CaMV est également la cible de la machinerie de silencing, sa région *leader* étant notamment clivée en vsRNA (Moissiard et Voinnet, 2006). Cette dégradation limite encore davantage l'accumulation de l'ARN 35S pré-génomique, qui est déjà soumis à un épissage alternatif. Afin de préserver un pool d'ARN 35S intact pour la réplication voire de ses ARN épissés qui conservent pour la plupart d'entre-eux la région *leader* complète, il est probable que le CaMV, comme bon nombre de phytovirus, code pour un suppresseur du RNA silencing. Les supprimeurs, bien que divergents en séquence et en structure, possèdent la caractéristique commune d'être des facteurs de pathogénicité (pour revue, Voinnet, 2005). P6 ayant cette propriété, il est donc fort possible qu'elle exerce la fonction de suppresseur de RNA silencing. Cette dernière hypothèse concernant la fonction nucléaire éventuelle de P6 est d'autant plus plausible que certains acteurs du RNA silencing dont les protéines DICER-like ont une localisation nucléaire (Vaucheret, 2006).

Au cours de ma thèse, j'ai entrepris d'identifier la fonction exercée par P6 au sein du noyau. Il fallait au préalable caractériser la voie d'importation et le signal de localisation nucléaire (NLS) de P6 de manière à pouvoir par la suite, maîtriser la localisation subcellulaire de la protéine virale et ainsi déterminer l'importance du transport nucléo-cytoplasmique de la protéine pour le cycle infectieux du CaMV. Les études, visant à comprendre comment se fait le transit de P6 entre le noyau et le cytoplasme, seront décrites dans le premier chapitre de ce manuscrit qui, pour cette raison, sera introduit par un récapitulatif des mécanismes cellulaires régissant le transport nucléo-cytoplasmique. Dans ce même chapitre seront présentés des travaux menés en contexte viral et ayant abouti à la découverte que les viroplasmes denses du CaMV ne sont pas requis pour la multiplication du virus, en dépit des fonctions qui leurs ont été assignées ces dernières années.

Enfin, le second chapitre sera consacré à la détermination de la fonction de suppresseur du RNA silencing exercée par la protéine P6, et pour cela, des notions générales sur les mécanismes et les rôles du silencing chez les plantes seront exposées au préalable.

Chapitre I

*Etude de l'importance du transport nucléo-
cytoplasmique et des viroplasmes denses pour
l'infectivité du CaMV*

Introduction

Les virus à ADN, exception faite des *Poxviridae*, se répliquent dans le noyau des cellules hôtes eucaryotiques où ils recrutent les ARN et/ou ADN polymérases cellulaires pour la transcription et/ou la réplication, ainsi que les complexes impliqués dans la maturation des ARN messagers (épissage, polyadénylation ou mise en place de la coiffe).

Certains virus à ARN effectuent une partie de leur cycle infectieux dans le noyau. Ainsi, l'intégration de l'ADN proviral des rétrovirus dans le génome de l'hôte est indispensable pour la réplication de ces virus. Les *Orthomyxovirus*, comme le virus de la grippe, transcrivent et répliquent leur génome segmenté à ARN de polarité négative dans le noyau de la cellule hôte. Suite à la transcription, les ARN viraux sont exportés dans le cytoplasme pour y être traduits, grâce à la machinerie d'exportation-importation cellulaire, tout en se mêlant au trafic nucléo-cytoplasmique des ARNm de l'hôte. Les virus codent le plus fréquemment pour une ou plusieurs protéines qui possèdent les signaux nécessaires pour transiter entre le noyau et le cytoplasme et/ou, interagissent avec les facteurs cellulaires régissant le transport nucléo-cytoplasmique. Ainsi, la protéine Rev du HIV-1, l'exemple le plus connu, fixe les transcrits viraux pour réguler leur degré d'épissage et pour promouvoir leur exportation nucléaire et ce, en recrutant l'exportine CRM-1. La protéine Rev favorise ainsi, lors de la phase tardive du cycle infectieux, l'exportation des ARN complets et monoépissés au détriment des ARN multiépissés qui sont exportés lors de la phase précoce. La protéine Rev agit en reconnaissant la structure dite RRE (*Rev Recognition Element*) présente dans le gène *env*. Les rétrovirus simples n'utilisent pas de protéines virales attitrées pour l'export des ARN génomique et monoépissé, mais leur organisation structurale leur permet d'être reconnus *de facto* par la machinerie d'export. Enfin, la protéine ICP27 de l'herpès virus de type 1 recrute un facteur cellulaire qui lui permet d'emprunter la voie d'export des ARNm cellulaires pour exporter les transcrits viraux (pour revues, Whittaker et Helenius, 1998 ; Cullen, 2003b).

Les pararétrovirus des animaux et des plantes ont également une étape nucléaire au cours de leur cycle infectieux. En effet, rappelons que le génome à ADN double-brin de ces virus est réparé par des enzymes cellulaires, puis après conversion en minichromosome, transcrit par l'ARN polymérase II. L'ARN pré-génomique, l'un des transcrits majeurs, est soumis chez certains pararétrovirus comme le CaMV, à un épissage différentiel, à la manière des rétrovirus (Rothnie *et al.*, 1994). Ainsi, l'épissage alternatif de l'ARN 35S du CaMV génère quatre transcrits qui représentent environ 70% de l'ensemble des ARN 35S et de ses dérivés. De même, l'ARN pré-génomique du RTBV (*Rice Tungro Balliciform Virus*) subit un épissage qui donne naissance à un ARNm spécifique de la protéine P4 (ORF IV). Le mécanisme impliqué dans la régulation de l'épissage de ces ARN viraux est inconnu actuellement ; on ignore plus particulièrement comment le virus empêche l'épissage systématique de

l'ensemble des ARN afin de préserver un pool d'ARN pré-génomique, indispensable à la fois pour la synthèse de toutes les protéines du virus et pour la réplication.

Récemment, il a été découvert que la protéine P6 du CaMV est une protéine nucléocytoplasmique et que cette dernière renferme un signal d'export nucléaire reconnu par l'exportine CRM-1 (Haas *et al.*, 2005). Nous avons émis l'hypothèse par analogie avec les rétrovirus complexes (HIV, HTLV) que P6 entre dans le noyau pour réguler l'épissage et l'export de l'ARN pré-génomique, cette fonction n'étant pas mutuellement exclusive de celles suggérées dans l'introduction générale.

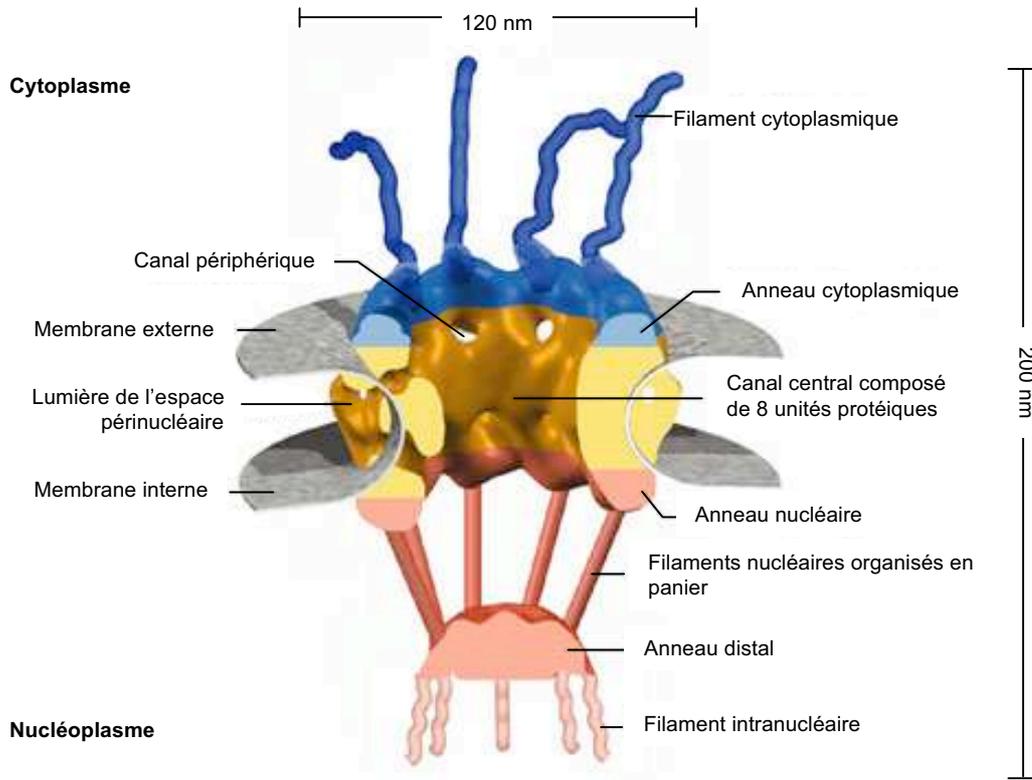
Afin de pouvoir déterminer si la navette nucléocytoplasmique de P6 est une étape indispensable pour le cycle infectieux du CaMV et identifier dans tel cas, la fonction nucléaire qu'elle exerce, il fallait au préalable identifier les séquences impliquées dans l'importation nucléaire de P6 afin de pouvoir procéder à des expériences fines de mutagenèse dirigée sans affecter les autres fonctions de cette protéine virale. Ainsi, j'ai caractérisé au cours de ma thèse, les séquences de localisation nucléaire de P6 et étudié l'influence de son transport sur le cycle viral. J'ai également étudié le rôle éventuel joué par certains partenaires de P6 sur sa localisation intracellulaire et celui des viroplasmes denses sur le transport nucléocytoplasmique. L'ensemble des résultats est décrit dans la partie II de ce chapitre, après avoir brièvement introduit quelques informations sur le trafic nucléocytoplasmique.

Cette étude nous a permis de démontrer que les viroplasmes denses ne sont aucunement requis pour la multiplication du CaMV et pour l'infection systémique des plantes, alors que ces corps d'inclusion sont considérés depuis plusieurs décennies comme le lieu de la réplication et de la morphogenèse virale. Ces résultats seront présentés dans la partie III de ce chapitre, sous la forme d'une publication.

I Le transport nucléocytoplasmique des macromolécules

Dans la cellule eucaryote en interphase, l'enveloppe nucléaire sépare le noyau du cytoplasme créant ainsi une barrière sélective pour l'importation et l'exportation de macromolécules et de complexes. L'enveloppe nucléaire est composée de deux membranes, une interne et une externe, dans laquelle sont enchâssés des canaux appelés complexes du pore nucléaire ou NPC (*Nuclear Pore Complex*). Bien que les deux membranes soient en continuité et fusionnées au niveau des pores nucléaires, elles sont dissemblables du point de vue compositions et fonctions. La membrane nucléaire externe est associée au réticulum endoplasmique (RE) dont elle possède les caractéristiques, notamment l'association aux ribosomes (Staehelein, 1997). La membrane nucléaire interne est composée de protéines membranaires spécifiques connectées à la lamina nucléaire et à la chromatine (Gruenbaum *et al.*, 2003).

A.



B.

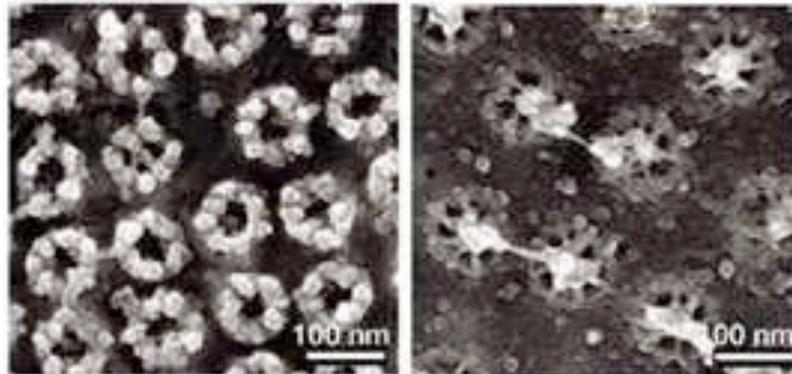


Figure 14 : Le pore nucléaire chez les vertébrés. A. Représentation schématique d'un pore nucléaire ou en anglais, « nuclear pore complex » (NPC) selon Fahrenkrog et Aebi (2003). La région centrale (jaune-marron) contient un canal aqueux à travers lequel ont lieu les translocations des produits importés et/ou exportés. Les filaments cytoplasmiques (bleu) et nucléaires (rose) sont impliqués dans les étapes initiale et finale de la translocation. La portion grise représente la double membrane de l'enveloppe nucléaire. B. Observation des NPC en microscopie électronique après cryodécapage et ombrage (Fahrenkrog et Aebi, 2003) du côté cytoplasmique (partie gauche) et nucléaire (partie droite).

I.1 Le pore nucléaire : structure et généralités

Les pores nucléaires sont de larges complexes multiprotéiques inclus dans l'enveloppe nucléaire et, impliqués dans l'échange bidirectionnel des macromolécules entre le cytoplasme et le noyau. Leur masse moléculaire est comprise entre 50 MDa chez la levure et 125 MDa chez les mammifères. Chaque cellule en contient plusieurs milliers. Les ions et les petites molécules peuvent diffuser passivement à travers les pores alors qu'à l'inverse, les macromolécules, et *a fortiori* les complexes ou les virus, dont la masse moléculaire est supérieure à 40-50 kDa, sont transloquées par un processus actif et rapide qui agit contre un gradient de concentration (Ribbeck et Gorlich, 2001). Ce transport est assuré par des transporteurs protéiques mobiles, appelés importines et exportines, appartenant à la famille des karyophérines (Strom et Weiss, 2001). On estime qu'environ 800 translocations d'une protéine de 100 kDa s'effectuent chaque seconde à travers un pore nucléaire (Ribbeck et Gorlich, 2001).

Le NPC possède une structure tripartite organisée selon une symétrie octogonale qui est conservée chez les animaux, la levure et les plantes (Roberts et Northcote, 1970 ; Yang *et al.*, 1998 ; Stoffler *et al.*, 2003) (Figure 14). Il est composé d'un corps central cylindrique enchâssé dans l'enveloppe nucléaire et formé de deux anneaux, un cytoplasmique et un nucléaire, qui sont reliés par un canal central. Le cylindre central est perforé par huit petit canaux d'un diamètre de 9 nm. L'ensemble de cette structure a une longueur d'environ 50 nm et un diamètre de 45 nm. Huit fibrilles protéiques d'une longueur de 50 nm émanent de l'anneau cytoplasmique et baignent dans le cytosol : ils forment la face cytosolique du pore. Du côté nucléaire, huit autres fibrilles, d'une longueur de 100 nm, partent de l'anneau nucléaire et se rejoignent au niveau d'un anneau distal formant une structure appelée le panier nucléaire (*nuclear basket*).

Le NPC est formé par une trentaine de protéines de la famille des nucléoporines (Nups). Les progrès de la protéomique ont permis de constater que si la taille d'un pore varie d'une espèce à une autre, l'organisation et le nombre de nucléoporines est constant (Allen *et al.*, 2001 ; Cronshaw *et al.*, 2002). Chaque nucléoporine est présente à raison de huit copies ou d'un multiple entier de ce chiffre, respectant ainsi la symétrie octogonale. Si la plupart d'entre-elles sont disposées de manière symétrique au niveau du pore, d'autres sont spécifiques des faces nucléaire et cytoplasmique (Fahrenkrog et Aebi, 2003 ; Rout *et al.*, 2003). Une de leur caractéristique structurale est la présence de répétitions de motifs FXFG, GLFG ou FG (F correspond à la phénylalanine, G à la glycine, L à la leucine et X un acide aminé quelconque).

I.2 Les signaux d'import-export

Les molécules activement transportées vers l'intérieur ou à l'extérieur du noyau possèdent des signaux spécifiques, reconnus par les karyophérines. Ces signaux sont appelés séquence de localisation nucléaire ou NLS (*Nuclear Localization Sequence*) et signal d'export nucléaire ou NES (*Nuclear Export Signal*) lorsqu'ils servent respectivement à l'importation ou à l'exportation nucléaire des molécules. En règle générale, les propriétés caryophiles ou d'export de ces signaux sont transférables d'une molécule à une autre et constituent un moyen pour les identifier.

Il existe plusieurs classes de NLS. La majorité d'entre-eux sont dits NLS basiques classiques car ils contiennent une succession de résidus basiques, des lysines et/ou des arginines. Le premier NLS identifié fut celui de l'antigène T du virus simien SV40 (**PKKKRKV**) (Kalderon *et al.*, 1984 ; Kalderon *et al.*, 1984b). Par la suite, des séquences similaires ont été caractérisées chez de nombreuses protéines cellulaires et virales ayant des propriétés caryophiles. L'analyse de ces séquences a permis de faire ressortir deux motifs consensus bien que non exclusifs (Cokol *et al.*, 2000 ; Macara, 2001). Le premier consiste en une succession de quatre résidus basiques alors que le second motif commence par une proline qui est suivie de six acides aminés dont trois des quatre derniers sont basiques. Dans cette classe de NLS, on trouve également un sous-groupe dont les signaux sont dits basiques bipartites ; ils sont présents fréquemment chez les protéines nucléaires de plantes. Comme le nom l'indique, ces signaux comprennent deux motifs basiques qui sont généralement séparés de 6 à 13 acides aminés de toutes natures, dont l'un est constitué du dipeptide KR. Un exemple parmi d'autres, est le NLS de la nucléoplasmine végétale qui possède le motif **KRPAATKKAGQAKKK** (Robbins *et al.*, 1991).

Il existe d'autres séquences d'adressage nucléaire qui diffèrent non seulement des NLS basiques mais qui divergent complètement entre-elles : on les appelle communément NLS non conventionnels. Ils sont trouvés par exemple au niveau des protéines hnRNP (*Heterogenous Nuclear RNP*) : la protéine hnRNP A1 renferme une séquence d'importation qui est localisée dans un domaine de 40 acides aminés particulièrement riche en glycines et appelée M9 (Siomi et Dreyfuss, 1995), la protéine hnRNP K possède une séquence de même longueur appelée domaine KNS (Michael *et al.*, 1997). Ces deux séquences ont la particularité de promouvoir à la fois l'import et l'export nucléaire des protéines alors que de manière générale, les NLS même non conventionnels ne permettent qu'un transport unidirectionnel.

Parfois, les résidus d'un NLS sont répartis sur une longue séquence en acides aminés et, c'est la structure tridimensionnelle de la protéine qui permet le rapprochement de ces résidus (Rosenblum *et al.*, 1998) ; on parle alors de NLS conformationnel. La structure atomique du complexe formé entre la protéine importée et la karyophérine est requise pour leur identification.

Enfin, l'importation des snARN U impliqués dans l'épissage des ARNm nécessite la présence d'une coiffe triméthylée (2,2',7mG) (Hamm *et al.*, 1990b).

Certaines protéines, une fois dans le noyau, gagnent le nucléole (Hiscox, 2007). Leur localisation nucléolaire peut être due à des interactions avec d'autres protéines ou avec des ARN résidant dans ce compartiment, et plus particulièrement les ARN ribosomiques. Il existe bel et bien des séquences appelées « signal de localisation nucléolaire » ou NoLS (*Nucleolar Localization Signal*), mais elles sont assez difficilement identifiables. Elles sont fréquemment composées de résidus basiques, avec une organisation mono- ou multipartite et sont parfois constitutives d'une séquence NLS. Elles peuvent également être conformationnelles. Les protéines L7 et L5 de la sous-unité ribosomique 60S renferment une séquence nucléolaire de ce type (Michael et Dreyfuss, 1996 ; Russo *et al.*, 1997). Peu de choses est encore connu sur la manière dont une protéine se localise, s'accumule ou est retenue dans le nucléole. De ce fait, les NoLS sont également appelés signaux d'adressage nucléolaire ou signaux de rétention nucléolaire.

Les signaux d'export nucléaire (NES) des protéines sont également variables, mais la plupart d'entre eux ont des motifs riches en leucines, répondant à la séquence consensus suivante : LX_(2,3)LX_(2,3)LXL (où L correspond à une leucine et X à un résidu quelconque dont le nombre figure entre parenthèses) (Macara, 2001). Néanmoins les leucines peuvent être remplacées par d'autres résidus aliphatiques. Un des NES les plus étudiés, et le premier identifié, est celui de la protéine Rev du HIV-1 ; sa séquence est LPPLERLTL (Fischer *et al.*, 1995).

Concernant l'exportation nucléaire des ARN, elle dépend de signaux dont la nature varie en fonction de l'acide ribonucléique. Le signal d'export des ARNt est constitué par l'extrémité CCA-3'OH (Lipowsky *et al.*, 1999 ; Arts *et al.*, 1998b) et celui des snARN U par une coiffe monométhylée (m7G) (Dargemont et Kuhn, 1992 ; Hamm et Mattaj, 1990) alors que, l'export des précurseurs des microRNA requiert la structure en forme de tige-boucle et il est facilité par les extrémités 3' flanquantes (Zeng et Cullen, 2004). Aucun motif ou structure de reconnaissance consensus pour les ARN messagers cellulaires n'a été identifié, exception faite d'une séquence riche en AU appelée séquence ARE (*AU Rich Element*) qui est localisée à l'extrémité 3' non codante de certains ARNm et qui permet leur exportation.

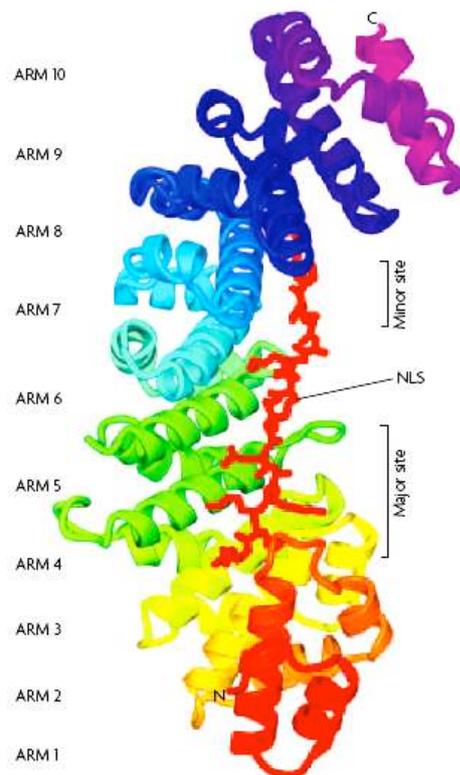


Figure 15 : Les sites de fixation des NLS sur l'importine α (Stewart, 2007). La structure de l'importine α est représentée avec ses dix répétitions des motifs Armadillo en couleurs ; les sites de fixation des NLS sont indiqués, le site majeur de fixation aux NLS correspond aux répétitions ARM 1 à 4 et le site mineur, aux motifs 6 à 8. Le NLS bipartite de la nucléoplasmine est indiqué en rouge à titre d'exemple.

I.3 L'importation nucléaire des protéines

I.3.2 Les importines

Les protéines possédant un NLS, encore dites cargos, sont reconnues et transloquées dans le noyau *via* des récepteurs appelés importines. Ces dernières sont séparées en deux catégories, les importines α et les importines β (pour revues, Fried et Kutay, 2003 ; Stewart, 2007).

L'importine β est le transporteur principal. Cette protéine interagit avec les répétitions de type FG des nucléoporines présentes au niveau du pore nucléaire pour permettre la translocation du complexe cargo-récepteur. Elle reconnaît des NLS qui sont généralement plus longs que les NLS classiques, et composés de nombreux résidus basiques : c'est le cas du NLS des histones, des protéines ribosomiques ou des motifs riches en glycines comme le domaine M9 de la protéine hnRNP A1. Cependant, l'importine β est le plus souvent associée à l'importine α qui joue le rôle d'adaptateur entre le cargo et l'importine β . Sa partie C-terminale est impliquée dans la liaison à l'importine α alors que la région N-terminale renferme un site de fixation de la protéine RanGTP

La plupart des NLS sont reconnus par l'importine α . Cet adaptateur est organisé autour de trois domaines fonctionnels. La région N-terminale renferme un domaine basique de liaison à l'importine β appelé IBB (*Importin β Binding site*), la partie centrale est hydrophobe et formée d'une répétition de dix motifs ARM (pour Armadillo) impliqués dans la fixation de séquence NLS et enfin, une séquence acide en C-terminal qui permet le recyclage de l'importine par le facteur d'export nucléaire CAS (*Cellular Apoptosis Susceptibility*). Les différents facteurs impliqués dans l'importation nucléaire sont répertoriés dans le tableau 1.

| Composants | Autres noms | Fonctions |
|--------------------|--|---|
| Importine β | Kap95*, Kap- β 1, Karyphérine- β | Facteur d'import transportant les cargos à travers les NPC |
| Importine α | Kap60*, Srp1*, Karyphérine- α | Adaptateur liant les cargos contenant un NLS, à l'importine β |
| CAS | Cse1* | Facteur d'export nucléaire de l'importine α |
| Ran | Gsp1* | GTPase régulant les interactions |
| RanGAP | Ran1* | Activateur de la GTPase Ran |
| RanGEF | RCC1, Prp20* | Echange le GDP de Ran par un GTP |
| NTF2 | P10 | Facteur d'import nucléaire de RanGDP |
| RanBP1 | Yrb1* | Protéines accessoires pour la dissociation de RanGDP de l'importine β dans le cytoplasme. |

Tableau 1. Les composants du cycle d'importation nucléaire des protéines (Stewart, 2007)

* Nom chez *Saccharomyces cerevisiae*

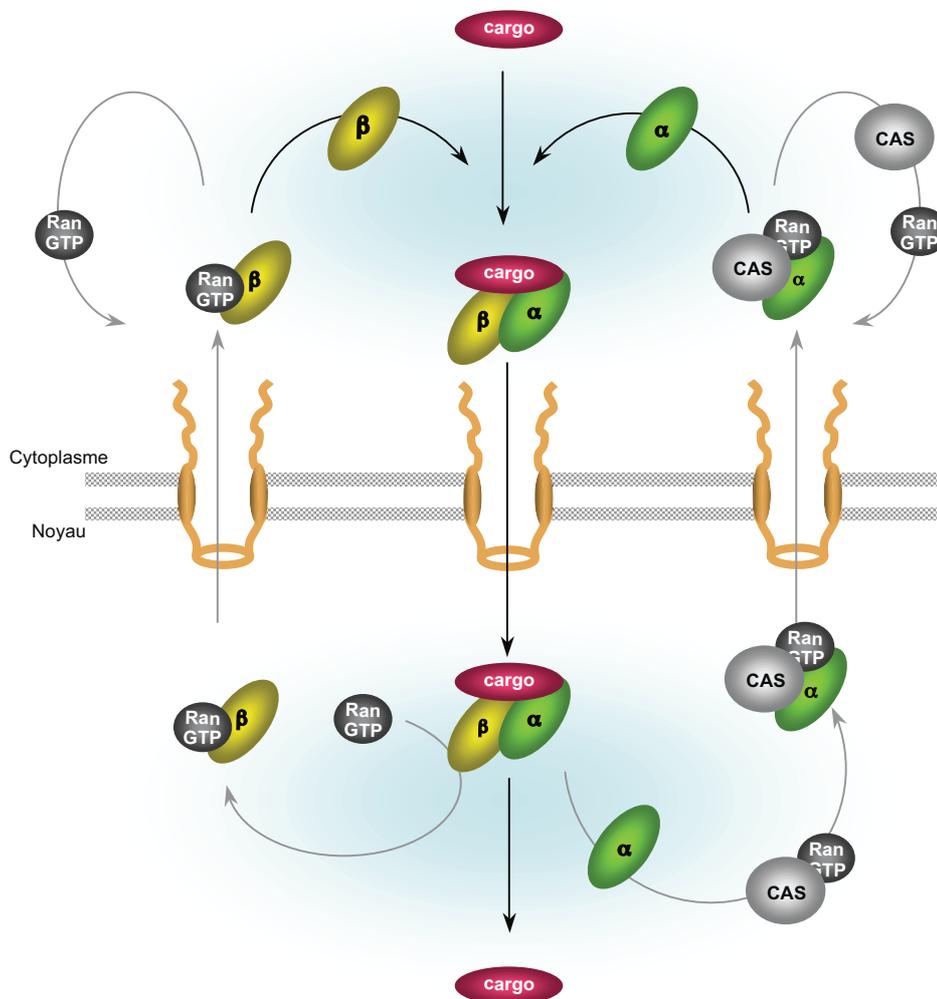


Figure 16 : L'importation nucléaire des protéines par les importines α et β . Le cargo est dans un premier temps, reconnu dans le cytoplasme par l'importine α qui va se complexer à l'importine β . Le complexe cargo-importine α/β est ensuite transloqué à travers le pore nucléaire. La fixation d'une molécule de RanGTP sur l'importine β va conduire à la dissociation du complexe, libérant ainsi le cargo dans le noyau. Le complexe importine β -RanGTP retourne dans le cytoplasme tandis que l'importine α est exportée par la protéine CAS, associée à RanGTP.

I.3.1 Mécanisme général de l'importation nucléaire des protéines

Une des étapes cruciales pour la formation du complexe d'importation est la reconnaissance d'un NLS ; celle-ci s'opère grâce à deux sites de l'importine α , localisés au niveau des répétitions de motifs ARM (Conti et Kuriyan, 2000). Un NLS monopartite ou la séquence la plus basique d'un NLS bipartite se fixe au niveau du site majeur de l'importine α , formé des motifs ARM 1 à 4. En revanche, le motif basique le plus court du NLS bipartite, en général un dipeptide KR, s'assemble au niveau du site mineur constitué des motifs ARM 6 à 8 (Figure 15) (Conti *et al.*, 1998 ; Conti et Kuriyan, 2000 ; Fontes *et al.*, 2000). L'importine α s'associe également à l'importine β *via* son domaine IBB (Gorlich *et al.*, 1996 ; Weis *et al.*, 1996). Le complexe d'importation cargo/importine α/β ainsi formé va pouvoir traverser le pore nucléaire (Figure 16). Cet événement est possible grâce à des interactions engagées entre les transporteurs et les répétitions FG des nucléoporines constitutives des NPC (Bayliss *et al.*, 2000 ; Bayliss *et al.*, 2002b). Ces interactions sont faibles et transitoires permettant le déplacement rapide du complexe à travers le canal (Bayliss *et al.*, 1999). Il a été montré grâce à des mutants dont l'affinité pour les motifs FG est atténuée, que ces interactions sont primordiales pour l'importation de l'importine β et de la protéine RanGTP (Bednenko *et al.*, 2003) (Bayliss *et al.*, 1999 ; Bayliss *et al.*, 2000 ; Bayliss *et al.*, 2002 ; Bayliss *et al.*, 2002b). Les nucléoporines jouent un rôle important pour la traversée du pore mais aussi pour le relargage du cargo. Cependant, le mécanisme de translocation n'est pas totalement établi bien que de nombreuses études suggèrent que le complexe d'importation saute d'une répétition FG à une autre à la manière d'un galet faisant des ricochets.

Une fois dans le nucléoplasme, le complexe va se dissocier grâce à l'action de la protéine Ran couplée au GTP (RanGTP). Le site de liaison de RanGTP sur l'importine β chevauche partiellement le domaine IBB de sorte que la fixation de la GTPase va provoquer un changement conformationnel de l'importine β qui induira une diminution de l'affinité pour l'importine α et par conséquent, la dissociation du transporteur et de son adaptateur (Lee *et al.*, 2005). Cette dissociation est irréversible et indispensable pour le relargage du cargo. En effet, le domaine IBB de l'importine α possède une grande affinité pour le site de fixation des NLS de l'importine α et il entre en compétition avec le signal d'import du cargo, conduisant à la libération de ce dernier (Kobe, 1999).

Après la dissociation du complexe d'importation, les différents transporteurs doivent être acheminés vers le cytoplasme pour un nouveau cycle d'import. L'importine β couplée à RanGTP va rejoindre par elle-même le cytosol *via* des interactions qu'elle engage avec les nucléoporines. En revanche, l'importine α est exportée par la protéine CAS, couplée à RanGTP, qui possède une organisation similaire à l'importine β . Dans le cytoplasme, l'hydrolyse du GTP conduira à la libération des importines α et β , et la protéine RanGDP sera réimportée dans le noyau par le facteur NTF2 (Stewart, 2007).

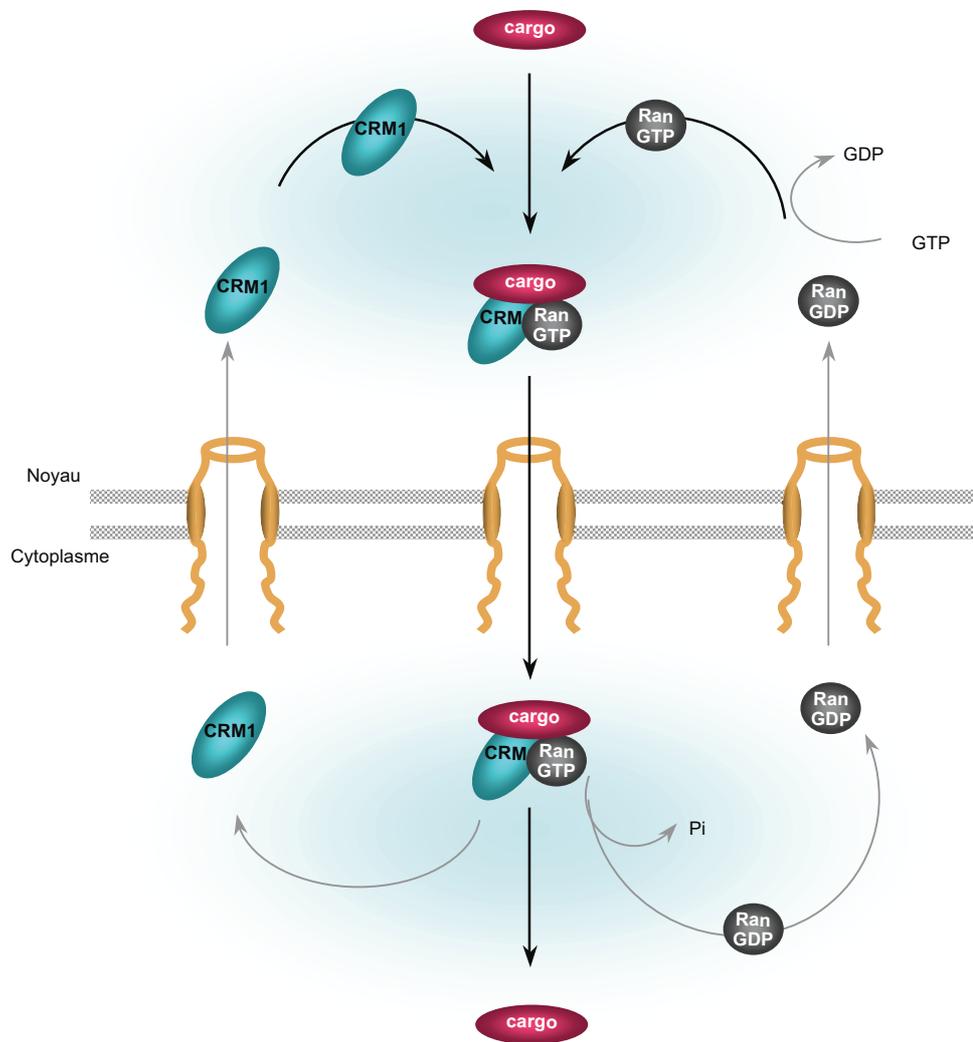


Figure 17 : L'exportation nucléaire des protéines. L'exportine fixe son substrat dans le noyau pour former un complexe ternaire cargo-exportine-RanGTP qui est ensuite exporté dans le cytoplasme. L'hydrolyse du GTP de Ran conduit à la dissociation du complexe et à la libération du cargo dans le cytoplasme. L'exportine CRM-1 et la protéine RanGDP retournent alors dans le noyau.

I.4 L'exportation nucléaire des protéines et des ARN

L'exportation nucléaire des protéines et des acides ribonucléïques requiert des transporteurs connus sous le terme générique d'exportines et qui appartiennent comme les importines, à la famille des karyophérines.

La voie la plus connue est celle de l'exportine 1, encore appelée XPO1 ou CRM-1 (*Chromosom Region Maintenance protein 1*) (Fornerod *et al.*, 1997 ; Haasen *et al.*, 1999). Cette dernière est impliquée dans l'exportation des protéines renfermant un NES riche en leucines (mais pas exclusivement) (Fornerod *et al.*, 1997) et, concernant les acides nucléiques, des ARN ribosomiques, de certains ARN messagers cellulaires ou viraux et des snRNA U. Si l'exportine CRM-1 reconnaît et se fixe directement aux protéines, l'export des ARN nécessite presque exclusivement la présence d'adaptateurs protéiques (Fried et Kutay, 2003).

I.4.1 L'exportation nucléaire des protéines

L'exportation des protéines débute par la reconnaissance de la séquence NES de la molécule cargo par l'exportine, suivi de l'association d'une molécule de RanGTP, formant un complexe ternaire Cargo/CRM-1/RanGTP. Ce complexe traverse alors le NPC grâce à des interactions faibles engagées entre le transporteur et les répétitions FG des nucléoporines (Figure 17). A la face cytoplasmique du pore, la protéine RanGAP associée aux deux cofacteurs RanBP1 et RanBP2, va procéder à l'hydrolyse du GTP de Ran entraînant sa dissociation du complexe. Le départ de RanGTP va conduire à une perte d'affinité du transporteur pour son cargo, permettant son relargage dans le cytosol. La protéine CRM-1 est alors réimportée directement dans le noyau grâce aux interactions qu'elle engage avec les nucléoporines, puis libre dans le noyau, elle s'engagera dans un nouveau cycle d'export (Fried et Kutay, 2003).

Une autre exportine, la protéine CAS a été caractérisée comme étant le transporteur spécifique de l'importine α (Kutay *et al.*, 1997 ; Kunzler et Hurt, 1998). Cette protéine a été caractérisée chez l'homme et la levure de même qu'un homologue, chez *Arabidopsis thaliana* (Haasen et Merkle, 2002). La protéine CAS fonctionne également sous une forme complexée à RanGTP. Elle reconnaît l'importine α et se fixe à son domaine acide C-terminal.

I.4.2 L'exportation nucléaire des snRNA U

L'exportation des snRNA U (*small nuclear RNA*) est dépendante de la voie CRM-1 (Figure 18). Ces ARN sont impliqués, sous formes de complexes ribonucléoprotéiques (snRNP), dans

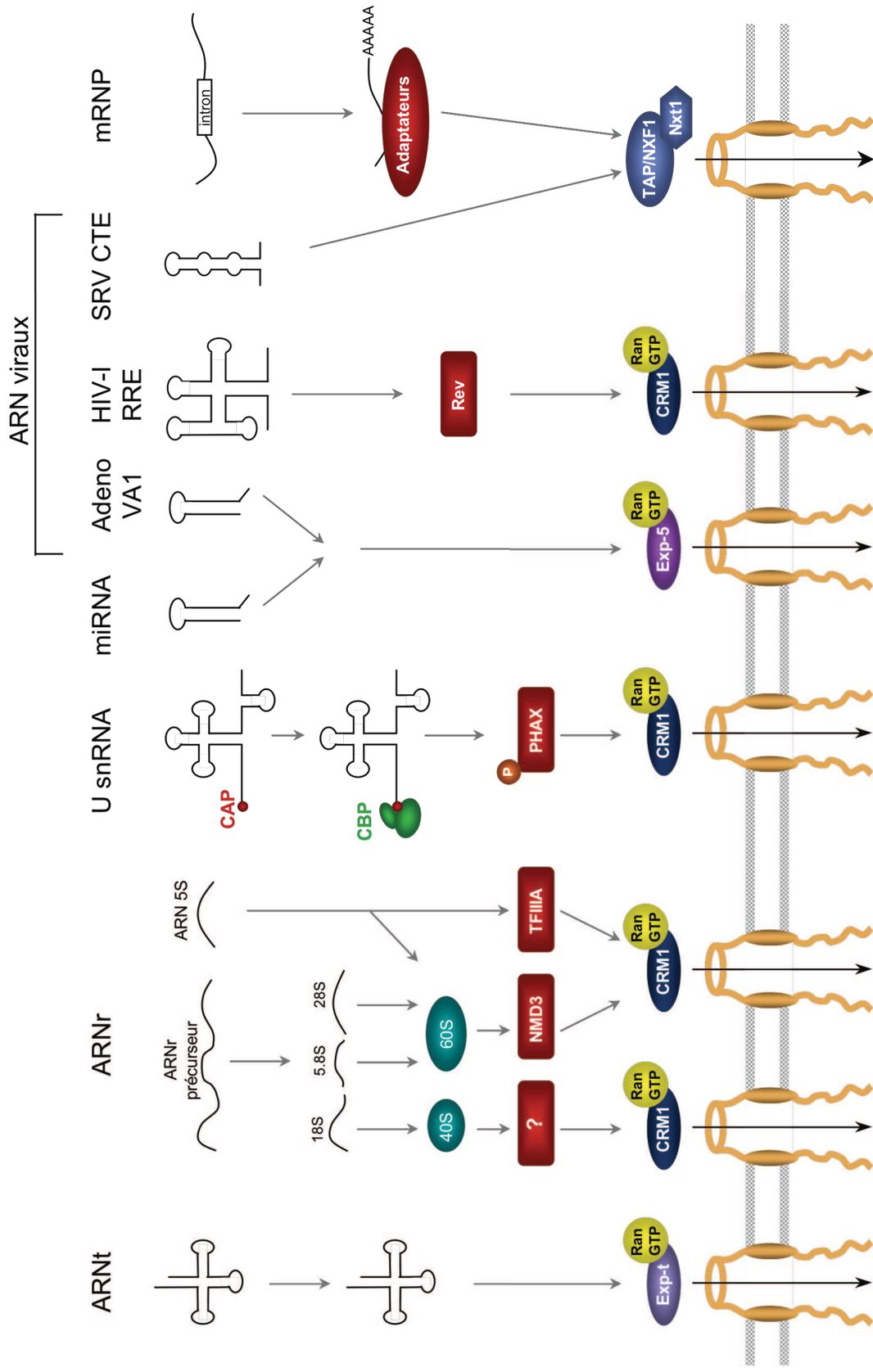


Figure 18 : Les différentes voies d'exportation des ARN cellulaires et de quelques ARN viraux par les karyophérines, selon Rodriguez et al., 2004.

Les différentes classes d'ARN cellulaires sont schématisées : les ARN de transfert (ARNt), les snRNA U (U snRNA), les microARN (miRNA) et les ARN messagers sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (mRNP). Pour les ARN viraux, sont représentés : l'ARN VA1 de l'adénovirus (Adeno), le motif RRE (Rev Recognition Element) du virus HIV de type 1 (HIV-1), la structure dite CTE (Constitutive transport Element) des messagers du virus du sarcome de Roux (SRV).

l'épissage des ARN pré-messagers. Après leur synthèse dans le noyau par l'ARN polymérase II, ils rejoignent le cytoplasme pour s'assembler en snRNP matures (à l'exception du snRNA U6) et regagnent ensuite le noyau. Les snRNA sont coiffés (m7G) après leur transcription et cette modification joue un rôle critique (Hamm et Mattaj, 1990). En effet, cette coiffe est reconnue par le complexe CBC (*Cap-Binding Complex*) qui est formée des protéines CBP20 et CBP80 (Izaurrealde *et al.*, 1995). Ces dernières étant dépourvues de NES, elles ne seront fixées à l'exportine CRM-1 que par le biais d'un adaptateur, la protéine PHAX qui n'est active que sous forme phosphorylée (Ohno *et al.*, 2000). Ainsi, le complexe snRNA/CBP20/CBP80 s'associe à la protéine PHAX phosphorylée qui s'est liée au préalable à l'exportine CRM-1 complexé à RanGTP. Cet ensemble va alors traverser le pore nucléaire et la déphosphorylation de PHAX couplée à l'hydrolyse du GTP de Ran va entraîner la dissociation du complexe (Ohno *et al.*, 2000).

I.4.3 L'exportation des sous-unités ribosomiques

Les ARN ribosomiques 28S, 18S et 5,8S sont transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase I sous la forme d'un long précurseur qui sera clivé et modifié post-transcriptionnellement, donnant ainsi naissance aux ARNr matures. L'ARNr 5S est transcrit par l'ARN polymérase III. Les ARNr 28S, 5,8S et 5S sont associés dans le nucléole à une cinquantaines de protéines ribosomiques pour former la sous-unité ribosomique 60S prématuration, alors que l'ARN 18S et 33 protéines vont former la sous-unité 40S. Les ARNr sont donc exportés dans le cytoplasme sous la forme de grands complexes ribonucleoprotéiques par CRM-1 et ce, selon un mécanisme dépendant de RanGTP (Hurt *et al.*, 1999) (Moy et Silver, 1999) (Figures 18 et 19). La sous-unité 60S se fixe à son adaptateur, la protéine Nmd3p, *via* une interaction avec la protéine ribosomique RpL10 (Ho et Johnson, 1999). Nmd3p peut alors engager des interactions avec l'exportine CRM-1 par le biais de ses deux NES riches en leucines, situés dans sa région C-terminale (Ho *et al.*, 2000 ; Gadal *et al.*, 2001). Après la traversée du pore nucléaire, CRM-1 se dissocie de Nmd3p suite à l'hydrolyse de RanGTP, tandis que Nmd3p est relaguée de la sous-unité 60S sous l'action de Lsg1, une GTPase cytoplasmique (Hedges *et al.*, 2005 ; West *et al.*, 2005). Enfin, il a été observé très récemment que la sous-unité 60S est également exportée indépendamment de CRM-1 chez la levure, *via* l'hétérodimère Mex67-Mtr2 connu pour son rôle dans l'export des ARNm (Yao *et al.*, 2007). L'export de la sous-unité 40S prématuration est également dépendant de la voie CRM-1 (Moy et Silver, 1999). Néanmoins, la protéine Nmd3p ne peut pas interagir avec elle ce qui suggère qu'un autre adaptateur est requis pour son exportation ; celui-ci n'est toujours pas identifié à l'heure actuelle. Enfin, il s'avère que l'ARNr 5S du xénope n'est pas seulement exporté *via* la sous-unité 60S mais également sous la forme de particules dite 7S, grâce au

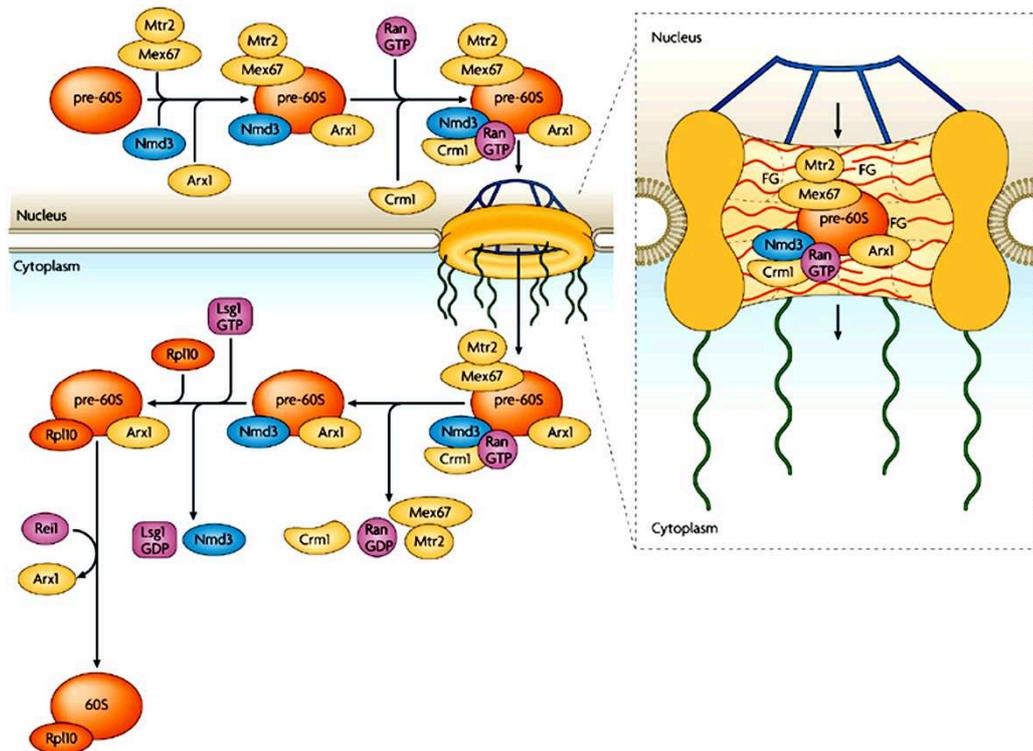


Figure 19 : L'export nucléaire de la sous-unité ribosomique 60S chez la levure (Köhler et Hurt, 2007). Après l'assemblage de ses différents constituants dans le nucléole, la particule 60S prématuration va rejoindre le nucléoplasme pour y recruter différents facteurs d'export. Elle va d'une part, interagir avec le facteur Nmd3p qui servira d'adaptateur pour l'export *via* l'exportine CRM1 et d'autre part, interagir directement avec le complexe d'export Mex67-Mtr2 associé à ses cofacteurs. Après la translocation à travers le pore nucléaire, les différents facteurs d'export se dissocient de la sous-unité 60S. Les différents facteurs sont représentés et un agrandissement du pore nucléaire permet de visualiser le complexe d'export associé aux nucléoporines.

facteur de transcription TFIIIA impliqué dans l'expression de son gène (Nakielny *et al.*, 1997 ; Fridell *et al.* 1996).

I.4.4 Les voies d'export des ARN messagers

Les ARN messagers diffèrent en longueur et en structure et, nécessitent des stratégies plus complexes pour leur exportation nucléaire. Ils doivent être conduits vers les pores nucléaires de manière coordonnée avec les processus impliqués dans leur maturation. Brièvement, les ARNm sont synthétisés par l'ARN polymérase II sous la forme de précurseurs (les ARN prémessagers) qui sont coiffés en 5', épissés puis clivés et polyadénylés en 3'. Il existe au moins deux voies d'export différentes (dont CRM-1) puisque la présence de leptomycine B, un inhibiteur de la voie CRM-1, ne bloque que faiblement l'exportation des ARNm (Fornerod *et al.*, 1997), ce qui signifie que seule une petite fraction des ARNm est exportée du noyau par cette voie. Ces ARNm qui codent généralement pour des proto-oncogènes ou des cytokines, possèdent dans leur région 3' non traduite une séquence ARE (Brennan *et al.*, 2000). Ils sont recrutés par la protéine HuR qui interagit elle-même avec deux protéines nucléo-cytoplasmiques : pp32 et APRIL. Ces deux protéines renferment un NES riche en leucines leur permettant d'interagir avec CRM-1 (Brennan *et al.*, 2000). Il est établi que CRM-1 est le transporteur ciblé par certaines protéines virales pour promouvoir l'export de messagers viraux non épissés ou partiellement épissés. Les exemples types sont la protéine Rev du HIV-1 (Figure 18) et la protéine E1b des adénovirus ; elles renferment toutes les deux, un NES reconnu par CRM-1 (Cullen, 2003b). Historiquement, c'est d'ailleurs la caractérisation du NES de la protéine Rev qui a permis d'identifier CRM-1 comme un récepteur de l'export nucléaire (Fischer *et al.*, 1995).

La majorité des ARN messagers est en fait exportée par une voie indépendante des karyophérines et du système RanGTP. Le transporteur est un hétérodimère formé des protéines mex67 et Mtr2 chez la levure, encore connu sous le nom de complexe TAP-p15 ou NXF1-NXT1 (Figure 20). Ce transporteur hétérodimérique engage des interactions physiques avec les répétitions FG des nucléoporines pour médier l'exportation (Segref *et al.*, 1997). En plus de son rôle physiologique dans l'exportation nucléaire des ARNm cellulaires, la protéine TAP humaine transporte des ARNm viraux en se fixant directement au niveau de structures secondaires en tige-boucle appelées CTE pour *Constitutive Transport Element*, présents chez les rétrovirus simples (Figure 18) (Gruter *et al.*, 1998).

Les ARNm cellulaires exportés par cette voie sont tous polyadénylés. Ils seront ciblés par des adaptateurs qui les relient aux transporteurs. Ces adaptateurs sont multiples et bien que peu d'entre-eux soient identifiés, ils sont typiquement des protéines de liaison à l'ARN. Le plus connu est le facteur Yra1 chez la levure, aussi connu sous le nom de ALY ou REF chez les métazoaires. Ces facteurs interagissent directement avec TAP-p15 (Reed et Hurt, 2002 ; Stutz et Izaurralde, 2003), et

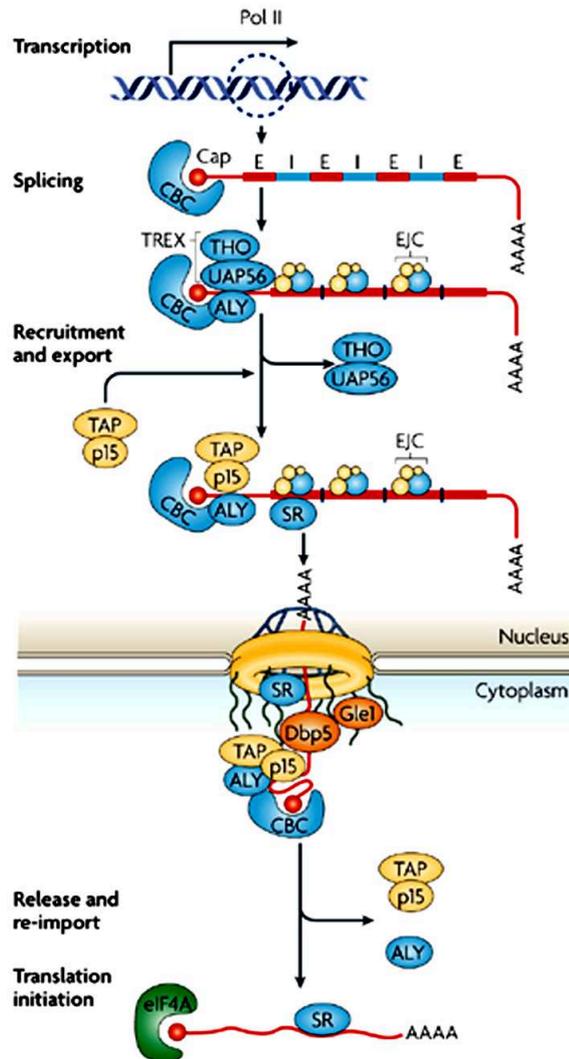


Figure 20 : Le couplage épissage-export des ARNm chez les métazoaires (Köhler et Hurt, 2007). Après la transcription, les ARN pré-messagers sont coiffés, polyadénylés et épissés. Ces étapes qui impliquent entre autres le complexe TREX, sont couplées à l'exportation nucléaire des ARNm. L'hétérodimère d'export TAP-p15 et les cofacteurs principaux comme CBC, ALY et les protéines SR sont représentés. Après l'export des mRNPs et la dissociation des protéines impliquées dans cette étape, les ARNm seront accessibles pour la machinerie traductionnelle.

engagent des interactions physiques avec la protéine UAP56 (Sub2 chez la levure), une ARN hélicase impliquée dans la biogenèse des complexes mRNP, pour faire la liaison avec les acides ribonucléiques (Strasser et Hurt, 2001 ; Zenklusen *et al.*, 2002). De nombreux facteurs, dont le rôle initial est l'épissage ou le contrôle-qualité des ARN, interagissent avec UAP56 ou ses partenaires, suggérant très fortement que les différentes étapes qui conduisent à la maturation des ARNm sont couplées à l'exportation nucléaire (Kohler et Hurt, 2007). A titre d'exemple, les protéines SR (appelées ainsi car elles sont riches en sérines (S) et arginines (R)) sont des phosphoprotéines qui jouent un rôle essentiel à la fois dans l'épissage, dans l'export et la stabilité des ARNm (Huang et Steitz, 2005). Après épissage, certaines protéines SR restent fixées aux transcrits épissés et participent à l'exportation grâce à une interaction directe avec TAP-p15 (Caceres *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 2003). Elles seront ensuite ré-importées dans le noyau. Chez la levure, un grand complexe multiprotéique, appelé TREX, qui est impliqué dans la transcription, comprend les protéines Yra1 et Sub2, suggérant vu leurs fonctions, que la transcription et l'export sont couplés chez cet organisme (Strasser *et al.*, 2002). Le complexe TREX est aussi présent chez l'animal et comprend entre autres, la protéine UAP56. Il est impliqué dans les événements d'épissage, ce qui signifie qu'il y a un couplage entre épissage et export des ARNm, grâce aux protéines ALY, UAP56 et TAP-p15 (Zhou *et al.*, 2000 ; Le Hir *et al.*, 2000). En effet, ces dernières sont associées aux EJC (*Exon junction complex*), des complexes qui jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la qualité des ARN néosynthétisés par le système du NMD (*Nonsense-Mediated RNA Decay*) (Le Hir *et al.*, 2001).

Outre son rôle dans l'exportation des ARNm cellulaires, la protéine ALY fonctionne également comme un adaptateur pour des transcrits viraux épissés. Par exemple, la protéine ICP27 du virus de l'herpès simplex utilise ALY pour accéder au transporteur TAP-p15 pour promouvoir ainsi l'export des transcrits viraux (Koffa *et al.*, 2001).

I.4.4 L'exportation des ARNt

L'export nucléaire des ARNt est médié par l'exportine-t (Exp-t), encore appelée PAUSED chez *Arabidopsis thaliana* ; elle appartient aussi à la famille des karyophérines (Arts *et al.*, 1998 ; Kutay *et al.*, 1998 ; Hunter *et al.*, 2003). L'exportine-t reconnaît et fixe directement les ARN de transfert pour les exporter dans le cytoplasme par un mécanisme dépendant de RanGTP (Figure 21). Après leur synthèse par l'ARN polymérase III, les pré-ARNt subissent plusieurs modifications post-transcriptionnelles comme le clivage de l'extrémité 5' par la RNase P, la substitution des uraciles en 3' par le triplet CCA présents chez tous les ARNt et, pour certains d'entre-eux, un épissage pour éliminer un intron localisé au niveau de la boucle de l'anticodon (Hopper et Phizicky, 2003). Il est apparu que seule la maturation des extrémités 5' et 3' des ARNt est nécessaire pour permettre leur reconnaissance

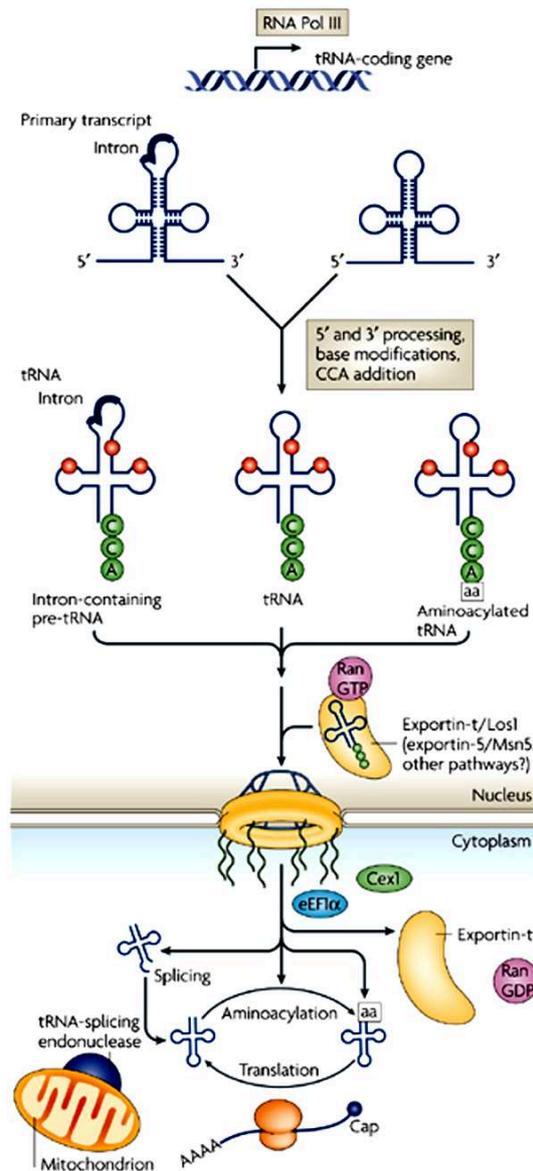


Figure 21 : L'exportation des ARNt chez la levure (Köhler et Hurt, 2007). Après la transcription de l'ARNt prématuro par l'ARN polymérase III, ce dernier subit des étapes de maturation au niveau de ces extrémités 5' et 3'. Il est aussi épissé s'il contient un intron. L'épissage se déroule avant l'exportation nucléaire chez les animaux ou les plantes mais il peut s'effectuer au niveau de la membrane externe des mitochondries chez la levure. Les ARNt, qu'ils soient épissés, aminoacylés ou non, vont être reconnus par l'exportine-t associée à RanGTP puis exportés dans le cytoplasme. Après hydrolyse du GTP de Ran, le complexe d'export sera dissocié et les ARNt seront libérés.

par l'exportine-t (Lipowsky *et al.*, 1999 ; Arts *et al.*, 1998b). En effet, des extrémités 5' et 3' incorrectes diminuent très fortement l'interaction entre l'ARNt et l'exportine alors que la présence d'un intron ou l'aminoacylation de l'ARNt ne perturbent pas l'exportation nucléaire (Lund et Dahlberg, 1998 ; Arts *et al.*, 1998b).

I.4.4 L'exportation nucléaire des miRNA

Les miRNA sont une classe d'ARN non codant participant à la régulation de l'expression des gènes cellulaires par le mécanisme de RNA silencing. Ils sont présents dans le noyau sous la forme de précurseurs, les pri-miRNA, qui possèdent une structure secondaire en tige-boucle d'une taille d'environ 70 nt de long. Cette tige-boucle est excisée par l'action de Drosha, une enzyme de type RNase III (Lee *et al.*, 2003), puis exportée dans le cytoplasme pour y être clivée par une autre RNase III appelée Dicer (Bartel, 2004) (Figure 22). L'export des miRNA se fait par l'exportine-5 également connue sous le nom de HASTY, son homologue chez *Arabidopsis thaliana*, de manière Ran-dépendante (Bollman *et al.*, 2003 ; Yi *et al.*, 2003 ; Lund *et al.*, 2004). La présence de deux nucléotides flottants en 3' du pri-miRNA est impliquée à la fois dans la reconnaissance par l'exportine 5 et par l'enzyme Dicer (Zeng et Cullen, 2004).

L'exportine 5 transporte également d'autres petits ARN comme l'ARN Y humain, d'une longueur d'environ 100 nt, qui est constitutif de la particule ribonucléique Ro ou l'ARN VA codé par les adénovirus (Figure 18), dont la séquence comporte environ 160 nt (Gwizdek *et al.*, 2001 ; Rutjes *et al.*, 2001).

Les acteurs principaux des voies d'exportation nucléaires des protéines et des acides ribonucléiques sont résumés dans le tableau 2, présenté sur la page suivante.

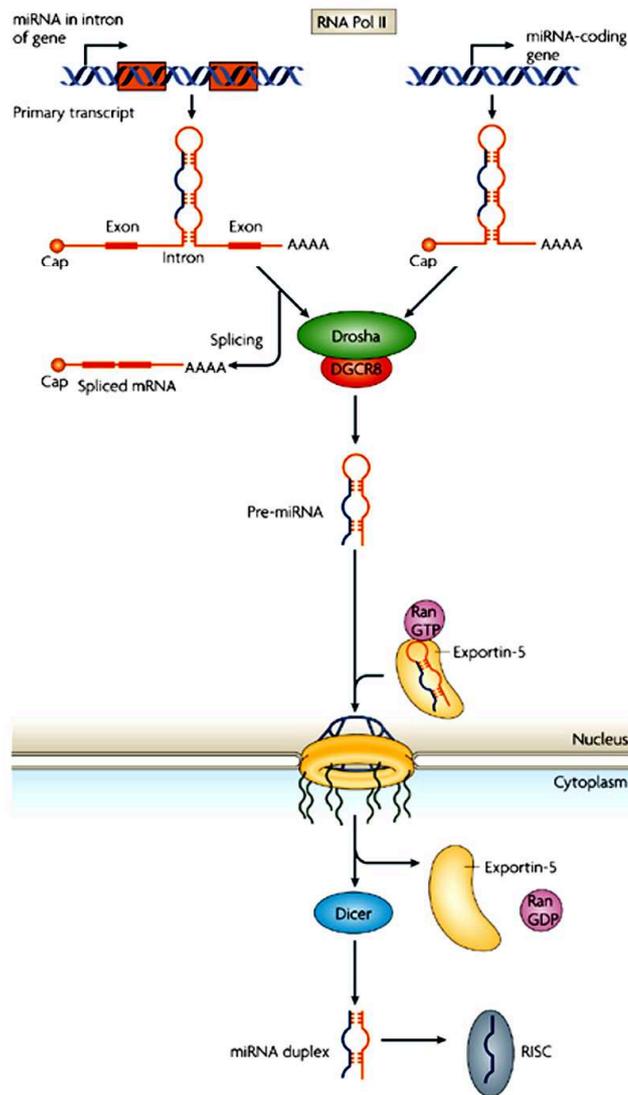


Figure 22 : Biogénèse et exportation nucléaire des microRNA (Köhler et Hurt, 2007). Les précurseurs des miRNA sont codés par leur propre gène ou contenus dans l'intron d'un autre gène. La région en tige-boucle contenant le miRNA est excisée par l'enzyme Drosha pour donner le pré-miRNA. Ce dernier est alors reconnu et exporté du noyau par l'exportine-5 couplée à la protéine RanGTP. Dans le cytoplasme, le complexe d'export est dissocié et le pré-miRNA est clivé par l'enzyme Dicer, en un petit ARN de 20 à 24 nucléotides ; ce dernier est ensuite incorporé dans le complexe RISC et guide le clivage de messagers cellulaires ou inhibe leur traduction.

| Composants (espèces) | Fonctions |
|---|--|
| Exportine-1 ou CRM-1 (Hs) Xpo-1 (Sc, At) | Caryophérine impliquée dans l'export des protéines, des ARNm, ARNr, snRNA U |
| Exportine-5 (Hs) HASTY (At) | Facteur d'export des miRNA |
| Exportine-t (Hs), Los1 (Sc), PAUSED (At) | Facteur d'export nucléaire des ARNt |
| Nmd3p (Sc) | Adaptateur de CRM-1 pour l'export de la sous-unité 60S ribosomique |
| Lsg1 (Sc) | GTPase impliquée dans le recyclage de Nmd3p |
| PHAX (Hs) | Adaptateur de l'export des U snRNA |
| CBP20-80 (Hs, Sc) | Complexe hétérodimérique fixant la coiffe, export des U snRNA |
| TAP-p15 ou NXF1-NTX1 (Hs), Mex67-Mtr2 (Sc) | Récepteur pour l'exportation des ARNm |
| ALY ou REF (Hs), Yra1 (Sc) | Adaptateur pour le couplage de la transcription et l'export des ARNm |
| UAP56 (Hs), Sub2 (Sc) | ARN hélicase, interagit avec ALY et des complexes impliqués dans la biogenèse des mRNP |
| Protéines SR | Facteurs d'épissage, export des ARNm |
| Hpr1-Tho2-Mft1-Thp2-TeX1- Sub2-Yra1 | Complexe TREX, couplage transcription et export des ARNm |

Tableau 2. Les principaux facteurs impliqués dans l'exportation nucléaire des protéines et des ARN cellulaires (Kohler et Hurt, 2007). Hs, *Homo sapiens* ; Sc, *Saccharomyces cerevisiae* ; At, *Arabidopsis thaliana*.

I.5 La régulation du transport nucléo-cytoplasmique

L'acteur clé de la régulation du transport nucléo-cytoplasmique est la protéine Ran, une petite protéine G, qui existe sous une forme complexée soit au GTP soit au GDP (pour revue, Takai *et al.*, 2001). Le rôle de Ran est de réguler la fixation et le relargage d'un récepteur et du cargo devant être importé. La distribution asymétrique entre le noyau et le cytoplasme de cette protéine et des facteurs qui régulent l'échange entre le GTP et le GDP oriente le transport nucléo-cytoplasmique (Izaurrealde *et al.*, 1997). Le complexe RanGTP est majoritairement présent dans le noyau, à un taux environ mille fois supérieur à celui du complexe RanGDP se trouvant dans le cytoplasme. RanGDP est incapable de s'ancrer au complexe cargo-importine dans le cytoplasme alors que dans le noyau, RanGTP possède une affinité très forte pour le transporteur.

Dans le noyau, la fixation avec une forte affinité de RanGTP sur le complexe cargo-importine entraîne un changement conformationnel du transporteur et conduit à la libération du cargo. RanGTP reste associée aux facteurs d'export et traverse le NPC pour rejoindre le cytosol. A la face cytoplasmique du pore, la protéine RanGAP (*RanGTPase activating protein*) et ses deux cofacteurs

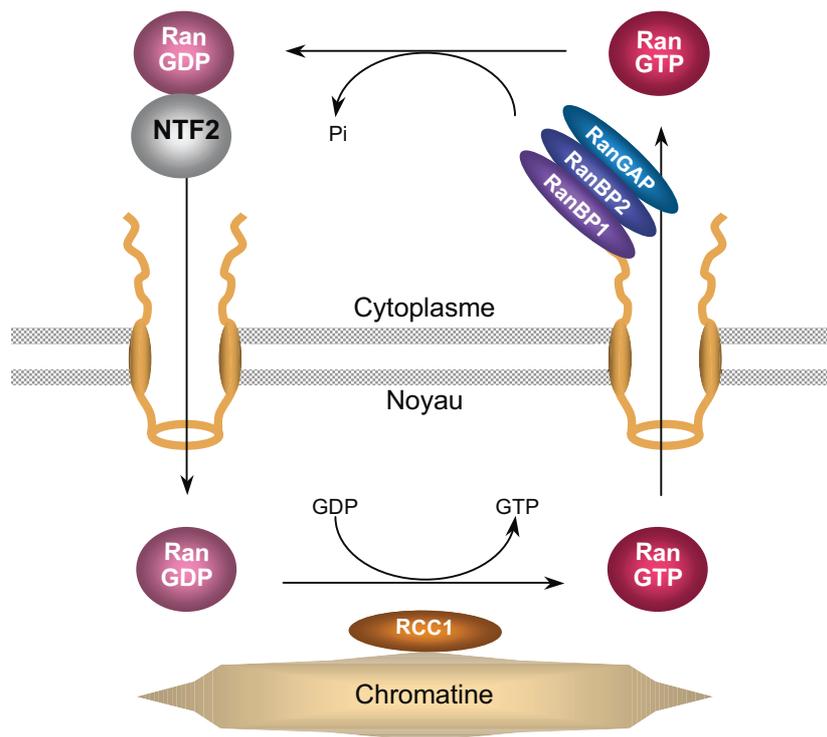


Figure 23 : Le cycle de la GTPase Ran selon Fahrenkrog et Aebi (2003). La GTPase Ran est sous la forme RanGTP dans le noyau grâce à l'activité du facteur d'échange RCC1 (ou RanGEF) qui permet l'échange entre une molécule de GTP et de GDP. Ce facteur est associé à la chromatine. Dans le cytoplasme, elle est sous forme RanGDP suite à l'hydrolyse du GTP qui est stimulée par la phosphatase RanGAP assistée des coactivateurs RanBP1 et RanBP2. Ces dernières sont localisées au niveau des filaments cytoplasmiques du pore nucléaire. La protéine RanGDP est ensuite ré-importée dans le noyau par le facteur NTF2.

RanBP1 et RanBP2 (*Ran Binding Protein 1 et 2*), localisés au niveau des filaments cytoplasmiques du pore nucléaire, vont conduire à l'hydrolyse du GTP de Ran. RanGDP est alors ré-importée dans le noyau par la protéine NTF2. Dans le nucléoplasme, la protéine RanGEF (*Ran Guanine-nucleotide-Exchange Factor*) aussi connue sous le nom de RCC1, promeut l'échange du GDP de Ran contre une molécule de GTP. La molécule Ran est alors prête pour un nouveau cycle de régulation (Fahrenkrog et Aebi, 2003) (Figure 23).

Le gradient de RanGTP entre les compartiments nucléo-cytoplasmiques est strictement dépendant de la localisation des protéines qui régule l'état de Ran. La protéine RanGEF n'est présente que dans le noyau où elle est principalement associée à la chromatine (Nemergut et Macara, 2000 ; Talcott et Moore, 2000). A l'inverse, les protéines RanGAP, RanBP1 et RanBP2 sont strictement cytoplasmiques. RanGAP est dépourvue de NLS et sa taille ne lui permet pas de diffuser à travers le pore nucléaire. De plus, cette dernière est modifiée par sumoylation, ce qui la retient à la face cytoplasmique du pore (Matunis *et al.*, 1996 ; Mahajan *et al.*, 1997). RanBP2 est en réalité une nucléoporine (Nup358) localisée sur les filaments cytoplasmiques des NPC et elle renferme quatre motifs de liaison à Ran favorisant la dissociation du complexe transporteur-RanGTP (Wu *et al.*, 1995). Enfin, RanBP1 est assez petite pour diffuser, mais elle possède un NES reconnu par CRM-1 qui la ré-exporte continuellement dans le cytoplasme.

Le transport nucléo-cytoplasmique des macromolécules peut également être régulé par des modifications post-traductionnelles présentes sur les facteurs impliqués dans le transport ou sur la molécule devant transiter. Elles sont généralement de trois types : la phosphorylation, la méthylation et la sumoylation.

La phosphorylation du NLS de l'antigène T du SV 40 module son importation (Jans *et al.*, 1991) alors qu'inversement, celles des facteurs de transcription de la famille NFAT, chez les mammifères, conduit à leur rétention cytoplasmique (Chow *et al.*, 1997 ; Rao *et al.*, 1997). La phosphorylation du facteur PHAX est nécessaire pour l'exportation des snARN U (Ohno *et al.*, 2000) et celle de certaines protéines du NPC par la protéine kinase C, régule l'exportation nucléaire des protéines et des ARN (Yang *et al.*, 1997).

De nombreuses hnRNPs sont diméthylées au niveau d'arginines par une méthyltransférase avant leur exportation vers le cytoplasme (Liu et Dreyfuss, 1995). Enfin, la sumoylation par le complexe SUMO (*Small Ubiquitin-related Modifier*) de la protéine CCtBP1 et du répresseur transcriptionnel TEL est requise pour leur localisation dans le noyau (Lin *et al.*, 2003 ; Wood *et al.*, 2003) alors que cette modification permet de retenir la protéine RanGAP dans le cytoplasme (Matunis *et al.*, 1996 ; Mahajan *et al.*, 1997).

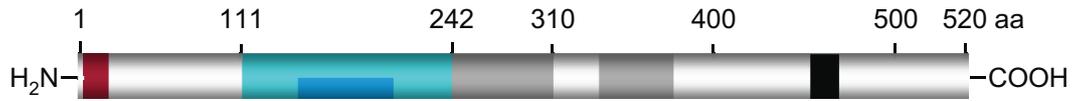


Figure 24. Représentation schématique de la protéine P6 du CaMV. Les extrémités N- et C-terminales ainsi que la position en acides aminés de certains domaines sont représentés. Les domaines de P6 relatifs à ses propriétés intrinsèques ou fonctionnelles sont représentés par des boîtes de couleurs dont la correspondance est détaillée ci-dessous.

- Domaine minimal nécessaire à la *transactivation* traductionnelle (domaine miniTAV)
- Domaine de fixation aux ARN double brin et aux hétéroduplex ARN/ADN (dsRNABD)
- Domaines putatifs de fixation aux ARN simple brin (ssRNABD)
- Motif en doigt à zinc
- Signal d'export nucléaire (NES)

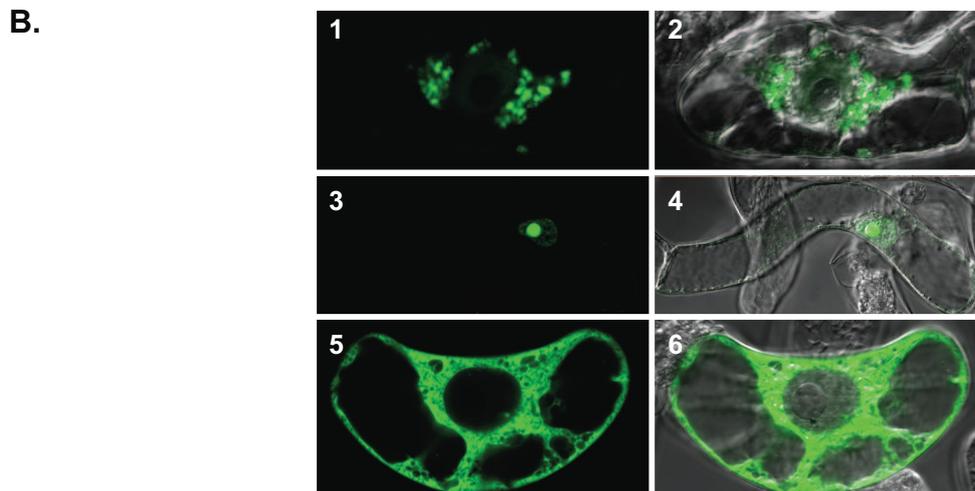
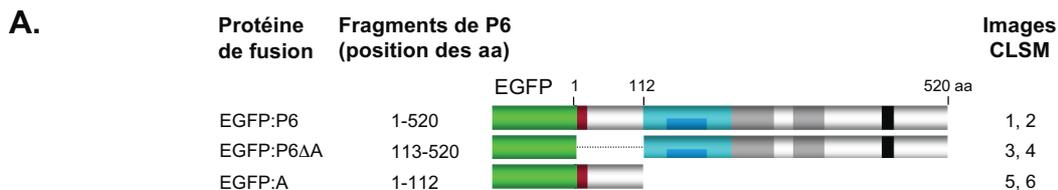


Figure 25 : Localisation subcellulaire de la protéine P6 ou de versions délétées fusionnées à la EGFP dans des cellules de tabac BY-2. A. Représentation schématique de la protéine P6 complète et de ses versions tronquées fusionnées à l'extrémité C-terminale de la EGFP. B. Localisation subcellulaire de EGFP:P6 (photographies 1 et 2), EGFP:P6ΔA (3 et 4) et EGFP:A (5 et 6) dans des cellules de tabac BY-2, 20h après transfection par biolistique. Les images en fluorescence ont été obtenues par microscopie confocale. Les images 2, 4 et 6 correspondent à la superposition de l'image de fluorescence et du contraste interférentiel différentiel (DIC).

II Les caractéristiques de l'importation nucléaire de la protéine P6

Pendant de nombreuses années, la protéine P6 du CaMV a été considérée à tort comme strictement cytoplasmique. Cette méprise est probablement une conséquence de la forte accumulation cytoplasmique de la protéine P6, notamment sous forme de viroplasmies, qui masquait tout marquage nucléaire en microscopie optique et électronique.

Sa localisation nucléaire a été découverte fortuitement au cours de l'étude de la formation des viroplasmies denses au laboratoire (Haas *et al.*, 2005). Il avait été observé que le domaine N-terminal de P6 appelé domaine A (résidus 1 à 111), situé en amont du domaine miniTAV requis pour la traduction (Figure 24), interagissait *in vitro* avec la protéine entière ou avec lui-même. Afin de vérifier son implication dans la formation des viroplasmies *in vivo*, des constructions ont été réalisées (Figure 25A) permettant l'expression transitoire dans des cellules de tabac BY-2, de la EGFP fusionnée à la protéine P6 (EGFP-P6), à P6 déléetée du domaine A (EGFP-P6 Δ A) ou au domaine A seul (EGFP-A). L'observation au microscope confocal du comportement de la protéine EGFP-P6 dans les cellules BY-2 montre la présence de corps d'inclusion périnucléaires démontrant que la EGFP n'entrave pas la formation des viroplasmies (Figure 25B, n°1 et 2). Il s'est avéré que la protéine EGFP-P6 est également présente dans le noyau de certaines cellules, sous la forme de petits agrégats fluorescents suggérant qu'elle possède les propriétés caryophiles nécessaires pour entrer dans ce compartiment. En effet, sa masse moléculaire théorique de 90 kDa ne lui permet pas de diffuser passivement à travers le pore nucléaire. Cette hypothèse a été confortée par la localisation nucléaire de la protéine EGFP-P6 Δ A avec une présence toute particulière dans le nucléole (Figure 25B, n°3 et 4). Inversement, la protéine EGFP-A est strictement cytoplasmique et répartie de manière homogène alors que sa masse moléculaire (39 kDa) lui permet de diffuser librement à travers les pores nucléaires (Figure 25B, n°5 et 6). La localisation nucléaire de P6 a été confirmée par la suite en contexte viral par des expériences d'immunomarquage réalisées sur des cellules de navet infecté par le CaMV. L'ensemble de ces données démontre que la protéine P6 est de nature nucléo-cytoplasmique et suggère qu'elle exerce des fonctions au sein du noyau. Afin de pouvoir déterminer le rôle nucléaire de P6, il était essentiel de déterminer les séquences impliquées dans son transport entre le cytoplasme et le noyau. La localisation cytoplasmique de la protéine EGFP-A suggèrait que le domaine A renferme un signal d'export nucléaire (NES) permettant sa relocalisation dans le cytoplasme après son importation nucléaire (Figure 25B, n°5 et 6). Cette hypothèse a été confirmée par le traitement de cellules BY-2 exprimant EGFP-A par de la leptomycine B, un inhibiteur de l'exportine CRM-1 (Wolff *et al.*, 1997). En effet, dans ces conditions, EGFP-A est retenue dans le noyau, ce qui a démontré par la même occasion, que l'exportation de la protéine P6 s'effectue par la voie CRM-1. Un NES putatif a été identifié dans un premier temps par une analyse *in silico* puis sa fonctionnalité a été démontrée par des expériences de

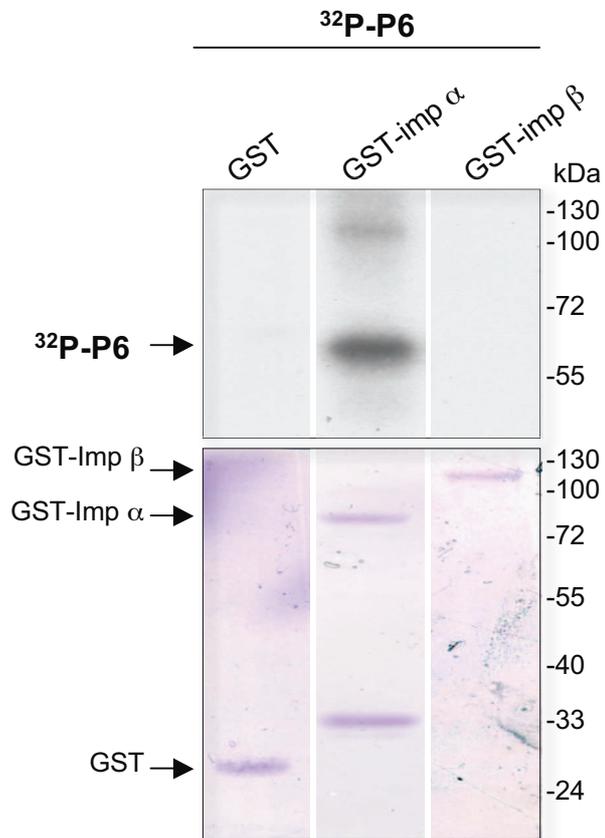


Figure 26. Etude des interactions entre la protéine P6 et les importines α et β de riz grâce à la technique de « GST-pulldown ». Les protéines de fusion GST-importine α (GST-imp α) et GST-importine β (GST-imp β) ou la GST seule ont été exprimées dans *E. coli*, fixées sur des billes de sépharose 4B couplées au glutathion, puis mélangées à un extrait de protéines solubles contenant P6 préalablement radiomarquée au ³²P. Les complexes billes-protéines ont été dissociés puis séparés sur gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes. La protéine P6 a ensuite été détectée par autoradiographie.

mutagenèse dirigée. Il s'agit de la séquence LMLELDL correspondant aux résidus 14 à 20 de P6 ; les leucines aux positions 14, 16 et 18 sont essentielles, comme pour les NES classiques, puisque leurs substitutions par des résidus chargés bloquent la protéine au sein du noyau (Haas *et al.*, 2005).

II.1 L'importation nucléaire de P6

Une protéine peut être importée activement dans le compartiment nucléaire soit par interaction avec les importines α ou β soit en étant pris en charge par une protéine nucléaire qui fait le relais avec ces transporteurs. Ces deux hypothèses ont été envisagées, d'autant plus que P6 interagit avec plusieurs partenaires cellulaires dont des protéines ribosomiques qui pourraient influencer sur sa localisation.

II.1.1 P6 interagit *in vitro* avec l'importine α

L'interaction entre la protéine P6 et les importines de plantes a été testée par des expériences de GST-pulldown. Des clones codant respectivement pour les importines $\alpha 1$ et $\beta 1$ de riz fusionnées à la GST (vecteur pGEX-6P1) et pour la protéine P6 (vecteur pET-Kaks, (Leh *et al.*, 1999)) ont été exprimés dans *E. coli*. Des quantités équivalentes de GST (contrôle négatif), GST-importine α et GST-importine β ont été fixées sur des billes de sépharose-4B couplées au glutathion. De son côté, la protéine P6 produite à partir du vecteur pET-Kaks possède en N-terminal, un hexapeptide additionnel contenant un site de phosphorylation par une protéine kinase bovine, ce qui permet de la radiomarquer en présence de ^{32}P - γ -ATP. L'analyse comparative des protéines d'*E. coli* et de celles du clone recombinant marquées au phosphore ^{32}P montre que seule la protéine P6 est reconnue comme substrat pour la kinase bovine. Après élimination de l'ATP non incorporé par gel filtration, la protéine P6 a été incubée avec les billes de sépharose portant les importines. Après plusieurs lavages pour éliminer l'excès de protéines, les complexes protéiques ont été dénaturés puis fractionnés par SDS-PAGE. Des quantités de protéines équivalentes ont été analysées comme le montre la coloration au bleu de Commassie (Figure 26). Après transfert électrophorétique sur membrane de nitrocellulose et autoradiographie, nous avons pu détecter un signal radioactif à 62 kDa uniquement lorsque P6 est incubée avec l'importine α (Figure 26) ; la protéine virale n'interagit ni avec l'importine β ni avec la GST ce qui confirme la spécificité de l'interaction entre P6 et l'importine α . Le signal visible à environ 120 kDa correspond probablement à des dimères de P6, cette dernière étant capable d'interagir avec elle-même.

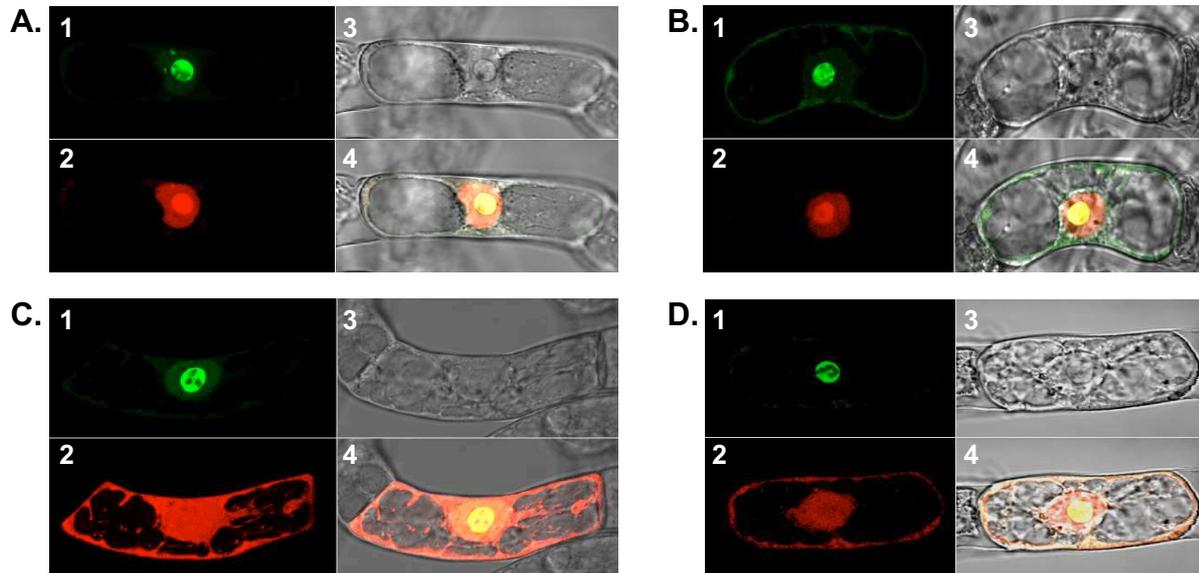


Figure 27. Etude du rôle des protéines ribosomiques L13 et L18 dans l'importation nucléaire de P6. Les cellules de tabac BY-2 ont été co-bombardées avec les plasmides exprimant la protéine ribosomique L13 ou L18 en fusion avec la GFP et ceux exprimant P6 Δ A ou P6 Δ A délétée des résidus 152 à 171 en fusion avec la mRFP. Les cellules ont été observées 18 heures après transfection. Les images de microscopie confocale correspondent aux co-bombardements suivants : A. GFP-L13 et mRFP-P6 Δ A ; B. GFP-L18 et mRFP-P6 Δ A ; C. GFP-L13 et mRFP-P6 Δ A Δ 152-171 ; D. GFP-L18 et mRFP-P6 Δ A Δ 152-171. Les images 1 et 2 représentent respectivement la fluorescence de la GFP (vert) et de la mRFP (rouge). Les images 3, le contraste interférentiel différentiel (DIC) et les images 4, la superposition des images 1 à 3.

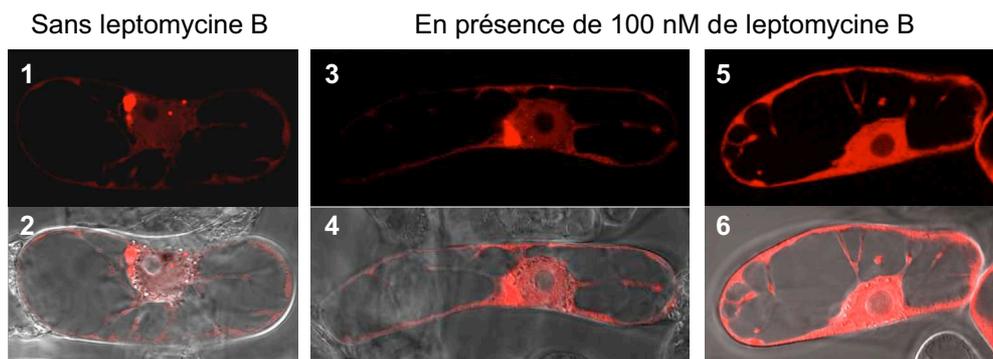


Figure 28. Effet de la leptomycine B sur la localisation subcellulaire de la protéine de fusion mRFP-P6. Les cellules BY-2 exprimant transitoirement le plasmide codant pour la protéine P6 en fusion avec la mRFP ont été collectées 18 heures après bombardement et incubées dans du milieu BY-2 contenant 100 nM de leptomycine B (images 3 à 6) ou non (images 1 et 2) pendant 12 heures à 24°C sous agitation douce et à l'obscurité. Les images avec des numéros impairs correspondent à la fluorescence de la mRFP-P6 et les images avec des numéros pairs à la superposition du DIC et de l'image de fluorescence.

II.1.2 Les protéines L13 et L18 contribuent à l'importation nucléaire de P6 et à sa localisation nucléolaire

P6 engage des interactions avec les protéines ribosomiques L13 et L18 grâce au domaine miniTAV et avec la protéine L24 *via* le domaine MBD (*Multiple Binding Domain*) ; ce dernier correspond au premier site de fixation des ARN simple brin, à partir de l'extrémité N-terminale. Les protéines L13 et L18 fusionnées par leur extrémité N-terminale à la EGFP se localisent dans le nucléole des cellules BY-2 de tabac (Bureau, 2004b), lieu de maturation et d'assemblage des complexes ribosomiques. Lorsque chacune de ces protéines est co-exprimée dans les cellules de tabac avec la protéine P6 Δ A en fusion avec la mRFP (mRFP-P6 Δ A), on observe que la protéine ribosomique L13 ou L18 et la protéine virale colocalisent dans le nucléole mais la construction mRFP-P6 Δ A est également présente dans le nucléoplasme, comme le montre la fluorescence rouge qui occupe tout le noyau (Figures 27A et 27B). Chaque protéine, exprimée séparément, présente le même profil (non représenté). Afin de déterminer si les protéines ribosomiques sont impliquées dans l'importation nucléaire de la protéine P6, les résidus 152 à 171 de P6 impliqués dans l'interaction avec L13 et L18 ont été éliminés de la construction mRFP-P6 Δ A. Des expériences de co-transfection ont été réalisées comme précédemment, et nous avons pu observer que la protéine mRFP-P6 Δ A Δ ₁₅₂₋₁₇₁ se répartit entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique, ce qui signifie qu'elle est importée partiellement dans le noyau grâce à l'assistance des protéines ribosomiques L13 et L18 (Figures 27C et 27D). A l'inverse, la localisation de L13 ou de L18 reste inchangée démontrant ainsi que P6 ne perturbe pas leurs comportements intracellulaires.

En conclusion, en plus de son interaction avec l'importine α , la protéine P6 semble être également importée comme cargo des protéines L13 et L18. La protéine mRFP-P6 Δ A Δ ₁₅₂₋₁₇₁, exprimée indépendamment, présente le même profil que celui observé avec les protéines ribosomiques fusionnées à la EGFP, due vraisemblablement à la présence des protéines ribosomiques endogènes (non représenté). Nous pouvons également observer une forte diminution de l'accumulation de P6 dans le nucléole lorsque le domaine d'interaction avec L13 et L18 est absent, suggérant que ces partenaires contribuent à retenir P6 dans ce compartiment nucléaire. Néanmoins, la localisation nucléolaire de P6 n'est pas complètement abolie et pourrait refléter son interaction avec L24, cette dernière étant également présente dans le nucléole (Bureau, 2004b) ou avec d'autres partenaires ribosomiques encore non identifiés voire avec des ARN ribosomiques, P6 possédant plusieurs domaines de liaison aux ARN. Cette éventualité n'a pas été testée.

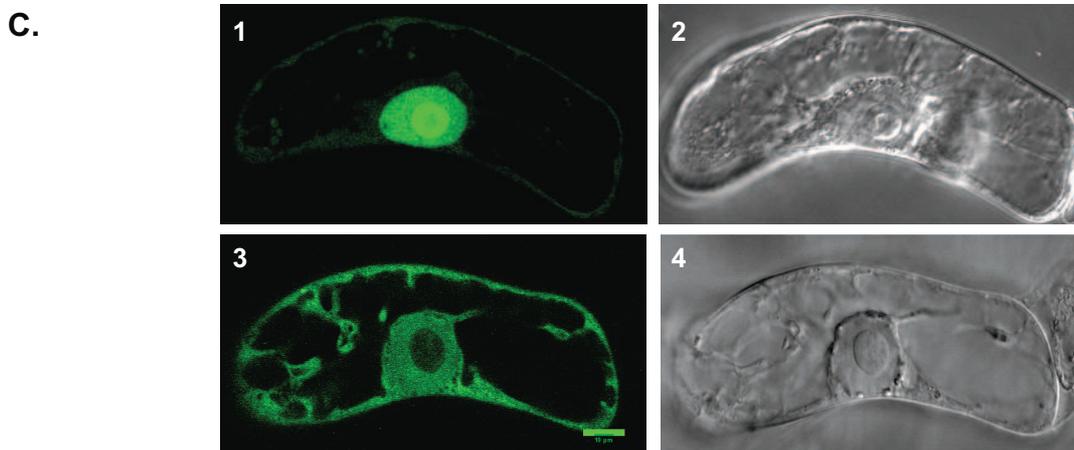
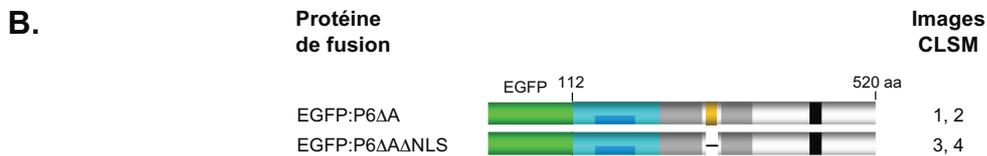
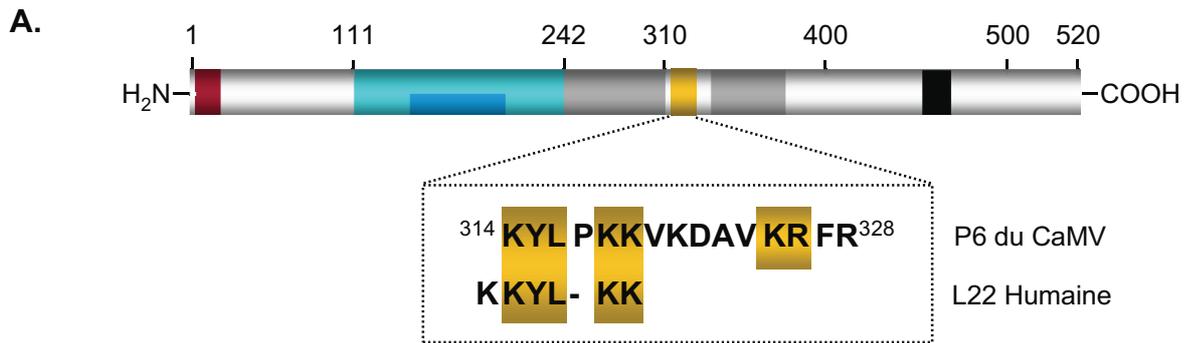


Figure 29 : Etude de l'effet de la délétion du NLS putatif sur la localisation subcellulaire de EGFP:P6ΔA dans des cellules de tabac BY-2. A. Représentation schématique de la protéine P6 et cartographie du NLS basique bipartite putatif. La localisation et la séquence en acides aminés du NLS sont représentées ; la séquence de P6 homologue au NLS de la protéine ribosomique L22 humaine est encadrée et en couleur. B. Représentation schématique de la protéine EGFP:P6ΔA délétée ou non du NLS putatif, utilisées pour les expériences d'expression transitoire dans les cellules BY-2. C. Localisation subcellulaire de EGFP:P6ΔA (photographies 1 et 2) et EGFP:P6ΔAΔNLS (3 et 4) dans des cellules de tabac BY-2, 18h après transfection par biolistique. Les images en fluorescence ont été obtenues par microscopie confocale.

II.1.3 Les viroplasmes limitent l'importation nucléaire de P6

Lorsque des cellules BY-2 bombardées avec le plasmide codant pour la protéine P6 complète et en fusion avec la mRFP (mRFP-P6) sont traitées 12h après transfection, par la leptomyicine B (100 nM), qui rappelons-le inhibe l'exportation de P6, nous observons deux profils différents de localisation de la protéine virale. Les cellules contenant de gros viroplasmes de P6 sont quasiment insensibles à l'inhibiteur de l'exportine CRM-1 (Figure 28, n°3 et 4). En effet, la protéine P6 reste cytoplasmique, le peu de protéine accumulée dans le noyau ayant un niveau comparable à celui de la cellule non traitée (Figure 28, n°1 et 2). En revanche, les cellules dépourvues de viroplasmes ou ne présentant que quelques petits agrégats restent sensibles à la drogue. Dans ce cas, la protéine P6 est retenue dans le nucléoplasme bien que la moitié du signal reste cytoplasmique. Ces observations suggèrent très fortement que l'agrégation de la protéine P6 sous forme de viroplasmes est de nature à limiter indirectement l'importation de P6, la quantité de protéine disponible pour transiter entre le cytoplasme et le noyau devenant de plus en plus faible.

II.2 Caractérisation des signaux de localisation nucléaire (NLS)

II.2.1 Identification d'un NLS basique bipartite

La localisation nucléaire de la protéine EGFP-P6 $\Delta\Delta$ suggère que la région comprise entre les résidus 112 et 520 renferme le NLS reconnu par l'importine α . L'analyse de la séquence primaire de P6 montre que la partie en aval du domaine miniTAV est fortement basique bien qu'elle ne contienne pas de *continuum* de résidus basiques typiques d'un NLS classique. En revanche, une séquence basique, ³¹⁴**KYLPKKVKDAVKRFR**³¹⁸ localisée entre les deux domaines de fixation aux ARN simple-brin présente des homologies avec le NLS KKYLLKK de la protéine ribosomique L22 humaine (Figure 29A) (Shu-Nu *et al.*, 2000). De plus, la présence du dipeptide **KR** suggère que cette séquence de P6 pourrait être un NLS basique de type bipartite, une classe de NLS fréquemment rencontrée chez les protéines nucléaires de plantes. Afin de déterminer son rôle dans l'importation de P6, ce motif a été délété de la construction EGFP-P6 $\Delta\Delta$ et le plasmide recombinant a été transfecté dans des cellules de tabac BY-2. Nous avons choisi de travailler à partir de la protéine P6 dépourvue du domaine N-terminal afin de s'affranchir de la formation des viroplasmes et de l'exportation nucléaire de la protéine virale. Il était ainsi plus aisé d'observer l'effet de la délétion du NLS putatif sur la localisation subcellulaire de P6 $\Delta\Delta$ (Figure 29B).

Lorsque le NLS putatif est éliminé (EGFP-P6 $\Delta\Delta$ NLS), la protéine se localise à la fois dans le cytoplasme et le nucléoplasme de la cellule où elle est, comme attendu, sous forme diffuse (Figure

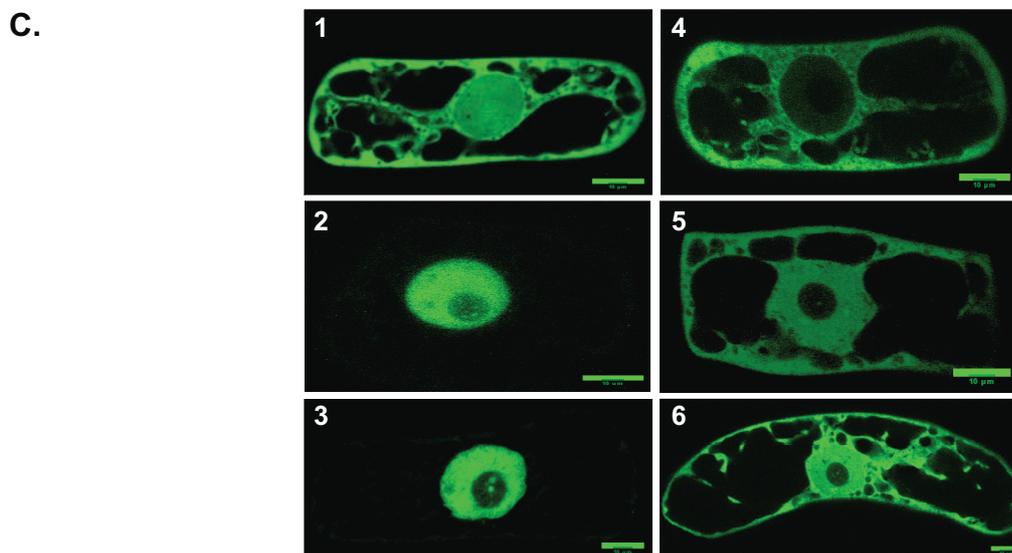
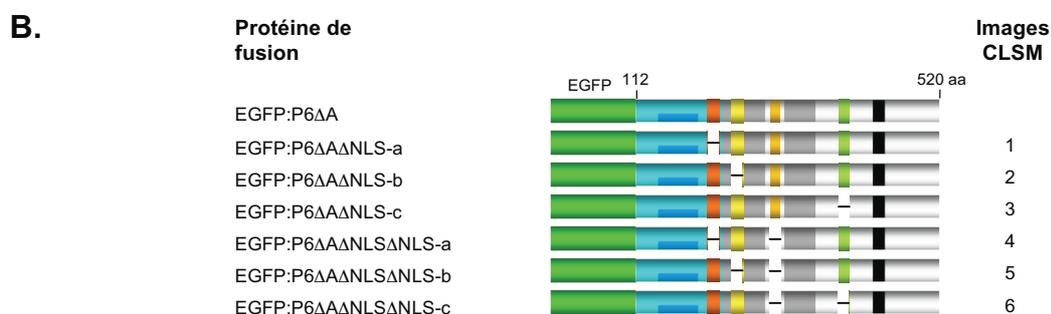
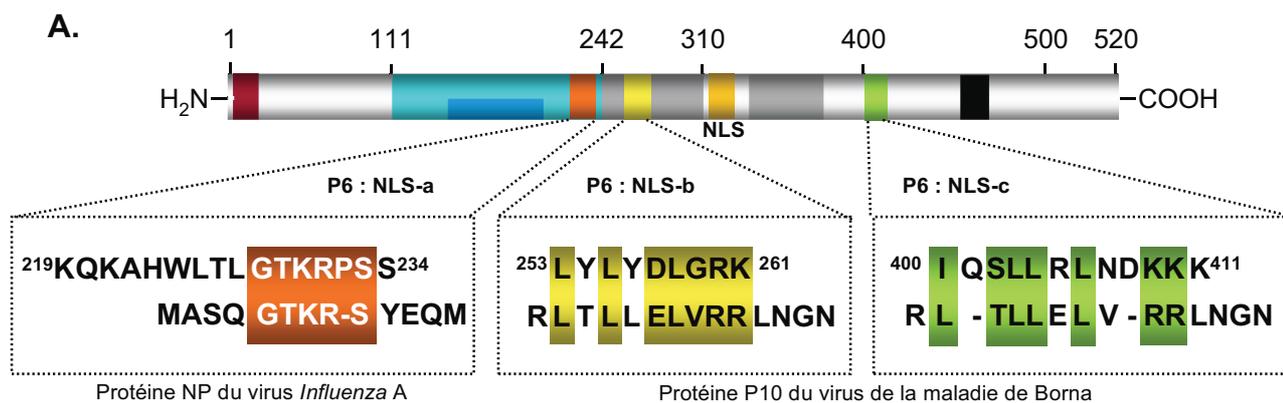


Figure 30 : Etude de l'effet de la délétion des différents NLS putatifs sur la localisation subcellulaire de EGFP:P6ΔA dans des cellules de tabac BY-2. A. Représentation schématique de la protéine P6 et cartographie des NLS non conventionnels putatifs. La localisation et la séquence en acides aminés de ces séquences sont représentées ; les séquences de P6 homologues aux NLS de protéines virales sont encadrées et en couleurs. B. Représentation schématique des différentes constructions portant une délétion simple ou double. C. Localisation subcellulaire de EGFP:P6ΔA délétée des motifs : NLS-a (1), NLS-b (2), NLS-c (3), et de EGFP:P6ΔAΔNLS délétée des motifs NLS-a (4), NLS-b (5) et NLS-c (6) dans des cellules de tabac BY-2, 18h après transfection par biolistique. Les images en fluorescence ont été obtenues par microscopie confocale. La barre représente 10 μM.

29C, n°3 et 4), alors que la protéine EGFP-P6ΔA se trouve exclusivement dans le noyau (Figure 29C, n°1 et 2). Comme la délétion de cette séquence n'abolit que partiellement l'importation de P6, cela suggère que la protéine renferme un deuxième voire plusieurs autres NLS comme c'est le cas chez d'autres protéines notamment d'origine virale (Sun *et al.*, 1995). De plus, l'éviction de P6 du nucléole lorsque le NLS basique est délété permet de supposer que cette séquence NLS permet l'adressage de P6 vers ce compartiment intranucléaire. En effet, il s'avère que des séquences NoLS (*Nucleolar Localisation Sequence*) peuvent être constitutives d'un NLS ; le NLS de la protéine L22 humaine a été présenté comme tel (Shu-Nu *et al.*, 2000). Nous avons vu précédemment que les protéines ribosomiques L13 et L18 influencent la localisation nucléolaire de P6. Il est ainsi envisageable que la protéine virale possède un signal d'entrée dans le nucléole et qu'ensuite les interactions avec ses partenaires ribosomiques lui permettent de s'y maintenir.

II.2.2 Identification d'un NLS non conventionnel

La co-existence et l'implication de plusieurs NLS dans l'importation nucléaire a été décrite chez des protéines cellulaires et virales comme la nucléoprotéine (NP) du virus *Influenza A*. Cette dernière possède trois NLS dont deux ont déjà été identifiés à savoir, un NLS basique bipartite et un NLS non conventionnel (Weber *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1997). La structure primaire de P6 ne renfermant pas d'autres motifs basiques, nous avons donc recherché des séquences apparentées à des NLS non conventionnels déjà répertoriés.

Trois séquences de P6 ont retenu notre attention car elles présentent une certaine homologie avec des NLS non conventionnels de protéines virales (Figure 30A). Elles ont été désignées respectivement NLS-a, NLS-b et NLS-c en fonction de leurs positions à partir de l'extrémité N-terminale de P6. La première séquence sélectionnée ²²⁰KQKAHWLTLGTKRPSS²³⁵ (NLS-a), est localisée dans le domaine miniTAV de P6 et ressemble au NLS non conventionnel présent à l'extrémité N-terminale de la protéine NP du virus *Influenza A*. Elle renferme notamment le motif **GTKR-S** dont l'implication dans la liaison à l'importine α1 a été formellement démontrée chez ce virus (Wang *et al.*, 1997). Nous avons élargi la séquence NLS-a par rapport au NLS de la protéine NP de manière à y inclure deux lysines qui pourraient éventuellement jouer un rôle dans l'importation de P6. Les deux autres motifs, ²⁵³LYLYDLGRK²⁶¹ (NLS-b) qui est localisé dans le premier domaine de fixation aux ARN et ⁴⁰⁰IQSLRLNDKKK⁴¹¹ (NLS-c), dans la région C-terminale, présentent des similitudes avec le NLS de la protéine P10 du virus de la maladie de Borna. Ce signal interagit également avec l'importine α (Wolff *et al.*, 2002).

Afin d'étudier leurs rôles dans l'importation de P6, ces séquences ont été délétées de la construction EGFP-P6ΔA (Figure 30B) puis la localisation des protéines mutagenisées dans les

cellules BY-2, a été analysée en microscopie confocale. Nous pouvons observer que la délétion du NLS-a modifie la localisation de P6 ; cette dernière est présente à la fois dans le noyau et le cytoplasme de la cellule (Figure 30C, n°1). Le NLS-a semble donc également jouer un rôle dans l'importation de P6 dans le noyau. Par ailleurs, la protéine virale est toujours présente dans le nucléole suggérant que ce NLS n'est pas impliqué dans ce transport intranucléaire. Inversement, la délétion du NLS-b ou du NLS-c ne perturbe pas l'importation nucléaire de P6 (Figure 30C, n° 2 et 3), les protéines correspondantes étant exclusivement nucléaires et par conséquent, elles ne semblent donc jouer aucun rôle dans l'importation. Néanmoins, on peut remarquer que ces deux mutants de P6 sont présents exclusivement dans le nucléoplasme avec parfois, des ponctuations vertes dans le nucléole. Il n'est donc pas exclu que les NLS-b et NLS-c interviennent, une fois l'importation nucléaire réalisée, dans la localisation nucléolaire de P6. Pour confirmer l'implication ou non des trois NLS putatifs dans l'importation, nous les avons éliminés de la construction EGFP-P6 Δ A Δ NLS, de manière à voir leur contribution au processus d'import en absence du NLS basique bipartite (Figure 30B). Le profil de localisation des protéines EGFP-P6 Δ A Δ NLS délétées des NLS-b ou NLS-c (Figure 30C, n°5 et 6) est similaire à celui de la protéine de fusion EGFP-P6 Δ A Δ NLS (Figure 29C, n°3) : la fluorescence est détectée dans le cytoplasme et le nucléoplasme. Par conséquent, ces séquences semblent dénuées de propriétés caryophiles. En revanche, lorsque la séquence NLS-a est éliminée, la protéine résultante est strictement cytoplasmique (Figure 30C, n°4), en d'autres termes, la double délétion des séquences NLS-a et NLS abolit totalement l'importation nucléaire de P6 suggérant qu'elles agissent de concert dans ce processus. Ces deux motifs semblent donc être les signaux de localisation nucléaire de la protéine P6. Nous les avons rebaptisés NLS1 et NLS2 d'après leurs positions sur la protéine P6, le NLS1 correspondant à la séquence non conventionnelle (NLS-a) et le NLS2, au motif basique bipartite.

Ensuite, pour vérifier que l'absence du domaine A N-terminal n'a pas d'effet sur les profils de localisation obtenus lorsque l'on délète les NLS, nous avons réitéré l'expérience en utilisant un mutant ponctuel de P6 pour lequel l'exportation nucléaire est déficiente. Ce mutant disponible au laboratoire et appelé EGFP-P6m1, porte la triple-substitution des leucines en positions 14, 16 et 18 du NES, ce qui perturbe très fortement l'export de P6 (Figure 31, n°1) (Haas *et al.*, 2005). Lorsque chaque NLS est éliminé de la construction EGFP-P6m1, nous observons des comportements des mutants de P6 similaires à ceux observés précédemment, à savoir que chaque mutation abolit partiellement l'importation de sorte que les protéines ont une localisation nucléo-cytoplasmique (Figure 31, n°2 et 3). La protéine EFP-P6m1 portant la double-délétion des NLS1 et NLS2 est strictement cytoplasmique, l'importation de P6 étant intégralement abolie (Figure 31, n°4). Ces analyses confirment donc que seules ces deux séquences sont importantes pour l'importation nucléaire de P6 et qu'elles agissent de concert.

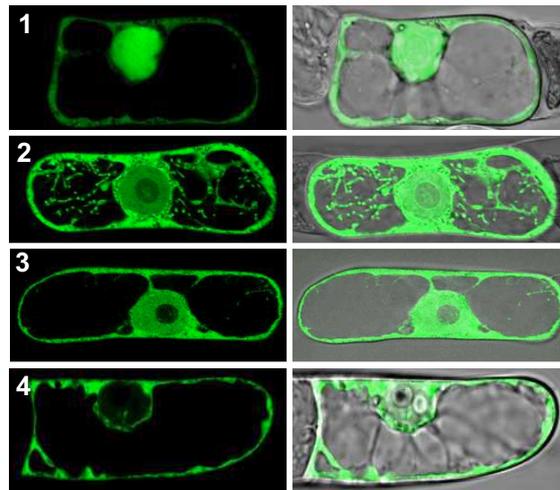


Figure 31 : Effet de la délétion des NLS1 et NLS2 sur la localisation subcellulaire de EGFP:P6m1 dans des cellules de tabac BY-2. Les cellules de tabac BY-2 ont été transfectées avec les plasmides codant pour les protéines P6m1 complète (1), puis délétée du NLS1 (2), du NLS2 (3) ou des deux NLS (4) en fusion avec la EGFP. Les observations en microscopie confocale ont été réalisées 18 heures après bombardement.

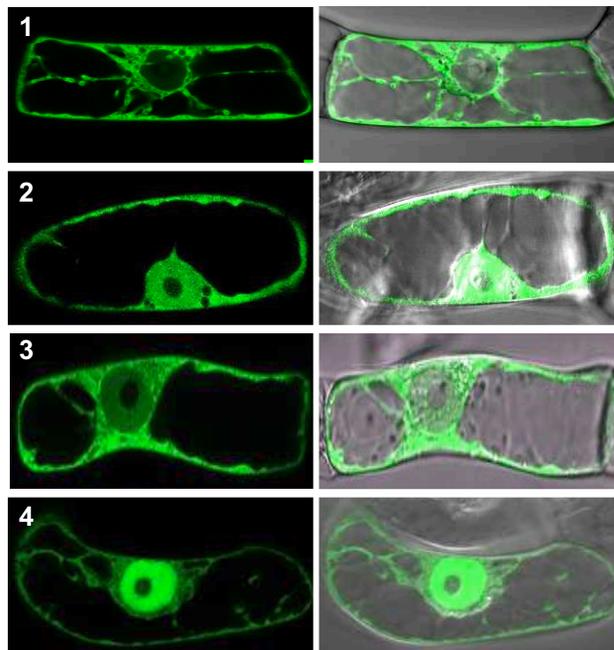


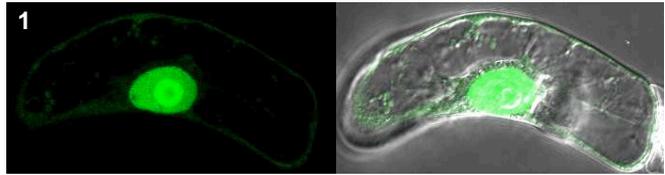
Figure 32 : Effet des NLS1 et/ou NLS2 sur la localisation subcellulaire du rapporteur cytoplasmique GFP:GUS dans des cellules BY-2. Les cellules BY-2 bombardées avec les plasmides recombinants codant pour les protéines EGFP:GUS (1), NLS1:EGFP:GUS (2), EGFP:NLS2:GUS (3) et NLS1:EGFP:NLS2:GUS (4) ont été observées 18 heures après transfection

II.2.3 Les séquences NLS permettent l'importation nucléaire d'un rapporteur cytoplasmique

Les signaux d'import et d'export nucléaire sont en règle générale transférables d'une macromolécule à une autre. Pour confirmer de manière indiscutable les propriétés caryophiles des deux séquences NLS de P6, nous avons entrepris d'étudier leur impact sur la localisation intracellulaire d'une protéine cytoplasmique servant de rapporteur. Notre choix s'est porté sur la β -glucuronidase (GUS), une enzyme de masse moléculaire élevée (93 kDa) qui est dépourvue de NLS. L'ORF GUS a été amplifié par PCR à partir du plasmide recombinant pBin:GUS (fourni par L. Otten, IBMP) et cloné dans le vecteur pCK-EGFP entre les sites de restriction *Bam* HI et *Xba* I. Comme le montrent les cellules BY-2 bombardées avec le plasmide recombinant, le rapporteur EGFP-GUS est bel et bien strictement cytoplasmique (Figure 32, n°1). Nous avons alors inséré le NLS1 en 5' de l'ORF codant la EGFP *via* le site de restriction *Nco* I et le NLS2 dans le site *Bam* HI localisé à la jonction entre les ORF de la EGFP et de GUS. Les positions d'insertion des NLS a été uniquement déterminée en fonction des sites de clonage présents, et leur ordre par rapport à celui de P6.

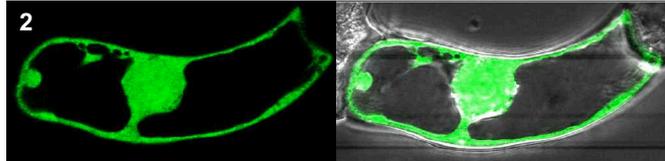
En présence du NLS1, la protéine NLS1:EGFP:GUS est répartie de manière équivalente entre le cytoplasme et le nucléoplasme (Figure 32, n°2). Le NLS non conventionnel permet donc à la protéine EGFP:GUS d'être importée dans le noyau. La protéine EGFP:NLS2:GUS est principalement cytoplasmique (Figure 32, n°3), un voile de fluorescence étant tout de même détectable dans le noyau à l'inverse de la protéine EGFP:GUS. Ce résultat suggère que le NLS2 ne présente pas une grande capacité d'importation lorsqu'il n'est plus dans le contexte de P6. Nous ne pouvons pas exclure que le motif, dans la protéine EGFP:GUS, ne soit pas accessible à l'importine α . En présence des deux NLS de P6, la protéine NLS1:EGFP:NLS2:GUS a une localisation nucléaire presque exclusive (Figure 32, n°4). Les résultats de ces expériences de « gain de fonction » montrent donc que les deux NLS ont un effet additionnel sur l'importation nucléaire de EGFP:GUS et qu'ils sont bien accessibles à l'importine α .

En conclusion, les deux séquences de P6 sont douées de propriétés caryophiles et semblent agir en synergie pour permettre l'importation de la protéine P6. Cependant, l'activité du NLS2 semble être a priori moins efficace que celle du NLS1. Nous pouvons également observer qu'aucun des deux NLS ne permet une localisation nucléolaire de EGFP:GUS, ce qui nous permet de conclure que le motif NLS2 n'est pas impliqué dans l'adressage de P6 au nucléole contrairement à l'hypothèse que nous avons émise suite aux résultats précédents (§ II.2.1). La présence de P6 dans le nucléole semble donc plutôt être due à son interaction avec les protéines et/ou les ARN des complexes ribosomiques.

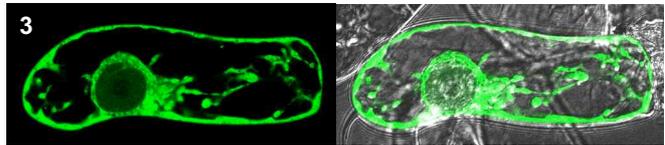


NLS1 : 220KQKAHWLTL**G**TKRPSS²³⁵

220KQKAHWLTL**VVV**RPSS²³⁵

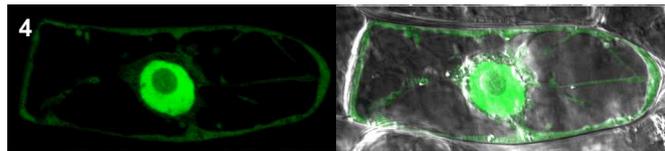


220KQKAHWLTL**VVVAVS**²³⁵

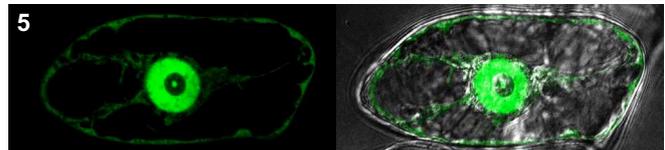


NLS2 : 314**K**YLPKKVKDAV**K**RFR³²⁸

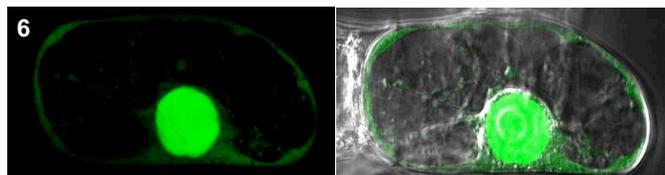
314**K**YLP**AAV**ADAV**K**RFR³²⁸



314**A**YLP**AAV**ADAV**K**RFR³²⁸



314**K**YLPKKVKDAV**AA**FR³²⁸



314**A**YLP**AAV**ADAV**AA**FR³²⁸

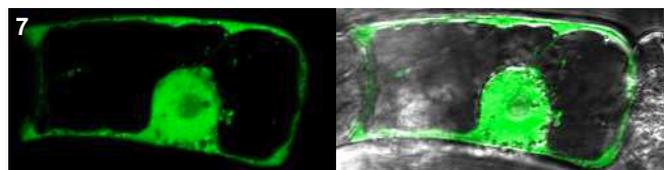


Figure 33 : Identification des résidus des NLS importants pour l'importation nucléaire par analyse de l'effet de leur substitution sur la localisation de la protéine de fusion EGFP:P6ΔA. Les séquences en acides aminés de chacun des NLS sont représentées et chaque résidu ciblé par la mutagenèse est en gras. Les substitutions effectuées sont reportées, notées en gras et en rouge. La protéine EGFP:P6ΔA (1), porte les mutations du NLS1 (2 et 3) ou celles du NLS2 (4 à 7). L'analyse des cellules a été faite 18 heures après transfection par biolistique.

II.2.4 Le NLS non conventionnel joue un rôle prépondérant

Comme nous envisagions d'élucider le rôle nucléaire de P6, il nous fallait déterminer l'importance du trafic nucléo-cytoplasmique de P6 en contexte viral et pour cela nous affranchir de l'importation sans détruire la fonction de transactivateur traductionnel. L'identification des résidus de chaque NLS, importants pour l'importation, était notamment incontournable pour le NLS1 car celui-ci est localisé dans la région C-terminale du miniTAV impliquée dans la transactivation de la traduction.

Pour le NLS1, nous avons décidé de cibler l'hexapeptide GTKRPS, ce dernier étant similaire au NLS de la protéine NP du virus *Influenza A* et connu pour jouer un rôle prépondérant dans l'importation nucléaire de cette protéine virale (Wang *et al.*, 1997). Les résidus de l'hexapeptide ont été substitués par des valines et/ou des alanines à partir du plasmide EGFP-P6 Δ A comme décrit précédemment, puis l'impact des mutations sur l'importation de P6 a été évalué. Deux mutants ont été générés, le premier se caractérisant par la substitution du tripeptide GTK par des valines et le second, porte la substitution complète du motif hexapeptidique (Figure 33). On observe dans les cellules BY-2 transfectées, que la mutation du GTK perturbe fortement l'importation ; en effet, la distribution de la protéine de fusion entre le cytoplasme et le noyau, est similaire à celle de la protéine EGFP-P6 Δ A délétée du NLS1 complet (Figure 30C, n°2). Ces trois acides aminés ensemble ou individuellement sont donc importants pour la reconnaissance de P6 par l'importine α . Nous avons constaté avec étonnement que la mutation du motif GTKRPS entier abolit complètement l'importation nucléaire bien que le NLS2 soit présent (Figure 33, n°3). La protéine est localisée uniquement dans le cytoplasme et seulement 6% des cellules observées (4 expériences indépendantes, près d'une centaine de cellules) présente un profil intermédiaire.

Nous avons aussi analysé l'importance des résidus basiques du NLS2 par le biais de différentes combinaisons de substitution des résidus lysines et arginines par des alanines (Figure 33). Quel que soit le nombre d'acides aminés basiques substitués, la protéine EGFP-P6 Δ A entre dans le noyau de la cellule, mais sa localisation nucléolaire est inhibée à l'exception de la protéine ne portant que la mutation du dipeptide KR (Figure 33, n°4 à 7). Les résidus basiques du NLS2, pris individuellement, ne semblent pas jouer de rôle dans l'importation contrairement à ce qui a été démontré pour d'autres NLS basiques. Comme l'étude de mutagenèse dirigée effectuée sur le NLS1 a révélé que ce dernier possède une activité forte, il est possible que sa présence masque l'importance des résidus du NLS2. De ce fait, nous avons réexaminé les mêmes combinaisons de mutations de cet NLS sur la séquence de EGFP-P6 Δ A délétée du NLS1 (EGFP-P6 Δ A Δ NLS1). Comme dans l'expérience précédente, les mutations ont peu d'effet sur l'importation de P6 (Figure 34, n°2 à 5). Les protéines mutées sont à localisation nucléo-cytoplasmique comme la construction de référence, l'effet observé sur l'importation n'étant que le résultat de la délétion du NLS1. La substitution des résidus

NLS2 : ³¹⁴KYLPKKVKDAVKRFR³²⁸

³¹⁴KYLP**AAV**ADAVKRFR³²⁸

³¹⁴**AYLP**AAVADAVKRFR³²⁸

³¹⁴KYLPKKVKDAV**AAFR**³²⁸

³¹⁴**AYLP**AAVADAV**AAFR**³²⁸

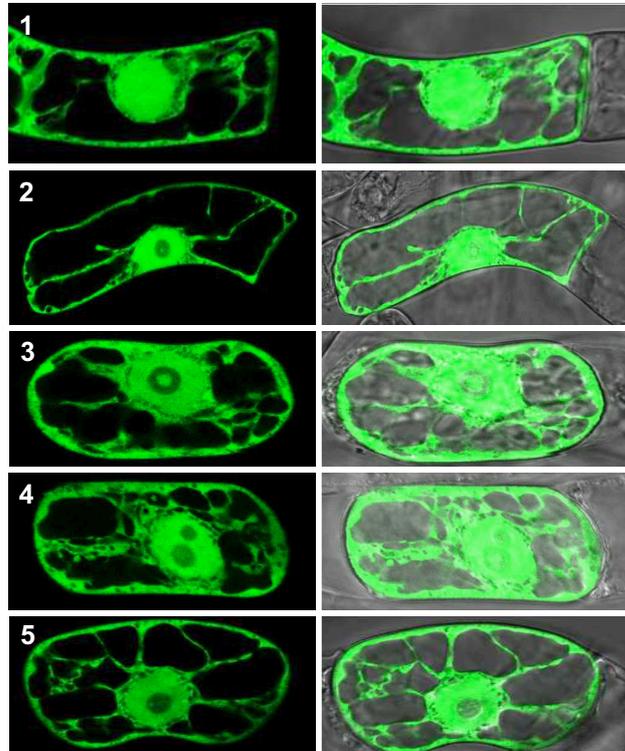


Figure 34. Images de microscopie confocale de cellules de tabac BY-2 exprimant de manière transitoire la protéine de fusion EGFP-P6ΔΔNLS1 (1), dont les résidus basiques du NLS2 ont été mutés. La séquence en acides aminés du NLS2 est représentée et chaque résidu ciblé par la mutagenèse est en gras. Les substitutions effectuées sont reportées, notées en gras et en rouge. La protéine EGFP:P6ΔA (1), porte les combinaisons, vues précédemment, des mutations du NLS2 (2 à 5). Les cellules ont été observées 18 heures après transfection par biolistique.

basiques du NLS2 ne tend qu'à faire perdre le maintien de la protéine P6 dans le nucléole. La mutation des résidus basiques n'étant pas suffisante pour abolir l'import, cela peut signifier que les autres résidus du NLS2 sont également importants. Des expériences de mutagenèse dirigée sont actuellement en cours, pour cibler les résidus non basiques, de même que l'arginine à la fin de la séquence.

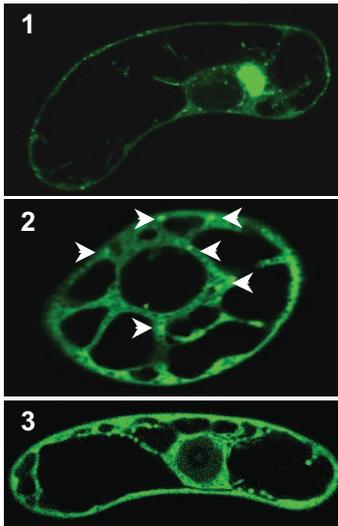
L'hypothèse d'un NLS conformationnel, formé par le rapprochement spatial des deux séquences pour former un site de reconnaissance pour l'importine α , a été envisagé pour expliquer la différence d'efficacité des deux NLS, mais celle-ci ne semble pas valide lorsqu'on analyse nos résultats dans leur ensemble.

Les dissimilitudes observées entre les effets des mutations ponctuelles des NLS et leurs délétions reflètent vraisemblablement une hiérarchie dans l'activité de ces séquences, le NLS1 jouant un rôle majeur dans l'importation de P6 alors que le NLS2 ne serait que de second ordre. L'importation de la protéine EGFP:GUS était plus efficace avec le NLS1 que le NLS2, l'impact de ce dernier n'étant visible que par la synergie des deux séquences. Nous savons que la protéine P6 a des partenaires multiples et peut interagir avec elle-même, et que probablement ces interactions modifient la conformation de la protéine virale. Il est donc fort possible que l'accessibilité des NLS par la machinerie d'importation soit dépendante de ces interactions et/ou de la conformation changeante de P6. Dans le cas où le NLS1 serait masqué, par exemple par interaction des domaines miniTAV et MBD avec les protéines ribosomiques, le NLS2 pourrait se substituer fonctionnellement afin d'assurer l'importation nucléaire de P6. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la délétion de chaque séquence a un impact certain sur l'importation et que la double-délétion l'abolit totalement. Ainsi, la présence d'environ 50% de fluorescence dans le noyau, lorsque le NLS1 est délété, atteste de l'activité du NLS2.

II.2.5 Les NLS de la protéine P6 contribuent à la formation des viroplasmes

Afin d'estimer l'influence des domaines contenant les NLS sur la capacité de la protéine P6 à former des viroplasmes, nous avons réalisé des bombardements de cellules BY-2 avec les plasmides codant pour EGFP-P6, -P6 Δ NLS1, -P6 Δ NLS2, -P6 Δ NLS1+2 et une version de P6 dont le motif GTKRPS a été remplacé par des valines/alanine ; cette mutation abolit l'importation nucléaire (§ II.2.4). Les cellules ont été regroupées selon trois profils : les cellules contenant des viroplasmes, et plus précisément des agrégats ayant une taille estimée supérieure ou égale à 2 μ m, les cellules présentant des petits agrégats (inférieurs à 2 μ m) et enfin, celles où la protéine P6 diffuse dans le cytoplasme (Figure 35A). Trois expériences indépendantes ont été mises en œuvre et environ 50 à 60 cellules ont été classées pour chaque construction à l'exception de EGFP-P6 Δ NLS1 pour laquelle la faible efficacité de transfection et/ou d'expression de la protéine ou son instabilité n'a pas permis de

A.



B.

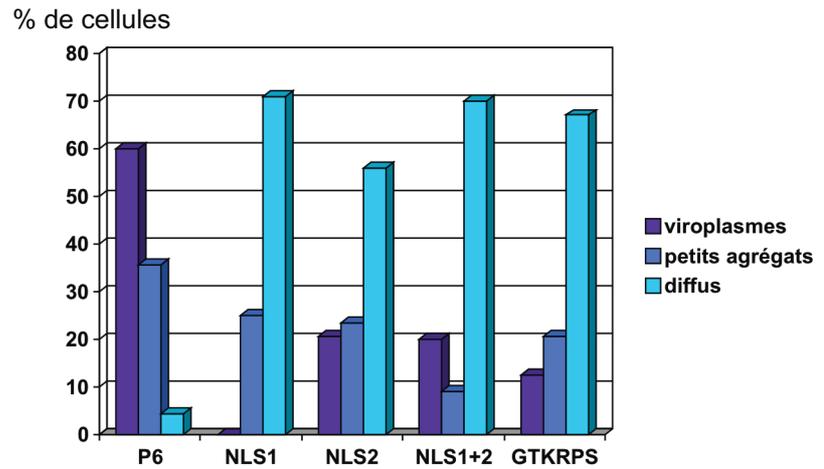


Figure 35 : Influence des domaines NLS1 et NLS2 de P6 sur la fréquence de formation des viroplasmes.

A. Photographies typiques des trois profils de cellules exprimant EGFP-P6 ou ses versions mutées. (1) Cellule possédant au moins un viroplasm. (2) Cellule ne formant que des petits agrégats de P6, visualisés par des têtes de flèches blanches. (3) Cellule dépourvue d'agrégats de P6 où la protéine est considérée comme diffuse.

B. Représentation graphique des fréquences des profils cellulaires observés pour P6 (P6), P6 déléte du NLS1 (NLS1), du NLS2 (NLS2), des deux NLS (NLS1+2) ou dont le motif GTKRPS du NLS1 est substitué par cinq valines et une alanine (GTKRPS). Le pourcentage figure sur l'axe des ordonnées. Une couleur est assignée à chaque profil dont la correspondance est à la droite du graphique.

travailler avec un échantillon statistiquement significatif. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un histogramme indiquant le pourcentage de chaque profil observé par construction (Figure 35B).

Si P6 forme comme attendu des viroplasmes (~60% des cellules) ou des petits agrégats (~35%), les protéines mutées au niveau de l'un ou des deux NLS sont majoritairement diffuses dans le cytoplasme (~70%) ou forment des petits agrégats (~20%). Les mutants de P6 sont également capables de générer des viroplasmes dans 10 à 20% des cellules à l'exception du mutant EGFP-P6 Δ NLS1, pour lequel des études supplémentaires seront nécessaires pour avoir un échantillon significatif.

L'ensemble de ce travail suggère fortement que les régions contenant les NLS1 et NLS2 à savoir respectivement, la partie C-terminale du domaine miniTAV et le domaine situé entre les deux sites de fixation aux ARN, semblent participer à l'élaboration de ces corps d'inclusion. Cette conclusion concorde avec les observations de Li et Leisner (2002) qui ont montré que les domaines D2 (résidus 156 à 253, incluant le NLS1) et D3 (249 à 379, comprenant le NLS2) sont capables d'interagir avec la protéine P6 complète, en double-hybride chez la levure.

II.2.6 P6 est probablement importée sous forme de monomère

La capacité de la protéine P6 à interagir avec elle-même, nous a amené à nous demander si la protéine était importée dans le noyau sous forme de monomères et/ou d'oligomères. Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé des co-bombardements de cellules BY-2 avec un clone codant un mutant de P6 déficient pour l'importation avec un autre codant pour une forme de P6 importable, en présence ou non du domaine A qui rappelons-le, est nécessaire pour former des viroplasmes.

Dans une première expérience, nous avons co-transfecté des cellules BY-2 avec le plasmide codant pour la EGFP-P6 $\Delta\Delta$ déléetée des deux NLS (EGFP-P6 $\Delta\Delta$ NLS1+2) avec celui codant pour la mRFP-P6 $\Delta\Delta$ (Figure 36, n°1). L'absence du domaine A chez ces deux protéines de fusion ne devrait conduire à aucun viroplasma (Haas *et al.*, 2005). Cependant, nous savons d'après nos résultats et ceux obtenus par Li et Leisner (2002) que d'autres domaines de P6 sont impliqués les interactions P6-P6 (voir Introduction générale § II.5.3). De ce fait, il n'est pas impossible que des interactions entre ces domaines permettent à la protéine mRFP-P6 $\Delta\Delta$ de former un dimère avec une molécule de EGFP-P6 $\Delta\Delta$ NLS1+2, sans pour autant former des agrégats et, importer cette dernière dans le noyau où elle s'accumulera en absence du NES. Comme le montrent les images de microscopie confocale présentées dans la figure 36 (n°1), mRFP-P6 $\Delta\Delta$ rentre vu qu'elle possède deux NLS, dans le noyau sans entraîner EGFP-P6 $\Delta\Delta$ NLS1+2 qui reste strictement cytoplasmique ; un léger voile fluorescent vert est visible dans le noyau, dû vraisemblablement à l'importation de cette protéine de fusion par des protéines ribosomiques endogènes. Ce résultat suggère donc qu'il n'y a pas d'interaction entre les deux versions

Protéine de fusion

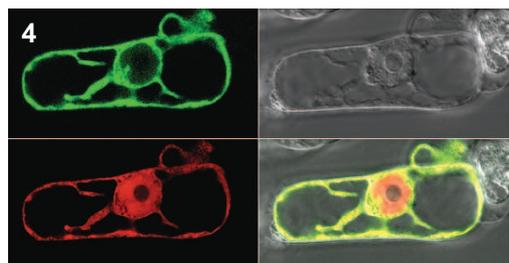
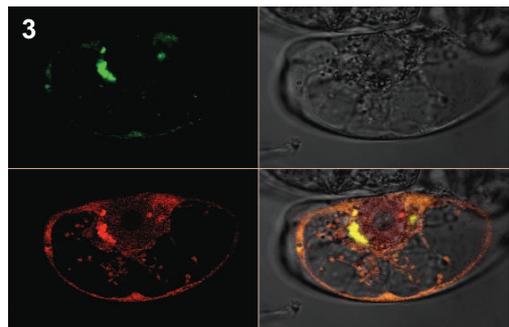
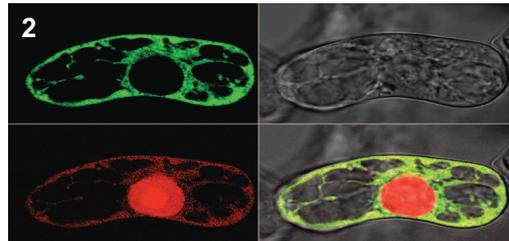
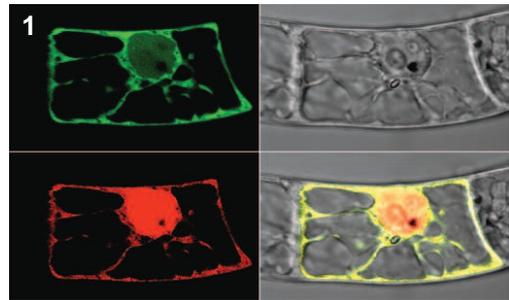
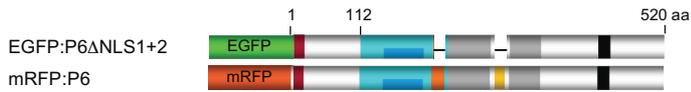
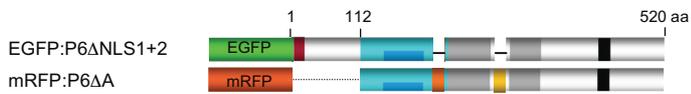
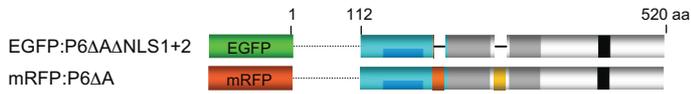


Figure 36 : Etude du rôle des interactions P6-P6 pour l'importation nucléaire de P6. Les cellules BY-2 de tabac ont été co-transfectées par deux plasmides codant pour des mutants de P6 en fusion avec la EGFP pour l'un et la mRFP pour l'autre. Les constructions de chaque bombardement sont représentées schématiquement et placées à gauche. Les co-bombardements effectués sont les suivants : EGFP:P6 $\Delta\Delta$ NLS1+2 et mRFP:P6 $\Delta\Delta$ (1), EGFP:P6 Δ NLS1+2 et mRFP:P6 $\Delta\Delta$ (2), EGFP:P6 Δ NLS1+2 et mRFP:P6 avant traitement (3) et après traitement (4) à la leptomycine B. Les observations sont réalisées 18 heures après transfection.

de la protéine P6, du moins que celles-ci ne peuvent se mettre en place en absence d'une interaction initiale entre les domaines A de P6.

Dans une seconde expérience, mRFP-P6 Δ A a été co-exprimée avec la EGFP-P6 Δ NLS1+2 qui possède le domaine A et donc le NES (Figure 36, n°2). Notre hypothèse est que le domaine A d'une des molécules de P6 est suffisant pour que les deux versions de P6 s'assemblent et que mRFP-P6 Δ A permette ainsi l'importation de EGFP-P6 Δ NLS1+2. Comme précédemment, mRFP-P6 Δ A a été importée avec efficacité alors que EGFP-P6 Δ NLS1+2 est exclusivement cytoplasmique, cette protéine possédant le NES ce qui conduit à l'exportation des molécules éventuellement emmenées dans le noyau par les protéines ribosomiques. Il n'y a donc pas d'interaction entre ces deux protéines de fusion. Nous pouvons noter qu'aucun viroplasma ou petit agrégat n'a été formé dans les cellules bombardées bien que EGFP-P6 Δ NLS1+2 possède le domaine A, ce qui confirme les observations précédemment obtenues selon lesquelles, la séquence d'un et/ou des deux NLS sont importants pour la formation de viroplasmes ou suggère que l'importation nucléaire soit un pré-requis pour l'agrégation de P6.

Dans la dernière expérience, les cellules BY-2 expriment la mRFP-P6 complète et la protéine EGFP-P6 Δ NLS1+2 (Figure 36, n°3 et 4). Le domaine A est présent sur les deux protéines. Si une interaction a lieu entre ces deux protéines, EGFP-P6 Δ NLS1+2 devrait être importée. L'analyse des cellules montre que ces deux protéines sont présentes dans le cytoplasme et sont capables d'interagir entre elles. En effet, on peut observer des viroplasmes rouges et verts qui colocalisent parfaitement (Figure 36, n°3) dans la région périnucléaire et en périphérie de la cellule, comme en témoignent les agrégats jaunes de l'image composite correspondant à la superposition des photographies EGFP et mRFP. Cependant, la présence du NES chez ces deux protéines ne leur permet pas de rester dans le noyau et leur importation éventuelle sous forme de dimères ne peut être visualisée. Afin de voir si mRFP-P6 peut entraîner EGFP-P6 Δ NLS1+2 dans le compartiment nucléaire, nous avons donc traité les cellules à la leptomycine B pour bloquer les molécules importées dans le noyau (Figure 36, n°4). Nous pouvons observer que mRFP-P6 est retenue dans le noyau mais qu'en revanche, EGFP-P6 Δ NLS1+2 reste dans le cytoplasme.

Les résultats de cette série d'expériences suggèrent très fortement que seuls des monomères de P6 sont importés dans le noyau. Elles confirment aussi que la présence du domaine A sur l'ensemble des molécules est nécessaire pour former des viroplasmes car seuls EGFP-P6 Δ NLS1+2 et mRFP-P6 sont capables de s'agréger entre-elles. De plus, EGFP-P6 Δ NLS1+2 ne transitant pas par le noyau, la navette nucléo-cytoplasmique n'est pas pré-requise pour la formation des viroplasmes. Enfin, l'absence de viroplasmes de fluorescence verte lorsque la protéine EGFP-P6 Δ NLS1+2 est exprimée avec mRFP-P6 Δ A suggère qu'au moins une des régions des NLS de P6 contribue à leur formation.

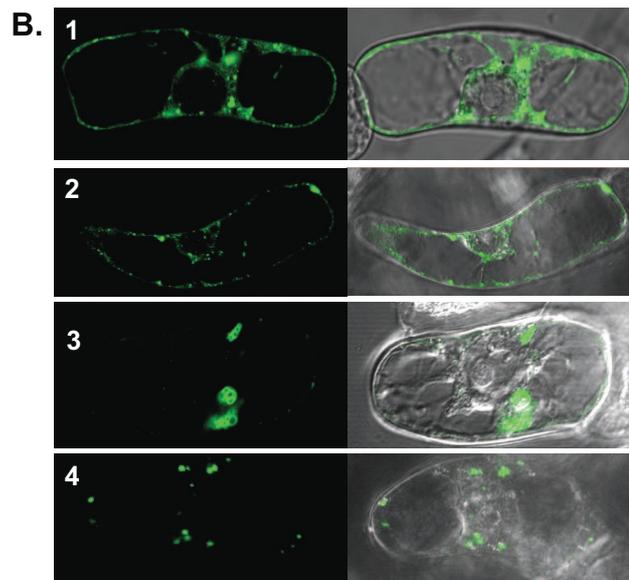
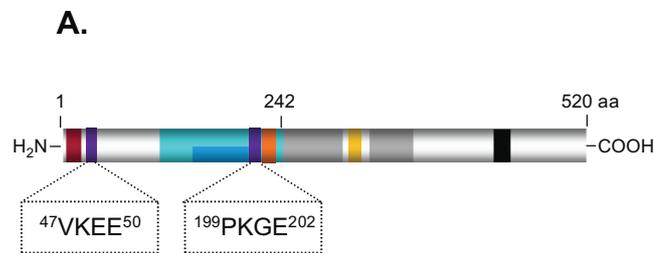


Figure 37 : Etude du rôle de deux motifs putatifs de sumoylation sur la localisation subcellulaire de la protéine EGFP:P6 dans les cellules BY-2 de tabac. A. Représentation schématique de la protéine P6 du CaMV. Les deux sites putatifs de sumoylation sont représentés par des boîtes violettes et leurs séquences en acides aminés sont encadrées. B. Localisation subcellulaire de la protéine EGFP-P6 (1) complète ou délétee respectivement du premier motif putatif de sumoylation ⁴⁷VKEE⁵⁰ (2), du second motif ¹⁹⁹PKGE²⁰² (3), des deux motifs (4). Les observations sont réalisées 18 heures après transfection.

II.2.7 L'importation nucléaire de P6 ne serait pas régulée par sumoylation

Le transport nucléo-cytoplasmique des macromolécules est fréquemment régulé par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la méthylation et la sumoylation. A la fin de sa thèse, Marina Bureau avait suggéré que le transport de P6 pourrait être régulé par sumoylation, une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (*Small Ubiquitin related Modifier*) sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. Le processus de sumoylation est très proche biochimiquement de celui de l'ubiquitination, impliquant notamment une cascade similaire d'enzymes. En revanche, alors que la polyubiquitination induit principalement la dégradation par le protéasome de la protéine marquée, la sumoylation semble plutôt réguler les propriétés biochimiques des protéines cibles comme le trafic intracellulaire ou les interactions protéine-protéine et ADN-protéine. Ce processus réversible, cible une séquence consensus de type ψ KxE/D où ψ est un acide amine aliphatique et x, un résidu quelconque. La protéine P6 renferme deux sites putatifs de sumoylation. Le premier, ⁴⁷VKEE⁵⁰ est situé en aval du NES et de l'hélice α N-terminale impliquée dans la formation des viroplasmes. Le second motif, ¹⁹⁹PKGE²⁰², est localisé 17 résidus en amont du NLS1 et bien qu'il ne respecte pas strictement la séquence consensus, nous avons choisi d'étudier son implication éventuelle dans la sumoylation (Figure 37A).

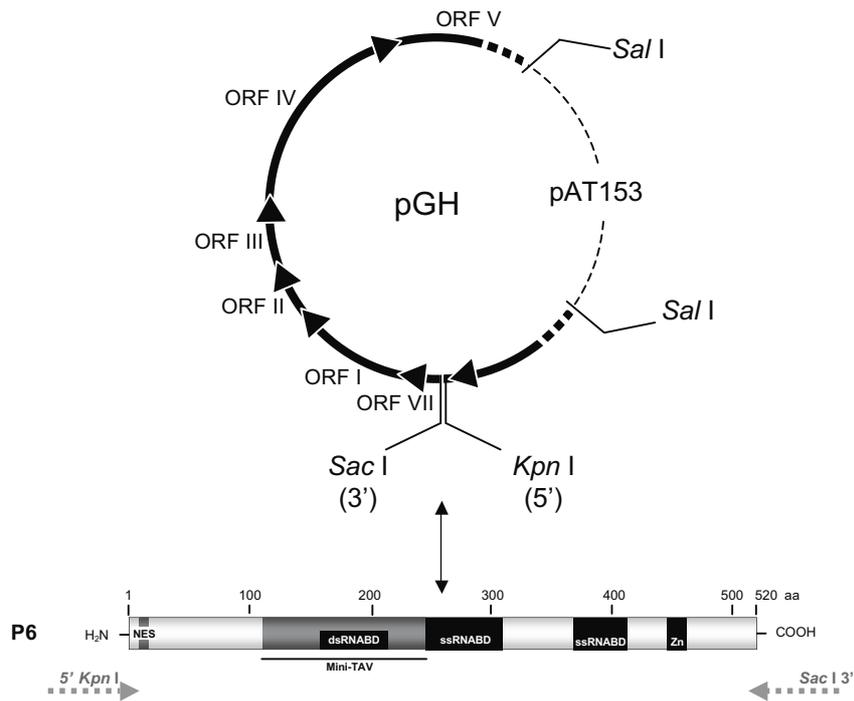
Afin d'analyser l'importance de ces sites putatifs de sumoylation sur la localisation cellulaire de P6 et/ou la formation des viroplasmes, ces séquences ont été délétées individuellement puis conjointement de la séquence EGFP-P6. Dix-huit heures après transfection de cellules BY-2 par biolistique, la protéine P6 délétée de ces sites est toujours strictement cytoplasmique et forme des agrégats dans la cellule (Figure 37B, n°2 à 4), ce qui démontre que ces deux sites ne sont impliqués ni dans le trafic nucléo-cytoplasmique ni dans la formation des viroplasmes.

Cependant, il serait intéressant de réaliser des analyses protéomiques de P6 en gel-2D afin d'identifier d'éventuelles modifications post-traductionnelles pouvant être impliquées dans la régulation des fonctions de la protéine P6.

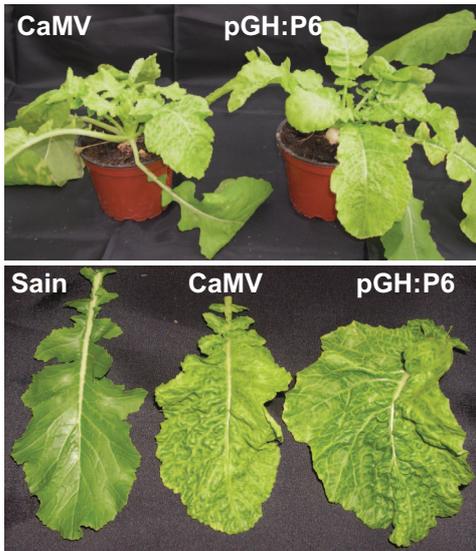
II.3 Importance du transport nucléo-cytoplasmique de P6 en contexte viral

Avant de caractériser la fonction nucléaire de P6, il nous fallait déterminer si le transport nucléo-cytoplasmique de la protéine est réellement indispensable pour la réplication du virus. Pour cela, l'approche utilisée fut de construire un vecteur viral modifié dans lequel l'ORF VI du CaMV puisse être substitué par des allèles codant pour des P6 mutées au niveau des signaux d'import et d'export nucléaire.

A.



B.



C.

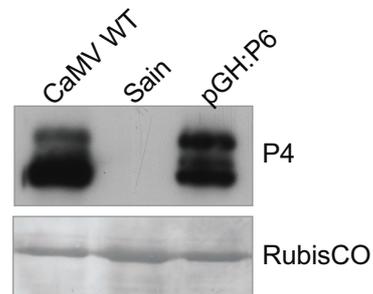


Figure 38 : Obtention d'un génome modifié du CaMV permettant d'interchanger l'ORFVI.

A. Représentation schématique du génome modifié pGH. Le plasmide PMD324 contenant le génome du CaMV a été modifié en remplaçant l'ORFVI par les sites de restriction *Kpn* I et *Sac* I. Les autres ORF sont représentées par des flèches noires. Les sites *Sal* I d'insertion dans le vecteur pAT-153 sont positionnés sur la carte. La structure de la protéine P6 dont le gène peut être inséré est présente en dessous. La position des oligonucléotides utilisés pour le clonage sont représentés par des flèches grises discontinues. B. Photographies de navets et de feuilles de navet sain et infectés obtenues après inoculation des plantes par le génome du CaMV (CaMV) ou par le génome modifié pGH dans lequel l'ORFVI a été inséré entre les sites de restriction *Kpn* I et *Sac* I (pGH:P6). C. Analyse par western blot de la présence de la protéine de capsid (P4) dans les feuilles de navet infectées par le CaMV ou le pGH:P6. En dessous, l'équivalence de charge est évaluée par l'accumulation de la RubisCO après coloration de la membrane au bleu de Coomassie.

II.3.1 Obtention d'un vecteur viral avec une ORF VI interchangeable

Pour obtenir un génome de CaMV délété de l'ORF VI, nous avons réalisé une mutagenèse dirigée par PCR, sur le vecteur PMD324 qui renferme le génome du CaMV, en présence d'oligonucléotides s'hybridant en amont et en aval de l'ORF VI (Matériel et Méthodes, § 2.3). Ces amorces possèdent également en 5', respectivement des séquences additionnelles contenant les sites de restriction *Kpn* I et *Sac* I qui seront utilisées par la suite pour le clonage des allèles mutés de l'ORF VI (Figure 38A). Le milieu d'amplification a été traité par l'enzyme *Dpn* I qui dégrade l'ADN matriciel, puis le produit de PCR a été phosphorylé en 5' par la T4 polynucléotide kinase et refermé par ligation. Après transformation d'*E. coli*, l'ADN plasmidique a été extrait des colonies recombinantes (plasmide appelé pGH) puis la substitution de l'ORF VI par les deux sites de restriction, a été vérifiée par séquençage.

Pour s'assurer que d'éventuelles mutations, introduites dans la séquence virale lors de la PCR, n'entraînent pas l'ineffectivité du virus, l'ORF VI sauvage a été amplifié par PCR à partir du PMD324 (la séquence a été vérifiée) puis cloné dans le vecteur viral recombinant, entre les sites *Kpn* I et *Sac* I. Les clones recombinants et le génome viral sauvage (PMD324) utilisé comme contrôle, ont alors été linéarisés au niveau du site *Sal* I (ce clivage libère l'ADN viral du vecteur) et inoculés mécaniquement à des plants de navet. Environ quinze jours après inoculation, les plantes inoculées avec l'ADN viral recombinant ont développé des symptômes similaires, de même sévérité, et apparaissant avec la même cinétique que ceux des plantes infectées par le virus sauvage (Figure 38B) : le vecteur correspondant a été désigné pGH:P6. De plus, des analyses réalisées par western blot à partir d'extraits de feuilles infectées systémiquement par pGH:P6 montre que la protéine de capsid P4 s'accumule à un taux identique à celui détecté pour le CaMV sauvage (Figure 38C).

II.3.2 L'abolition de l'import est délétère pour la multiplication du virus

L'importance du trafic nucléo-cytoplasmique de P6 pour la multiplication du CaMV a donc été étudiée en clonant les allèles de P6 délété du NLS1 (P6 Δ NLS1), du NLS2 (P6 Δ NLS2) et des deux NLS (P6 Δ NLS1+2) dans le vecteur pGH. Les vecteurs recombinants ont été inoculés mécaniquement à des plants de navets. Quatre semaines après inoculation, les navets sont tous asymptomatiques quel que soit l'ORF VI dans le vecteur pGH. En revanche, les plantes inoculées à partir du vecteur PMD324 contenant le génome sauvage du CaMV ou du vecteur pGH:P6 qui servent de contrôles, présentent une mosaïque prononcée des feuilles et un nanisme typique de l'infection virale. Au niveau moléculaire, une immunodétection de la protéine virale P4 montre que le virus n'est présent que dans les plantes contrôles (Figure 39). Ainsi, l'absence d'un des NLS semble suffisante pour annihiler

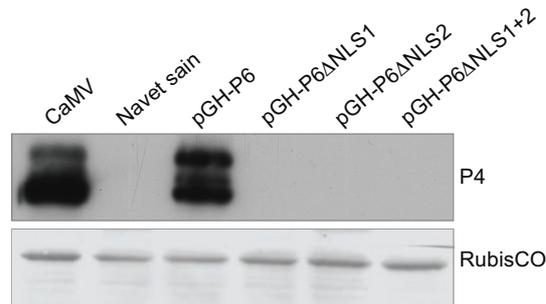
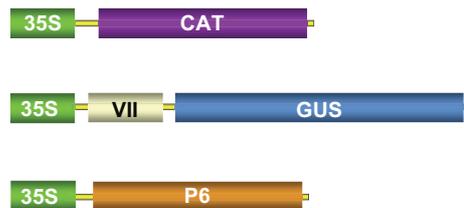


Figure 39 : Analyse de plants de navet infectés par des formes de CaMV déficientes pour l'importation nucléaire. Des navets ont été inoculés par le CaMV, le pGH-P6 puis le pGH dans lequel ont été insérés le gène de la P6 délétée du NLS1 (pGH-P6 Δ NLS1), du NLS2 (pGH-P6 Δ NLS2) puis des deux NLS (pGH-P6 Δ NLS1+2). La présence du virus a été révélée par immunodétection de la protéine P4 par la technique de western blot. La RubisCO permet d'apprécier l'équivalence de charge, après coloration de la membrane au bleu de Coomassie.

A.



B.

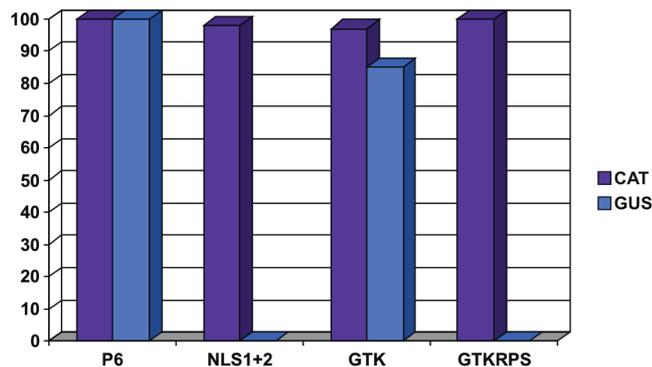


Figure 40 : Effet de la mutation des séquences NLS sur la fonction de transactivateur traductionnel de P6.

A. Représentation schématique des trois plasmides co-transfectés dans des protoplastes de *Nicotiana plumbaginifolia*. Le principe de l'expérience est de mesurer l'impact de la protéine P6 sur la traduction d'un ARN bicistronique. Pour cela, les protoplastes sont transfectés avec un plasmide exprimant la chloramphicol acétyl transférase (CAT) sous contrôle direct du promoteur 35S, un plasmide possédant le gène de la glucuronidase (GUS) cloné en aval de la région leader du CaMV. Le troisième plasmide contient l'ORF VI sauvage ou mutée. La détection de l'activité CAT reflète le niveau de traduction classique alors que GUS sert de témoin pour la réinitiation de la traduction. Les activités de CAT et GUS sont évaluées par fluorimétrie. B. Analyse de l'activité CAT (violet) et de GUS (bleu) lorsque les constructions sont transfectées en présence de P6 sauvage (P6), délétée des deux NLS (NLS1+2), P6 dont les résidus GTK du NLS1 sont mutés (GTK), ou le motif GTKRPS complet (GTKRPS).

l'infectivité du CaMV, ce qui suggère fortement que la navette nucléo-cytoplasmique de P6 est un événement indispensable pour le CaMV, en d'autres termes que P6 exerce une fonction nucléaire essentielle pour son cycle infectieux. Cependant, le NLS1 étant situé dans le domaine miniTAV, nous ne pouvons pas exclure que sa délétion entraîne une perte de l'activité de transactivation de la traduction. Néanmoins, la délétion du NLS2 est suffisante pour abolir la multiplication virale alors qu'il est situé dans une région de P6 qui n'est pas connue comme étant indispensable à cette fonction.

Nous avons entrepris de vérifier la capacité de certains allèles de P6 défectifs pour l'importation à activer en *trans* la traduction d'un ARN polycistronique dans des protoplastes de *Nicotiana plumbaginifolia* (Pooggin *et al.*, 2000). Dans ces expériences, les protoplastes sont transfectés par trois plasmides (Figure 40A). Le premier porte le gène de la chloramphicol-acétyl-transférase (CAT) sous contrôle du promoteur 35S et la mesure par immunodétection de la protéine CAT sert à la fois de témoin de transfection et de traduction. Le second plasmide comporte le promoteur 35S et le gène de la glucuronidase (GUS) cloné en aval de la région 5' de l'ARN 35S incluant l'ORF VII. Ainsi, la présence de la protéine GUS dans les protoplastes reflètera des événements de réinitiation de la traduction et donc la transactivation traductionnelle. Enfin, le troisième plasmide code soit pour la protéine P6, soit pour une de ses formes mutées au niveau des NLS. Après 24 heures d'incubation, les protoplastes sont récupérés et les protéines extraites. La protéine CAT, témoin de transfection, est révélée par immunodétection alors que l'activité de GUS est évaluée par fluorimétrie. Les valeurs obtenues en présence de la protéine P6 sauvage sont considérées arbitrairement comme représentant 100% de l'activité de transactivation traductionnelle et servent de référence pour les activités obtenues avec les protéines P6 mutées (Figure 40B).

Nous pouvons observer que la protéine GUS n'est pas exprimée dans les protoplastes de *Nicotiana plumbaginifolia* lorsque la protéine P6 est dépourvue de ses deux NLS, ce qui indique que l'incapacité du virus codant pour le mutant P6 Δ NLS1+2 à infecter les plants de navets est due à une perte de la fonction de transactivateur de la protéine P6.

Nous avons également testé la capacité des mutants ponctuels du NLS1 de P6 à exercer cette fonction. Pour cela, nous avons réitéré l'expérience en utilisant le plasmide portant la mutation des résidus GTK du NLS1 qui bloque partiellement l'importation nucléaire de P6 et, celui possédant la substitution du motif GTKRPS qui conduit à une abolition complète de l'entrée de P6 dans le noyau.

La mutation GTKRPS abolit totalement la transactivation traductionnelle de P6 : la protéine GUS n'est pas synthétisée (Figure 40B). La non-fonctionnalité de P6 est été confirmée *in planta* par l'absence de multiplication virale lorsque des plantes d'*Arabidopsis* ont été inoculées par le vecteur viral pGH codant pour ce mutant de P6 (non représenté).

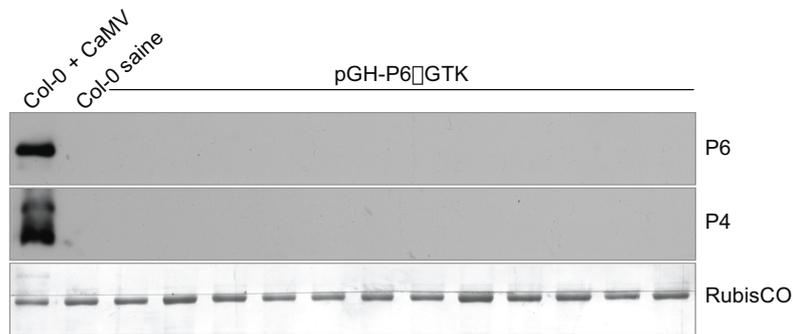


Figure 41 : Analyse de plantes d'*Arabidopsis* inoculées avec le vecteur recombinant pGH-P6 Δ GTK.

La détection de la protéine de capside (P4) et de la protéine P6 a été réalisée par western blot en utilisant les anticorps dirigés contre P4 et P6 sur des extraits de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* saines (col-0) et, infectées par le CaMV (Col-0 + CaMV) ou par le vecteur viral pGH-P6 Δ GTK. L'équivalence de charge est représentée par la RubisCO.

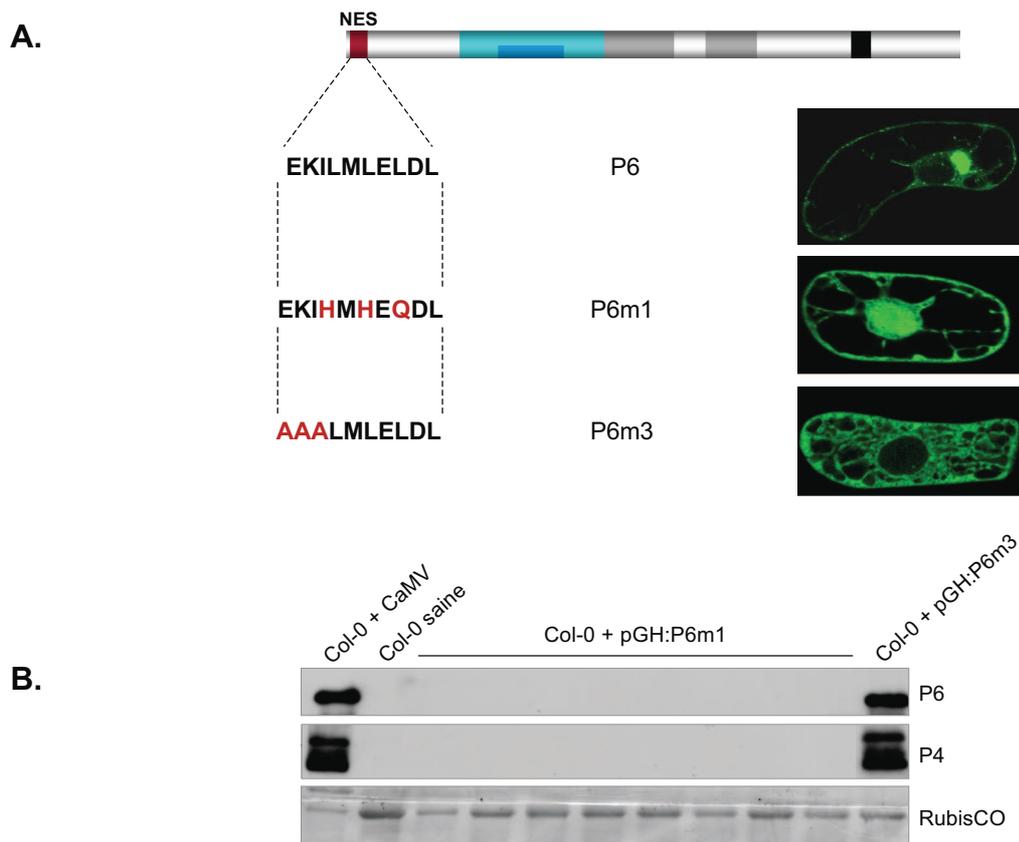


Figure 42 : Etude de l'importance de l'export nucléaire de P6 sur l'infectivité du virus. A. Représentation schématique des différentes formes de P6 clonées dans le vecteur pGH. La structure de P6, la séquence et la position du NES sont représentées. Les mutations du NES sont notées en dessous et les résidus du NES qui ont été substitués sont en rouge. L'effet de chaque mutation, visible par une photographie en microscopie confocale, et le nom du mutant figurent à la droite des séquences. B. Analyse de plantes d'*Arabidopsis thaliana* infectées par le CaMV, le pGH-P6m1 et le pGH-P6m3. La présence de P6 et P4 a été révélée par immunodétection. La RubisCO est visible après coloration de la membrane au bleu de Coomassie.

En revanche, la mutation des résidus GTK ne diminue que faiblement la transactivation traductionnelle, la protéine dite GTK ayant conservé 85% de son efficacité par rapport à la protéine P6 sauvage comme en témoigne le taux de GUS (Figure 40B). Le vecteur pGH portant cet allèle de P6 (GTK) a été inoculé à des plantes d'*Arabidopsis thaliana*. Quatre semaines après inoculation, les symptômes d'une infection n'étaient visibles sur aucune des plantes. Des expériences d'immunodétection montrent que ni la protéine P6 ni la protéine P4 ne sont exprimées dans ces plantes, contrairement aux plantes témoins inoculées avec le génome sauvage du CaMV (Figure 41). Ainsi, bien que la mutation GTK ne diminue l'efficacité de l'importation que d'environ 50% (évalué d'après la répartition de la fluorescence entre le noyau et le cytoplasme) (Figure 33), elle est suffisante pour annihiler la multiplication du virus. Ces résultats suggèrent donc que le trafic nucléocytoplasmique de P6 est nécessaire pour le cycle infectieux du CaMV.

II.3.3 Le trafic nucléocytoplasmique de P6 est essentiel pour l'infectivité du CaMV

Afin de confirmer l'importance du trafic de P6 entre le noyau et le cytoplasme nous avons déterminé l'effet de la suppression de l'export nucléaire de P6. Nous avons construit un génome viral exprimant la protéine P6m1 (pGH:P6m1). Rappelons que ce mutant de P6 a été obtenu par substitution des leucines 14, 16 et 18 du NES et qu'il se localise presque exclusivement dans le noyau (Figure 42A). Ces mutations empêchent également la formation des viroplasmes car elles déstabilisent les interactions engagées par l'hélice α du domaine A (Haas *et al.*, 2005). Nous avons cloné en parallèle dans le vecteur viral pGH le mutant P6m3 qui se caractérise par la substitution du motif EKI par trois alanines (Figure 42A). Cette mutation abolit la formation des viroplasmes sans affecter l'export nucléaire (Haas *et al.*, 2005). Les génomes viraux pGH:P6m1 et pGH:P6m3, libérés des vecteurs recombinants par digestion à l'aide de l'enzyme *Sal I* ont été inoculés à des plantes d'*Arabidopsis thaliana*.

Il s'avère que le génome viral codant pour P6m1 n'est pas infectieux *in planta* comme en témoigne l'absence de symptômes et sur le plan moléculaire, des protéines P6 et P4 ; en effet, ces deux protéines ne sont pas détectables lors de western blot réalisées sur des extraits protéiques de feuilles (Figure 42B). En revanche, les plantes inoculées avec l'ADN viral exprimant le mutant P6m3 présentent les symptômes d'une infection par le CaMV ; ceci a été confirmé par la présence des protéines P4 et P6 (Figure 42B). Cette expérience a conduit à la découverte que les viroplasmes ne sont pas indispensables pour le pouvoir infectieux du CaMV. L'ensemble des expériences sera décrit dans la partie III de ce chapitre.

Ces résultats démontrent que l'incapacité du virus muté pGH:P6m1 à se multiplier est une conséquence de l'abolition de l'export nucléaire de P6 et non, de l'absence de viroplasma. En d'autres termes, le trafic nucléo-cytoplasmique de la protéine P6 est nécessaire pour la réplication du CaMV et la protéine P6 exerce des fonctions qui sont séparées spatialement, la transactivation traductionnelle dans le cytoplasme et, une voire plusieurs fonctions dans le noyau. L'étude conduisant à l'identification d'une fonction nucléaire de P6 sera présentée dans le chapitre II de ce manuscrit.

III Etude de l'importance des viroplasmes denses pour l'infectivité du CaMV

Les viroplasmes denses du CaMV sont considérés depuis plus de deux décennies comme de véritables usines à virions car ils sont le siège de certaines étapes clés de la multiplication du virus (voir Introduction générale, § II.5.3).

Au cours de ma thèse, j'ai pu observer qu'un génome viral portant un ORF VI muté codant pour une protéine P6 défective pour la formation des viroplasmes denses, est capable de diriger l'infection systémique des plantes, remettant en question le caractère indispensable de ces structures pour l'infectivité du CaMV. Les analyses ayant conduit à cette conclusion sont présentés ci-après sous la forme d'une publication actuellement en préparation.

Publication n°1 :

Electron-Dense Viroplasmids of *Cauliflower mosaic virus* are dispensable for replication and systemic infection of susceptible plants

Electron-Dense Viroplasms of *Cauliflower mosaic virus* are dispensable for replication and systemic infection of susceptible plants

Gabrielle Haas, Angèle Geldreich, Mathieu Erhardt, Lyubov Ryabova and Mario Keller.

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche UPR2357, Centre National de la Recherche Scientifique 2357, Université Louis Pasteur, 67084 Strasbourg cedex, France

ABSTRACT

Electron-dense inclusion bodies (viroplasms) formed by the viral protein P6 during *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) infection were considered over more than two decades as essential for CaMV infectivity. In this study we demonstrate that a recombinant CaMV, defective for electron-dense viroplasms formation is still infectious in both *Arabidopsis* and turnip plants and therefore, that these inclusion bodies are dispensable for CaMV replication. Despite the absence of viroplasms, CaMV proteins accumulate in *Arabidopsis* at the same level as during infection by wild type CaMV and virions are found within the cells. However, CaMV multiplication is less efficient in turnip when P6 loses its capacity to form viroplasms. Our results lead to a rethinking of the spatial partition of the CaMV replication cycle.

Key words: CaMV, *Caulimoviridae*, electron-dense viroplasms, viral factory

Introduction

Cells infected by animal or plant viruses frequently contain cytoplasmic and/or nuclear inclusion bodies designed viroplasms or more specifically aggresomes if they are formed around the microtubule organization center (Kopito, 2000; Novoa *et al.*, 2005). These inclusion bodies result from the accumulation of viral proteins that are produced in excess during infection but they often also contain cellular factors. Some aggregates occupy large regions of the infected cells and may alter its ultrastructure whereas others are confined to restricted area such as aggresomes which are located at the periphery of the nucleus. Viroplasms and aggresomes are thought to provide for many viruses, a physical scaffold to concentrate viral proteins and host factors within specific sites and thereby increase the efficiency of genome replication and/or the assembly of viral particles. For this reason, these aggregates are considered as viral factories (Novoa *et al.*, 2005; Wileman, 2007). The mechanism involved in the formation of viroplasms

and the contribution of these structures to virus infection are largely unknown contrary to aggresomes. The latter results from the assembly of small protein aggregates which are transported by dynein along microtubules to the microtubule organization center where they recruit cellular proteins and mitochondria (Kopito, 2000). Aggresomes benefit to viruses as inhibition of their formation by drugs destabilizing microtubules slows the viral replication (Heath et al., 2001). Viroplasms are also formed during infection of host plants by several viruses of the *Caulimoviridae* family (Francki et al., 1985), in particular *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), the type member of the *Caulimovirus* genus (Shalla et al., 1980) .

CaMV has a circular double-stranded DNA genome (~8 kbp), which is replicated by reverse transcription of a pregenomic RNA (35S RNA), a feature of the pararetrovirus supergroup (Rothnie et al., 1994). The viral genome codes for six proteins (P1 to P6) whose functions are known: they are produced from the polycistronic 35S RNA except P6 which is expressed from its own mRNA, the monocistronic 19S RNA. P6 (62 kDa) is a multifunctional protein which plays a pivotal role in the infection of plants by CaMV and considered as a factor of pathogenicity (Haas et al., 2002). It trans-activates the translation reinitiation of the 35S RNA and thus permits the synthesis of the other viral proteins (Bonneville et al., 1989). P6 is also the major determinant of host specificity (Schoelz and Shepherd 1986) and symptomatology (Daubert et al., 1984). Finally, P6 is the main component of membrane-less electron-dense viroplasms (Covey and Hull 1981) and for this reason, P6 protein is also designed viroplasin or TAV for transactivator/viroplasin. Indeed, these aggregates consist of a finely granular electron dense material with electron transparent areas of variable size (0.1 to 1.0 μm in diameter) scattered through the matrix. CaMV-infected cells usually contain one large and irregularly shaped electron-dense viroplasm which is located next to the nucleus and several small circular P6-made aggregates: their size ranged from 0.3 to 10 μm in diameter depending on the CaMV strain (Shalla et al., 1980). The electron-dense viroplasms differ from another type of viroplasms which is lucent to electrons. The latter are formed almost exclusively by the viral protein P2 and are involved in the transmission of CaMV by aphid (Khelifa et al., 2007). Both types of viroplasms are considered as a hallmark of the *Caulimovirus* genus since many viruses belonging to the *Caulimoviridae* family do not form such structures.

The mechanism involved in the electron-dense viroplasm formation is not fully understood yet, but it has been shown that other viral proteins do not participate to this process (Geri et al., 1999). Analysis of the behaviour of P6 in CaMV-non host tobacco cells strongly suggested that electron-dense viroplasms are built up by assembly of small aggregates. We demonstrated that P6 specifically self-interacts by the intermediate of its N-terminus (residues 1 to 83) which is highly conserved in the P6 protein of all CaMV isolates. Transient expression of P6 mutant in

tobacco cells showed that this region is necessary for the viroplasm formation but not sufficient and thus, that other domains are involved in this process (Haas *et al.*, 2005).

CaMV electron-dense viroplasms were considered as containers of overexpressed non functional P6 protein without any role until it was discovered that reverse transcription (Modjtahedi N, *et al.*, 1984), morphogenesis (Shepherd 1976) and storage of virions occur at these sites. Indeed, these inclusion bodies are associated with replication complexes and contain almost all newly formed virions. Moreover, it was hypothesized that electron-dense viroplasms serve as support for viral translation because their surfaces are surrounded by polyribosomes (De Zoeten *et al.*, 1989) and all viral proteins but P2 are detected in these structures (Drucker *et al.*, 2002). All these observations led to the conclusion that electron-dense viroplasms are virus factories similar to those found in infected animal cells and thus, that they are essential for CaMV infectivity. However, this fact could never be confirmed because the domains of P6 involved in the formation of these inclusion bodies were not characterized. It was only recently that we identified a P6 mutant unable to form viroplasms (Haas *et al.*, 2005) which offered the opportunity to determine whether electron-dense viroplasms are required or not for CaMV pathogenesis. To address this issue we constructed a CaMV DNA-derived vector coding for this mutant P6 and tested the ability of the mutated viral genome to infect susceptible plants. We also determined if the absence of electron-dense viroplasms is detrimental to expression of CaMV proteins.

The results presented herein demonstrate that CaMV systemically infect both *Arabidopsis* and turnip in the absence of electron-dense viroplasms and therefore, that these inclusion bodies are dispensable for CaMV infectivity.

Material and methods

Construction of a CaMV-derived vector

The pMD324 plasmid (from M. Delseny, University of Perpignan, France) contains the CaMV Cabb-JI genome in the *Sal* I restriction site. It was amplified by PCR using Taq *Isis* polymerase (Q.BIOgene) according to the manufacturer's instruction and as primers, designed oligonucleotides carrying *Kpn* I or *Sac* I restriction sites at their 5' ends respectively. The mixture was then incubated with two units of *Dpn* I for 2 h at 37°C to degrade the template. The 5' ends of the PCR products were phosphorylated by T4 polynucleotide kinase in the presence of 1mM ATP for subsequent ligation. Correct insertion of restriction sites was verified by sequencing the mutated region of the recombinant plasmid designed pGH. Wild type ORF VI and a mutated version were amplified by PCR using two primers bearing at their 5' termini *Kpn* I and *Sac* I respectively. DNA fragments were digested with the appropriate restriction enzymes and cloned into the pGH recombinant plasmid. Error-free plasmid were selected by DNA sequencing.

Viruses and Infection Assays.

Arabidopsis thaliana (Ecotype Col-0) and turnip (*Brassica rapa*, Just Right) infections were carried out with *Sal* I-linearized pMD324 or pGH plasmids coding for P6 or the mutated version P6m3. Turnip (\approx 3 weeks old) and Arabidopsis (rosette leaves, \approx 4–5 weeks old, before bolting) plants were inoculation with 10 μ g of linearized viral DNA diluted in 20 μ l of sterile water per plant or with an CaMV-infected plant extract. Infected leaves were harvested at different days post-inoculation (dpi), ground in liquid nitrogen, and stored at -80°C . The results reported in this study were exclusively obtained from systemic infected tissues.

Biolistic experiment.

The CaMV P6 protein and its mutated version fused to EGFP were transiently expressed in BY-2 tobacco suspension cells (*Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow 2). Cells were subcultured weekly and harvested 3 days after medium renewal for biolistic transfection. Cells were filtered onto Whatman disks. Particle preparation and bombardment assays were performed as follow: 2 mg of 1.1 μ m tungsten particles (Bio-Rad, Hercules, CA) were immersed in 1 mL of absolute alcohol for 20 min. Dried particles were then successively mixed with 10 μ g of recombinant plasmid DNA (pCK-EGFP vector) supplemented with 18% glycerol, 0.75 M CaCl_2 , and 90 mM spermidine in a final volume of 90 μ L. The firing distance was 11 cm and the helium pressure was 7 bars. After bombardment, cells were transferred to 0.8% agar MS media plates and incubated in the dark at 28°C . BY-2 transfected cells were collected under HBO binoculars (excitation/emission wavelength 488/505 to 545 nm) 20 h after bombardment and cultured in MS liquid medium before further treatment and/or CLSM observations.

Fluorescence Analysis.

Fluorescent BY-2 tobacco cells, transfected with a protein fused to EGFP, were observed between a slide and cover slip with a Zeiss LSM510 confocal microscope (Jena, Germany). EGFP and RFP were viewed by excitation at 488 nm and 568 nm with an argon and HeNe laser respectively, using an appropriate emission filter to collect the signals from the optical section. Cells were observed 16 hours after bombardment.

For immunofluorescence studies, protoplasts prepared as described above were harvested and fixed for 15 min with gentle shaking in protoplast medium containing 1% glutaraldehyde. Thereafter, they were washed three times with the appropriate medium, once with the medium diluted volume to volume with PBS, then again with PBS and finally resuspended in PBS buffer. A sample of protoplasts was mounted on a poly-l-Lys-coated cover slip, allowed to settle for 1 h at room temperature, and then treated overnight at 4°C in a 0.1% sodium borohydride solution. Protoplasts were incubated for 1 h in a blocking solution (5% acetylated

BSA [Aurion, Wageningen, The Netherlands], 5% normal goat serum, and 0.1% cold water fish skin gelatin prepared in PBS) and then overnight, with polyclonal anti-P6 antibodies. After six washes with 0.1% BSAc in PBS, protoplasts were treated with goat anti-rabbit antibodies coupled to Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) for 12 h. After removal of excess secondary antibodies by six washes in 0.1% BSAc in PBS, the protoplasts were subsequently examined with a Zeiss LSM510 confocal microscope.

Electron microscopy of CaMV-infected turnip and Arabidopsis cells

Infected leaves, cut into even slides (1mm x 1cm), were fixed overnight in 4% glutaraldehyde, then successively treated with 10% picric acid and 2% uranyl acetate for 2 h each, and stained with 0.1% (v/v) osmium tetroxide in 150 mM phosphate buffer pH 7.2. Samples were dehydrated through an ethanol series and infiltrated with EPON812 medium-grade resin (Polysciences). Polymerization was done for 48 h at 60°C. Ultrathin sections (90 µm) were cut using an ultracut E microtom (Reichert) and collected on grids coated with formvar (Electron Microscopy Sciences). Finally, samples were visualized with a Hitachi H-600 electron microscope operating at 75 kV and viroplasm surface was measured with ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Analysis of CaMV proteins

Total proteins from healthy and infected plants were extracted in Laemmli buffer 2x containing 8M urea and fractionated by SDS-PAGE 12%. After migration, proteins were electrophoretically transferred onto a PVDF membrane (Immobilon-P; Millipore). The membrane was stained with Coomassie blue after transfer of the proteins in order to detect the large subunit of the ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) used as an internal control. CaMV P6, P4 and P2 proteins were detected using polyclonal antisera at 1:15,000 dilutions (anti-P2 were from Stéphane Blanc, CIRAD-INRA, Montpellier, France) and peroxidase-conjugated secondary antibodies (Biosys) through enhanced chemiluminescence (Lumi-light PLUS; ROCHE).

Results

The motif EKI of P6 is essential for initiation of the viroplasm formation in a viral context

The N-terminal region of P6 determines the host specificity and partially, the expression of symptoms in infected plants (Daubert *et al.*, 1984; Schoelz and Shepherd 1986; Daubert and Routh 1990). Its deletion impairs systemic infection of turnip plants and strongly affects CaMV replication in protoplasts (Kobayashi and Hohn 2004). This region of P6 is highly conserved among CaMV strains and notably contains the invariant sequence EKILMLELDL which has a

pivotal role in the formation of viroplasms as aminoacid substitutions totally impair this process in tobacco BY2 cells. Mutation of the tripeptide EKI was of particular interest for investigating the relevance of electron-dense viroplasms for CaMV infectivity because it abolishes their formation without seemingly impairing other functions of the P6 protein. Indeed, this P6 mutant designed P6m3, fused at its N-terminus to EGFP is still able to shuttle between the nucleocytoplasmic compartments (Haas et al., 2005) and should efficiently mediate the reinitiation of translation of viral polycistronic transcripts as the mutated motif is located far from the domains involved in this function.

As previous studies were performed only with tobacco cells which are non host for CaMV, we determined if the mutation of EKI also impairs the formation of viroplasms in turnip plant, a susceptible plant commonly used with Arabidopsis to study CaMV pathogenesis. Healthy turnip leaves were bombarded with a construction coding for EGFP-P6m3 or EGFP-P6 used as a control and epidermal cells were observed under confocal microscope, 18 to 24 hours after transfection. As expected EGFP-P6 assembled into small aggregates and perinuclear viroplasms (Fig.1A, panel 1). Green fluorescent filaments were also visualized strongly suggesting that the fusion protein colocalized with the microtubule network and/or with actin filaments. At the opposite, EGFP-P6m3 diffused in the cytoplasm but it also formed few small fluorescent foci; in any case, it was able to form viroplasms (Fig.1A, panel 2). To determine if the viral context and in particular the presence of original P6, modifies the behaviour of P6m3, turnip leaves systemically infected with the wild type CaMV were taken at 14 days post inoculation (dpi) and transfected with pCK-EGFP plasmids coding for EGFP-P6m3. Unexpectedly, expression of EGFP-P6m3 in CaMV-infected cells led, similarly to EGFP-P6, to numerous fluorescent aggregates of various sizes as well as green filaments (Fig. 1A, panel 3) as observed when EGFP-P6 was expressed alone in turnip cells (Fig. 1A, panel 1), thus showing that other CaMV proteins did not interfere with the novel properties of P6m3 and that P6m3 was able to interact with P6-preformed aggregates. This latter point was confirmed when we co-expressed P6 and P6m3 fused to mRFP and EGFP respectively, in tobacco BY-2 cells. As shown in Figure 1B (panels 1-3), EGFP-P6m3 co-localized with mRFP-P6 aggregates indicating that the fusion proteins formed composite viroplasms by the intermediate of domains downstream of the P6 N-terminus.

Mutation of the P6 EKI motif does not impair CaMV infectivity on host plants

The incapacity of P6m3 to form viroplasms led us to determine if these structures are really important for CaMV replication and systemic infection as reported by Kobayashi and Hohn (2004). To set up these experiments, we engineered from the pMD324 plasmid containing the DNA of the CaMV Cabb-JI strain, a new viral vector designed pGH allowing the replacement of

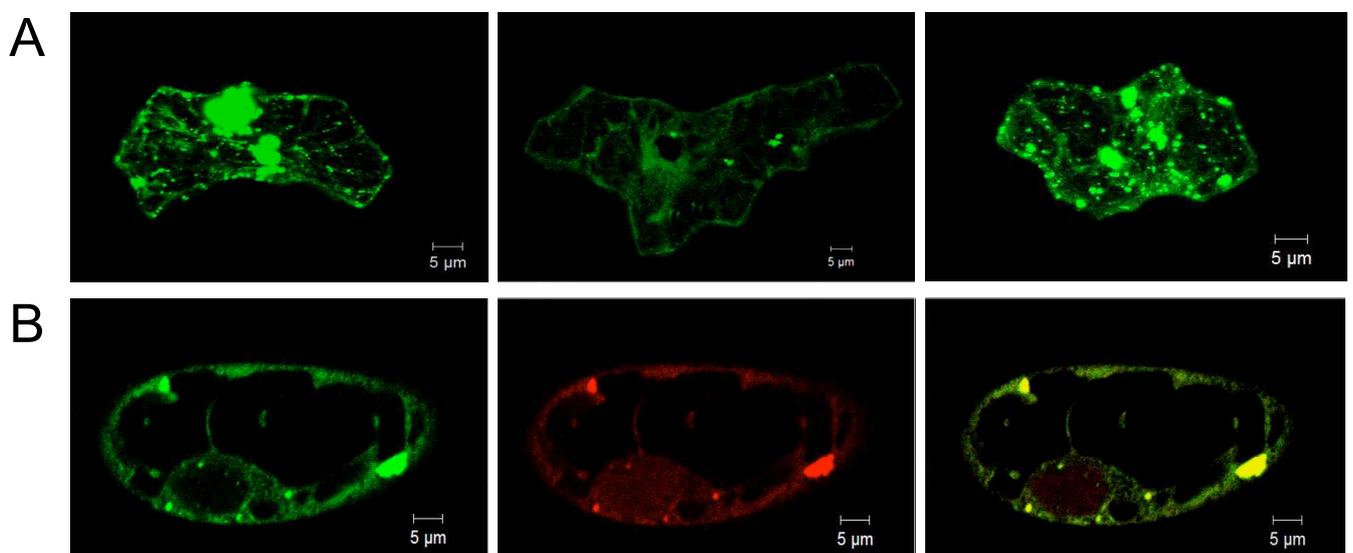


Figure 1: Subcellular localization of CaMV P6m3 or original protein fused to a fluorochrome in protoplasts from turnip (A) and in tobacco BY2 cells (B).

A : Green fluorescent images of EGFP-P6m3 were observed by CLSM 18 h after bombardment with pCK-EGFP-P6m3 of healthy (A1) and CaMV-infected turnip plants (A2). A3 : CaMV-infected turnip protoplast transfected by bombardment with EGFP-P6m3. B. Fluorescent images obtained after transfection of BY2 tobacco cells with EGFP-P6m3 (B1) and RFP-P6 (B2). Superposition of both images is given in B3. Bars = 5 μm.

ORF VI by mutated versions. *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Col-0) and turnip plants, at 2 and 4 leaves stages respectively, were mechanically inoculated with the linearized CaMV genome obtained upon hydrolysis of the recombinant plasmid by *Sal* I.

Disease symptoms developed normally (chlorosis, crinkling, vein clearing and stunting) when *Arabidopsis* and turnip plants were inoculated with the modified CaMV DNA containing the original ORF VI thereby demonstrating that introduction of *Kpn* I and *Sac* I restriction sites in the viral genome had no effect on CaMV infectivity. At 14 dpi, *Arabidopsis* plants inoculated with the recombinant viral DNA expressing P6m3 showed symptoms that were indistinguishable from those elicited by the wild type viral DNA, in particular, vein chlorosis and mosaic and, stunting of the rosette (Fig. 2A). However at 21 dpi, the symptoms displayed by the plants infected with the mutant virus were less severe compared to wild type CaMV-infected plants especially the stunting of the rosette leaves was not so pronounced and chlorosis was milder (Fig. 2B). Turnip plants were also systemically infected by the mutant CaMV but contrary to *Arabidopsis*, they developed mild and delayed symptoms. Indeed, plants exhibited neither chlorosis nor stunting until one month after inoculation with the viral genome; after this period, leaves showed a faint chlorosis. At the opposite, turnip plants inoculated with the wild type viral DNA expressed severe symptoms already at 14 dpi (Fig. 2C).

To ensure that mutations introduced in the EKI did not revert in *Arabidopsis* and turnip plants, PCR analysis was performed on newly-formed leaves presenting disease symptoms. Leaves from 4 infected plants were ground and ORF VI was subjected to independent amplification by PCR, cloned into the pGem vector and sequenced. Approximately 50 clones per infected plant were sequenced. CaMV did not restore this mutation even after several rounds of replication or successive inoculations of host plants with an infectious sap thus confirming that EKI mutation was stable along infection.

From these observations, we conclude that the CaMV genome coding for the P6m3 protein, systemically infects host plants. However, the mild phenotype of infected turnip indicates that the EKI mutation of P6 renders this plant less susceptible to CaMV infection and thus, that another function of P6 affected by this mutation could not be totally fulfilled in turnip plants.

Formation of electron-dense viroplasms is not a prerequisite for infection of host plants by CaMV

To verify that plants systemically infected by mutant CaMV did not contain any electron-dense viroplasms, protoplasts were prepared from turnip plants infected either with mutant CaMV expressing P6m3 or with wild type virus and subjected to immunodetection using antibodies raised against the miniTAV domain (positions 112 to 242) and secondary antibodies coupled to Alexa 488. Analysis of a population of several hundred of protoplasts under

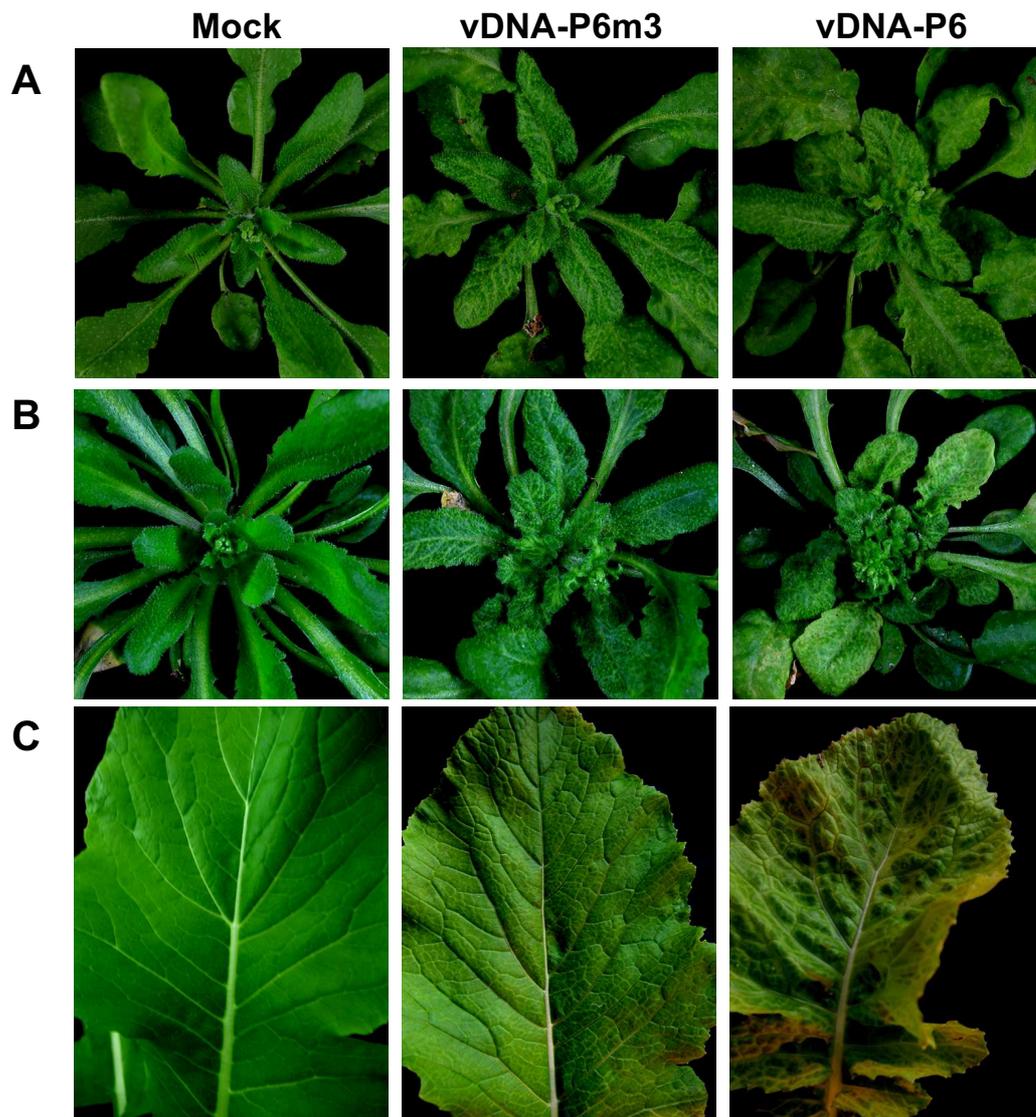


Figure 2: Systemic symptoms developed by *Arabidopsis thaliana* (A and B) and turnip (C) inoculated either with CaMV vDNA-P6 (wild type DNA) or vDNA-P6m3 (DNA with a mutated ORF VI), compared to non-infected plants (Mock), at respectively 14 (A), 21 (B) and 24 (C) days post-inoculation.

epifluorescence microscope showed that protoplasts infected with wild type CaMV contained numerous small aggregates at their periphery and viroplasms which were frequently stacked against the nucleus (Fig. 3 A). At the opposite, most protoplasts from plants infected with the mutant CaMV exhibited a diffuse fluorescence, lining the cytoplasmic membrane (Fig. 3B). In approximately 10% of protoplasts, the fluorescence was superimposed by randomly distributed foci similarly to those observed when we expressed EGFP-P6m3 alone in turnip cells. Furthermore, no P6-made aggregates were detected in turnip leaves infected with mutant CaMV when EGFP-P6m3 was expressed by biolistic. Taken together, these observations suggested that electron-dense viroplasms were not made in plants systemically infected by mutant CaMV.

To confirm this, electron-microscope analysis was performed on different systemic infected leaves from Arabidopsis and turnip plants inoculated by CaMV or the mutant virus, at 21 dpi and 27 dpi respectively. Photographs representative of approximately 350 cells from four independent infection assays are shown in Figure 4; the percentage of cells containing electron-dense viroplasms is illustrated by a diagram (Fig. 4C). Typical electron-dense viroplasms were found in 90% of cells from Arabidopsis and turnip plants infected by wild type CaMV (Fig. 4A, panels 1-4 and 4B, panels 1-3). The electron-dense viroplasms were located close to the nucleus and punched with electron-lucent spherical areas containing viral particles. In some cells, virions were also visualized along microtubules suggesting that they are transported along the cytoskeleton and/or may be assembled on these sites (Fig. 4A, panels 8-9). The surface of viroplasms found in Arabidopsis was in average smaller than those present in turnip cells, 1.4 μm and 2.6 μm , respectively. Cells with electron-dense viroplasms also possessed electron-lucent viroplasms. At the opposite, cells infected by recombinant CaMV contained neither electron-dense viroplasm nor surprisingly, electron-lucent viroplasms albeit the viral genome encoded the original P2 protein. Nonetheless we observed few irregular shaped aggregates decorated by virions in 2.5% of turnip and 5% of Arabidopsis cells infected by the recombinant virus and which might correspond to the fluorescent foci visualized under confocal microscopy when we expressed EGFP-P6m3 in the viral context or not. These bodies are less dense and appeared as totally desorganized compared to the small aggregates present in cells infected by wild type CaMV i.e. they never formed donuts-like structures (Haas *et al.*, 2005). They might result from clumping of virions with P6m3 molecules (Fig. 4A, panel 7). The surfaces (difficult to estimate because of their irregular shape) of these unusual aggregates is approximately 10 to 15 times smaller than those of typical viroplasms in Arabidopsis and turnip (Fig. 4A and B, panel 3).

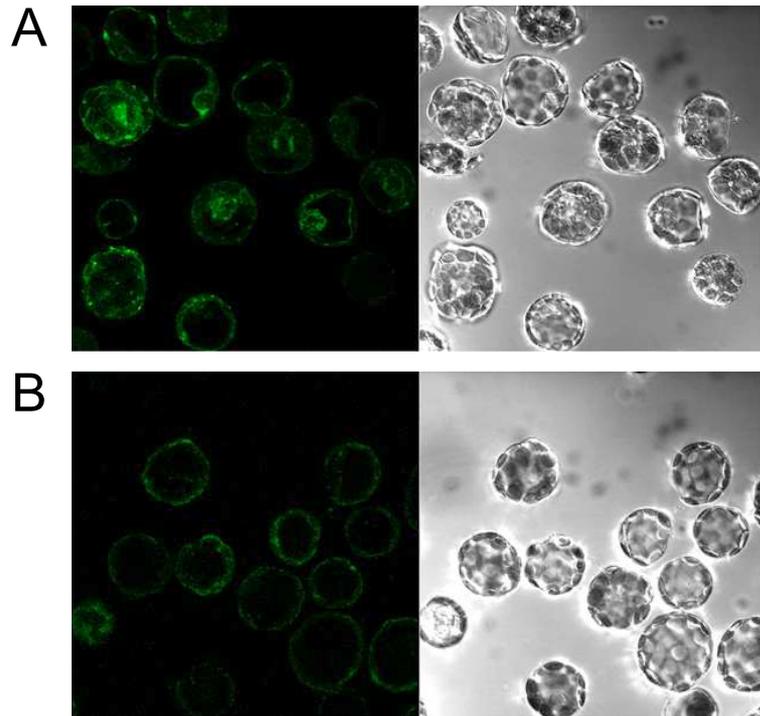


Figure 3: Turnip protoplasts prepared from plants infected with wild type CaMV (A) and the mutant CaMV coding for P6m3 (B)

A1 and B1: The P6 protein and its mutated version were immunodetected using polyclonal antibodies directed against P6 and secondary antibodies coupled with the fluorochrome Alexa 488. A2 and B2 represent protoplasts observed under light microscope

The loss of electron-dense viroplasms is not due to a defect in P6m3 accumulation

In order to determine if the absence of electron-dense viroplasms is correlated to lower amounts of P6m3, we undertook western blot analysis using antibodies directed against the miniTAV domain (involved in translational transactivation) of P6. In parallel, we also analyzed the levels of P4 which is the precursor of the capsid proteins (42, 39 and 35 kDa) and P2, the aphid transmission factor which forms electron-lucent viroplasms. Total proteins from Arabidopsis and turnip leaves infected by CaMV or the mutant virus were extracted from leaves at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 dpi, fractionated by SDS-PAGE and submitted to immunodetection. Staining of the membrane with Coomassie blue to reveal in particular the RubisCO large subunit demonstrated that we analyzed identical amounts of proteins.

In infected Arabidopsis plants (Fig. 5A), P6 was detectable at 10 dpi whereas P6m3 was only at 15 dpi but both P6 versions reached their steady level already at 20 dpi. The same kinetic of protein accumulation was observed with P2 and identical amounts of this protein were found at 25 dpi in plants infected by the wild type or mutant CaMV. In contrast to P6m3 and P2, the P4 protein and its processed forms were produced at a low rate in the absence of electron-dense viroplasms and accumulated at reduced levels compared to those found in control plants. The three major capsid proteins were found but the 35 kDa polypeptide was predominant over the 42 and 39 kDa products in plants infected with the mutant CaMV whereas identical amounts were detectable in Arabidopsis infected by the non-mutated virus. Only traces of the full length P4 protein (57 kDa) was found in both types of infection indicating that morphogenesis rapidly occurred, even in the absence of electron-dense viroplasms, as P4 is cleaved by the viral protease only during or after its assembly into capsids (Karsies *et al.*, 2002). These results clearly demonstrate that the EKI mutation did not alter the P6 transactivation activity in Arabidopsis and thus, that viral proteins were produced at the same efficiency as in plants infected with wild type CaMV. Furthermore they reinforce the previous conclusion that infection of Arabidopsis plants can occur independently of electron-dense viroplasms.

The situation observed with turnip plants (Fig. 5B) was quite different except that viral protein appeared as in Arabidopsis with a short delay (15 dpi) in turnip infected with the mutant CaMV relative to control plants (10 dpi). Indeed, in contrast to Arabidopsis, the amounts of P6m3, P4 and P2 in turnip were relatively low and remained constant over the period of infection suggesting that their synthesis was arrested from 15 dpi or that the viral proteins were unstable/degraded in the absence of viroplasms as the levels 42 and 37 kDa capsid proteins dropped from 20 dpi. The low level of P6 protein probably accounts for the mild and delayed symptoms displayed by turnip plants infected with the mutant CaMV.

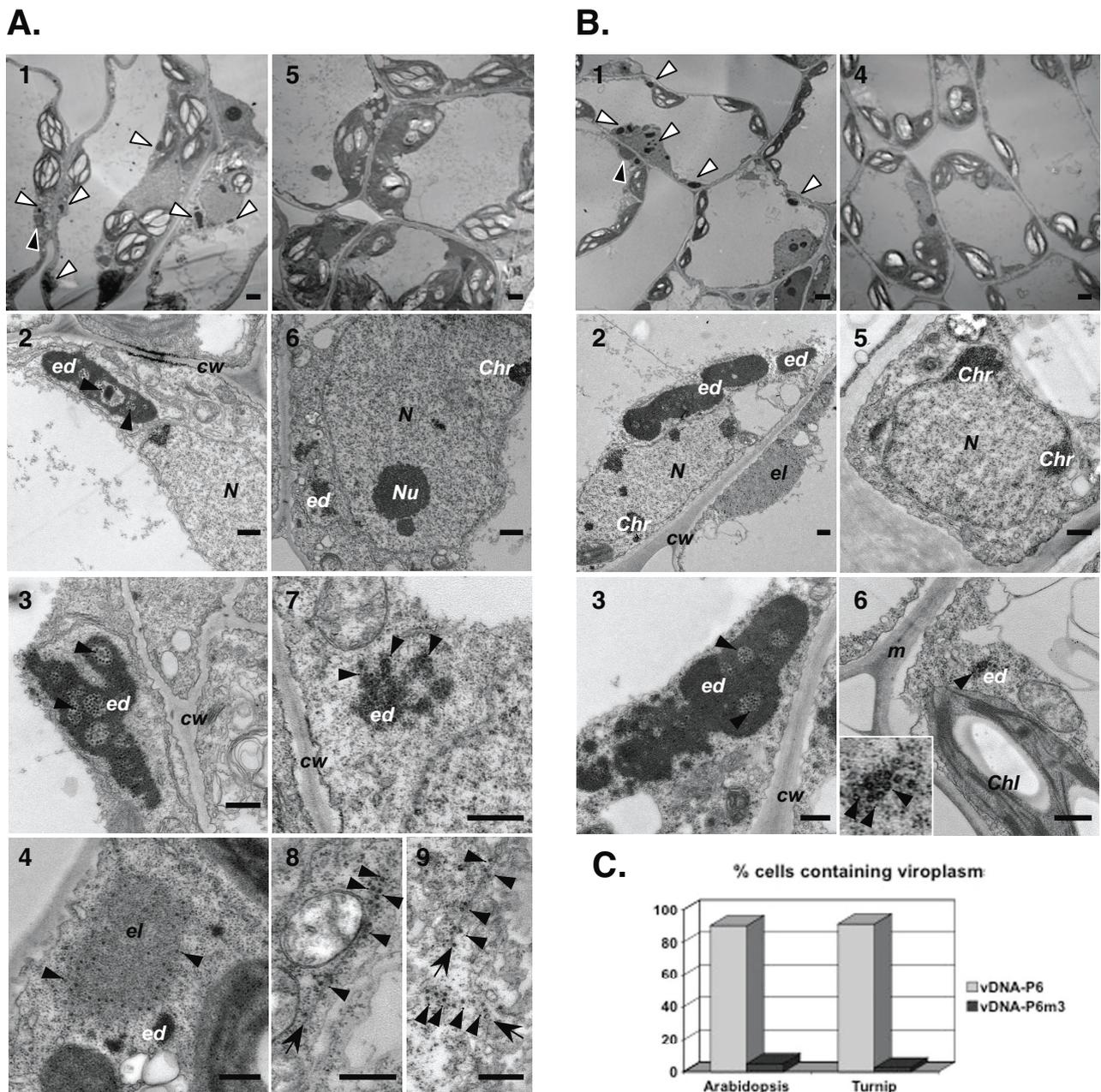


Figure 4: Electron-dense (ed) and electron-lucent (el) viroplasms in *Arabidopsis* (A) and turnip (B) infected cells. A. *Arabidopsis* plants were infected either by vDNA-P6 (1-4) or vDNA-P6m3 (5-9). B. Turnip plants infected by vDNA-P6 (1-3) or vDNA-P6m3 (4-6). Virus particles are indicated by black arrow heads; note the presence of virions along cortical microtubules. Bars represent 0.5 μ m except for photographs A1, A5, B1 and B4 where their length correspond to 2 μ m. White and black arrows point to electron-dense and electron-lucent viroplasms respectively. N, nucleus; Chr, chromatin; Nu, nucleolus; cw, cell wall; Chl, chloroplast. C. The percentage of *Arabidopsis* and turnip cells infected containing electron-dense viroplasms are represented by histograms. Photographs are representative of about 350 cells observed in four independent experiments. Grey and black histograms correspond to values obtained after examination under electron microscope, of approximately 350 cells from infected tissue of plants inoculated by vDNA-P6 and vDNA-P6m3, respectively.

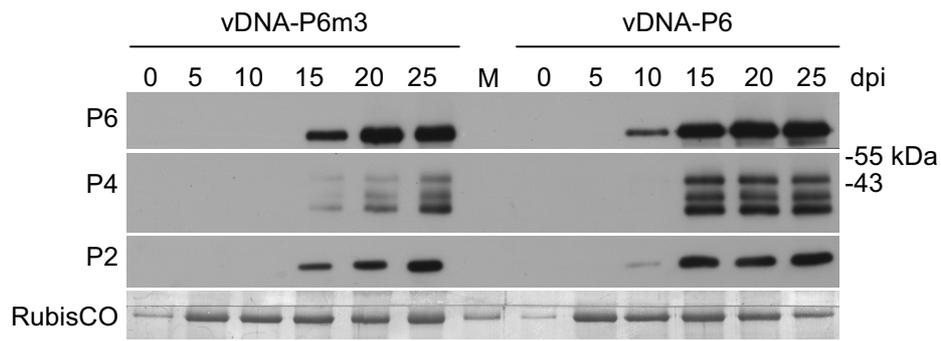
Discussion

Over more than two decades, it was commonly accepted that electron-dense viroplasms formed by the viral protein P6 are essential for CaMV infectivity. In this paper we show that a recombinant CaMV unable to form electron-dense viroplasms, as confirmed by confocal and electron-microscopy observations, systemically infected turnip and Arabidopsis plants thereby demonstrating that these inclusion bodies are not essential both for replication and spread of CaMV in host plants. Consequently, CaMV probably uses cellular structures or organelles for translation, replication and morphogenesis. The efficiency of Arabidopsis infection was similar whether CaMV formed or not electron-dense viroplasms in contrast to turnip where the infectivity of the mutant CaMV was seriously disrupted thus indicating that the N-terminal mutation in P6 resulted in collateral damages in this host plant.

Arabidopsis plants expressed systemic severe symptoms whether they were infected by the wild type or recombinant CaMV. All Arabidopsis cells infected with the mutant virus were devoid of typical electron-dense viroplasms but some cells contained small aggregates which presumably resulted from clumping of virus particles and P6m3 molecules. Nonetheless the majority of newly formed virions were scattered in the cytoplasm but some of them colocalized with microtubules. The absence of electron-dense viroplasms in infected cells confirmed indirectly that the EKI mutation of P6 did not revert as we demonstrated that the co-expression of P6 mutant (P6m3) and the wild type protein leads to composite inclusion bodies. The stability of this mutation, confirmed by sequencing of the ORF VI from CaMV progeny, was somewhat surprising as we expected its restoration after a series of inoculations since the EKI motif is invariant in all CaMV isolates and thus, certainly of functional relevance. Western blot analysis revealed that P6m3 accumulates in large amounts during infection thus demonstrating unequivocally that formation of electron-dense viroplasms is not related to the abundance of P6 but to its structure and/or conformation. The presence of large amounts of P2 and P4 in Arabidopsis plants infected by the mutant CaMV confirms on one hand, that P6m3 is capable to transactivate the translation of the 35S RNA and its spliced forms and on the other, that electron-dense viroplasms are not required for the synthesis of the viral proteins as stated previously (De Zoeten *et al.*, 1989; Hohn and Fütterer 1991). Thus, CaMV translation probably occurred on free polysomes or on sites usually supporting translation of cellular mRNAs such as the membrane of endoplasmic reticulum or the cytoskeleton (see below).

The mutant CaMV also infected turnip plants as evidenced by the presence of CaMV particles in systemic tissues but the virulence of CaMV was strongly affected by the mutation introduced in P6 since symptoms were extremely mild compared to those of wild type CaMV-infected plants. Therefore, if electron-dense viroplasms are clearly dispensable for CaMV infectivity, we cannot totally exclude that they might be beneficial to the virus in turnip. Indeed,

A.



B.

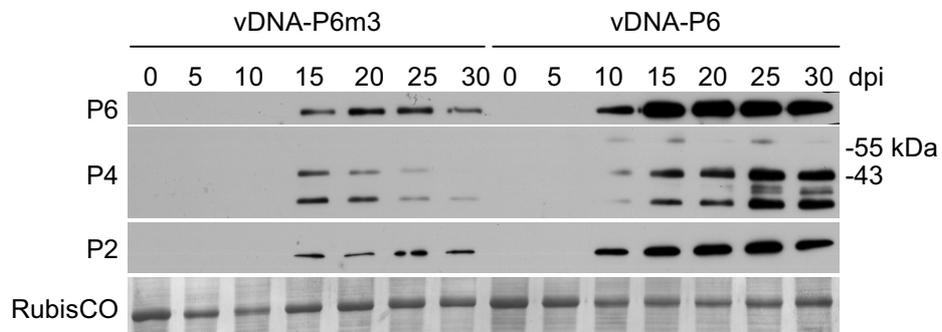


Figure 5: Kinetic of viral proteins accumulation in *Arabidopsis thaliana* (A) and turnip (B) infected either with wild type CaMV (vDNA-P6m3) or the mutant virus (vDNA-P6). Total proteins were collected from systemic leaves every 5 days after inoculation and fractioned by SDS-PAGE. After electrotransfer onto immobilon membrane, viral proteins were immunodetected using polyclonal antibodies raised against P6, P4 (coat protein) and P2 (aphid transmission factor). Coomassie blue staining of the membrane was used to detect RubisCO large subunit as loading control.

the infected plants contained low amounts of P6m3 as well as P2 and P4, the expression level of the two latter being certainly linked to the amounts of P6 as it transactivates the translation of polycistronic viral RNAs. Considering the results obtained with Arabidopsis we exclude that viroplasm deprivation hampered the synthesis of viral proteins. Therefore, we rather hypothesize that translation operated inefficiently particularly since identical quantities of 35S and 19S RNAs were detected in plants infected by CaMV and the mutated virus (data not shown). It might be that the EKI mutation modifies the P6 conformation rendering this protein unable to interact with cellular factors and/or ribosomes in turnip plants, reducing thereby the translation yield. The continuous loss of the 42 and 37 kDa polypeptides during the course of infection indicates that their stability is affected in the absence of electron-dense viroplasms. As Himmelbach *et al.*, (1996) showed that P6 interacts with P4, it was tempting to speculate that P6 protects the viral capsid from degradation but the data obtained with Arabidopsis indicate that neither P6m3 nor the absence of viroplasms play a role in maintaining the integrity of the virus particles. Finally, the weak pathogenicity of the recombinant CaMV might be unrelated to its incapacity to form viroplasms but simply due to the EKI mutation *per se* as the N-terminal region of P6 is a major determinant for host specificity and symptomatology (Schoelz and Shepherd, 1986, Daubert and Routh, 1990, Broglio, 1995) and essential for viral spread in the plant (Kobayashi and Hohn, 2004). Our results emphasize the importance of this motif in CaMV pathogenicity and indirectly, the evolutionary pressure to conserve the N-terminal sequence of P6. Recently, it was demonstrated that CaMV is an elicitor of defense-signaling pathways (jasmonic acid/ethylene involved in systemic acquired resistance and activates the generation of reactive oxygen species (Love *et al.*, 2005). Moreover, studies performed on Arabidopsis mutants showed that chlorosis and stunting are dependent on interactions between P6 and components involved in ethylene signaling and that these interactions may be enhanced thanks to a cellular product (Geri *et al.*, 2004). It is not impossible that the EKI mutation specifically impairs these interactions in turnip plants leading to discrete symptoms whereas it has no effect in Arabidopsis as this plant is susceptible to both mutant CaMV and wild type virus.

If electron-dense viroplasms are dispensable for CaMV infectivity what is then their “raison d’être”? Many animal and plant viruses form inclusion bodies in host cells, some behaving as viral factories whereas others, usually formed late in infection, are non-functional storage sites of overexpressed proteins (Novoa *et al.*, 2005; Wileman, 2007). CaMV P6 protein is synthesized in large amounts early in infection (Kobayashi *et al.*, 1998) to initiate virus replication. Whether two populations of P6 co-exist in infected cells, one non-functional forming viroplasms and another, functional and soluble, is another open question, in the light of our results. Apparently, CaMV just took advantage of electron-dense viroplasms which probably arose fortuitously during evolution, to partition the CaMV cycle, in particular since P6 interacts with several

cellular and viral factors thereby favoring basic virus replication. Indeed the absence of electron-dense viroplasms did not reduce CaMV replication and viral systemic spread, at least in *Arabidopsis*. This means also that CaMV efficiently accomplishes its cycle on subcellular structures and/or organelles; these sites are probably those used by members of the *Caulimoviridae* family which do not make viroplasms i.e. *Tungroviruses* and *Badnaviruses* and more generally, by the plant viruses. Champagne *et al.*, (2004) showed that the CaMV coat protein precursor is anchored in the cytoplasmic membrane and proposed a model in which reverse transcription and virus assembly is triggered on this cellular site. Further morphogenesis continues on small inclusion bodies probably containing P6 which contribute to the expansion of electron-dense viroplasms. These bodies might correspond to the small aggregates we observed in infected cells devoid of electron-dense viroplasms. Such a situation was already described for animal viruses notably rotavirus which replicates on aggresomes but would just do it as well if they remain in the cytoplasm. Indeed, depending on the strain, these viruses replicate in globular inclusion bodies located next to the nucleus (Parker *et al.*, 2002) or along microtubules in the cytoplasm (Broering *et al.*, 2002; Broering *et al.*, 2004). Recently, we discovered that P6 binds ribosomes (Park *et al.*, 2002) and a cellular factor associated with microtubules (Thiebauld *et al.*, 2007, unpublished data) suggesting that translation of viral transcripts occurs on the cytoskeleton.

P6 was identified as a suppressor of RNA silencing (Milner *et al.*, 2007; Haas G *et al.*, submitted) leading to the hypothesis that electron-dense viroplasms might be involved to restrict dicing of the viral 35S RNA (Moissiard and Voinnet 2006). However, systemic infection of host plants by the mutant CaMV indicates that electron-dense viroplasms do not contribute to silencing suppression.

We observed that P2, an aphid transmission factor (P3 also involved in transmission was not analyzed), was abundantly synthesized in *Arabidopsis* infected with mutant CaMV. However, surprisingly, this protein never assembled into electron-lucent viroplasms in the absence of electron-dense viroplasms suggesting that the formation of the former inclusion bodies is dependent P6-made inclusion bodies. Hitherto, it was admitted that P2 is expressed on the level of electron-dense viroplasms but soon after, quits these structures *via* the cytoskeleton to form electron-lucent viroplasm. Interaction between P6 and P2 was suggested by Qiu *et al.*, (1997) so that one can imagine that P6 acts as a chaperonin helping P2 to acquire the conformation needed for its assembly into electron-lucent viroplasms. Alternatively, it might be that P3, the natural partner of P2, plays this role as it is found at high levels on electron-dense viroplasms. Finally, it is remarkable that the vast majority of virions (~95%) are concentrated in the electron-dense inclusion bodies so that aphids have to puncture them to efficiently transmit the virus. Interactions between P6 and with both, the capsid P4 (Himmelbach *et al.*, 1996) and P3 proteins

(data not shown) on these structures might be relevant to transmission of CaMV particles. Therefore, a daring hypothesis is that electron-dense viroplasms might primarily serve to mediate electron-luscent viroplasm formation and to scaffold and store viral particles and thus, permit transmission of CaMV by aphids to ensure the perpetuation of CaMV.

References

Bonneville JM, Sanfacon H, Futterer J. and Hohn T. (1989). Posttranscriptional trans-activation in cauliflower mosaic virus. *Cell*. 59, 1135-43.

Broering TJ, Parker JS, Joyce PL, Kim J and Nibert ML. (2002). Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells. *J Virol*. 76: 8285-97.

Broering TJ, Kim J, Miller CL, Piggott CD, Dinoso JB, Nibert ML and Parker JS. (2004). Reovirus nonstructural protein mu NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. *J Virol*. 78, 1882-92.

Broglia EP. (1995). Mutational analysis of cauliflower mosaic virus gene VI: changes in host range, symptoms, and discovery of transactivation-positive, noninfectious mutants. *Mol Plant Microbe Interact*. 8, 755-60.

Champagne J, Benhamou N and Leclerc D. (2004). Localization of the N-terminal domain of cauliflower mosaic virus coat protein precursor. *Virology*. 324, 257-62.

Daubert SD, Schoelz J, Debaio L. and Shepherd RJ. (1984). Expression of disease symptoms in cauliflower mosaic virus genomic hybrids. *J Mol Appl Genet*. 2, 537-47.

Daubert S and Routh G. (1990). Point mutations in cauliflower mosaic virus gene VI confer host-specific symptom changes. *Mol Plant Microbe Interact*. 3, 341-5.

De Zoeten GA, Penswick JR, Horisberger MA, Ahl P, Schultze M. and Hohn T. (1989). The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology*. 72, 213-22.

Drucker M, Froissart R, Hebrard E, Uzest M, Ravallec M, Esperandieu P, Mani JC, Pugnieri M, Roquet F, Fereres A. and Blanc S. (2002). Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc Natl Acad Sci*. 99, 2422-7

Francki RIB, Milne RG. and Hatta T. (1985). Caulimovirus group. In: "Atlas of Plant Viruses" Vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 17-32.

Hohn T and Futterer J. (1991). Pararetroviruses and retroviruses: a comparison of expression strategies. *Semin. Virol*. 2: 55-69.

Geri C, Cecchini E, Giannakou ME, Covey SN. and Milner JJ. (1999). Altered patterns of gene expression in Arabidopsis elicited by cauliflower mosaic virus (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene. *Mol Plant Microbe Interact*. 12, 377-84

Geri C, Love AJ, Cecchini E, Barrett SJ, Laird J, Covey SN and Milner JJ. (2004). Arabidopsis mutants that suppress the phenotype induced by transgene-mediated expression of

cauliflower mosaic virus (CaMV) gene VI are less susceptible to CaMV-infection and show reduced ethylene sensitivity. *Plant Mol Biol.* 56, 111-24.

Haas M, Geldreich A, Bureau M, Dupuis L, Leh V, Vetter G, Kobayashi K, Hohn T, Ryabova L, Yot P and Keller M. (2005). The open reading frame VI product of Cauliflower mosaic virus is a nucleocytoplasmic protein: its N terminus mediates its nuclear export and formation of electron-dense viroplasms. *Plant Cell.* 17: 927-43.

Haas M, Bureau M, Geldreich A, Yot P. and Keller M. (2002). Cauliflower mosaic virus: still in the news *Mol Plant Pathol.* 3, 419-29.

Heath CM, Windsor M. and Wileman T (2001). Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly. *J Cell Biol.*153:449-55

Himmelbach A, Chapdelaine Y and Hohn T. (1996). Interaction between cauliflower mosaic virus inclusion body protein and capsid protein: implications for viral assembly. *Virology.* 217, 147-57

Karsies A, Merkle T, Szurek B, Bonas U, Hohn T, Leclerc D. (2002). Regulated nuclear targeting of cauliflower mosaic virus. *J Gen Virol.* 83, 1783-90.

Khelifa M, Journou S, Krishnan K, Gargani D, Esperandieu P, Blanc S. and Drucker M. (2007) Electron-lucent inclusion bodies are structures specialized for aphid transmission of cauliflower mosaic virus. *J Gen Viro.* 88, 2872-80.

Kobayashi K, Nakayashiki H, Tsuge S, Mise K and Furusawa I. (1998). Accumulation kinetics of viral gene products in cauliflower mosaic virus-infected turnip protoplasts. *Microbiol Immunol.* 42, 65-9.

Kobayashi K. and Hohn T. (2004). The avirulence domain of *Cauliflower mosaic virus* transactivator/viroplasin is a determinant of viral virulence in susceptible hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 475-483.

Kopito RR. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.*10: 524-530.

Love AJ, Yun BW, Laval V, Loake GJ, Milner JJ. (2005). Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 139, 935-48.

Love AJ, Laird J, Schweigler P, Hamilton AJ, Sadanandom A. and Milner J. (2007). Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA-silencing. XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. July 21-27, 2007, Sorrento, Italy.

Modjtahedi N, Volovitch M, Sossountzov I, Habricot Y, Bonneville JM and Yot P (1984). CaMV replication intermediates are encapsidated into virion-like particles. *Virology* 161: 129-137.

Moissiard G and Voinnet O. (2006). RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 103, 19593-8.

- Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H. and Risco C (2005).** Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell.* 97:147-72.
- Park HS, Browning KS, Hohn T, Ryabova LA. (2004).** Eucaryotic initiation factor 4B controls eIF3-mediated ribosomal entry of viral reinitiation factor. *EMBO J.* 23, 1381-91.
- Parker JS, Broering TJ, Kim J, Higgins DE and Nibert ML. (2002).** Reovirus core protein mu2 determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. *J Virol.* 76: 4483-96.
- Qiu SG, Wintermantel WM, Sha Y and Schoelz JE. (1997).** Light-dependent systemic infection of solanaceous species by cauliflower mosaic virus can be conditioned by a viral gene encoding an aphid transmission factor. *Virology.* 227, 180-8.
- Rothnie H, Chapdelaine Y. and Hohn T. (1994).** Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies. *Adv Virus Res.* 44, 1-67
- Schoelz JE and Shepherd RJ (1988).** Host range control of cauliflower mosaic virus. *Virology.* 162: 30-7.
- Schoelz JE, Shepherd RJ. and Daubert SD. (1986).** Gene VI of CaMV encodes a host range determinant. *J. Mol. Cell. Biol.* 6, 2632-2637.
- Shalla TA, Shepherd RJ. and Petersen, L. J. (1980).** Comparative cytology of nine isolates of Cauliflower mosaic virus. *Virology* 102, 381-388.
- Shepherd RJ. (1976).** DNA viruses of higher plants. *Adv Virus Res.* 20, 305-39.
- Wileman T. (2007).** Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: cellular defense or viral design? *Annu Rev Microbiol.* 61:149-67.

Chapitre II

*Etude du rôle de P6 dans la suppression du
silencing antiviral*

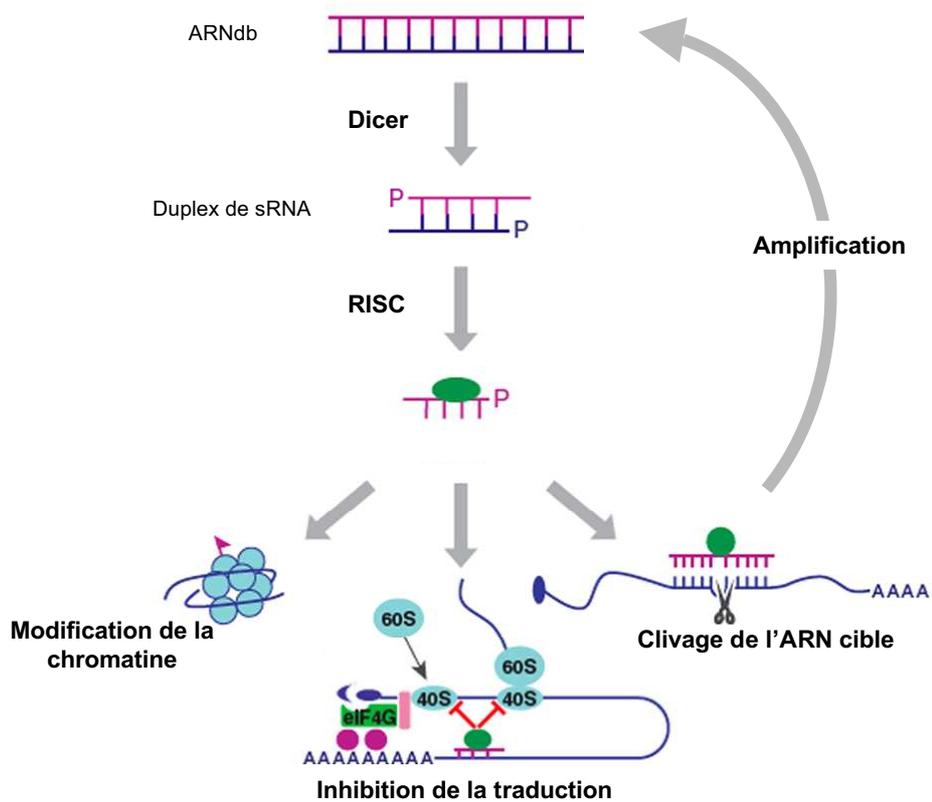


Figure 43 : Les étapes clés du RNA silencing (Li et Ding, 2006)

Le mécanisme de RNA silencing démarre par le clivage séquentiel d'un ARNdb en petits duplex de sRNA par une RNase III appelée dicer. Les sRNA sont alors incorporés dans le complexe RISC et guident la modification de la chromatine, l'inhibition de la traduction ou le clivage endonucléolytique d'ARNm, conduisant dans ce dernier cas à leur dégradation. Chez les plantes et *C. elegans*, des ARN polymérases ARN-dépendantes conduisent à une amplification de ce mécanisme.

et al., 1997). De la même manière, l'expression transgénique d'une construction portant un gène en répétition inverse produit un ARN en forme de tige-boucle, qui induit le RNA silencing (Chuang et Meyerowitz, 2000). Cette propriété est d'ailleurs utilisée expérimentalement pour diminuer l'expression d'un gène, notamment chez la plante, la drosophile ou le nématode. Cependant, l'activation de ce mécanisme n'est pas l'apanage de ce type de transcrits. Ainsi, des transcrits simple-brin exprimés à partir d'un transgène peuvent être reconnus comme aberrants puis convertis en ARNdb par des ARN polymérases ARN-dépendantes (RdRP) cellulaires (Dalmay *et al.*, 2000 ; Gazzani *et al.*, 2004 ; Sijen *et al.*, 2001). Les virus sont également inducteurs de RNA silencing. La plupart d'entre-eux possèdent un génome à ARN et leur réplication nécessite la formation d'ARNdb comme intermédiaire de réplication (Voinnet, 2005). La formation de structures secondaires ou la présence de séquences chevauchantes au niveau des transcrits viraux induit aussi la machinerie de silencing de l'hôte (Moissiard et Voinnet, 2006 ; Blevins *et al.*, 2006 ; Chellappan *et al.*, 2004 ; Voinnet, 2005), notamment chez les virus à ADN dans le dernier cas.

Enfin, des transcrits d'origine endogène vont également former des ARNdb. Les plus connus sont les transcrits de miRNA dont les précurseurs (pré-miRNA) ont une organisation structurale en tige-boucle (Bartel, 2004). Il existe également des loci renfermant des séquences répétées ou ayant à la fois une organisation en sens et en antisens, dont les transcrits résultants possèdent des régions chevauchantes pouvant s'apparier (Brodersen et Voinnet, 2006).

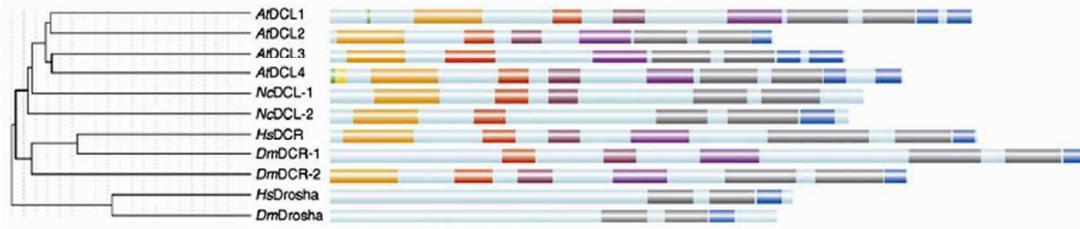
I.2 Formation de duplex de sRNA par les protéines Dicer-like

L'ARN double brin est reconnu et clivé de manière séquentielle par l'enzyme Dicer sous forme de duplex d'ARN (sRNA pour *small RNA*) de 21 à 25 nt de long, phosphorylés en 5' et possédant 2 nt flottants en 3' (Bernstein *et al.*, 2001 ; Elbashir *et al.*, 2001 ; Nykanen *et al.*, 2001). Les protéines Dicer-like appartiennent à la classe des RNase de type III et contiennent plusieurs domaines fonctionnels. On retrouve un domaine à ARN hélicase, un domaine de fonction inconnue (DUF pour *Domain of Unknown Function*), un domaine PAZ, deux domaines RNase III organisés en tandem et un domaine de fixation aux ARN double brin (dsRBD) (Figure 44A). Le domaine PAZ est très conservé et englobe une région de 130 acides aminés impliquée dans la reconnaissance spécifique d'ARNdb ayant 2 nt flottants en 3' (Carmell et Hannon, 2004). Son nom lui a été attribué suite à l'identification de trois protéines de la famille Argonaute qui possède également ce domaine, Piwi, Argonaute et Zwillie.

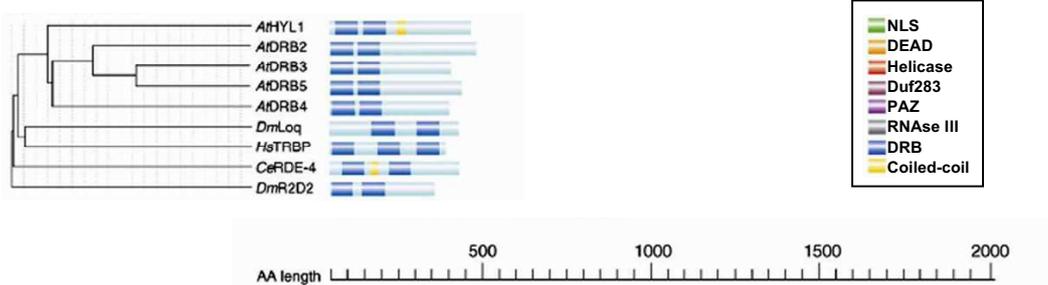
Des données cristallographiques obtenues chez l'archae *Giarda* montrent que Dicer agit en mesurant puis clivant une molécule d'ARNdb à une distance précise à partir de son extrémité. Ceci est possible grâce au domaine PAZ qui forme une poche se liant à l'ARNdb et distant, chez *Giarda*, de 65

A.

Dicer et DCL



DRB



B.

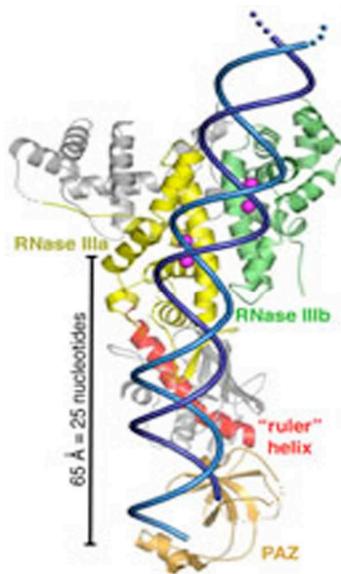


Figure 44 : Les protéines Dicer et DRB

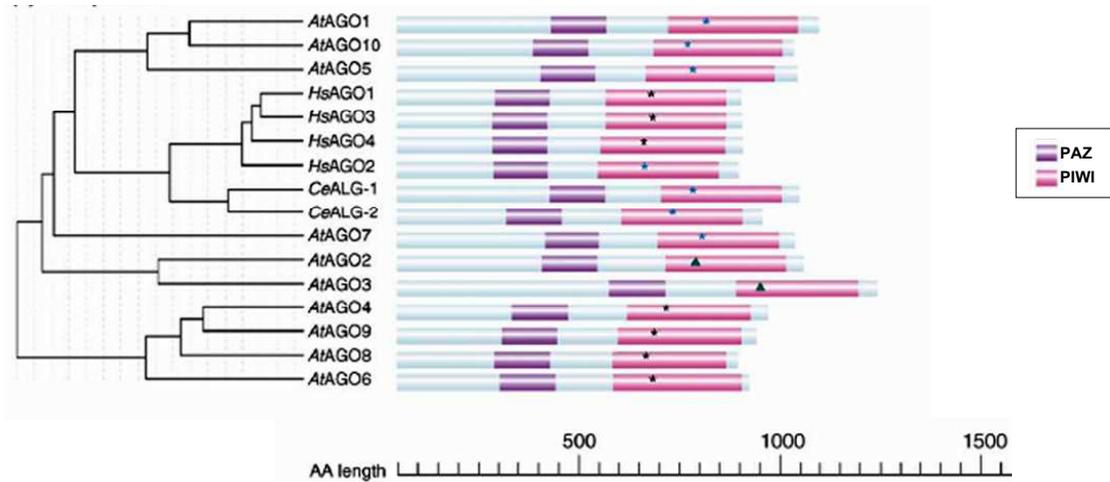
A. Représentation schématique des domaines fonctionnels conservés des protéines Dicer-like et DRB de divers organismes. Chaque domaine fonctionnel est représenté par une boîte de couleur dont la correspondance est indiqué dans un encadré. Les différents paralogues proviennent d'*Arabidopsis thaliana* (At), de *Drosophila melanogaster* (Dm), de l'homme (Hs), de *Neurospora crassa* (Ns) ou de *C. elegans* (Ce). Une échelle de taille en acides aminés est tracée sous les alignements (Vazquez, 2006). B. Représentation structurale de la protéine Dicer du protozoaire *Giardia intestinalis*. Les différents domaines sont représentés en couleurs et annotés. Une molécule d'ARNdb est modélisée en bleu et une échelle indique la distance de 65Å séparant le domaine Rnase IIIa du domaine PAZ (MacRae *et al.*, 2006).

À du premier motif RNase III. Cette distance correspond à la longueur d'un duplex de 25 nt, qui est la taille des produits de Dicer chez cet organisme (Macrae *et al.*, 2006) (Figure 44B). Chez les mammifères, *Saccharomyces pombe* et *C. elegans*, on ne trouve qu'une seule protéine Dicer. En revanche, le génome de la drosophile code pour deux paralogues de Dicer (Dcr-1 et Dcr-2) et celui d'*Arabidopsis thaliana* en contient quatre (DCL1 à DCL4) (Carmell et Hannon, 2004).

Chez *Arabidopsis*, chaque Dicer produit des duplex de sRNA de longueurs distinctes, à l'exception de DCL1 qui, outre la production de miRNA mature de taille variable (19-24nt), agit aussi de manière similaire à l'enzyme Drosha des mammifères, en excisant la région en tige-boucle des précurseurs de miRNAs (Lee *et al.*, 2003 ; Kurihara et Watanabe, 2004). DCL2, DCL3 et DCL4 génèrent quant à eux des siRNA (*short interfering RNA*) de respectivement 22, 24 et 21 nt de long (Brodersen et Voinnet, 2006).

Les protéines Dicer fonctionnent en association avec des protéines de liaison à l'ARNdb, les DRB (*dsRNA Binding Protein*). Ces dernières possèdent deux domaines de fixation aux ARNdb et sont présentes chez les plantes et les animaux (Figure 44A). Elles sont impliquées dans la réaction de « *dicing* », mais peuvent également faciliter le transfert des sRNA au niveau du complexe effecteur RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) (voir section suivante) (Tomari *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2006; Chendrimada *et al.*, 2005). Les couples DRB-Dicer les mieux caractérisés chez les animaux sont RDE4 et Dicer chez *C. elegans*, Loquacious et Dcr-1 chez la drosophile et PACT (ou TRBP) et Dicer chez l'homme (Tabara *et al.*, 2002 ; Forstemann *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2006 ; Chendrimada *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis*, l'interaction entre DCL1 et la protéine DRB1, appelée HYL1, est nécessaire pour l'accumulation des miRNA en contribuant au positionnement de DCL1 au niveau du site de coupure sur le pré-miRNA (Hiraguri *et al.*, 2005 ; Kurihara et Watanabe, 2004). La protéine DRB4 interagit *in vitro* et *in vivo* avec DCL4 dans le noyau et contribue à la production de certains siRNA endogènes (Hiraguri *et al.*, 2005 ; Nakazawa *et al.*, 2007). Malgré tout, la capacité de ces DRB à moduler l'activité des différentes DCL reste à définir. Il a été cependant observé récemment au cours d'une réaction de RNAi expérimentale que, le mutant *drb4* accumule moins de siRNA de 21 nt générés par DCL4 à partir d'ARNdb, mais génère plus beaucoup de siRNA de 24 nt (produits par DCL3). Une explication proposée à ce phénomène très caractéristique est que les sites occupés par DRB4 sur l'ARNdb sont aussi compétitivement liés par la protéine DRB (encore non connue, dénommée ici DRBX) normalement couplée à DCL3. L'absence de DRB4 favoriserait ainsi la fixation optimale de DRBX au dsRNA, et donc l'action de DCL3 (Dunoyer *et al.*, 2007).

A.



B.

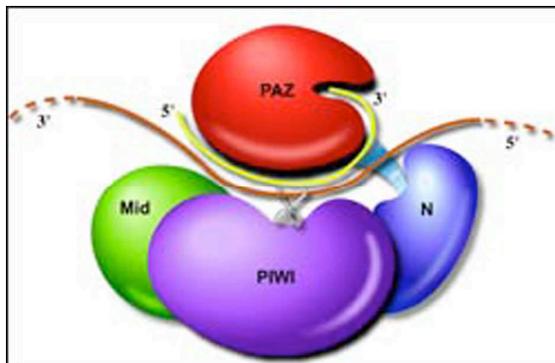


Figure 45 : Les protéines argonautes représentent le centre catalytique du complexe RISC

A. Représentation schématique des domaines fonctionnels conservés entre les protéines argonautes présentes chez *Arabidopsis thaliana* (At), *C. elegans* (Ce) et l'homme (Hs). Les domaines PAZ et PIWI sont représentés par une boîte de couleur dont la correspondance est indiquée dans un encadré. Une échelle de taille en acides aminés est tracée sous les alignements (Vazquez, 2006). B. Modélisation du clivage d'un ARNm par une protéine Argonaute. Le siRNA (jaune) se lie par son extrémité 3' au domaine PAZ (rouge). L'ARNm est incorporé entre les domaines PAZ et N-terminal (bleu) puis PAZ et un domaine central (vert) de la protéine. Le domaine PIWI (violet) renferme le site catalytique qui détermine le *slicing* de l'ARNm (représenté par des ciseaux) (Song *et al.*, 2004)

I.3 Assemblage et activité du complexe RISC

Pour pouvoir guider la suppression des cibles ADN ou ARN, les duplex de sRNA sont convertis en molécules simple brin, puis le brin ayant l'extrémité 5' phosphate la moins stable du duplex, appelé brin "guide", est incorporé dans le complexe RISC, alors que le second brin d'ARN, dit brin "passager", est clivé et dégradé (Schwarz *et al.*, 2003 ; Rand *et al.*, 2005). Le complexe RISC est l'effecteur du RNA silencing qui permet la répression transcriptionnelle (TGS) ou post-transcriptionnelle (PTGS) de l'expression des gènes. Il s'agit d'un grand complexe multiprotéique dont la constitution est peu connue, mais qui inclut invariablement une protéine de la famille Argonaute (AGO) (Hammond *et al.*, 2000 ; Hannon, 2002). Les protéines AGO renferment un domaine PAZ, comme les dicers, une signature des composants du silencing, ainsi qu'un domaine PIWI, qui possède le repliement et les deux acides aspartiques typiques des protéines de la famille des RNase H (Figure 45B). Le domaine PIWI constitue le site catalytique du complexe RISC (Parker *et al.*, 2004 ; Song *et al.*, 2004). Le nombre de protéines AGO est variable d'un organisme à un autre. Si *S. pombe* n'en a qu'une, la drosophile, l'homme et *Arabidopsis* en possèdent respectivement 5, 9 et 10 (Figure 45A), suggérant des spécialisations diverses de ces protéines dans les différentes voies du RNA silencing (Joshua-Tor, 2006).

Dans le cas du silencing post-transcriptionnel, le brin incorporé dans le complexe RISC guide ce dernier au niveau d'un ou plusieurs ARN cibles et, grâce à la complémentarité nucléotidique, permet leurs clivages séquence-spécifiques. Cette activité de clivage endonucléolytique, portée par la protéine AGO du complexe RISC, est aussi désignée « slicer » (Liu *et al.*, 2004). Le « slicing » est réalisé par le domaine RNase H et est positionné entre la 10^{ème} et 11^{ème} base à partir de l'extrémité 5' du brin guide (Elbashir *et al.*, 2001b). L'ARN cible ainsi clivé est ensuite dégradé par d'autres clivages endonucléolytiques ou par les voies générales de dégradation des ARN. Chez l'animal, le silencing post-transcriptionnel peut également s'opérer en réprimant la traduction de l'ARNm, et non en provoquant sa dégradation. C'est notamment très souvent le cas des miRNAs animaux dont le brin guide, associé au complexe RISC, n'est qu'imparfaitement complémentaire aux ARNm, et ciblés pour la plupart dans la région 5' non traduite (UTR). Cette interaction résulte en une inhibition de l'initiation et/ou de l'élongation de la traduction *via* des mécanismes encore mal compris. Enfin, le complexe RISC peut également intervenir au niveau transcriptionnel en contrôlant la formation de l'hétérochromatine. Chez *S. pombe*, ce type de complexe RISC a été appelé complexe RITS pour *RNA-Induced Transcriptional Silencing complex* (Verdel *et al.*, 2004) et son existence chez les plantes a été suggérée puisque certaines protéines AGO semblent préférentiellement guider le TGS et la méthylation de l'ADN ; c'est notamment le cas des protéines AGO4 et AGO6 (Zheng *et al.*, 2007 ; Zilberman *et al.*, 2003).

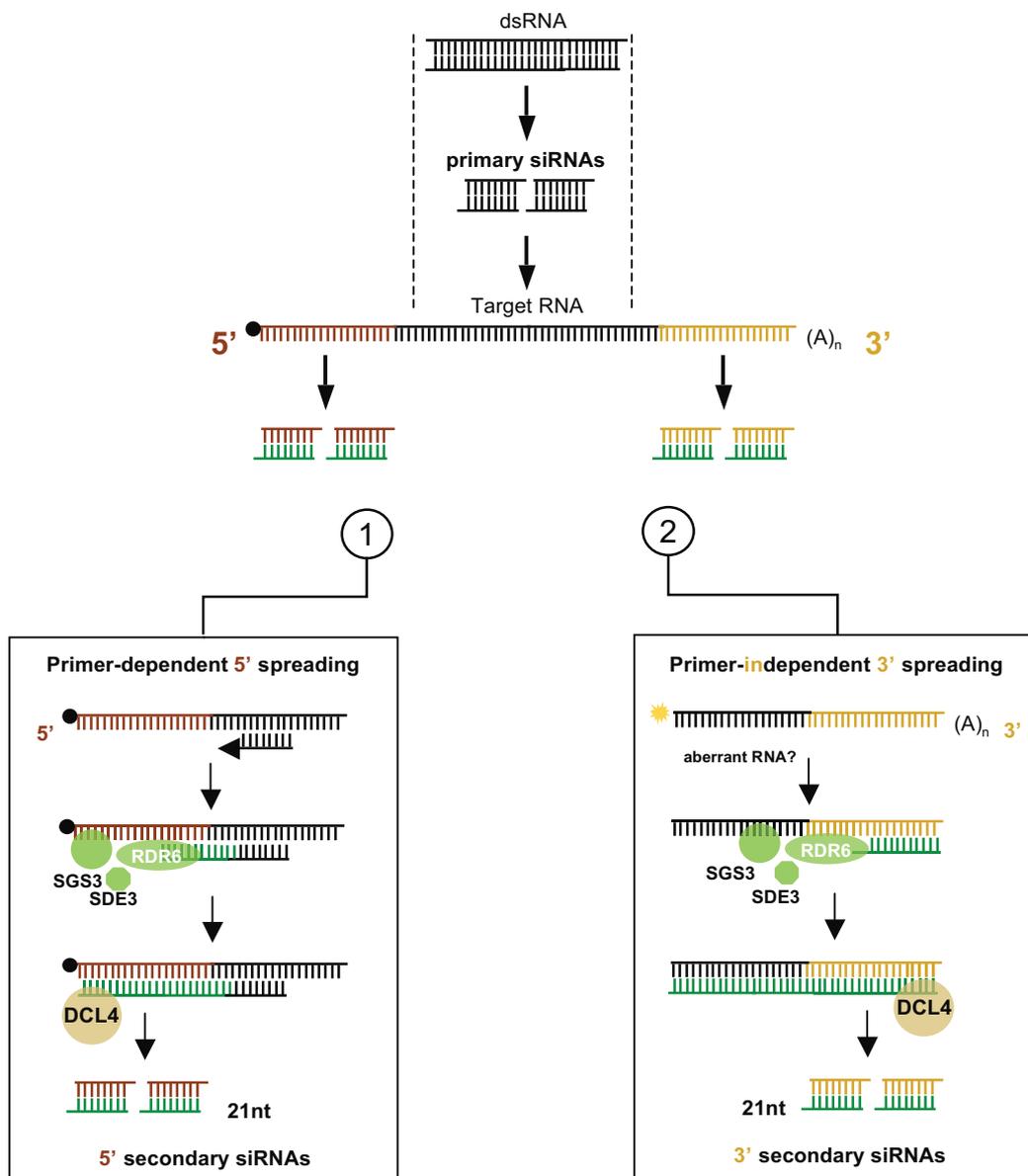


Figure 46: Amplification du RNA silencing (Brodersen et Voinnet, 2006)

Après la synthèse de siRNA primaires à partir d'un ARNdb et le clivage séquence-spécifique de transcrits cibles, les produits de clivage vont servir de matrice à la synthèse de nouvelles molécules d'ARNdb par l'ARN polymérase ARN-dépendante RDR6, qui seront ensuite clivées par DCL4, générant des siRNA secondaires. Il y a deux alternatives à ce processus, selon que l'activité de RDR6 requiert un siRNA primaire comme amorce (1) ou non (2). Dans ce dernier cas, RDR6 reconnaît le produit de clivage comme aberrant.

I.4 Amplification du RNA silencing par les RdRp cellulaires

Chez *C.elegans* et les plantes, le RNA silencing peut être amplifié par la synthèse de nouvelles molécules d'ARNdb à partir d'ARNsb grâce à l'activité d'ARN polymérases ARN-dépendantes (RdRP) cellulaires. Si les génomes de *C. elegans* et *Arabidopsis* en possèdent trois et six copies (RDR1-6) respectivement, ceux de la drosophile et de l'homme en sont dépourvus (Wassenegger et Krczal, 2006). Chez les plantes, il existe au moins deux mécanismes qui diffèrent selon qu'ils nécessitent ou non des siRNA comme amorces (Figure 46). Dans le premier mécanisme, les siRNA dérivant d'un ARNdb d'origine transgénique ou virale (siRNA primaires) recrutent une RdRP au niveau de l'ARNsb qui leur est homologue en séquence, conduisant à la synthèse *de novo* d'ARNdb pouvant être « *dicé* » en siRNA dits secondaires. Ce processus implique que les siRNA primaires homologues à une région donnée d'un ARN servent à la formation de nouvelles molécules localisées en 5' de la zone de l'ARN initialement ciblée. Cette caractéristique est connue sous le nom de « transitivity ». Chez *Arabidopsis*, la transitivity requiert la polymérase RDR6 et les ARN hélicases SDE3 et SDE5 (Voinnet, 2005b ; Hernandez-Pinzon *et al.*, 2007). Le second mécanisme utilise les trois protéines précédentes ainsi que AGO1 et SGS3 et, il se dispense d'amorce en ce sens qu'il ne requiert pas la pré-synthèse de siRNAs primaires. Il convertit en ARNdb, des ARNsb reconnus directement comme aberrants (abRNA) car, par exemple, démunis de coiffe ou de queue poly-A, et provenant de transgènes, de transposons ou de virus.

I.5 Le RNA silencing et son mouvement à courte et longue distance

Le PTGS est un mécanisme non cellule-autonome. Il se propage de cellule à cellule mais aussi à longue distance (pour revue, Voinnet, 2005b) (Figure 47). Les premières observations allant dans ce sens ont été faites sur des plants de tabac transgéniques exprimant un transgène codant pour la nitrate réductase (Nia) et qui présentaient une co-suppression spontanée démarrant en un site d'initiation et se propageant sur les nouvelles feuilles en croissance. Il est ensuite apparu que cet état de co-suppression de la nitrate réductase se propageait d'un porte-greffe *silencé* à un greffon non *silencé* (Palauqui *et al.*, 1996). L'existence d'un signal mobile du RNA silencing a été confirmée en introduisant transitoirement et localement (par agroinfiltration) des copies ectopiques de l'ARNm de la GFP dans des plantes de *Nicotiana benthamiana* exprimant constitutivement un transgène GFP (Voinnet *et al.*, 1998). Il en a résulté une perte de l'expression de la GFP au niveau des feuilles traitées, mais aussi au niveau des feuilles systémiques où l'inducteur est pourtant absent. Les auteurs ont alors suggéré que le signal mobile serait un acide nucléique, compte tenu de la spécificité de séquence du phénomène de propagation.

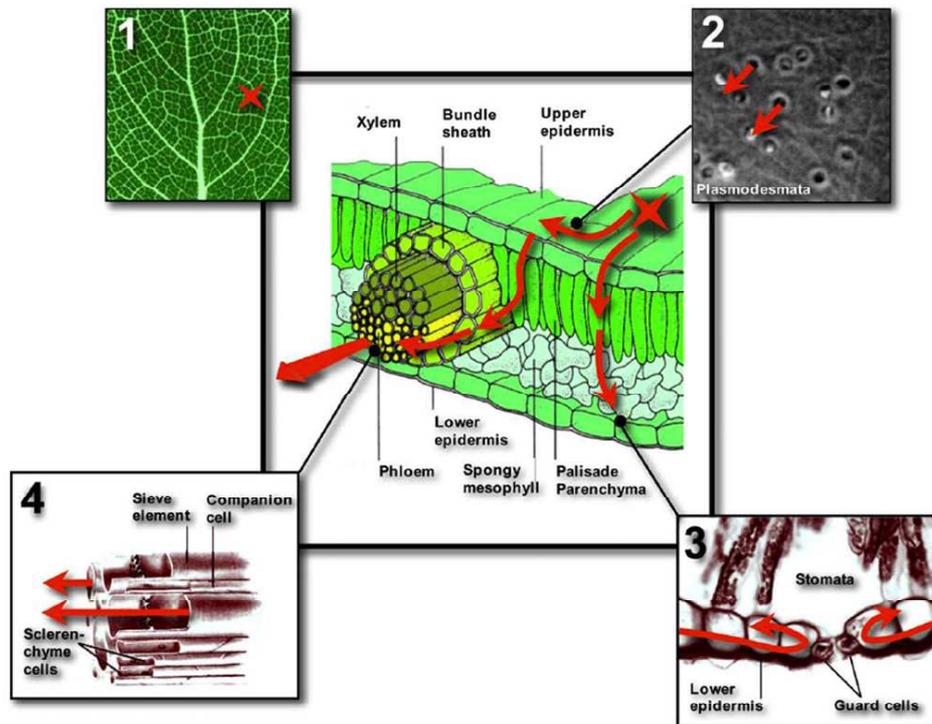


Figure 47 : Le mouvement à courte et à longue distance du silencing (Voinnet, 2005)

Représentation schématique du mouvement du signal de silencing (rouge) dans une feuille en coupe transversale, après bombardement d'une construction exprimant un transcrit double-brin. Le site de départ est visualisé par une étoile rouge (1). Après l'initiation du silencing dans l'épiderme supérieur, le signal se déplace de cellule à cellule *via* les plasmodesmes (visibles en microscopie électronique (2)), puis se déplace dans l'épiderme à l'exception des cellules de gardes dont il est exclu (3). Il rejoint ensuite les canaux du phloème dans les feuilles matures (4) pour se propager à longue distance.

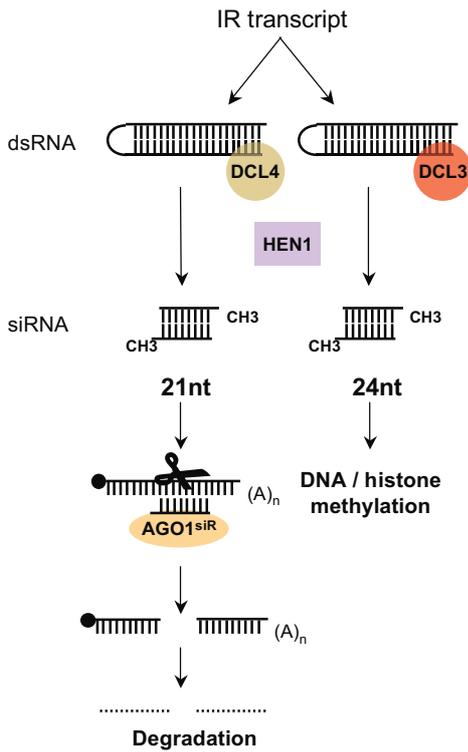
Plusieurs études ont corroboré ces expériences et montré que le mouvement à longue distance du silencing emprunte les voies du phloème. Le mouvement de cellule à cellule s'effectue par le symplasme car le silencing n'affecte pas les cellules de gardes matures qui ont la particularité d'être démunies de plasmodesmes (Voinnet *et al.*, 1998). Ce mode de propagation du signal est similaire à celui des phytovirus.

Si le transport vasculaire, à longue distance ne nécessite pas d'étape d'amplification (Schwach *et al.*, 2005), le déplacement de cellule à cellule implique l'ARN polymérase ARN-dépendante RDR6. En effet, l'étendue du mouvement est compromise dans un mutant *rdr6*, et ne se produit que dans 10 à 15 cellules autour du site d'initiation du RNA silencing (Himber *et al.*, 2003). Sur la base d'études génétiques, il a été proposé que les siRNA de 21 nt produits par DCL4 sont responsables du mouvement de cellule à cellule (Dunoyer *et al.*, 2005). Le modèle propose que les siRNAs de 21 nt rejoignent une cellule adjacente en se déplaçant à travers les plasmodesmes, puis guident le clivage des transcrits qui leur sont homologues. L'action de RDR6 dans ces tissus récepteurs conduit à la synthèse de nouvelles molécules d'ARNdb qui servent à alimenter le pool de siRNA et *a fortiori* la propagation. En absence de RDR6, les siRNA dans la cellule adjacente ne proviennent que de la cellule initiatrice. Ainsi, la distance de 10 à 15 cellules parcourue par le silencing autour du site d'initiation reflète la distance parcourue par les siRNA primaires, qui se diluent très probablement au fur et à mesure de leur mouvement (Himber *et al.*, 2003). Le mécanisme contribuant au mouvement physique des siRNAs n'est pas encore élucidé. Néanmoins les produits de plusieurs gènes baptisés *SMD* (pour *Silencing Movement Deficient*) sont requis pour la propagation du silencing (Dunoyer *et al.*, 2005). Deux d'entre-eux, SMD1 et SMD2 sont en fait respectivement les protéines RDR2 et NRPD1a qui sont impliquées dans le silencing de la chromatine (voir §II) (Dunoyer *et al.*, 2007). Leur contribution exacte au phénotype de propagation reste à déterminer, et notamment, il serait intéressant de vérifier si ces deux facteurs sont requis pour la synthèse, pour le mouvement ou pour la perception du signal de silencing (dans les cellules réceptrices dans ce dernier cas).

II. Les différentes voies du RNA silencing chez *Arabidopsis* et leurs fonctions

Le RNA silencing chez les plantes regroupe des voies diverses conduisant à la synthèse de sRNA de taille variable et possédant des fonctions propres. Elles reposent sur la multitude des paralogues des acteurs clés : les protéines DCL, AGO, DRB et RDR. Ces différentes voies sont bien documentées chez *Arabidopsis* et sont présentées ci-dessous.

A.



B.

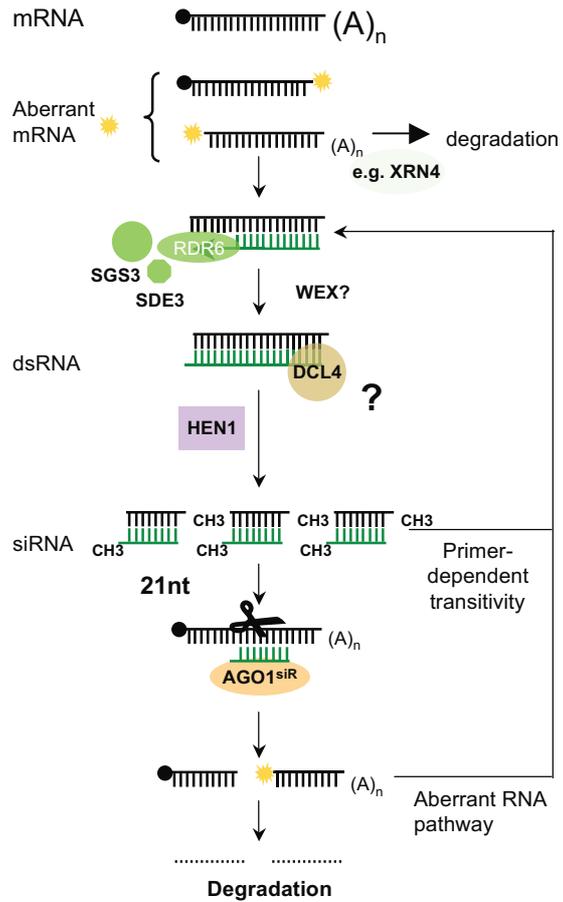


Figure 48 : Les voies de l'IR-PTGS et du S-PTGS chez Arabidopsis (Brodersen et Voinnet, 2006)

Ces deux voies distinctes sont activées par l'expression de transgène. A. L'expression d'une construction en répétition inverse conduit à la synthèse d'un transcript en forme de tige-boucle qui induit la voie de l'*inverted-repeat*-PTGS (IR-PTGS). Cet ARNdb sera clivé en siRNA de 21 et 24 nt par respectivement DCL4 et DCL3, puis méthylés par l'enzyme HEN1. Les siRNA de 21 nt guideront le clivage des transcripts homologues en séquence, tandis que les siRNA de 24 nt serviront à méthyliser la séquence ADN homologue. B. Dans le cas d'une expression d'un transgène mono-copie en orientation sens, le fort niveau d'expression du transgène peut conduire à la synthèse de transcripts imparfaits qui activeront le *sense*-PTGS (S-PTGS). Les transcripts aberrants sont convertis en ARNdb par RDR6, clivés par DCL4 et méthylés par HEN1. Ensuite ils provoqueront le clivage des messages qui leur sont homologues, par le complexe RISC. Ce mécanisme peut être amplifié par le phénomène de transitivity.

II.1 Transgènes et RNA silencing : IR-PTGS et S-PTGS

L'expression de transgènes peut conduire à une activation du PTGS si les transcrits synthétisés forment un duplex à ARNdb (pour une revue, Brodersen et Voinnet, 2006). Ce phénomène se produit si l'on exprime un gène en répétition inverse, le transcrit formant une structure en tige-boucle, active la voie appelée IR-PTGS pour *inverted-repeat-PTGS* (Figure 48A) (Chuang et Meyerowitz, 2000). L'ARNdb inducteur de RNAi est typiquement reconnu et clivé par deux DCL : DCL4, qui produit des siRNA de 21 nt, et DCL3, qui produit les siRNA de 24 nt (Hamilton *et al.*, 2002). Les siRNA de 24 nt sont impliqués dans le silencing transcriptionnel, conduisant à la méthylation de la chromatine (Llave *et al.*, 2002). DCL4 est la RNase III préférentielle des effets post-transcriptionnels du RNAi (Dunoyer *et al.*, 2005). Cependant des études de mutants knock-out des différents dicers montrent que DCL4 peut être suppléé par DCL2, qui clive alors l'ARNdb en siRNA de 22 nt (Gascioli *et al.*, 2005 ; Xie *et al.*, 2005b). Les siRNA de 21 nt sont incorporés dans le complexe RISC associé à la protéine AGO1 (Morel *et al.*, 2002) et guident le clivage des transcrits synthétisés à partir du transgène ou, de transcrits cellulaires si le transgène porte la séquence d'un gène endogène.

L'insertion d'un transgène mono-copie peut également induire le RNA silencing bien que son expression ne conduise pas à la synthèse d'un ARNdb (pour revue, Brodersen et Voinnet, 2006). On parle dans ce cas de S-PTGS pour *Sense-PTGS* (figure 48B). On ne connaît pas clairement le mécanisme d'activation de cette voie. Néanmoins, il semble que le fort niveau d'expression d'un transgène puisse conduire à la synthèse d'ARNsb aberrants, reconnus par l'ARN polymérase ARN-dépendante RDR6 qui les convertit en ARNdb (Gazzani *et al.*, 2004) comme expliqué précédemment (§I.4). Les duplex ainsi formés sont ensuite clivés de manière séquentielle par DCL4 pour générer une population de siRNA de 21 nt. Ces derniers, associés au complexe RISC/AGO1 vont provoquer le clivage et la dégradation des transcrits néosynthétisés (Morel *et al.*, 2002). L'implication de la protéine RDR6 signifie que le phénomène de S-PTGS s'opère pour amplifier la dégradation de transcrits exogènes et qu'il est, par nature, non-cellule autonome (Himber *et al.*, 2003).

II.2 Les *micro* (mi)-RNA

Les microRNA (miRNA) sont des sRNA simple brin de 19-24 nt excisés à partir de transcrits non codants endogènes (pri-miRNA), présentant une structure secondaire en tige-boucle. Ils agissent en *trans* au niveau de transcrits cellulaires cibles et induisent leur dégradation par clivage ou répriment leur traduction (Bartel, 2004). Une centaine de gènes codant pour des miRNA ont déjà été identifiés chez *Arabidopsis* (Xie *et al.*, 2005). Les miRNA, chez les plantes et les animaux, sont impliqués dans diverses étapes du développement, puisque la surexpression ou la perte de fonction de miRNA conduit

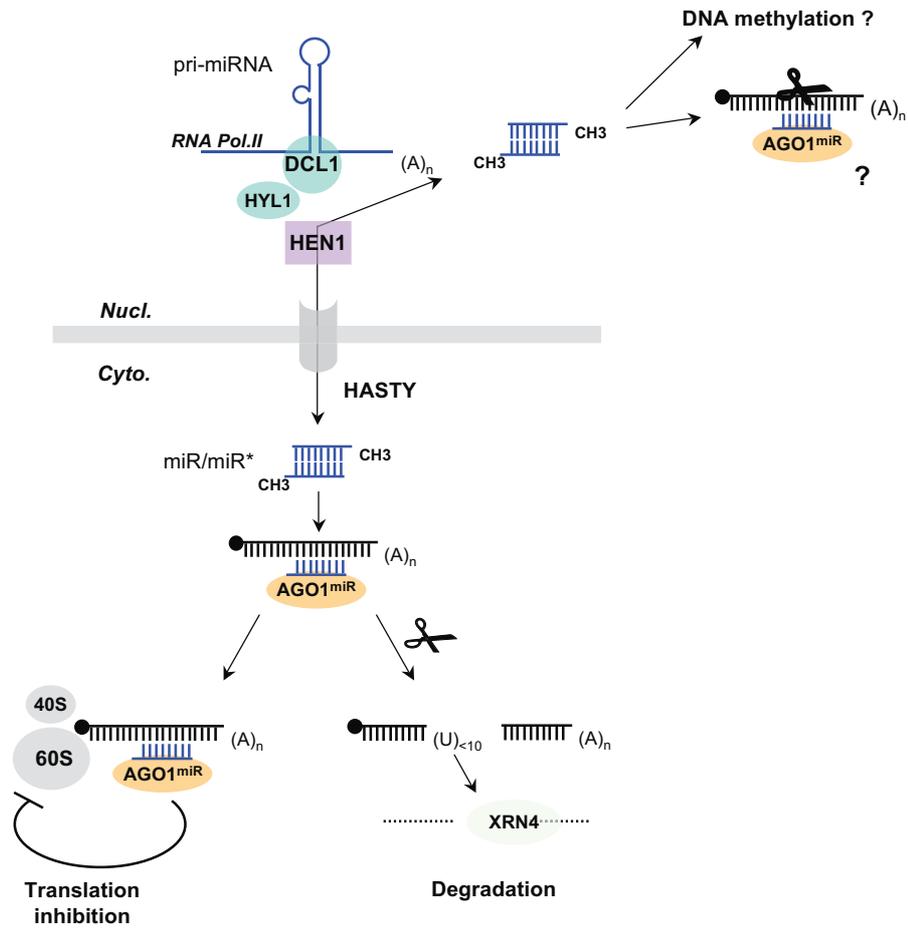


Figure 49: Biosynthèse et activités des miRNA chez Arabidopsis (Brodersen et Voinnet, 2006)

Les transcrits primaires de miRNA (pri-miRNA) qui exhibent des structures en tige-boucle sont synthétisés par l'ARN polymérase II. Dans le noyau, l'action combinée des protéines DCL1, HYL1 et HEN1 conduit à la production de miRNA matures et méthylés. Après leur export nucléaire par l'exportine HASTY, les miRNA sont incorporés dans le complexe RISC, ce qui amènera soit au clivage de transcrits cibles qui seront ensuite dégradés, soit à l'inhibition de la traduction de ces transcrits cibles. Il est également probable que certains miRNA puissent induire la méthylation de l'ADN ou guider le clivage de messagers dans le noyau.

à des malformations chez ces mutants (Bartel, 2004). De nombreuses cibles des miRNA sont par ailleurs des facteurs de transcription. De plus, l'activité des miRNA est généralement tissu-spécifique (Parizotto *et al.*, 2004) et suggère leurs implications dans des étapes particulières du développement et donc probablement lors de la différenciation cellulaire. Certains miRNA pourraient jouer un rôle dans la physiologie de la plante puisque ces derniers ciblent des composants du métabolisme ou sont impliqués dans la réponse au stress (Jones-Rhoades et Bartel, 2004 ; Sunkar et Zhu, 2004). Enfin, les miRNA matures sont présents à la fois dans le cytoplasme et le noyau de la cellule (Park *et al.*, 2005).

Les gènes codant pour les miRNA se localisent entre les gènes codants pour des protéines ou à l'intérieur d'introns (Bartel, 2004). Ils sont vraisemblablement transcrits en pri-miRNA par l'ARN polymérase II (Xie *et al.*, 2005) dans le noyau de la cellule. La RNase III DCL1 clive le transcrit primaire, conduisant à l'excision de la structure en tige-boucle qui possède 2 nt flottants en 3', et appelée pré-miRNA (Figure 49) (Park *et al.*, 2002). Le pré-miRNA est ensuite clivé une seconde fois par DCL1 pour former le duplex miRNA/miRNA*, où le miRNA* correspond au brin passager (Kurihara et Watanabe, 2004). Cette étape requiert l'interaction entre DCL1 et HYL1 (Vazquez *et al.*, 2004 ; Kurihara *et al.*, 2006). Chaque brin du duplex est ensuite protégé de la dégradation par une méthylation du groupement hydroxyle en 2' du ribose 3'-terminal, par la méthylase HEN1 (Li *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2005). Cette modification est spécifique du règne végétal, au moins en ce qui concerne les miRNAs. Après transfert dans le cytoplasme par le transporteur HASTY (HST) (Park *et al.*, 2005), le brin guide est incorporé dans le complexe RISC qui contient la protéine AGO1 (Baumberger et Baulcombe, 2005). Chez les plantes, le miRNA associé au RISC conduit préférentiellement à un clivage endonucléolytique de l'ARNm cible (Llave *et al.*, 2002b) bien que des études récentes suggèrent que la répression traductionnelle s'opère également (Gandikota *et al.*, 2007), comme chez les animaux. Cette différence serait portée par le niveau de complémentarité entre les séquences des miRNA et de leurs cibles. Chez les plantes, la séquence des miRNA présente une complémentarité quasi-parfaite avec la cible. Après le clivage de l'ARN cible, la partie 5' est dégradée par l'exosome suite à une oligo-uridylation (Shen et Goodman, 2004), alors que la partie 3' semble être digérée par la 5'-3' exonucléase XRN4 (Souret *et al.*, 2004).

II.3 Les trans-acting (ta)-siRNA

Les tasiRNA sont produits, comme les miRNA, à partir de gènes non codants transcrits par l'ARN polymérase II et guident le clivage séquence-spécifique de messagers cellulaires cibles (Vazquez *et al.*, 2004b ; Xie *et al.*, 2005). A la différence d'un gène de miRNA qui code pour une espèce unique de sRNA, les gènes des tasiRNA codent pour une série de siRNA complémentaires à de nombreux ARNm sans relation particulière entre eux. La fonction de ces tasiRNA reste à définir bien

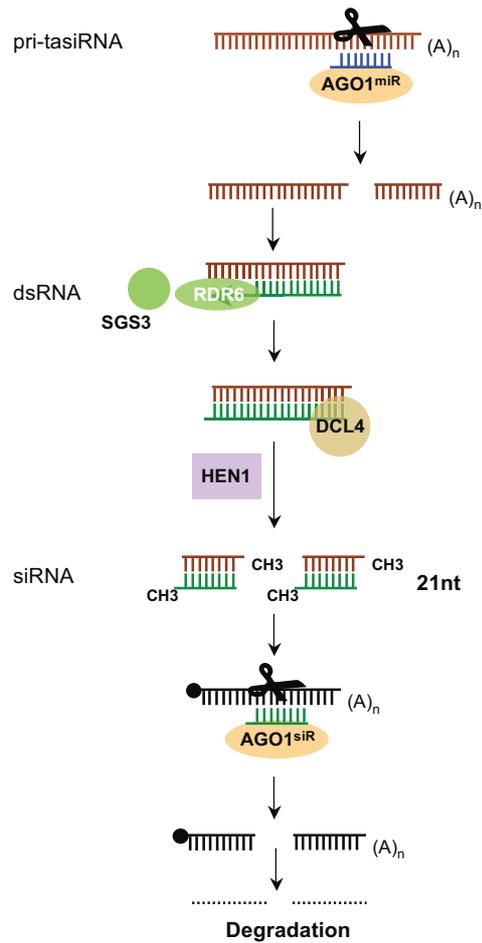


Figure 50 : La voie des *trans-acting* siRNA chez Arabidopsis (Brodersen et Voinnet, 2006)

La synthèse des tasiRNA nécessite en premier lieu le clivage endonucléolytique d'un précurseur (pri-tasiRNA) par un miRNA qui lui est spécifique. Les produits de clivage sont alors convertis en ARNdb par RDR6, puis l'activité de DCL4 conduira à la production des populations de tasiRNA, qui permettront le clivage puis la dégradation de nombreux messagers cellulaires.

Introduction

Le terme générique de RNA silencing regroupe l'ensemble des mécanismes eucaryotiques de régulation de l'expression des gènes guidés par de très courtes molécules d'ARN de 20 à 26 nucléotides de long. L'un de ces mécanismes est appelé *Post-Transcriptional Gene Silencing* (PTGS) chez les plantes, *quelling* chez les champignons et *RNA interference* (RNAi) chez les animaux. C'est en 1990 que Napoli et ses collaborateurs mirent en évidence le phénomène de co-suppression, la première manifestation expérimentale du PTGS chez les plantes (Napoli *et al.*, 1990). L'introduction d'un transgène codant pour la chalcone synthase chez le pétunia, pour renforcer la couleur pourpre des fleurs, a conduit à l'obtention de transformants ayant des fleurs dont certaines parties des pétales étaient blanches suite à une extinction du gène endogène. Cette découverte fortuite vint rapidement renverser le dogme, bien ancré, de la biologie selon lequel l'information génétique portée par l'ADN est transcrite en ARN, support intermédiaire destiné à la synthèse des protéines, ces dernières étant considérées comme les molécules-clés régissant l'ensemble des mécanismes moléculaires du vivant.

Rapidement, le RNA silencing est apparu comme un processus fondamental et pan-eucaryotique régulant négativement l'expression des gènes en modulant le niveau de transcription d'un gène, la stabilité de son ARNm ou en inhibant sa traduction. Il est impliqué dans divers processus fondamentaux comme la défense contre les virus, le contrôle de la mobilité des transposons, la régulation de l'expression des gènes *via* les miRNA (*microRNA*), ou la méthylation des histones et de l'ADN, et l'établissement de la chromatine (Carrington et Ambros, 2003 ; Baulcombe, 2004 ; Lippman et Martienssen, 2004 ; Voinnet, 2005). Si le RNA silencing est un mécanisme complexe comprenant plusieurs voies, il s'établit néanmoins autour de trois étapes clés : (i) la formation d'un ARN double brin (ARNdb) ; (ii) le clivage séquentiel (aussi appelé « *dicing* ») de cet ARNdb en petits duplex de 20-26 pb (paires de base) de long ; (iii) l'action inhibitrice guidée par ce petit ARN (*sRNA* pour *small RNA*) associé à un complexe effecteur, agissant au niveau de molécules d'ARN (*Post-Transcriptional Gene Silencing* ou PTGS) ou d'ADN (*Transcriptional Gene Silencing* ou TGS) de façon séquence spécifique (Brodersen et Voinnet, 2006) (Figure 43).

I. Les bases moléculaires du RNA silencing

I.1 Induction du RNA silencing par l'ARN double brin

L'élément inducteur du RNA silencing est la molécule d'ARN double brin. Son origine peut être exogène ou endogène. Ainsi, les insertions multiples et juxtaposées d'un transgène, en orientation sens et antisens, conduisent à la synthèse de transcrits formant un ARNdb après appariement (Metzlaff

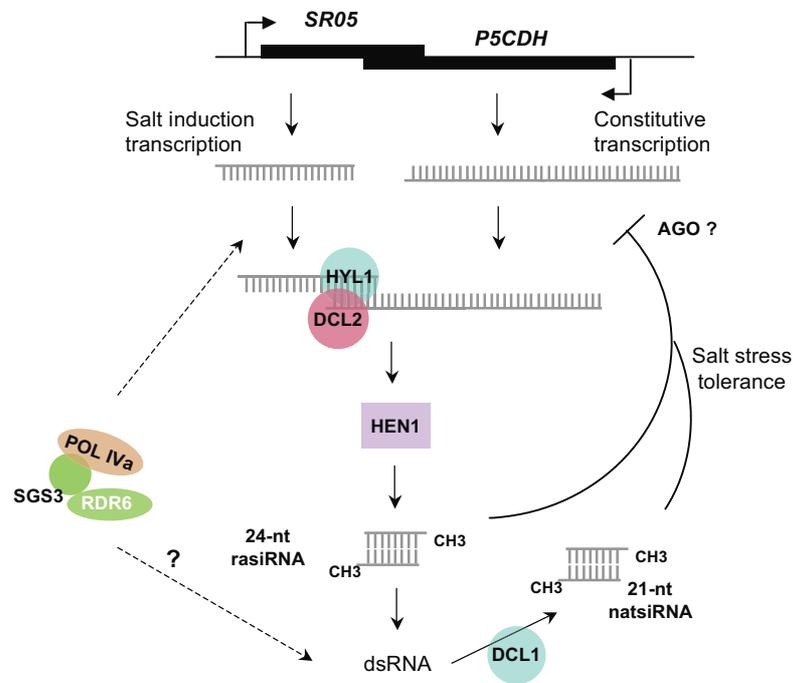


Figure 51 : La voie des *natural-antisense-transcript* (nat)-siRNA chez Arabidopsis.

La voie des natsiRNA est induite en réponse au stress salin. Ce stress provoque l'expression du gène *SR05*, qui conduira à la répression du gène *P5CDH*, exprimé constitutivement, pour augmenter la tolérance au stress. Les transcrits *SR05* et *P5CDH* présentent une complémentarité de séquence sur 760 nt leur permettant de s'apparier, générant un ARNdb qui sera clivé par DCL2 en natsiRNA de 24 nt de long. La biogenèse des nat-siRNA requiert les protéines RDR6, SGS3 et Pol IVa bien que leur contribution ne soit pas définie. Les nat-siRNA vont guider le clivage des ARNm *P5CDH* par le biais d'une protéine AGO indéterminée et, permettre la synthèse d'ARNdb correspondants à *P5CDH*, lesquels sont alors *dicés* par DCL1 en nat-siRNA de 21 nt, renforçant le clivage des transcrits de *P5CDH*.

qu'il semble qu'ils jouent un rôle dans le développement précoce des plantes, lors de la phase de transition entre les stades juvénile et adulte (Peragine *et al.*, 2004). Certains ont été identifiés comme ayant un impact sur les facteurs de transcription ARF3 et ARF4 impliqués dans les voies de réponses à l'auxine, néanmoins leur rôle dans le développement reste à déterminer (Williams *et al.*, 2005 ; Fahlgren *et al.*, 2006). Quatre loci codant pour des tasiRNA ont déjà été identifiés (TAS1 à TAS4) chez *Arabidopsis* (Allen *et al.*, 2005 ; Rajagopalan *et al.*, 2006).

Après la synthèse du précurseur des tasiRNA (pri-tasiRNA) par l'ARN polymérase II, ce dernier est clivé par un miRNA (miR173 ou miR390), associé à la protéine AGO1 (Figure 50) (Allen *et al.*, 2005). La complémentarité entre le miRNA et le pri-tasiRNA s'opère en 3' du précurseur pour TAS1 et TAS2, et en 5' pour TAS3 (Vazquez *et al.*, 2004b ; Peragine *et al.*, 2004 ; Allen *et al.*, 2005). Les produits de clivage sont ensuite convertis en un long ARNdb par la protéine RDR6 associée à SGE3 (Vazquez *et al.*, 2004b ; Peragine *et al.*, 2004 ; Allen *et al.*, 2005). La RNase III DCL4 digère ensuite ce long ARNdb dans une réaction phasée générant des populations de tasiRNA de 21nt de séquence bien définie (Vazquez *et al.*, 2004b ; Allen *et al.*, 2005 ; Xie *et al.*, 2005b ; Yoshikawa *et al.*, 2005 ; Gascioli *et al.*, 2005) qui sont ensuite méthylés par HEN1 (Li *et al.*, 2005). La production de tasiRNAs implique probablement diverses protéines DRB. En effet, si l'interaction entre DRB4 et DCL4 est nécessaire pour TAS3, TAS1 et TAS2 ne sont pas dépendants de cette dernière (Hiraguri *et al.*, 2005 ; Adenot *et al.*, 2006). Les tasiRNA matures s'associent alors au complexe RISC et guide le clivage de messagers cibles (ARF3 et ARF4 par exemple). La protéine AGO1 est impliquée dans le clivage des ARNm complémentaires aux tasiRNA originaires des loci TAS1 et TAS2 (Baumberger et Baulcombe, 2005), alors que pour TAS3, cette réaction s'opère en présence d'AGO7 (Adenot *et al.*, 2006). On ignore ce qui permet cette discrimination.

On ignore également dans quel compartiment cellulaire se déroulent les diverses étapes de synthèse des tasiRNA. Une étude récente décrit un nouvel acteur, la protéine SDE5, qui porte de nombreuses caractéristiques communes avec le facteur humain TAP impliqué dans l'export des ARNm cellulaires (Hernandez-Pinzon *et al.*, 2007). Les auteurs suggèrent que SDE5 pourrait participer à la synthèse d'ARNdb par RDR6 et permettre l'exportation nucléaire de la molécule d'ARNdb. Néanmoins, les protéines DCL4 et DRB4 présentent une localisation nucléaire lorsqu'elles sont exprimées transitoirement suggérant que la réaction de « *dicing* » s'opère en fait dans ce compartiment (Hiraguri *et al.*, 2005).

II.4 Les *natural-antisense transcript-derived* (nat)-siRNA

Récemment, une nouvelle classe de sRNA a été caractérisée et appelée nat-siRNA (*natural-antisense transcript-derived siRNA*) car elle dérive de l'appariement partiel entre deux transcrits

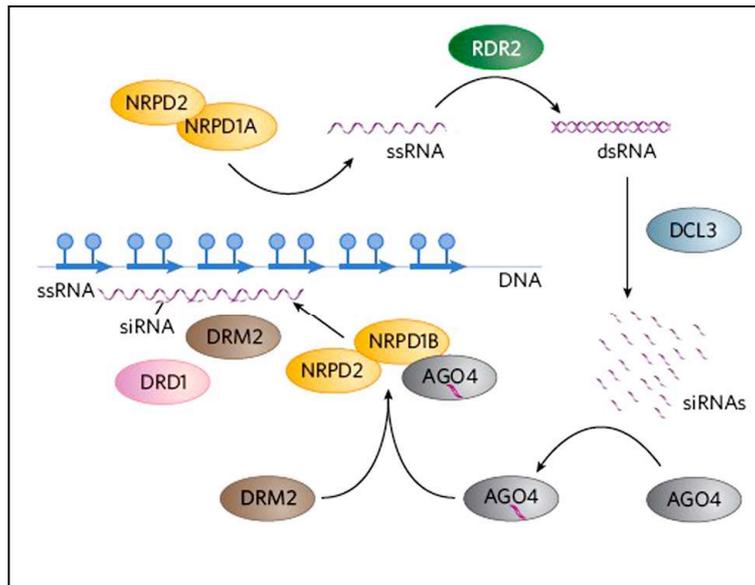


Figure 52 : Méthylation de la chromatine et *repeat-associated* (ra)-siRNA (Herderson et Jacobsen, 2007)

Un locus en répétition inverse est reconnu par l'ARN polymérase IV sous sa forme NRPD1a/NRPD2 qui synthétise de l'ARNsb. Ce dernier est ensuite converti en ARNdb par RDR2 puis *dicé* par DCL3 en rasiRNA de 24 nt qui sont incorporés dans le complexe RITS, formé d'AGO4 et de l'ARN polymérase IV sous sa forme NRPD1b/NRPD2. Ce complexe siRNA/protéines, en présence de la protéine DRM2, vont méthyler l'ADN complémentaire. Enfin, il semble que NRPD1b/NRPD2 puisse également générer des ARNsb auxquels AGO4, associée aux rasiRNA puisse s'hybrider.

différents ayant une partie chevauchante (Figure 51) (Borsani *et al.*, 2005). Ainsi, l'appariement antisens entre les transcrits des gènes SRO5 et P5CDH crée une région double brin de 760 pb qui est reconnue et clivée par DCL2 en nat-siRNA de 24 nt de long. Ces siRNA s'accumulent en réponse au stress, notamment après un traitement au NaCl (Borsani *et al.*, 2005). La voie de synthèse des nat-siRNA est encore très floue, cependant elle nécessite les protéines DCL2, RDR6, SGS3 et la sous-unité NRPD1a constitutive de l'ARN polymérase IV (Borsani *et al.*, 2005). Les nat-siRNA synthétisés guident alors le clivage des transcrits P5CDH par une protéine AGO encore non identifiée. Il existe une phase d'amplification de cette voie, puisque les transcrits clivés sont convertis en ARNdb puis « dicés » par DCL1 en des siRNA secondaires de 21 nt de long (Borsani *et al.*, 2005). Il a été proposé que l'amplification est assurée par la protéine NRPD1a qui agirait comme une ARN polymérase ARN-dépendante pour auto-alimenter la voie de biosynthèse des nat-siRNA (Vaucheret, 2005). La fonction de cette espèce de siRNA reste à élucider. Néanmoins, 4 à 20% des gènes eucaryotiques possèdent cette organisation chevauchante, suggérant que la voie des nat-siRNA peut avoir un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes (Borsani *et al.*, 2005).

II.5 Méthylation de l'ADN et *repeat-associated* (ra)-siRNA

Les siRNA n'agissent pas seulement au niveau de l'ARN, mais peuvent également guider la formation de l'hétérochromatine chez les champignons, les plantes et les animaux. L'hétérochromatine se définit comme une région fortement condensée de la chromatine, généralement centromérique, et riche en éléments transposables ou en répétitions de gènes (pour revue, Henderson et Jacobsen, 2007). Chez *Arabidopsis*, elle se caractérise par deux types de modifications : la méthylation de cytosines au niveau d'îlots CG, CNN et CHH (où N représente un nucléotide quelconque et H, un nucléotide A, T ou C) (Cao et Jacobsen, 2002) et la méthylation de l'histone H3 au niveau des lysines 9 (H3K9) et 27 (H3K27) (Jackson *et al.*, 2004). Le mécanisme conduisant à la formation de l'hétérochromatine a été nommé RdDM (*RNA-directed DNA Methylation*). Il a été découvert dans des plantes transgéniques dont le génome présentait des méthylation de cytosines au niveau de séquences homologues d'un transgène correspondant à la séquence d'un viroïde (Wassenegger *et al.*, 1994). Par la suite, il fut découvert que les ARNdb génèrent des siRNA impliqués dans la méthylation des cytosines (Matzke *et al.*, 2001). Depuis, la fonction attribuée au RdDM est la maintenance de l'intégrité du génome par la méthylation des régions répétées, des rétrotransposons, ou de séquences virales intégrées (Henderson et Jacobsen, 2007).

Le mécanisme conduisant à la méthylation de ces régions comporte beaucoup de zones d'ombres. Néanmoins, on sait à présent qu'il requiert les siRNA de 24 nt générés par DCL3 (Xie *et al.*, 2004), l'ARN polymérase ARN-dépendante RDR2, AGO4 (Zilberman *et al.*, 2003 ; Qi *et al.*,

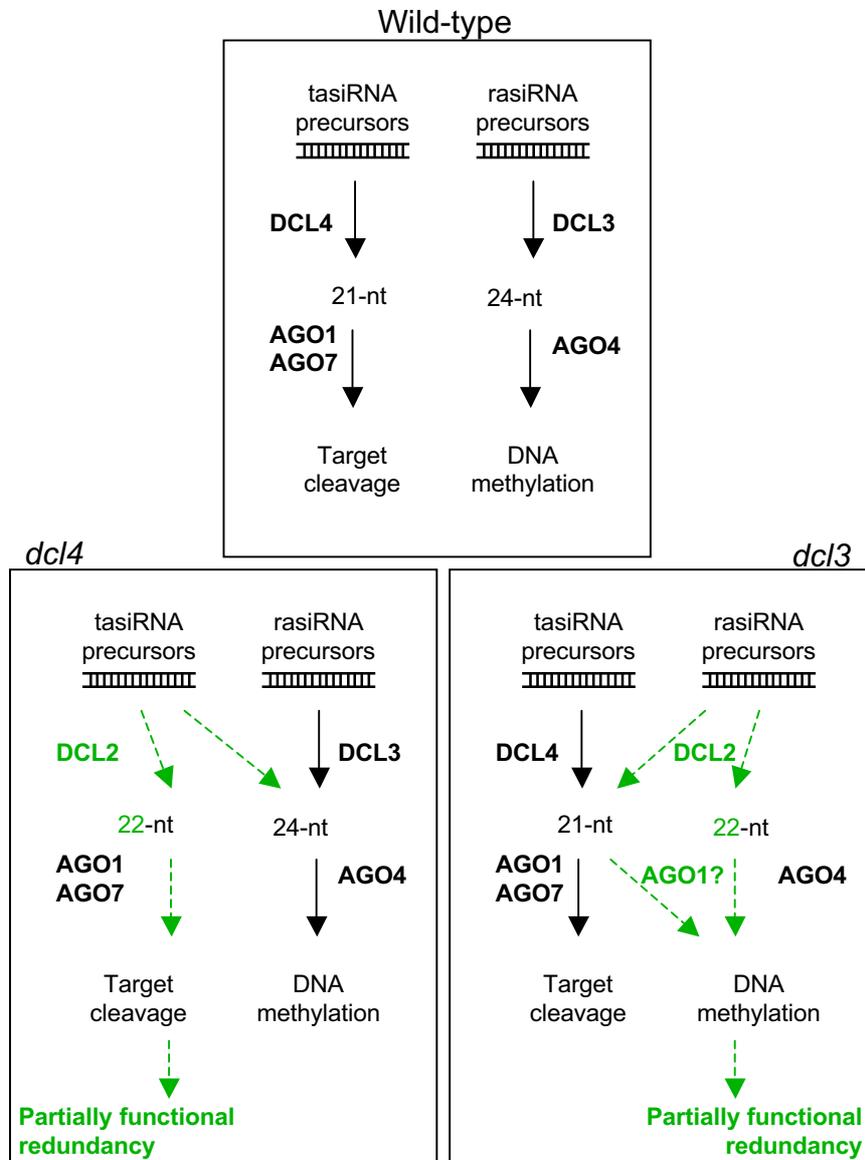


Figure 53 : Redondance et compétition entre les composants du silencing (Vazquez, 2006)

Dans ce modèle figurent les redondances observées entre les voies des tasiRNA et des rasiRNA. Pour chaque voie, les protéines DCL et AGO impliquées sont notées, ainsi que la taille des siRNA produits et le rôle qu'ils jouent sur le transcriptome d'une plante sauvage. Dans le cas des mutants *dcl4* et *dcl3*, les redondances fonctionnelles observées et les modifications qu'elles impliquent sont représentées en vert.

2006) et HEN1 (Li *et al.*, 2005). D'autres facteurs ont été impliqués bien que l'on ne dispose pas d'information précise sur leur contribution. On trouve entre autres, la sous-unité NRPD1a de la polymérase IV qui est indispensable pour l'accumulation des siRNA, les protéines NRPD1b et NRPD2 qui sont impliquées dans la méthylation de gènes en répétition inverse (Onodera *et al.*, 2005), le facteur de remodelage de la chromatine DRD1 (Kanno *et al.*, 2004), et la protéine DRM2 qui porte une activité cytosine-méthyl-transférase (Chan *et al.*, 2005). Un modèle a été proposé pour expliquer comment se déroule le RdDM en présence des facteurs cités ci-dessus, bien que d'autres protéines y jouent également un rôle. Ce modèle repose sur la méthylation de séquences répétées comme l'ADN 5S ribosomique ou l'élément transposable atSN1 (Henderson et Jacobsen, 2007).

Dans ce modèle, le locus cible recrute l'ARN polymérase IV comprenant NRPD1a et NRPD2 par un mécanisme non élucidé, ce qui conduit à la synthèse d'ARNsb (Figure 52). Ces molécules d'ARNsb sont alors reconnues par l'ARN polymérase ARN-dépendante RDR2 et converties en ARNdb. Ce dernier est alors « *dicé* » par DCL3, générant ainsi les siRNA de 24 nt qui sont méthylés (et donc stabilisés) par HEN1. Ces siRNA, appelés *repeat-associated* (ra)-siRNA, sont alors incorporés dans le complexe RITS (par analogie avec *S. pombe*) comprenant la protéine AGO4 qui s'associe à une nouvelle forme de la polymérase IV, NRPD1b-NRPD2. A ce moment-là, AGO4 associé aux siRNA est programmé pour se localiser au niveau des séquences génomiques homologues, et guider la protéine DRM2 qui porte l'activité cytosine-méthyl-transférase. La méthylation de la chromatine est possible en présence de la protéine DRD1. Enfin, le complexe NRPD1b-NRPD2 pourrait générer des transcrits simple brin auxquels AGO4, associé aux rasiRNA, pourrait s'hybrider. De plus, le fait que les rasiRNA homologues à certaines régions répétées ne s'accumulent pas dans des mutants *knock-out* pour DRM2 et AGO4, suggère que la méthylation de l'ADN pourrait elle-même stimuler la production des rasiRNA et ainsi renforcer le silencing.

II.6 Redondance / compétition

Chez *Arabidopsis*, la multitude de paralogues des protéines DCL, DRB et AGO, aux nombres respectifs de 4, 5 et 10 suggère des redondances fonctionnelles entre ces différentes protéines (Vazquez, 2006). Plusieurs observations expérimentales réalisées grâce à la disponibilité de mutants de silencing tendent à confirmer ce phénomène bien que son ampleur et les mécanismes qui le régissent ne soient pas encore bien établis.

Les premières observations de redondance concernent les DCL, et montrent une interconnection entre les voies des tasiRNA et des rasiRNA (Figure 53) (Gascioli *et al.*, 2005 ; Xie *et al.*, 2005b). Ainsi, en absence de DCL3, les rasiRNA peuvent être produits par DCL2 et DCL4. Inversement, en absence de DCL4, les tasiRNA sont majoritairement produits par DCL2 ou, dans un

JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH

VOL. 37 WASHINGTON, D. C., AUGUST 1, 1928 No. 3

HOSTS AND SYMPTOMS OF RING SPOT, A VIRUS DISEASE OF PLANTS¹

By S. A. WINGARD²

Associate Plant Pathologist, Virginia Agricultural Experiment Station

INTRODUCTION

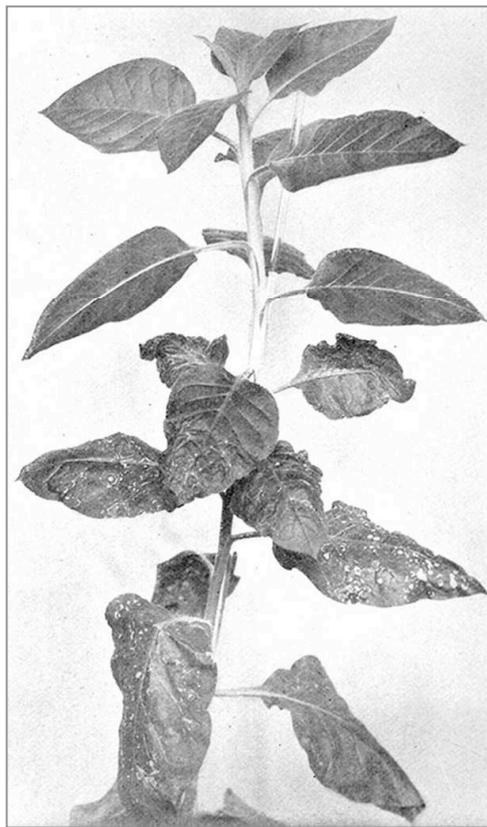


Figure 54 : Première publication sur le phénomène de *recovery* observée par S. A. Wingard sur un plant de tabac infecté par le *Tobacco Ring Spot Virus*, datant de 1928.

double mutant *dcl4-dcl2*, par DCL3. De même, un triple mutant *dcl2-dcl3-dcl4* n'abolit pas complètement l'accumulation des tasiRNA et des siRNA montrant que DCL1 peut en principe assurer cette fonction en plus de son rôle dans la biogénèse des miRNA (Henderson *et al.*, 2006). La redondance entre DCL4 et DCL2 a également été observée pour la voie de l'IR-PTGS et du RNA silencing antiviral, où DCL2 vient suppléer l'activité compromise de DCL4 (Adenot *et al.*, 2006 ; Blevins *et al.*, 2006 ; Deleris *et al.*, 2006). On ignore par quel mécanisme se déroule ce croisement fonctionnel. Néanmoins, il est envisageable que les protéines DRB soient impliquées grâce aux interactions spécifiques qu'elles engagent avec les DCL (Hiraguri *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que s'il existe une interaction préférentielle entre DCL1 et HYL1 ou DCL4 et DRB4, d'autres interactions plus faibles sont possibles. Ainsi, DCL1 peut aussi se lier à DRB2 et DRB5, et DRB2 peut interagir avec DCL3 ou DCL4 (Hiraguri *et al.*, 2005). Enfin, concernant les protéines AGO, il est encore trop tôt pour se prononcer sur d'éventuelles redondances dans la mesure où peu d'entre elles ont une fonction assignée. Toutefois, des similitudes dans le phénotype des mutants *ago1* et *ago10* suggèrent que les protéines correspondantes soient fonctionnellement redondantes. Il en est de même pour AGO4 et AGO6, toutes deux impliquées dans le TGS (Vazquez, 2006).

III. Phytovirus et RNA silencing antiviral

Dès les années 1950, les phytovirologistes ont remarqué la possibilité d'une co-infection d'une plante par plusieurs virus de genre différents, conduisant à une augmentation drastique de la sévérité des symptômes (Moissiard, 2007). Ce phénomène a été particulièrement bien étudié au cours de co-infections mettant en jeu un potyvirus et un autre virus quelconque, et a été appelé synergisme. Ainsi, il a été observé lors d'une double infection avec un potyvirus et des virus ayant des génomes sans relation comme le CaMV (Khan et Demski, 1982), le PVX (*Potato Virus X*) (Rochow et Ross, 1955) ou le CMV (*Cowpea Mosaic Virus*) (Anjos *et al.*, 1992) qui appartiennent respectivement aux super-groupes des pararétrovirus, des alphavirus-like ou des picornavirus-like. Lors du phénomène de synergisme, l'intensité des symptômes n'est pas due à une modification du niveau de multiplication du potyvirus, mais à une augmentation du titre du second virus co-infectant (Vance, 1991 ; Vance *et al.*, 1995). Chez le tabac, la co-infection du PVY (*Potato Virus Y*, un potyvirus) permet d'augmenter l'accumulation du PVX d'un facteur 3 à 10, en comparaison d'une infection par le PVX seul (Vance, 1991). Ce phénomène a été relié à la séquence 5' proximale du génome du PVY, comprenant la région 5' non traduite et la partie 5' de la séquence de la polyprotéine qui code pour la protéinase HcPro et le quart N-terminal de la protéine P3 (Vance *et al.*, 1995). Deux ans plus tard, il s'est avéré que la protéine HcPro était responsable du phénomène de synergisme. En effet, l'expression transgénique de HcPro seule dans des plants de tabac conduit à une hypersusceptibilité de ces plantes à l'infection par

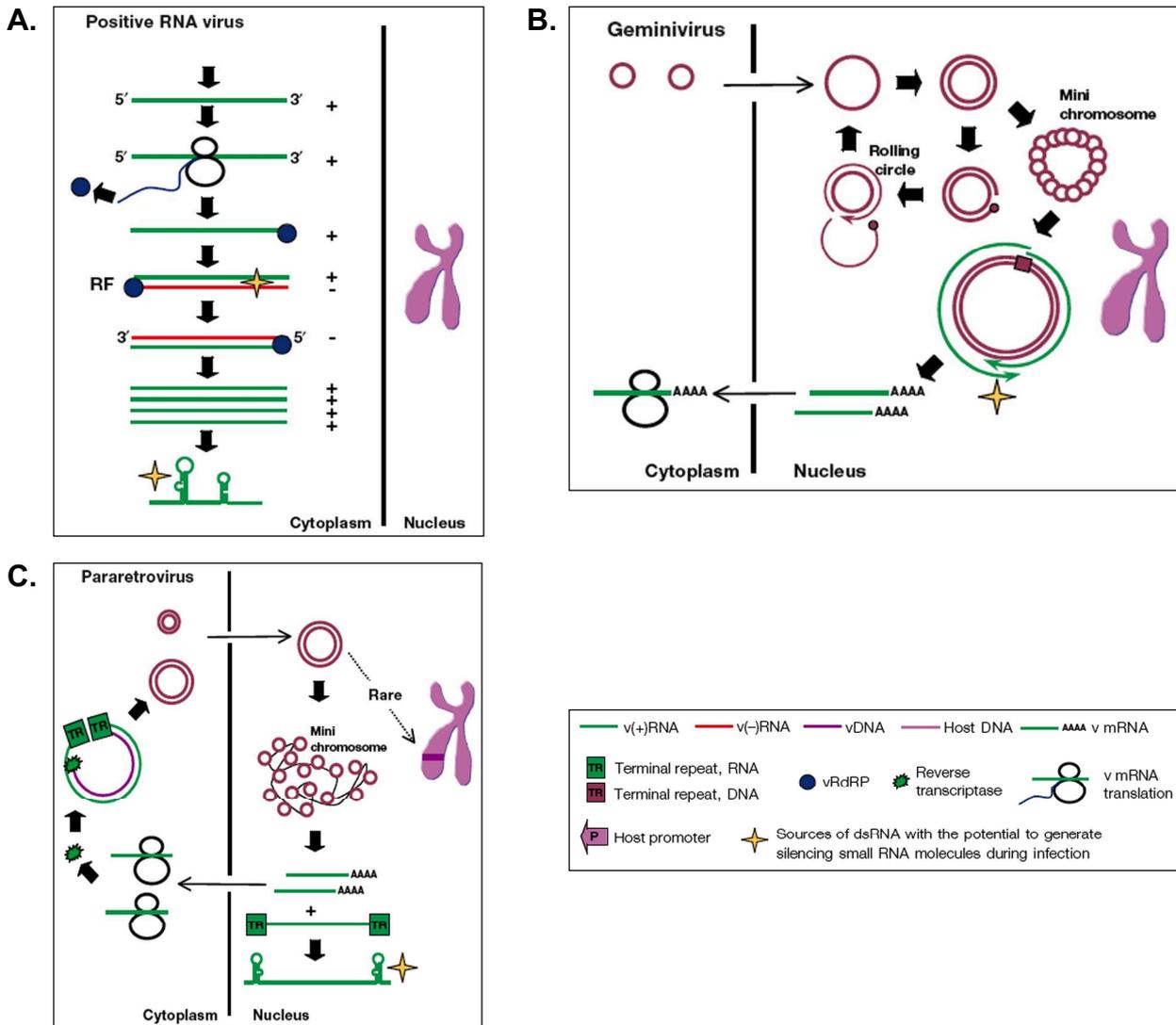


Figure 55: les sources d'ARNdb chez les phytovirus (Voinnet, 2005)

Les stratégies de répllication des phytovirus à ARN (+) et à ADN sont représentés et une légende en bas à droite, indique la correspondance des symboles utilisés. Les virus ayant un génome à ARN (+) se répliquent en synthétisant un ARN (-) complémentaire servant de matrice pour produire de nouvelles molécules d'ARN génomique et subgénomique (A). Cette étape conduit à la synthèse d'un intermédiaire ARNdb qui induit le silencing. Certains transcrits viraux formant des appariements intra-moléculaires sont également des inducteurs du silencing. Dans le cas des géminivirus (B), le génome circulaire à ADNsb se réplique dans le noyau de la cellule par un mécanisme de *rolling circle* formant un ADNdb qui peut être converti en minichromosome. Dans le noyau, la transcription bidirectionnelle du génome des géminivirus forme des ARN partiellement chevauchants qui peuvent s'apparier et ainsi conduire à un ARNdb. Le génome des pararétrovirus (C) est répliqué dans le cytoplasme par transcription inverse, puis transporté dans le noyau où il formera un minichromosome. Ce dernier est transcrit par l'ARN polymérase II, donnant des transcrits viraux dont certaines régions fortement structurées induiront le RNA silencing.

le PVX, le TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) et le CMV (*Cucumber Mosaic Virus*), visible par une pathogénicité accrue et une augmentation du niveau d'ARN génomique de ces virus (Pruss *et al.*, 1997).

Un autre phénomène, appelé *recovery* et inhérent à une infection phytovirale a été observé dès 1928 par S. A. Wingard : alors qu'une plante infectée par le TRSV (*Tobacco Ring Spot Virus*) développe initialement des nécroses, les nouvelles feuilles émergentes sont asymptomatiques et s'avèrent résistantes à une nouvelle infection par ce même virus (Figure 54) (pour revue, Baulcombe, 2004). Cette observation fut réitérée quelques décennies plus tard, tout d'abord pour le CaMV lors de l'infection de plants de chou-rave (Al-Kaff et Covey, 1995 ; Covey *et al.*, 1997), puis pour le TBRV (*Tomato Black Ring Virus*) chez le tabac (Ratcliff *et al.*, 1997). Chez les plantes infectées par le TBRV, les feuilles émergentes étaient également résistantes à une nouvelle infection par ce virus, mais restaient susceptibles au PVX. En revanche, ces tissus sont résistants à un virus PVX modifié contenant une fraction de la séquence génomique du TBRV, alors que la présence du gène de la GFP ou une séquence du TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) n'empêche pas la prolifération du PVX modifié (Ratcliff *et al.*, 1997). Cette étude fut la première à suggérer que le phénomène de *recovery* est séquence spécifique, et face à l'avènement du RNA silencing, que ce dernier pourrait avoir un rôle dans la défense contre les virus.

Néanmoins, il fallut attendre 1999 pour avoir la démonstration irréfutable que le RNA silencing a un rôle antiviral, grâce à la détection lors d'une infection par le PVX, de petits ARN viraux estimés à 21-24 nt (*vsRNA*, pour *virus-derived siRNA*) et résultant du phénomène de PTGS (Hamilton et Baulcombe, 1999). Le rôle antiviral du RNA silencing fut ensuite clairement étayé par la découverte de protéines virales contrecarrant l'activité de PTGS chez *Nicotiana benthamiana*, et communément dénommées par le terme de "suppresseurs du RNA silencing". Les deux premiers suppresseurs ainsi identifiés furent la protéine 2b du CMV et la protéine HcPro du PVY (Brigneti *et al.*, 1998). Cette découverte a permis par la suite de relier RNA silencing et synergisme ; la contre-attaque du PVY par le biais de HcPro sur la machinerie de silencing de l'hôte permettant la prolifération d'autres virus dans une plante car les mécanismes de défense sont inhibés. Par la suite, d'autres suppresseurs furent caractérisés, chez des virus à ARN comme à ADN, et se sont révélés pour la plupart être des facteurs de pathogénicité. Néanmoins, des différences notables ont été observées pour ces facteurs concernant la spécificité tissulaire et l'intensité de la suppression du PTGS, laissant dès lors entrevoir une grande diversité dans le mode d'action de ces facteurs (Voinnet *et al.*, 1999).

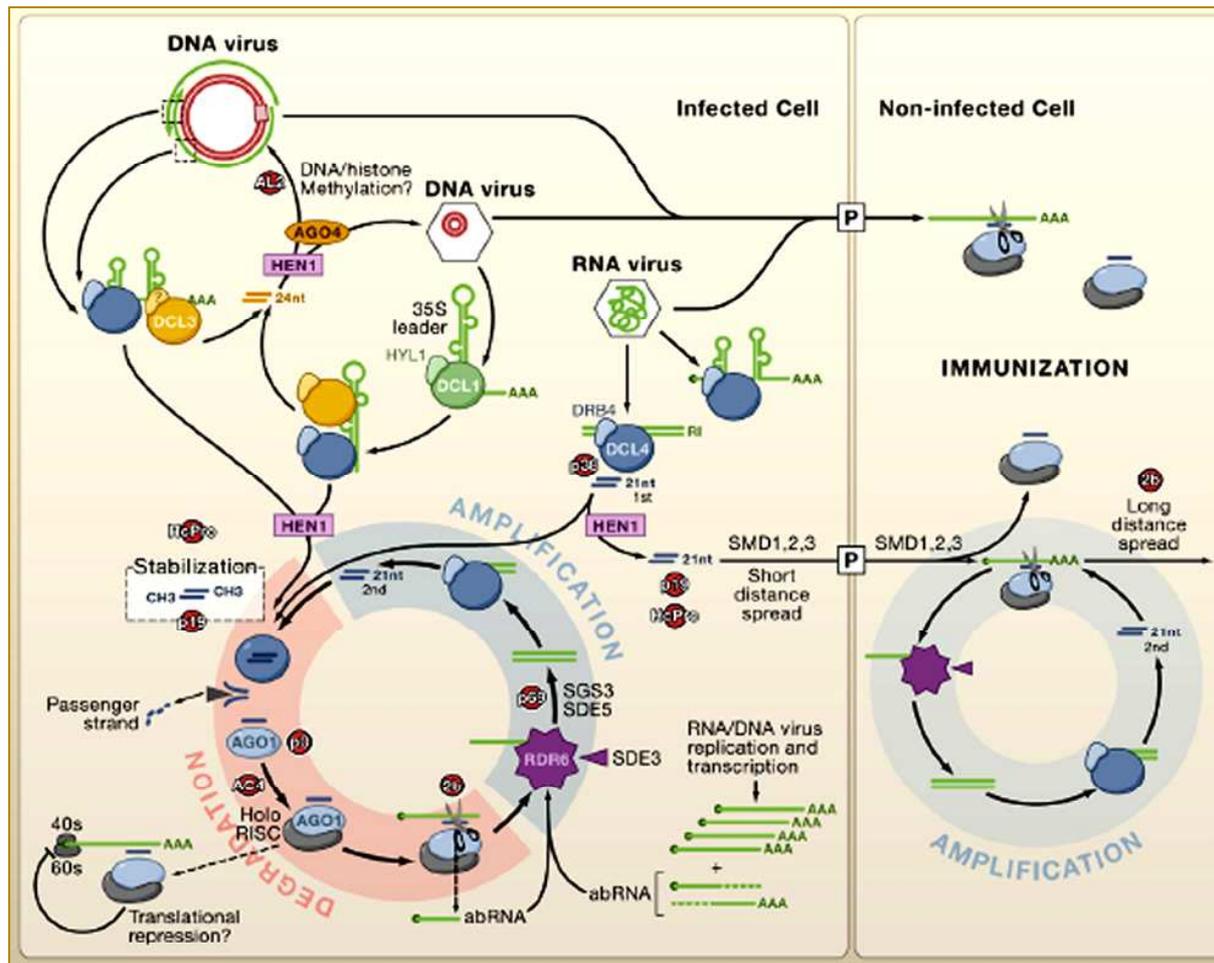


Figure 56 : schéma général du silencing antiviral chez *Arabidopsis* (Ding et Voinnet, 2007)

Ce schéma représente deux cellules adjacentes où des virus sont reconnus par la machinerie de silencing, tout d'abord dans une cellule infectée (gauche) puis lors du mouvement à courte distance vers une cellule adjacente (droite). Les différentes classes de phytovirus induisant le silencing sont présentés. Les ARNdb viraux sont clivés par DCL4 mais aussi par DCL1, DCL2 et DCL3 dans le cas des virus à ADN. Après leur méthylation par HEN1, les vsRNA sont incorporés dans le complexe RISC/AGO1 pour peut être induire une répression traductionnelle des messagers viraux, ou dans le plupart des cas, leur clivage conduisant à leur dégradation. Certains produits de clivage sont reconnus comme aberrants par RDR6 et convertis en ARNdb pour amplifier le signal. Les siRNA produits se déplacent dans la cellule adjacente via les facteurs SMD1, 2 et 3. Ils pourront alors cibler les transcrits viraux arrivant dans cette cellule également via les plasmodesmes, pour ainsi limiter la propagation du virus. La possibilité de la méthylation des génomes à ADN des phytovirus par les vsRNA de 24 nt figure également sur le schéma. Enfin, différents suppresseurs viraux (rouge) sont indiqués en face des composants du silencing avec lesquels ils interfèrent.

III.1 Les bases moléculaires du RNA silencing antiviral

III.1.1 Les sources d'ARNdb

La grande majorité des phytovirus est représentée par des virus ayant un génome à ARNsb de polarité positive. Lors de l'étape de réplication, l'ARN génomique (ARN (+)) est copié par l'ARN polymérase ARN-dépendante virale, produisant un brin complémentaire qui sert de matrice pour la synthèse d'ARN subgénomiques ou de nouvelles molécules d'ARN génomique (Figure 55A). Cette étape conduit à la formation d'un intermédiaire de réplication double brin, formé de l'ARN (+) associé à son brin complémentaire, l'ARN (-). Pendant longtemps cet intermédiaire a été considéré comme matrice privilégiée des protéines DCL antivirales. C'est aussi par cette hypothèse que le phénomène de VIGS (*Virus-Induced Gene Silencing*) fut rationalisé. Au cours du VIGS, un virus recombinant contenant un fragment de transcrite hôte cause le silencing de ce dernier au cours de l'infection.

Cependant, des données récentes montrent que d'ARNdb viral n'est pas *dicé* de manière homogène, mais qu'il existe des points chauds ciblés préférentiellement par les DCL, observés notamment chez les tombusvirus (Szittyá *et al.*, 2002). Ainsi, il est tout d'abord apparu que les vsRNA du CymRSV (*Cymbidium Ring Spot Virus*) et du TBSV (*Tomato Bushy Stunt Virus*) proviennent essentiellement de l'ARN (+), et en particulier de régions fortement structurées. Il fut par la suite démontré dans le cas du CymRSV, que les vsRNA dérivent de structures double brin formées par appariement intra-moléculaires, les ARN viraux étant sensibles à un traitement à la RNase A indiquant la présence de mis-appariements entre les ARN (+) et (-) relatifs (Molnar *et al.*, 2005). Cette origine asymétrique des vsRNA ne semble pas être l'apanage des tombusvirus puisque des observations identiques ont été faites pour des potyvirus et des carmovirus ainsi que pour des viroïdes (Molnar *et al.*, 2005 ; Ho *et al.*, 2006 ; Itaya *et al.*, 2007).

Les phytovirus à ADN, plus particulièrement les géminivirus et les pararétrovirus, se répliquent dans le noyau de la cellule hôte où leur génome à ADN est la sous forme de minichromosomes, transcrits par l'ARN polymérase II cellulaire. La réplication du génome à ADN simple brin des géminivirus se fait selon un mécanisme dit de *rolling circle*, alors que la réplication des pararétrovirus, et en particulier du CaMV, se fait par rétrotranscription de l'ARN pré-génomique. Ces deux types de virus ne génèrent donc pas d'ARNdb répliatif à l'inverse des virus à ARN. Néanmoins, ils sont la cible du RNA silencing. Dans le cas des géminivirus, la transcription du génome par l'ARN polymérase II se fait de façon bidirectionnelle, conduisant à la synthèse de deux transcrits chevauchants au niveau de leurs extrémités 3' à cause d'un arrêt tardif de la transcription (Figure 55B). Il est apparu que ces régions complémentaires réalisent des appariements inter-moléculaires reconnus par la machinerie de silencing, bien que les vsRNA proviennent également de

régions internes (pour revue, (Bisaro, 2006)). Dans le cas du CaMV qui est transcrit de manière asymétrique, la source de vsRNA provient essentiellement de régions fortement structurées présentes sur l'ARN 35S, notamment la région *leader* (Figure 55C) (Moissiard et Voinnet, 2006).

III.1.2 Les DCL impliqués dans le silencing antiviral

En dépit des redondances fonctionnelles observées entre les quatre DCL d'*Arabidopsis*, tous ne possèdent pas un rôle important dans la défense antivirale (Figure 56). Des études récentes ont montré que DCL4 est le dicer antiviral principal, conduisant à la dégradation des transcrits de virus à ARN ou ADN en vsRNA de 21 nt de long. Néanmoins, lors de l'infection d'un mutant déficient pour *DCL4* par différents virus à ARN (+) tels que TCV, CMV, ou TuMV (*Turnip Mosaic Virus*), des vsRNA de 22 nt de long sont produits par DCL2 (Bouche *et al.*, 2006 ; Deleris *et al.*, 2006 ; Fusaro *et al.*, 2006 ; Diaz-Pendon *et al.*, 2007). DCL2 est donc capable de se substituer à DCL4 en absence de ce dernier pour assurer le *dicing* des ARN viraux. Une démonstration génétique du rôle antiviral de DCL2 et DCL4 a été faite en employant un virus TCV dont l'ORF codant pour le suppresseur de silencing P38 est substitué par celui de la GFP (TCV-GFP). Ce virus fut inoculé sur des plantes d'*Arabidopsis* double mutant *dcl2dcl4* ou bien sur des plantes sauvages (WT, *wild-type*). Alors que TCV-GFP est incapable de se multiplier sur les plantes WT, on observe, par contre, une infection systémique en absence des deux DCL visible par la détection de la GFP sous lumière UV (Deleris *et al.*, 2006). Au niveau moléculaire et de manière plus générale, il a été établi que seul dans un mutant *dcl2dcl4*, les virus à ARN (+) ont une accumulation accrue coïncidant avec une diminution drastique des quantités de vsRNA produits (Bouche *et al.*, 2006 ; Deleris *et al.*, 2006 ; Fusaro *et al.*, 2006 ; Diaz-Pendon *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, seuls les virus TRV et CMV conduisent à la synthèse de vsRNA de 24nt produits par DCL3 (en plus des vsRNA de 21nt et 22nt produits par DCL4 et DCL2, respectivement) dans une plante d'*Arabidopsis* sauvage ou, dans un mutant *dcl2*, *dcl4* ou *dcl2dcl4* (dans le cas d'une infection par le virus TCV) (Deleris *et al.*, 2006 ; Diaz-Pendon *et al.*, 2007). Néanmoins, ces vsRNA de 24 nt ne sont pas impliqués dans la dégradation des transcrits viraux, ce qui est cohérent avec leur rôle dans le TGS. Enfin, DCL1 ne semble pas jouer de rôle majeur puisque l'infection d'un triple mutant *dcl2dcl3dcl4* est associée à une très faible production de vsRNA (Deleris *et al.*, 2006).

Dans le cas des virus à ADN, les quatre DCL d'*Arabidopsis* semblent jouer un rôle, comme cela a été démontré pour le CaLCuV (*Cabbage Leaf Curl Virus*), un géminivirus, et pour le CaMV. L'infection par ces virus génère principalement des vsRNA de 24 et de 21 nt, respectivement produits par DCL3 et DCL4 (Blevins *et al.*, 2006 ; Moissiard et Voinnet, 2006). Cependant, comme pour les virus à ARN, l'inactivation de DCL4 permet de détecter des vsRNA de 22 nt, témoignant de l'action

de DCL2. Ces deux virus ne voient leur accumulation accroître que, dans le triple mutant *dcl2dcl3dcl4*, indiquant que DCL3 joue un rôle dans le silencing antiviral dirigé contre les virus à ADN (Blevins *et al.*, 2006 ; Moissiard et Voinnet, 2006). La localisation nucléaire des génomes à ADN de ces virus suggère donc que DCL3 pourrait induire la méthylation des minichromosomes viraux et ainsi limiter leur transcription et les étapes subséquentes de la multiplication de ces virus. Enfin, l'absence de ces trois DCL n'est pas suffisante pour abolir totalement la production de vsRNA, une quantité résiduelle de vsRNA de 21 nt de long étant détectable, résultant de l'activité de DCL1 (Moissiard et Voinnet, 2006).

III.1.3 Le complexe RISC

L'existence d'un complexe RISC antiviral a été sujet à débat dans la mesure où l'activité de *dicing* peut, en principe, être considérée suffisante pour limiter la propagation des virus, et qu'il n'avait pas été clairement établi que les vsRNA pouvaient induire le clivage endonucléolytique d'ARN viraux.

Cependant, une étude réalisée dans différentes combinaisons de double-mutants *dcl* inoculé par le virus modifié TRV-PDS (*Tobacco Rattle Virus*, portant le gène endogène de la phytoène désaturase (PDS)) a montré que le VIGS n'est aboli que dans un mutant *dcl2dcl4* pour lequel l'infection conduit au développement de symptômes (Deleris *et al.*, 2006). Néanmoins, DCL3 est capable de générer des vsRNA de 24 nt de long aussi abondants que les vsRNA de 21 ou 22 nt observés dans les mutants *dcl2dcl3* et *dcl3dcl4* respectivement. Ainsi, cette expérience montre que les vsRNA produits par DCL3 ne sont pas impliqués dans la réaction de VIGS et, par conséquent, que le *dicing* n'est pas suffisant en soi : une activité de *slicing* via les vsRNA dépendants de DCL4 et DCL2 est requise (Deleris *et al.*, 2006).

Des études réalisées sur le CymRSV, un tombusvirus ayant un génome à ARN de polarité positive, ont montré que les vsRNA produits, au cours de l'infection, sont impliqués dans le clivage des ARN viraux et que ces produits de clivages portent les caractéristiques d'un clivage par RISC. De plus, les vsRNA du CymRSV co-fractionnent en gel-filtration avec la protéine AGO1, seule ou sous forme d'un complexe de haut poids moléculaire (Pantaleo *et al.*, 2007). Il a été également observé que les vsRNA générés lors d'une infection par le CMV sont aussi associés à AGO1 (Zhang *et al.*, 2006), suggérant que AGO1 est effectivement un slicer antiviral. Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par le fait que la protéine 2b, le suppresseur du CMV, inhibe l'activité de clivage d'AGO1 (Zhang *et al.*, 2006), et que des mutants *ago1* hypomorphes d'*Arabidopsis* sont hypersusceptibles à plusieurs virus (Morel *et al.*, 2002).

III.1.4 Amplification et mouvement du signal de silencing dans la défense contre les virus

Le phénomène de transitivity décrit précédemment, joue un rôle dans la défense antivirale, puisque si l'un des acteurs de cette voie est déficient (AGO1, RDR6, SGS3 ou SDE5), il en résulte une suraccumulation du CMV à un niveau comparable à celui observé au cours d'une infection d'un mutant *dcl4dcl2* (Bouche *et al.*, 2006 ; Deleris *et al.*, 2006 ; Ding et Voinnet, 2007). La production des siRNA primaires et secondaires, qui ont une taille de 21 nt, est dépendante de l'activité DCL4, mais peut être également réalisée par DCL2, qui peut suppléer une activité DCL4 défaillante comme cela a été décrit dans le cas de l'IR-PTGS (Moissiard *et al.*, 2007). L'existence de vsRNA secondaires n'a été établie que très récemment dans le cas d'une infection par le CMV (Diaz-Pendon *et al.*, 2007).

Ce phénomène, et plus généralement les activités RDR sont importantes dans la défense antivirale, plus particulièrement dans le mouvement à courte et à longue distance du silencing. Ce système joue un rôle dans l'immunité en limitant la propagation du virus en amont du front d'infection (pour revue, Voinnet 2005b). Ceci a tout d'abord été observé par le fait qu'un virus modifié PVX-RbcS qui est restreint au phloème, induit le silencing de la RubisCO (RbcS) endogène dans les cellules adjacentes au phloème où le virus est absent, suggérant que les virus sont capables de produire un signal de silencing mobile qui se déplace en amont du front d'infection (Voinnet *et al.*, 2000 ; Himber *et al.*, 2003). Par ailleurs, lorsque les virus TCV et le CymRSV sont dépourvus de leur suppresseur de silencing, ils se retrouvent restreints dans les tissus vasculaires, incapables de se propager dans les cellules adjacentes qui sont résistantes de façon séquence-spécifique à une infection secondaire. Cette restriction vasculaire est abrogée lors de l'infection d'un mutant *dcl4*, suggérant que les vsRNA de 21 nt générés par DCL4 permettent d'immuniser les cellules en amont du front d'infection (Deleris *et al.*, 2006 ; Havelda *et al.*, 2003). L'impact de RDR6 dans ce processus est dans l'amplification de la production de vsRNAs de 21nt, qui permet au signal de se propager toujours plus en amont des zones infectées à mesure que l'infection progresse.

De nombreux virus sont exclus des méristèmes apicaux, bien que ces tissus constituent paradoxalement des puits photosynthétiques majeurs pour lesquels les virus ont un fort tropisme. C'est le cas du PVX pour lequel il a été observé que son exclusion des tissus apicaux méristématiques est levée dans des plantes de *Nicotiana benthamiana* dont le gène *RDR6* est *silencé* par RNAi (Schwach *et al.*, 2005). Compte-tenu du rôle de RDR6 dans l'amplification du RNA silencing, il a été suggéré que le mouvement à longue distance du signal de silencing antiviral permettrait d'immuniser les tissus apicaux contre l'invasion par les virus, sauvant ainsi l'intégrité des cellules germinales.

III.1.5 Diversité des modes d'action des supresseurs du RNA silencing

Tous les virus de plante étudiés à ce jour, codent pour au moins un supresseur de RNA silencing, incluant les virus à ARN de polarité positive, négative, ambisens ou les géminivirus dont le génome est à ADN circulaire simple brin. Bien qu'ils soient tous des facteurs de pathogénicité, les protéines supresseurs divergent en séquence et en structure et se révèlent avoir des modes d'action très différents (Figure 56). Une conséquence inhérente à la suppression est la dérégulation des voies de silencing endogènes. Quelques exemples de contre-stratégies déployées par les virus sont évoqués, mais les modes d'action de la plupart des supresseurs restent à déterminer (pour revues, Ding et Voinnet, 2007 ; Li et Ding, 2006 ; Voinnet, 2005).

Un grand nombre de supresseurs ont une capacité à se lier à l'ARNdb bien que cette propriété ne soit pas exclusive. Ainsi, parmi ceux possédant cette particularité, on trouve les protéines 2b du CMV (Li et Ding, 2006), P21 du BYV (*Beet Yellow virus*) (Ye et Patel, 2005), P14 du PLV (*Pothos Latent Virus*) (Merai *et al.*, 2005), ou P19 des tombusvirus (Silhavy *et al.*, 2002). Hormis P19, ces supresseurs se lient à l'ARNdb sans aucune spécificité de taille. En revanche, P19 a une très grande affinité pour les duplex de siRNA de 21 nt de long, mais beaucoup moins pour ceux de 22 nt ou les longs ARNdb (Vargason *et al.*, 2003 ; Ye *et al.*, 2003). Une des conséquences de la fixation des ARNdb par les supresseurs est une diminution de l'accumulation des siRNA, en limitant leur production par les DCL. Une seconde stratégie est la séquestration des siRNA, illustrée par la protéine P19. Cette dernière fonctionne sous forme homodimérique et fixe *in vitro* et *in vivo* les siRNA de 21 nt, limitant ainsi leur incorporation dans le complexe RISC (Lakatos *et al.*, 2004 ; Silhavy *et al.*, 2002; Vargason *et al.*, 2003). Cette séquestration des siRNA de 21 nt pourrait aussi potentiellement éviter le mouvement du signal de silencing et ainsi favoriser la propagation du virus.

Certains supresseurs interviennent en compromettant l'assemblage ou l'activité endonucléolytique du complexe RISC. A la différence d'autres supresseurs, la protéine AC4 de certains géminivirus se lie à l'ARNsb *in vitro* et précisément aux siRNA ou miRNA monocaténares, suggérant qu'elle compromet la formation d'un complexe RISC compétent (Chellappan *et al.*, 2005). La protéine 2b du CMV n'empêche pas l'incorporation des siRNA, mais inhibe le clivage par AGO1 (Zhang *et al.*, 2006). Cette dernière est également la cible de la protéine P0 des polérovirus, qui grâce à un domaine F-box, pourrait induire la dégradation d'AGO1 par le protéasome (Bortolamiol *et al.*, 2007).

Les supresseurs P19, HcPro et P38 interfèrent également avec le processus de transitivité dépendant de RDR6 ; cette activité pourrait être une conséquence de leur capacité à séquestrer les siRNA pour le premier ou à limiter l'activité de DCL4 pour les deux autres (Moissiard *et al.*, 2007). Certains supresseurs peuvent également inhiber le silencing systémique, comme la protéine P25 du

PVX, qui comme cela a déjà été évoqué précédemment, lève l'exclusion du virus des méristèmes apicaux (Schwach *et al.*, 2005). La protéine 2b du CMV inhibe aussi le mouvement du silencing puisque son expression empêche la propagation du silencing d'un porte-greffe vers un greffon (Guo et Ding, 2002).

Les géminivirus constituent une classe particulière car ils codent jusqu'à trois suppresseurs, les protéines virales AC4 et AC2 et la protéine β C1 porté par un ADN satellite (pour revue, Bisaro, 2006). La protéine AC2 possède un domaine d'activation de la transcription nécessaire pour sa fonction de suppression qui lui permet de modifier l'expression d'une trentaine de gènes cellulaires dont un régulateur négatif du RNA silencing. Chez d'autres géminivirus, AC2 fonctionne en inactivant une adénosine kinase (ADK), qui catalyse la production d'AMP requis dans le cycle du méthyl. Ainsi AC2 pourrait intervenir en diminuant les voies générales de méthylation, ce qui suggère qu'elle éviterait par ce biais l'inactivation transcriptionnelle des génomes viraux par les produits de DCL3

III.2 CaMV et RNA silencing

Comme cela a été décrit précédemment, le CaMV est la cible du RNA silencing. Des vsRNA, majoritairement de 24 et 21 nt, sont produits au cours de l'infection chez deux hôtes du CaMV, le navet et *Arabidopsis* (Blevins *et al.*, 2006 ; Moissiard et Voinnet, 2006). La région *leader* de l'ARN 35S, qui rappelons-le forme une tige-boucle très stable, est la source primaire des vsRNA, mais ces derniers sont aussi produits dans une moindre mesure, par la région correspondant à l'extrémité 5' de l'ARN 19S (Moissiard et Voinnet, 2006). Des expériences réalisées dans différents fonds mutants *dcl* ont montré que, si les vsRNA sont principalement produits par DCL4 et DCL3, DCL2 peut également générer des vsRNA de 22 nt, et que seules des plantes *dcl2dcl3dcl4* présentent une hypersusceptibilité au CaMV qui voit son accumulation accrue en termes d'ARN génomique mais également de protéine (Blevins *et al.*, 2006 ; Moissiard et Voinnet, 2006). Néanmoins, la synthèse de vsRNA n'est pas abolie dans ce mutant, bien que les quantités de vsRNA soient infimes, reflétant l'activité suboptimale de DCL1. En revanche, l'infection de mutants *dcl1* montre une diminution drastique des vsRNA de 21nt et 24nt (Blevins *et al.*, 2006 ; Moissiard et Voinnet, 2006). Il a été suggéré que c'est l'action "Drosha" et non "dicer" de DCL1 qui serait importante dans ce cas, en excisant la structure en tige-boucle de la région *leader* de l'ARN 35S, facilitant ainsi son accès par DCL4 et DCL3. Enfin, l'accumulation des vsRNA n'est pas perturbée dans des mutants *rdr2* ou *rdr6* signifiant que la synthèse d'ARNdb par ces protéines n'est pas essentielle à la maintenance des vsRNA au cours de l'infection (Blevins *et al.*, 2006 ; Moissiard et Voinnet, 2006). Une particularité du CaMV (peut-être généralisable à d'autres virus) est que les vsRNA sont capables d'induire la dégradation de messagers cellulaires (voir Introduction Générale) (Moissiard et Voinnet, 2006). Cette observation cumulée au fait que la tige-

boucle du *leader* n'est pas uniquement conservée en structure mais aussi en séquence, suggère que le virus peut usurper le silencing et ainsi modifier le transcriptome de l'hôte à son avantage au cours de l'infection, comme cela est le cas de virus animaux codant pour leurs propres miRNA (pour revues, Pfeffer et Voinnet, 2006 ; Ding et Voinnet, 2007). En revanche, on ignore si les vsRNA générés sont utilisés pour induire la dégradation des transcrits viraux. Néanmoins, la réaction de *dicing* est à elle seule de nature à significativement limiter l'abondance de l'ARN 35S dans la cellule. Il est donc légitime de penser que le CaMV code pour un suppresseur du RNA silencing pour limiter la biogénèse des vsRNAs, et ainsi préserver un pool d'ARN 35S intègre nécessaire à la réplication virale.

IV. Caractéristiques de la suppression du RNA silencing par la protéine P6 du CaMV

La protéine P6 du CaMV qui à la particularité d'être un facteur de pathogénicité (voir Introduction Générale) est suspectée d'exercer la fonction de suppresseur depuis un certain temps (Voinnet, 2005). Nous avons donc entrepris, au cours de ma thèse, de tester cette hypothèse qui s'est avérée exacte. Nous avons cherché à déterminer comment P6 interfère avec la machinerie de silencing, dans quel compartiment cellulaire elle opère, ainsi que l'implication ou non de certaines propriétés de cette protéine virale. La suite de ce chapitre présente nos résultats sous la forme d'un manuscrit soumis au journal Plos.

Nuclear import of the *Cauliflower mosaic virus* P6 protein is mandatory for viral replication and for suppression of the RNA silencing component DRB4

Gabrielle Haas¹, Jacinthe Azevedo¹, Guillaume Moissiard¹, Angèle Geldreich¹, Christophe Himber¹, Marina Bureau^{1,3}, Toshi Fukuhara², Mario Keller^{1,*} and Olivier Voinnet^{1,*}

¹Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS UPR2353 -Université Louis Pasteur.
12, rue du Général Zimmer 67084 Strasbourg Cedex, France

²Lab. of Molecular & Cellular Biology. TokyoUniv.of Agriculture & Technology.
3-5-8 Saiwaicho,Fuchu,Tokyo183-8509, Japan.

³Present address: Institut für Genetik, Heinrich-Heine Universität von Düsseldorf
Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf Germany.

*To whom correspondence should be addressed:

olivier.voinnet@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

mario.keller@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

ABSTRACT

Replication of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), a plant dsDNA virus, requires the viral translational transactivator protein P6. Although P6 is known to form cytoplasmic aggregates (viroplasms) so far considered essential for virus biology, a small fraction of the protein also accumulates in the nucleus. Here, we report that monomeric P6 is imported into the nucleus via two importin- α -dependent nuclear localization signals, and show that this process is mandatory for CaMV infectivity in a manner that is independent of translational transactivation and viroplasm formation, the latter being completely dispensable for viral replication and movement. We show that one nuclear function of P6 is to suppress RNA silencing, a gene regulation mechanism with antiviral roles in plants and invertebrates that is commonly counteracted by dedicated viral suppressor proteins (VSRs). Transgenic P6 expression in *Arabidopsis* is genetically equivalent to inactivating the nuclear protein DRB4, known to facilitate the activity of the major plant antiviral silencing factor DCL4. We further show that a fraction of P6 immunoprecipitates with DRB4 in CaMV-infected cells. This study provides the first example of both genetic and physical interactions linking a VSR to a host RNA silencing component, and highlights the importance of subcellular compartmentalization in VSR function.

INTRODUCTION

In RNA silencing, double-stranded (ds) RNA or imperfect stem-loop RNA molecules are processed by homologs of the RNase-III enzyme Dicer into 21nt-24nt RNAs, called short interfering (si)RNAs and micro (mi)RNAs (Baulcombe 2004). *Arabidopsis thaliana* exhibits a broad spectrum of endogenous RNA silencing pathways that involve specialized Dicer-like (DCL) proteins producing specifically sized small RNAs: DCL1 catalyzes cleavage of fold-back precursors to release miRNAs that repress expression of cellular transcripts; DCL3 produces 24nt siRNAs guiding heterochromatin formation at DNA repeat and transposon loci, while DCL4 processes non-coding RNA precursors into 21nt trans-acting (ta)siRNAs controlling developmental timing and organ polarity (reviewed in Brodersen and Voinnet 2006). The specific size of DCL products is likely influenced by dsRNA binding proteins (DRB) that physically and specifically interact with Dicers in several organisms. Hence, *Arabidopsis* DRB1, also known as HYL1, facilitates DCL1-directed miRNA synthesis, whereas the nuclear protein DRB4 enhances DCL4-mediated processing of some tasiRNAs (Adenot et al. 2006; Nakazawa et al. 2007).

Besides its cellular regulatory purposes, one important function of RNA silencing in plants and invertebrates is to convey sequence-specific antiviral immunity through the action of virus-derived short interfering (vi)RNAs (reviewed in Ding and Voinnet 2007). Recent evidence obtained in *Arabidopsis* with several RNA viruses indicates that viRNAs accumulate in a Dicer-like 4 (DCL4) and Dicer-like 2 (DCL2) dependent manner. DCL4 is the primary Dicer of RNA viruses, and produces 21nt-long viRNAs. Production of viRNAs by DCL2 is hardly detectable when DCL4 is functional, but DCL2 rescues antiviral silencing if DCL4 is genetically inactivated or suppressed, producing diagnostic, 22-nt long viRNAs (Bouche et al. 2006; Deleris et al. 2006; Fusaro et al. 2006). Following their processing,

viRNAs are thought to guide endonucleolytic cleavage ('slicing') of viral genomes/transcripts upon incorporation into an RNA-induced Silencing Complex (RISC) that likely contains one member of the ARGONAUTE (AGO) protein family (Rivas et al. 2005). Evidence for a plant antiviral RISC was recently provided by analyses of *Tombus*- RNA virus infections in tobacco, showing that most viRNAs associate with a high molecular weight protein complex exhibiting *in vitro* nuclease activity (Omarov et al. 2007; Pantaleo et al. 2007). AGO1 is probably part of this complex, because *Arabidopsis ago1* mutants are supersusceptible to several RNA viruses and RNA virus-derived viRNAs immunoprecipitate with AGO1 (Zhang et al. 2006).

This model for antiviral silencing is supported by the fact that most plant RNA viruses produce proteins called viral silencing suppressors (VSRs) that target many steps involving DCL, RISC or small RNA activities (reviewed in Li and Ding 2006). For instance, the tombusviral P19 protein forms a caliper that prevents viRNA loading into the antiviral RISC (Vargason et al. 2003). Several additional VSRs exhibit affinity for siRNAs or long dsRNA *in vitro* and are thus suspected to act in a manner similar to P19, although this awaits *in vivo* validation in most cases (Merai et al. 2006). In fact, only in a few instances have clear-cut physical or genetic interactions been established between specific RNA virus-encoded VSRs and host RNA silencing components (reviewed in Ding and Voinnet 2007). Recently, the *Cucumber mosaic virus* (CMV) 2b protein was found to interact directly with *Arabidopsis* AGO1 and to inhibit its endonucleolytic cleavage activity (Zhang et al. 2006), supporting the role of AGO1 in antiviral silencing. Two recent studies have also established AGO1 as a direct target of the poliovirus F-Box-like protein P0 (Baumberger et al. 2007; Bortolamiol et al. 2007). The only two available examples of genetic interactions linking viral proteins and RNA silencing components have been established using VSR-deficient carmoviruses and cucumoviruses (Deleris et al. 2006; Diaz-Pendon et al. 2007).

RNA silencing pathways against DNA viruses were deciphered only very recently: geminiviruses and caulimoviruses are sensitive to the four Arabidopsis DCLs, with a prevalent role played by DCL4 and DCL3 (Blevins et al. 2006; Moissiard and Voinnet 2006). Nonetheless, hypersusceptibility to caulimoviruses was only observed in Arabidopsis *dcl4-dcl3-dcl2* triple mutants, unraveling a function for DCL2 (Moissiard and Voinnet 2006). The dsDNA genome of CaMV, type member of the *caulimoviridae* (super-group: pararetrovirus), is replicated by reverse RNA transcription, allowing RNA PolIII-dependent transcription of the 35S and 19S nuclear RNAs. The 35S RNA 5' end forms an extensive fold-back structure known as translational leader, ensuring ribosomal shunting required for expression of all CaMV ORFs (Ryabova and Hohn 2000). The leader is also a major source of CaMV-derived viRNAs, which accumulate as 24nt (DCL3-dependent) and 21nt (DCL4-dependent) species (Moissiard and Voinnet 2006).

Among the CaMV-encoded proteins, the ORF6 product, called P6, is a prime VSR candidate because it has been associated with symptom formation and host-range determination (Cecchini et al. 1997), frequent features of RNA virus-encoded VSRs. P6 is mandatory for translational transactivation of the 35S RNA, and is, therefore, vital for CaMV accumulation in single cells (Kobayashi et al. 1998). The most part of P6 aggregates into large, amorphous cytoplasmic bodies called viroplasms (Kobayashi et al. 1998; Haas et al. 2005), considered so far to be essential sites of virus assembly, replication, protein synthesis and, possibly, silencing suppression. Nonetheless, more recent studies indicate that a small fraction of P6 is also found in the nucleus of infected cells, but its mode of import and function(s) into this organelle have remained mysterious (Haas et al. 2005). Using a combination of cell biology, genetics and biochemistry, we address these questions and show that the small nuclear fraction of P6 is essential for CaMV infection, independently of its roles in translational transactivation or viroplasm formation. Our result indicate that nuclear

P6 acts as a VSR that genetically and physically interacts with DRB4, a nuclear protein that interacts with and facilitates the activity of the antiviral enzyme DCL4.

RESULTS

Two NLSs are cooperatively required for nuclear import of monomeric P6 molecules through the importin α pathway

Use of N-terminal green fluorescent protein fusions (GFP-P6, Fig.1) shows that P6 shuttles between the cytoplasm and the nucleus of bombarded BY-2 cells and forms nuclear speckles in authentic infection contexts (Haas et al. 2005). Nonetheless, most of GFP-P6 is normally found in cytoplasmic, perinuclear bodies structurally identical to the viroplasms found in CaMV-infected cells (Fig.1A, top panel, Haas et al., 2005). This prevalent cytoplasmic P6 distribution is contributed by the N-terminal domain (domain A, aa 1 to 111), which contains a nuclear export signal (NES) overlapping with residues required for P6-P6 intermolecular interactions and viroplasm formation (Haas et al. 2005). To address the mechanisms of P6 import and its possible role(s) in the nucleus, we used GFP-P6 Δ A, which localizes exclusively to the nucleus owing to a deletion of domain A (Fig. 1A, middle panel; Haas et al. 2005). The molecular mass of GFP-P6 Δ A (85 kDa) is incompatible with its passive diffusion across nuclear pores, suggesting that the region between aa 112 and 520 contains at least one nuclear localization signal (NLS) for P6 active import. Scanning the P6 primary sequence, we found that the **KYLPKKVKDAVKRFR** motif between aa 314 and 328 defines a bipartite basic NLS frequently found in plant proteins, and shares homologies with the NLS of human ribosomal protein L22 (Fig.1A, middle panel; Shu-Nu et al. 2000). Deleting this motif in GFP-P6 Δ A indeed caused cytoplasmic redistribution and partial loss of nuclear import of the resulting protein GFP-P6 Δ A Δ NLS (Fig.1A, lower panel).

The residual nuclear GFP signal in GFP-P6 Δ A Δ NLS-bombarded cells suggested that additional sequences are required for complete P6 import, as often observed for viral nuclear proteins. Further inspection of P6 identified three regions with homologies to known, non-

conventional NLSs of viruses. NLS-a (spanning aa 219 to 234) contains the GTKR-S motif recruited by importin α 1 for nuclear import of *Influenza A virus* NP protein (Wang et al. 1997). The second and third sequences (NLS-b and NLS-c, respectively) display similarities with the importin α -dependent NLS of *Borna disease virus* P10 protein (Fig.1B; Wolff et al. 2002). To test the contribution of NLS-a, -b and -c to P6 import, their individual deletions or combinations thereof were engineered into GFP-P6 Δ A, and subcellular distribution of the resulting proteins monitored in bombarded BY-2 cells (Fig.1B). Deletion of NLS-a alone caused a nucleo-cytoplasmic redistribution resembling that of GFP-P6 Δ A Δ NLS, except for the nucleolus (Fig.1B, panel 1). Nuclear import of GFP-P6 Δ A, remained, however, unaltered by NLS-b or NLS-c deletions (Fig. 1B, panels 2-3), although nucleolar localization was partially prevented. Neither the NLS-b nor the NLS-c deletion caused a change in the nucleo-cytoplasmic distribution of GFP-P6 Δ A Δ NLS (Fig. 1B, panels 5-6). By contrast, its nuclear localization was abolished by the NLS-a deletion (GFP-P6 Δ A Δ NLS Δ a; Fig. 1B, panel 4). Collectively, the results suggest that, among the three predicted non-conventional NLSs, only NLS-a cooperates with the bipartite NLS for GFP-P6 Δ A import. Additional experiments further indicated that P6 molecules are likely imported into the nucleus as monomers (Supp. Data 1).

To rule out that the large deletion in domain A artificially influenced localization of GFP-P6 Δ A and its derivatives, we used construct GFP-P6 $_{m1}$ in which functionality of the NES within domain A is strongly reduced, albeit not eliminated, by three point mutations in essential leucine residues (Haas et al. 2005); Fig. 1C). Consequently, GFP-P6 $_{m1}$ localizes to the cytoplasm and the nucleus. Deleting the bipartite NLS and NLS-a in GFP-P6 $_{m1}$ (leading to GFP-P6 $_{m1}$ Δ NLS Δ a) abolished nuclear localization, reinforcing the idea that both sequences are indeed necessary for P6 import. We then measured the ability of each sequence, or combination thereof, to promote nuclear import of the unrelated and strictly cytoplasmic

GFP-GUS fusion protein (120 kDa; Fig. 1D, top panel). Each sequence individually contributed to GFP-GUS import, but their effect was only partial and consistently stronger with NLS-a (Fig. 1D middle panels). By contrast, GFP was strictly nuclear when both sequences were introduced (Fig. 1D, lower panel), indicating that the bipartite NLS and the non-conventional NLS-a are sufficient to cooperatively mediate full nuclear import.

NLS-dependent nuclear import occurs either through importin α or importin β . To address this issue, we used GST-fusions of rice importin α 1 and β 1 immobilized onto glutathion-coupled sepharose (GST-Imp α and GST-Imp β , respectively). A P6 variant carrying an amino-terminal hexapeptide allowing its phosphorylation was expressed in *E.coli* and radiolabeled with ^{32}P - γ -ATP. Previous work showed that P6 is specifically labeled among the proteins produced in this recombinant *E.coli* strain (Leh et al. 2000). Labeled P6 was incubated with sepharose beads coupled to GST alone, GST-Imp α , or GST-Imp β , and protein complexes resolved on SDS-PAGE. As shown in Fig. 1E, the P6 signal (62 kDa) and a fainter signal corresponding to P6 homodimers (~120 kDa) were only detected in fractions incubated with GST-Imp α . Therefore, nuclear import of monomeric P6 by the bipartite NLS and the nonconventional NLS-a is likely through the importin α pathway.

The role of ribosomal protein interactions in P6 nuclear import and nucleolar retention

P6 interacts with ribosomal proteins L13 and L18 via a region of the miniTAV domain overlapping with a putative dsRNA binding domain (dsRNA, Fig. 1A; Bureau et al. 2004). N-terminal GFP fusions of L13 and L18 (GFP-L13 and GFP-L18, respectively) show an exclusive nucleolar localization in BY-2 cells (Fig. 2A and data not shown). Upon co-bombardment of GFP-L13 and RFP-P6 $\Delta\Delta$, both proteins co-localized into the nucleolus but RFP-P6 $\Delta\Delta$ was additionally found in the nucleoplasm (Fig. 2A, upper panel). Identical co-localization patterns were found between RFP-P6 $\Delta\Delta$ and GFP-L18 (data not shown). To test

if the L13 or L18 association is involved in P6 nuclear import, we constructed RFP-P6 Δ A Δ dsR, in which the putative dsRNA-binding domain lacks residues 132-191 required for L13/L18 interactions (Bureau et al. 2004). Upon co-bombardment of BY-2 cells, L13-GFP remained nucleolar, indicating that P6 Δ A does not alter normal distribution of ribosomal proteins. By contrast, the red signal from RFP-P6 Δ A Δ dsR had a nucleo-cytoplasmic distribution and was reduced, albeit not eliminated, in the nucleolus (Fig.2A, lower panel). We conclude that a small part of P6 nuclear import occurs through its interaction with L13, L18, and presumably other ribosomal proteins. However, this process causes P6 retention within the nucleolar, as opposed to nucleoplasmic compartment.

A nuclear function of P6 distinct from translational transactivation is essential for CaMV infectivity

A primordial function of P6 in CaMV biology is to transactivate translation of the polycistronic 35S RNA and its derivatives *via* the mini-TAV domain (Pooggin et al. 2000; Fig. 1A). To get insights into possible nuclear role(s) of P6 in this process, we created additional alleles of GFP-P6 Δ A carrying point mutations in conserved amino acids of the non-conventional NLS-a. Some, or all of the GTKRPS residues were replaced by valines or alanines in constructs GFP-P6 Δ AVVV and GFP-P6 Δ AVVVAV, respectively (Fig. 2B). Compared to the strict nuclear localization of GFP-P6 Δ A (Fig. 1A, middle panel), GFP-P6 Δ AVVV had a nucleo-cytoplasmic pattern, while nuclear import was nearly completely abolished with GFP-P6 Δ AVVVAV (Fig. 2B), resembling GFP-P6 Δ A Δ _{NLS} Δ a distribution (Fig. 1B, panel 4). We then re-inserted the N-terminal A domain into the above P6 alleles to test their ability to re-initiate translation of a bicistronic GUS reporter gene, using a transactivation assay in *N. plumbaginifolia* protoplasts (Pooggin et al. 2000). In this assay, a second, monocistronic reporter gene encoding the chloramphenicol-acetyl-transferase (CAT)

is used as an internal transfection and translation control. Transactivation values obtained with wild-type P6, arbitrarily set to 100%, served as reference for the activity of P6 variants. In two independent experiments, neither the P6 Δ NLS Δ a nor the P6VVVAV allele could transactivate GUS expression, whereas transactivation by P6VVV was 82% that of wild-type P6 (Fig. 2C).

To test the three P6 alleles in infection contexts, we engineered a DNA-based viral vector (pGH) allowing insertion of ORF VI variants (Fig. 2D, diagram). Arabidopsis plants inoculated with pGH:P6, carrying the wild type P6 allele, showed typical chlorotic and leaf curling symptoms. Moreover P4 (coat-protein) accumulation in systemically infected tissues was the same in pGH:P6- as it was in CaMV-infected plants, confirming full infectivity of the pGH:P6-derived virus (Fig. 2D). By contrast, plants inoculated with pGH carrying either of the three P6 mutant alleles remained symptomless, and P4 was undetectable in systemic tissues (Fig. 2D). This was notably the case for pGH:P6VVV, carrying a transactivation-proficient P6 allele (Fig.2D). Thus, partial loss of P6 nuclear localization caused by the GTK \rightarrow VVV substitution in NLS-a (Fig.2B) was sufficient to abolish CaMV infectivity without significantly altering transactivation.

Lack of infectivity was also observed with pGH:P6_{m1} (Fig. 2EF, right panel), carrying a triple mutation that compromises P6 nuclear export (Fig.1C). However, and unlike mutations affecting P6 nuclear import (Figs.1 and 2), m1 also alleviates viroplasm formation (Fig.1C). Viroplasms normally contain the vast majority of P6 molecules and have been so far considered essential for viral replication and particle morphogenesis or storage (Haas et al. 2002). Thus, to discriminate which impaired function (viroplasm formation or nuclear export) accounted for the lack of pGH:P6_{m1} infectivity, we used P6_{m3}, carrying the EKI \rightarrow AAA amino acid substitution in the NES motif of domain A (Fig.2E, left panel). GFP-P6 fusions carrying this mutation (GFP-P6_{m3}) display intact nuclear export but fail to form viroplasms in

BY-2 cells (Haas et al. 2005; Fig.2E). In contrast to pGH:P6_{m1}, pGH:P6_{m3} was fully infectious in Arabidopsis despite complete absence of detectable viroplasms in infected tissues (Fig.2E and accompanying manuscript by Haas *et al.*). Therefore, while viroplasms are totally dispensable for CaMV infection, P6 nuclear export is essential for this process. We conclude from the compared analysis of its import- and export-deficient alleles that nucleocytoplasmic shuttling of P6 is mandatory for infection, and that P6 exerts in the nucleus one or several essential functions distinct from its role in translational transactivation.

Nuclear import is required for RNA silencing suppression by transgenic P6

P6 is a major CaMV symptom determinant and has roles in host-range determination (Cecchini et al. 1997; Haas et al. 2002). These features are common among viral pathogenicity factors, many of which are viral suppressors of RNA silencing (VSRs; Li and Ding 2006). Because loss of VSR activity often results in reduced virus accumulation and systemic spread, we set out to determine if nuclear P6 indeed has VSR functions, potentially explaining the loss of infectivity of pGH variants expressing nuclear import-deficient P6 alleles (Fig.2D-E). Wild type P6 was cloned under the CaMV 35S promoter and transformed into the Arabidopsis AMPLICON (AMP) line, in which a transgene expressing GFP-tagged and replicating PVX RNA (PVX-GFP, Fig. 3A) is both an initiator and a target of RNA silencing (Dalmay et al. 2000a). In the AMP line (ecotype C24), PVX-GFP RNA levels are vastly reduced, and plants appear uniformly red under UV illumination, owing to chlorophyll fluorescence (Fig.3B, upper panel and lane 2). Viral-derived siRNAs remain undetectable (Fig.3E, lane 2).

A positive control for AMP silencing suppression was provided by the AMP-P38 line (Moissiard et al. 2007) in which green fluorescence, PVX-GFP and viral siRNA accumulation are all restored by expression of the P38 VSR of *Turnip crinkle virus* (TCV) (Fig.3B, middle

panel, lane 1). Independent T2 AMP-P6 lines were isolated and P6 expression confirmed by Western blot analysis. The results in Fig. 3A-B are representative of several independent P6 lines showing comparable expression levels; similar observations were made in progenies of individual P6 plants crossed to the AMP line (data not shown). In all cases, AMP-P6 plants had visual and molecular phenotypes resembling those of the AMP-P38 line (Fig.3B, lower panel; lane 3), indicating that transgenic P6 suppresses AMP silencing nearly to the same extent as transgenic P38.

To test if P6 nuclear import is required for silencing suppression, we transformed the AMP line with the P6 Δ a or P6 Δ NLS Δ a alleles, expected to be partially and completely excluded from the nucleus, respectively (Figs.1 and 2). Transgenic lines were selected to express similar levels of P6 and its variants (Fig.3D). Of note, only two lines expressing the P6 Δ NLS Δ a allele to significant levels could be obtained in multiple transformation attempts, suggesting some cellular toxicity. The silencing suppression phenotype of AMP-P6 Δ a lines was consistently less pronounced than in AMP-P6 lines: green fluorescence was less extensive in plant tissues (Fig.3C, middle panel compared to left panel) and AMP-derived siRNAs accumulated slightly less than in AMP-P6 plants (Fig.3D, lane 3 compared to lane 1). Accordingly, reactivation of PVX-GFP replication was less pronounced in AMP-P6 Δ a compared to AMP-P6 plants (Fig. 3E, lanes 1 and 3). The AMP-P6 Δ NLS Δ a lines remained completely red fluorescent (Fig.3C, right panel) while siRNAs and PVX-GFP replication products were below detection limit (Fig.3D, lane 4; Fig.3E, lane 4). We conclude that silencing suppression by transgenic P6 requires its nuclear import by the bipartite NLS and non-coventionnal NLS-a.

P6-mediated suppression of the tasiRNA pathway requires nuclear import, but none of the previously characterized features of the protein

Viral symptom expression, viroplasm formation and dsRNA binding through the mini-TAV domain are verified or suspected biochemical features of P6 that could all contribute to its VSR function (discussed in Voinnet and Ding, 2007). To address this issue, we established transgenic lines in WT Arabidopsis (ecotype Col-0) expressing either P6, P6 Δ dsR, P6 $_{m3}$, P6 Δ a, or P6 Δ NLS Δ a from the CaMV 35S promoter, and tested the effect of these various alleles on accumulation of endogenous small silencing RNA. These experiments were not carried out in the AMP background because high PVX-GFP replication caused by silencing suppression (Fig.3) results in accumulation of the PVX-encoded VSR protein P25, which can alter endogenous silencing pathways (Moissiard et al. 2007). All the plants expressing wild type P6 exhibited strong stunting, leaf serration, and a ‘silvering’ chlorotic phenotype resembling the symptoms elicited by CaMV (Fig.4A-B). These results agreed with previous work in the Laer ecotype (Cecchini et al. 1997) and with the phenotype of AMP-P6 lines (Fig. 3B and data not shown), confirming that P6 is a major CaMV symptom determinant. By contrast, none of the transgenic lines expressing the various P6 mutant alleles displayed these phenotypic defects (Fig.4D), despite accumulation of comparable protein levels (Fig. 4E, left panel).

We then measured accumulation of endogenous trans-acting (ta)siRNAs in the various transgenic lines. In tasiRNA biogenesis, the initial miRNA-guided cleavage of primary tasiRNA transcripts sets a defined point for RDR6-directed complementary strand synthesis, followed by a phased DCL4-dependent processing reaction that generates mature tasiRNAs (Allen et al. 2005; Yoshikawa et al. 2005). Accumulation of tasiRNA₂₅₅ from the *TASI* locus was decreased but still detectable in the P6 Δ a transgenic lines compared to non-transgenic plants (Fig.4E, left panel, lane 6). It was strongly reduced in the P6 lines, and abolished in the

P6 Δ dsR and P6_{m3} lines (Fig.4E, left panel, lanes 1, 2 and 4). These results could not be ascribed to altered accumulation of miR173, which is required for tasiRNA255 biogenesis: its levels were either unaffected in P6 Δ dsR and P6 Δ a lines, or enhanced by approximately 2.5 folds in P6 and P6_{m3} lines (Fig.4E, left panel, lanes 1, 2, 4 and 6). None of the above P6 alleles caused significant changes in the levels of miR156, unrelated to tasiRNA biogenesis (Fig.4E, left panel, lanes 1, 2, 4 and 6). miR173 and miR156 levels were also unaltered in transgenic lines expressing the P6 Δ NLS Δ a allele, which is completely excluded from the nucleus (Fig.1C). However, unlike all the other P6 alleles, P6 Δ NLS Δ a had no effect on tasiRNA255 accumulation (Fig.4E right panel, lane 5).

Therefore, transgenic P6 suppresses tasiRNA, but not miRNA accumulation. This mimics the effects of authentic CaMV infections because CaMV-infected and P6 transgenic Arabidopsis had similar molecular phenotypes (Fig.4E, right panel). However, symptom formation, dsRNA binding, and viroplasm formation are all dispensable for suppression. Moreover, because the P6 Δ dsR deletion disrupts the mini-TAV domain, neither its transactivation property nor its interaction with L13/L18 is required by P6 to suppress the tasiRNA pathway. By contrast, nuclear import is essential for this process, agreeing with the AMP results (Fig. 3). We conclude that P6 VSR function entails an interaction with a nuclear factor specifically required for siRNA-, but not miRNA- biogenesis or accumulation.

The nuclear protein DRB4 is a genetic and physical target of nuclear P6

Based on our current knowledge of Arabidopsis post-transcriptional siRNA pathways and on the results of Figs. 3-4, known possible nuclear targets of P6 include the DCL4 RNase-III and the dsRNA binding protein DRB4: both localize to, and interact together within the nucleus (Nakazawa et al. 2007), and both are required downstream of RDR6 for tasiRNA synthesis. Of the two possibilities, an effect of P6 on DCL4 was unlikely, as genetic lesions or VSRs

that compromise DCL4 activity generally cause a diagnostic 21nt→22nt shift in tasiRNA size (Adenot et al. 2006; Deleris et al. 2006; Moissiard et al. 2007), not observed in any of our P6 transgenic lines. By contrast, mutations in *DRB4* decrease the levels of some tasiRNAs, including tasiRNA255, without size shifting (Adenot et al. 2006). We could not formally rule out an effect of P6 on RDR6, which also localizes into the nucleus (Luo and Chen 2007), although the extensive suppression phenotype in AMP-P6 lines made this possibility unlikely, as green fluorescence in AMP lines is only modestly re-activated by the *rdr6* mutation (Moissiard et al. 2007).

To get insights into the nature of the nuclear silencing factor(s) targeted by P6, we used the SUC-*SUL* (SS) reporter line, in which phloem-specific expression of an inverted-repeat transgene triggers non-cell-autonomous RNAi of endogenous *SULPHUR* (*SUL*) transcripts, causing a vein-centred chlorotic phenotype (Fig. 1A; Dunoyer et al. 2007). We showed that *SUL* silencing is RDR6-independent (Himber et al. 2003) and that, of the 21nt (DCL4-dependent) and 24nt (DCL3-dependent) *SUL* siRNA species accumulating in the SS reference line, only the former is required for RNAi in a strict AGO1-dependent manner (Dunoyer et al. 2007). Nonetheless, introduction of specific RNA silencing mutations in the SS system unravelled the existence of redundant pathways that can compensate for reduced DCL4 activities. Notably, null mutations in *DRB4* reduce the levels of 21nt *SUL* siRNAs, but simultaneously dramatically elevate those of DCL3-dependent 24nt *SUL* siRNAs. We showed that these abnormally high levels of DCL3 products fully rescue the *SUL* silencing phenotype upon recruitment of AGO1 (Dunoyer et al. 2007; Fig.5A, upper panel, Fig.5B, lane 4).

The transgenic plants described in Fig.4 were crossed to the SS reference line (Col-0 ecotype). *SUL* silencing and siRNA accumulation were then assayed in progenies, in which P6

or its variants accumulated to comparable levels (Fig.5B). Note that we repeatedly failed to produce viable plants out of many SS-P6 Δ _{NLS} Δ **a** crosses, or by direct transformation of the SS line. As in the AMP system, exclusive accumulation of P6 Δ _{NLS} Δ **a** into the cytoplasm likely caused cellular toxicity, probably exacerbated by the chlorosis developing in the SS background. The previously described SS-*dcl4* and SS-*drb4* plants, carrying null mutations in *DCL4* and *DRB4* respectively (Dunoyer et al. 2007), were used as references (Fig.5A, upper panel). SS-P6**dsR** plants had a phenotype resembling that of SS or SS-*drb4* plants. SS-P6 plants also displayed unaltered *SUL* silencing superimposed onto the silvery chlorosis caused by wild type P6 (Fig.5A, lower panel). SS plants expressing the P6_{m3} allele also showed the vein-chlorotic phenotype, but it was somewhat less pronounced than in SS-P6 and SS-P6**dsR**, owing, presumably, to slightly lower expression (Fig.5A, lower panel; Fig.5B, lane 7). By contrast, the extent of *SUL* silencing was significantly reduced in the SS-P6 Δ **a** crosses (Fig.5A, lower panel) but it was still visible compared to the complete lack of RNAi in SS-*dcl4* plants (Fig.5A, upper panel).

All P6 alleles, except P6 Δ **a**, had a molecular phenotype resembling strikingly that of the *drb4* mutation: there were reduced levels of DCL4-dependent 21nt siRNAs, whereas those of DCL3-dependent 24nt siRNAs were dramatically enhanced (Fig.5B). The latter effect was particularly pronounced with the P6 Δ **dsR** allele (Fig.5B, lane 8). SS-P6 Δ **a** plants also had reduced 21nt siRNAs levels but accumulated normal levels of 24nt siRNAs (Fig.5A), resembling the effect of weak *dcl4* alleles (Dunoyer et al., 2007). As reported previously, there was a complete lack of 21nt siRNAs and unaltered 24nt siRNA levels in the *dcl4* null background (Dunoyer et al., 2007). These results agree with those in Fig.4, and indicate that expression of P6 alleles with unaltered nuclear import properties, on the one hand, and null mutations in *DRB4*, on the other, are genetically equivalent. Accordingly, the molecular and visual phenotypes of SS-P6 Δ **a** plants, expressing a P6 allele that is incompletely imported

into the nucleus, likely results from a weaker interaction with DRB4 preventing overaccumulation of 24nt siRNAs and rescue of compromised DCL4 activity.

We previously showed that the vast majority of 21nt and 24nt siRNAs accumulating during CaMV infection result from the action of DCL4 and DCL3, respectively, using the highly structured 35S RNA leader as a template (Fig. 5C, lane 2; Moissiard and Voinnet 2006). Transposed into infection contexts, the results in the SS system (Fig.5B) thus predicted that the 35S leader should be accessed by DRB4. To test this idea, viral RNA and siRNA levels were measured in CaMV-infected *drb4* mutants of Arabidopsis. *dcl2 dcl4* mutant plants were also infected in parallel, because this specific combination of *dcl* lesions promotes the exclusive accumulation of CaMV-derived 24nt siRNAs, which are predominantly affected by the *drb4* mutation in RNAi (Fig.5B). The effects of the *drb4* mutation on accumulation of leader-derived siRNAs were strikingly similar to its effects on *SUL* siRNAs: the levels of the 21nt species were reduced and those of the 24nt species strongly enhanced (Fig.5C). Viral RNA levels were also slightly reduced (Fig.5C), presumably because 24nt siRNAs were shown to impact CaMV accumulation negatively (Moissiard and Voinnet 2006). We conclude that the nuclear DRB4 protein is a genetic target of nuclear P6.

To test if P6 expression alters DRB4 accumulation, we employed a DRB4 antibody previously used in immunoprecipitation experiments (Nakazawa et al. 2007). First, we verified that the antibody could be used in Western blot analyses of Arabidopsis protein extracts. As shown in Fig.5D, a signal consistent with the predicted molecular mass of DRB4 (approx. 43 kDa) was detected in wild type, but not in *drb4* mutant plants. We then carried out similar experiments with protein extracts isolated from P6 transgenic Arabidopsis (Fig.4B) or CaMV-infected plants. In both cases, neither the accumulation nor the electrophoretic mobility of DRB4 was compromised by P6 (Fig.5E, lanes 4-5). The same result was obtained in *dcl4* mutants, used as controls (Fig.5E, lane 1). The integrity of DRB4

being not apparently altered by P6, we then assayed for possible interactions between the two proteins in authentic infection contexts. The DRB4 antibody was used to immunoprecipitate total proteins extracted from either mock-inoculated or CaMV-infected *Arabidopsis* (Fig. 5F, lanes 1 and 3). Immunoprecipitates were then assayed for the presence of P6 and DRB4 in Western blot analyses (Fig. 5F, upper and lower panels, respectively). We found that a fraction of P6 does indeed co-immunoprecipitate with DRB4 in CaMV-infected plants (Fig. 5F, lane 4). Presumably, this fraction corresponds to nuclear P6, which accounts for only a small proportion of the protein in infected cells (Haas et al. 2005). As expected, the DRB4 immunoprecipitates were devoid of P6 in mock-inoculated plants (Fig. 5F, lane 2), and P6 could not be immunoprecipitated from CaMV-infected plants with the *drb4* null mutation (data not shown). We conclude that P6 and DRB4 interact together, either directly or indirectly, in authentic infection contexts. Therefore, DRB4 is not only a genetic, but also a physical target of P6.

DISCUSSION

RNA silencing suppression is a widespread strategy of plant and invertebrate RNA viruses (Ding and Voinnet 2007). However, scant information is available as to how viruses with DNA genomes accommodate this host defense reaction. More generally, the mode of action and molecular targets of VSRs from plant and animal viruses remain largely unknown. The present study contributes to address both issues by uncovering a previously unappreciated nuclear function of the CaMV-encoded P6 protein. This function, while independent of the established role of P6 in translational transactivation, is essential for virus infectivity. We show that at least one nuclear activity of P6 is to suppress RNA silencing through inhibition of DRB4, required for optimal dicing of CaMV-derived dsRNA molecules by DCL4.

Monomeric P6 is imported into the nucleus via the cooperative action of two NLSs

that likely recruit importin α . Nuclear import is facilitated by P6 interaction with ribosomal proteins L13 and L18, but this particular association results in nucleolar retention of the protein and is completely dispensable for P6 VSR function. We propose, therefore, that P6-mediated silencing suppression occurs predominantly in the nucleoplasm. This agrees with the fact that silencing suppression by the P6 Δ dsR allele was consistently stronger than with wild type P6 (Fig. 4E and 5B). Presumably, loss of interaction with ribosomal protein L13/L18 reduces P6 Δ dsR access to the nucleolus and, thus, increases its availability in the nucleoplasm for enhanced VSR activity. The viroplasm-deficient P6_{m3} allele also displays an enhanced silencing phenotype, at least in terms of tasiRNA accumulation (Fig.4E). The finding that viroplasm is dispensable not only for silencing suppression, but also for CaMV infectivity in whole plants, thus raises the possibility that P6 aggregation in amorphous cytoplasmic bodies might, in fact, restrain nuclear silencing suppression. We consistently experienced difficulties in generating plants expressing high levels of strictly cytoplasmic P6 (i.e. P6 Δ NLS Δ a), suggesting that its full cytoplasmic retention is toxic. Conversely, all attempts to generate transgenic plants expressing the strictly nuclear P6_{m1} allele (Fig. 1C) were unsuccessful (data not shown). Taking also into account the data in Fig. 2D-E, these results suggest that constant shuttling of P6 between the nucleus and the cytoplasm is a prerequisite to successful virus infection. This nucleo-cytoplasmic shuttling might represent an original viral strategy to modulate P6 VSR activity and, consequently, to preserve host cell integrity. Nonetheless, silencing suppression is only one of several possible nuclear functions of P6. Additional functions include splicing or export of viral transcripts, as well as recruitment of host factors required for virus transcription and translation.

Among the several biochemical properties of P6 tested in this study, nuclear import appears to be solely required for its transgenic VSR function. Notably, silencing suppression and symptom expression could be readily uncoupled, illustrating that this feature alone cannot

be reliably used in VSR identification. Similar observations were made with natural variants of the 2b protein from related cucumoviruses: these variants elicited symptoms of drastically different severity when expressed from recombinant PVX, yet they suppressed silencing to the same extent (Li et al. 1999). Incidentally, 2b nuclear import was also found mandatory for VSR function (Lucy et al. 2000), a feature somewhat difficult to reconcile with the recent demonstration that 2b inhibits AGO1-mediated slicing (Zhang et al. 2006), which is expected to occur in the cytoplasm where cucumoviral transcripts accumulate. Most likely, 2b and other VSRs have multiple targets in host cells, and the results presented here with P6 provide an example as to how inhibiting RNA silencing factors in the nucleus might contribute to the effects of some VSRs, including 2b.

So far, clear-cut genetic interactions between VSRs and host silencing components have been only established in the case of the TCV P38 and the CMV 2b proteins (Deleris et al. 2006; Diaz-Pendon et al. 2007). These experiments, which entail the rescue of VSR-deficient viruses in plants carrying specific lesions in RNA silencing components, are often challenging because many VSR proteins have additional functions that are essential for virus replication or movement (Ding and Voinnet 2007). This caveat obviously applies to the P6 protein, which is indispensable for translational transactivation of the CaMV 35S RNA, required for replication (Pooggin et al. 2000). Nonetheless, the present study illustrates an alternative approach taking advantage of the highly sensitive and discriminative SUC-*SUL* RNAi reporter system. The SS line has been already successfully used to decipher the impact of many RNA silencing mutations, including *drb4*, whose effects on RNAi had not been appreciated using other available silencing systems (Dunoyer et al. 2007). Similarly, the diagnostic gain in 24nt-long *SUL* siRNAs and rescue of vein-centered chlorosis in SS-P6 lines allow us to conclude confidently that constitutive expression of P6 is molecularly equivalent to the genetic inactivation of *DRB4*, but not of *DCL4*, although additional interactions with

other nuclear silencing components cannot yet be excluded. Importantly, the sensitivity of leader-derived siRNAs to the *drb4* mutation (Fig. 5C) indicates that DRB4 interacts with dsRNA produced during CaMV infection. This provides a molecular explanation as to why CaMV-derived siRNAs are in their majority 24nt in size in wild type infected plants (Fig. 5C; Blevins et al. 2006; Moissiard and Voinnet 2006), as this probably reflects inhibition of DRB4 by P6.

Neither the accumulation nor the electrophoretic mobility of DRB4 is modified by P6. However, a fraction of P6 -presumably nuclear- co-immunoprecipitates with DRB4 *in vivo*, indicating that the P6-DRB4 interaction is not only genetic, but also physical. Although a direct interaction between the two proteins remains to be formally established, it is possible that its association to P6 promotes the constant nucleo-cytoplasmic shuttling of DRB4, thereby compromising its nuclear RNA silencing function. Alternatively, P6-DRB4 nuclear interaction might induce conformational changes or post-translational protein modifications that prevent DRB4 function. Targeting of DRB4 by P6 may seem at odd considering that this protein only plays an accessory role in viral siRNA biogenesis by DCL4. DCL4 is the major antiviral Dicer of Arabidopsis and is thus expected to be a preferred target of VSRs, as shown with TCV P38, for instance (Deleris et al. 2006). However, we have shown that several DCL4-dependent siRNAs derived from the CaMV 35S leader exhibit near-complete complementarity to dozens of host transcript that are likely degraded during infection, possibly to the virus benefit (Moissiard and Voinnet, 2006). Decreasing rather than eliminating DCL4 activity through DRB4 inhibition may therefore constitute a compromise whereby 21nt siRNA levels are sufficiently reduced to prevent antiviral defense, but high enough to target host gene expression. Alternatively, targeting of DRB4 by P6 could allow for high accumulation of 24nt siRNAs that may be required for heterochromatin formation and transcriptional silencing of CaMV minichromosomes (Al-Kaff et al. 1998), potentially

preventing virus over-accumulation and preserving host cell integrity.

MATERIAL AND METHODS

pGH construction and PCR-directed mutagenesis

Plasmid pMD324 (M. Delseny, Perpignan University, France) was PCR-amplified with Taq *Isis* polymerase (Q.BIOgene) using oligonucleotides bearing *KpnI* or *SacI* sites. The mixture was incubated with *DpnI* for 2h at 37°C. Upon 5'-end phosphorylation by T4 polynucleotide kinase, PCR products were ligated. Correct insertion of restriction sites was verified by sequencing the resulting plasmid, pGH. Wild type ORF VI and mutated versions thereof were amplified by PCR using primers bearing 5' *KpnI* and *SacI* sites, respectively. DNA fragments were digested and cloned into pGH. Point mutations and small deletions in ORF VI were introduced either in the pCK-EGFP-P6 vector (Haas et al. 2005) for localization studies, or in the pETK-ORFVI vector (Leh et al. 2000) for protein expression in *E. coli*.

Biolistic experiment and fluorescence Analysis.

eGFP fusions of P6 and its variants were transiently expressed in BY-2 tobacco suspension cells (*Nicotiana tabacum* cv Bright Yellow 2). Cells were subcultured weekly and harvested 3 days after medium renewal for biolistic transfection. Particle preparation and bombardment were performed as in Haas et al., (2005). After bombardment, cells were transferred to 0.8% agar MS media plates, incubated in the dark at 28°C and collected under HBO binoculars for confocal microscopy (Zeiss LSM510). EGFP and RFP imaging was by excitation at 488 nm and 568 nm with argon and HeNe lasers, respectively.

Translational transactivation in *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts

pmonoCAT and pbiGUS were described by Bonneville et al. 1989. PCR products corresponding to P6 or its derivatives were mobilized under the CaMV 35S RNA promoter of pTAV (p35S-P6; Kobayashi et al. 1998). Leaf protoplasts derived from *N. plumbaginifolia* were prepared and protein extracts analysed as described (Pooggin et al. 2000).

Protein extraction and Western blot analyses

Briefly, protein extracts were prepared from inflorescences ground in liquid nitrogen, according to Hurkman and Tanaka 1986. Protein concentrations were determined by using the BioRad RCDC protein assay and BSA as standard. After SDS-PAGE separation and transfer to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore) proteins were stained by Ponceau S or Coomassie blue and analysed for antibody reaction using the Lumi-light plus ECL western blotting substrate from Roche. CaMV P6 and P4 proteins were detected using polyclonal antisera at 1:15,000 dilution. DRB4 was detected using a previously described polyclonal antibody (Nakazawa et al. 2007) at 1:10,000 dilution.

Immunoprecipitation

Inflorescences were ground in liquid nitrogen, and proteins were extracted in 3 ml/g fresh material of extraction buffer EB [50 mM Tris•HCl, pH 7.5/150 mM NaCl/5 mM MgCl₂/Glycerol 10%/complete inhibitors protease cocktail (Roche)/MG132 10 μM (Sigma)]. Insoluble material was separated by centrifugation (30 min, 12,000 g, 4°C) and lysate pre-cleaned by incubation with proteinA-agarose beads (Roche) at 4°C for 30 min. The

supernatant was then incubated with anti-DRB4 serum (1/500 dilution) over-night at 4°C. After subsequent incubation with 25 µL of proteinA-agarose beads, immunoprecipitates were washed three times with EB, and eluted from beads with SDS loading buffer.

RNA preparation and hybridization

Total leaf RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen), precipitated with isopropanol, and redissolved in 50% formamide. Northern blot analyses of low- and high-molecular-weight RNA were performed with 10 and 5 µg of total RNA, respectively, as described by Deleris et al., (2006). Radiolabeled probes for detection of the full-length CaMV or SUL RNAs were made by random priming reactions (Promega, Madison, WI) in the presence of [α -³²P]dCTP. The template used was a 400-bp (SUL) PCR product amplified from *A. thaliana* cDNA. DNA oligonucleotides complementary to miRNAs or trans-acting siRNAs were end-labelled with [γ -³²P]ATP using T4 PNK.

Expression and phosphorylation of recombinant proteins

GST, GST-importin alpha, GST-importin beta and P6 were expressed in *E. coli* BL21/DE3 (Novagen). GST and GST-importin were expressed in *E. coli* BL21/DE3(pLys S) from pGEX-2TK, and P6 from pETKaks (Leh et al. 2000). Expression of heterologous proteins was induced at exponential phase with 1 mM IPTG for 3 h. Bacteria were collected by centrifugation at 4000 g for 10 min, resuspended in HMK buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 12 mM MgCl₂), and lysed by sonication (two pulses for 20 s at 50 W). After centrifugation (12,000 g, 10 min), the supernatant was frozen at -20°C. Protein aliquots were separated by SDS-PAGE and protein expression controlled by Coomassie blue staining for GST and GST-importins, and by Western blot for P6. P6 was end-labelled with [γ -³²P]ATP [3000 Ci mmol⁻¹; 10 mCi ml⁻¹ (370 MBq)] and 20 U bovine heart muscle protein kinase for

1h at room temperature (Sigma). Non-incorporated radioactive ATP was eliminated by Sephadex G-50 filtration through (Amersham Pharmacia Biotech). The eluate (300 µl) was treated for 30 min with a mixture of RNase A (40 µg) and DNase (100 U) at 37 °C. Degradation of nucleic acids was verified by fractionation of an aliquot (20 µl) on 1,5 % agarose and ethidium bromide staining.

In vitro GST pull-down

Approximately 1 µg GST or GST-importin fusion proteins (Leh et al. 2000) was mixed with 50 µl glutathione–Sepharose 4B beads, previously washed and resuspended in PBS buffer, and incubated in PBS containing 1 % Tween 20 for 1h at 4 °C with gentle shaking. After three washes, beads were mixed with 30 µl bacterial protein containing 32P-labelled P6. The mixture was adjusted to a final volume of 500 µl and incubated for 3 h at 4 °C with gentle shaking. Beads were then washed three times and resuspended in 20 µl dissociation buffer, boiled for 5 min, and pelleted at 10 000 g for 2 min. The supernatant was immediately subjected to SDS-PAGE and 32P-labelled P6 detected by autoradiography.

Transgenic plants

Arabidopsis AMP and SUC-*SUL* (SS) lines were described previously (Dalmay et al. 2000a; Dunoyer et al. 2007). The P6 ORF and derivatives were cloned into the pBin61 binary vector, mobilized into *Agrobacterium* strain GV3101 and transformed into WT Arabidopsis (ecotype Col-0) or AMP line using the floral dip method (Bechtold and Pelletier 1998). Upon Kanamycin selection of primary transformants, stable T2 lines were established from representative individuals showing comparable expression levels of P6 or its derivatives. Single and combination silencing mutants, and *SS-dcl4* and *SS-drb4* were as described previously (Dunoyer et al. 2007). Plants were germinated under selective media in standard

growth chamber conditions for 3 wk and subsequently transferred into soil under short-days conditions before analyses.

Viruses and infection Assays.

Infections of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Col-0) and turnip (*Brassica rapa*, Just Right) were carried out with *Sal* I-linearized pMD324 or pGH-derived plasmids. Turnip (\approx 3 weeks old) and *Arabidopsis* (rosette leaves, \approx 4–5 weeks old) plants were inoculated with 10 μ g of viral DNA diluted in 20 μ l of sterile water per plant, or with a sap extract from CaMV-infected turnip. Infected leaves were harvested, ground in liquid nitrogen, and stored at -80°C .

REFERENCES

- Adenot, X., Elmayan, T., Laussergues, D., Boutet, S., Bouche, N., Gascioli, V., and Vaucheret, H. 2006. DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr Biol* 16: 927-932.
- Al-Kaff, N.S., Covey, S.N., Kreike, M.M., Page, A.M., Pinder, R., and Dale, P.J. 1998. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 279: 2113-2115.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
- Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E., and Baulcombe, D.C. 2007. The Pterovirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Current Biology* 17: 1609-1614.
- Bechtold, N. and Pelletier, G. 1998. In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* 82: 259-266.
- Blevins, T., *et al.* 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res* 34: 6233-6246.
- Bonneville, J.M., Sanfaçon, H., Futterer, J., and Hohn, T. 1989. Posttranscriptional trans-activation in cauliflower mosaic virus. *Cell* 59: 1135-1143.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., and Ziegler-Graff, V. 2007. The pterovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA silencing. *Current Biology* 17: 1615-1621.
- Bouche, N., Laussergues, D., Gascioli, V., and Vaucheret, H. 2006. An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *Embo J* 25: 3347-3356.
- Brodersen, P. and Voinnet, O. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22: 268-280.
- Bureau, M., Leh, V., Haas, M., Geldreich, A., Ryabova, L., Yot, P., and Keller, M. 2004. P6 protein of Cauliflower mosaic virus, a translation reinitiator, interacts with ribosomal protein L13 from Arabidopsis thaliana. *J Gen Virol* 85: 3765-3775.
- Cecchini, E., Gong, Z., Geri, C., Covey, S.N., and Milner, J.J. 1997. Transgenic Arabidopsis lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotypes and accumulate inclusion bodies. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 1094-1101.
- Dalmay, T., Hamilton, A.J., Mueller, E., and Baulcombe, D.C. 2000a. Potato Virus X amplicons in Arabidopsis mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell* 12: 369-379.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., and Voinnet, O. 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313(5783): 68-71.
- Diaz-Pendon, J.A., Li, F., Li, W.X., and Ding, S.W. 2007. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19: 2053-2063.
- Ding, S.W. and Voinnet, O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130: 413-426.

- Dunoyer, P., Himber, C., Ruiz-Ferrer, V., Alioua, A., and Voinnet, O. 2007. Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nat Genet* 39: 848-856.
- Fusaro, A.F., *et al.* 2006. RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep* 7: 1168-1175.
- Haas, M., Bureau, M., Geldreich, A., Yot, P., and Keller, M. 2002. Cauliflower mosaic virus: still in the news. *Mol Plant Pathol* 3(6): 419-429.
- Haas, M., Geldreich, A., Bureau, M., Dupuis, L., Leh, V., Vetter, G., Kobayashi, K., Hohn, T., Ryabova, L., Yot, P., and Keller, M. 2005. The open reading frame VI product of Cauliflower mosaic virus is a nucleocytoplasmic protein: its N terminus mediates its nuclear export and formation of electron-dense viroplasms. *Plant Cell* 17: 927-943.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., and Voinnet, O. 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J* 22: 4523-4533.
- Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K. 1986. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiol* 81: 802-806.
- Kobayashi, K., Tsuge, S., Nakayashiki, H., Mise, K., and Furusawa, I. 1998. Requirement of cauliflower mosaic virus open reading frame VI product for viral gene expression and multiplication in turnip protoplasts. *Microbiol Immunol* 42: 377-386.
- Leh, V., Yot, P., and Keller, M. 2000. The cauliflower mosaic virus translational transactivator interacts with the 60S ribosomal subunit protein L18 of *Arabidopsis thaliana*. *J Virol* 266: 1-7.
- Li, F. and Ding, S.W. 2006. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 60: 503-531.
- Li, H.W., Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., Ji, L.H., Wong, S.M., and Ding, S.W. 1999. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *Embo J* 18: 2683-2691.
- Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., and Ding, S.W. 2000. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *Embo J* 19: 1672-1680.
- Luo, Z. and Chen, Z. 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 943-958.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80: 5747-5756.
- Moissiard, G., Parizotto, E.A., Himber, C., and Voinnet, O. 2007. Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA* 13: 1268-1278.
- Moissiard, G. and Voinnet, O. 2006. RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19593-19598.
- Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H., and Fukuhara, T. 2007. The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway. *Plant Mol Biol*: 777-785.
- Omarov, R.T., Ciomperlik, J.J., and Scholthof, H.B. 2007. RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in Tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1714-1719.
- Pantaleo, V., Szittyá, G., and Burgyan, J. 2007. Molecular bases of viral RNA targeting by viral siRNA programmed RISC. *J Virol* 81: 11768-11780.

- Pooggin, M.M., Hohn, T., and Futterer, J. 2000. Role of a short open reading frame in ribosome shunt on the cauliflower mosaic virus RNA leader. *J Biol Chem* 275: 17288-17296.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12: 340-349.
- Ryabova, L.A. and Hohn, T. 2000. Ribosome shunting in the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and animal systems. *Genes Dev* 14: 817-829.
- Shu-Nu, C., Lin, C.H., and Lin, A. 2000. An acidic amino acid cluster regulates the nucleolar localization and ribosome assembly of human ribosomal protein L22. *FEBS Lett* 484: 22-28.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyan, J., and Tanaka Hall, T.M. 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115: 799-811.
- Wang, P., Palese, P., and O'Neill, R.E. 1997. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* 71: 1850-1856.
- Wolff, T., Unterstab, G., Heins, G., Richt, J.A., and Kann, M. 2002. Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import. *J Biol Chem* 277: 12151-12157.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y., and Poethig, R.S. 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev*.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., and Chua, N.H. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20: 3255-3268.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Schematic of wild type P6 and its main functional domains, as indicated by colored boxes. NES: nuclear export signal; Domain A: involved in P6-P6 interaction; mini-TAV: minimal domain required for translational transactivation; ssRNA: single-stranded RNA binding domain; dsRNA: double-stranded RNA binding domain. The indicated alleles of GFP-P6 were transiently expressed into BY-2 tobacco cells and observations made under confocal microscope 18 hours after bombardment. The images on the left show detection of GFP and those on the right are composite images of green fluorescence and DIC. The position and amino acid sequence of the putative basic bipartite NLS is indicated and its similarities with the NLS of human ribosomal protein L22 are highlighted in yellow. (B) Positions of P6 sequences (a, b, and c) showing homology with non-conventional NLSs from viral proteins (red: Influenza virus 1 NP protein; yellow and green: Borna disease virus P10 protein). The effects of their deletion, either singly or in combination, on P6 Δ A distribution are depicted in the confocal images on the right. (C) Cellular localization of the GFP-P6_{m1} mutant (leucine substitution in red) and of its derivative GFP-P6_{m1} Δ NLS Δ a. (D) Cellular localization of the GFP-GUS reporter in the absence/presence of individual P6 NLS motifs (a and/or NLS) or combination thereof. (E) GST pull-down assay between P6 and rice importins. Radiolabelled P6 was incubated either with importin α (GST-imp α), β (GST-imp β) or GST alone (GST). Following SDS-PAGE and electrotransfer, P6 was detected by autoradiography (upper panel). Total protein was estimated by Coomassie blue staining (lower panel).

Figure 2. (A) Influence of L13 ribosomal protein interaction on P6 subcellular localization. BY-2 cell co-transfection of GFP-P6 and RFP-P6 or deleted versions thereof. GFP-L13 was co-expressed either with RFP-P6 Δ A or with RFP-P6 Δ A Δ dsR, and localization observed 16h

post-transfection of tobacco BY-2 cells. (B) Effect of NLS-a point mutations on GFP-P6 Δ A localization. Residue substitutions are indicated in red. (C) Translational transactivation assays in *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts. Protoplasts were co-transfected, as indicated, with constructs expressing P6, CAT and GUS, under the control of the CaMV 35S promoter. The GUS ORF is cloned downstream of the CaMV ORF VI, and is used to monitor translational transactivation events. CAT expression is an internal control for translation and transfection efficiency. The effects of P6, or mutated version thereof (as indicated) on GUS expression are represented by histograms. GUS activity in the presence of wild-type P6 was arbitrarily set to 100%. The data are from two independent experiments. (D) Schematic of the pGH recombinant viral vector in which ORF VI variants can be inserted owing to the *SacI/KpnI* restriction sites. The indicated P6 variants were cloned in pGH and inoculated to *Arabidopsis* plants upon linearization with *SalI*. Plants were monitored for symptom formation over a period of 18 days, upon which a blend of inoculated and systemic plant tissues was collected for analysis of the CaMV coat protein P4. The ratio of infected plants to inoculated plants is indicated underneath. Coomassie blue staining shows equal protein loading. (E) Schematic of the GFP-P6 and GFP-P6_{m3} proteins and analysis of their localization in tobacco BY-2 cells 18h post-bombardment (left and middle panel, respectively). Both alleles were introduced into pGH and infections scored as in E. At 18 dpi, leaf tissues were collected, and protein extracts subjected to Western blot analysis, as in D.

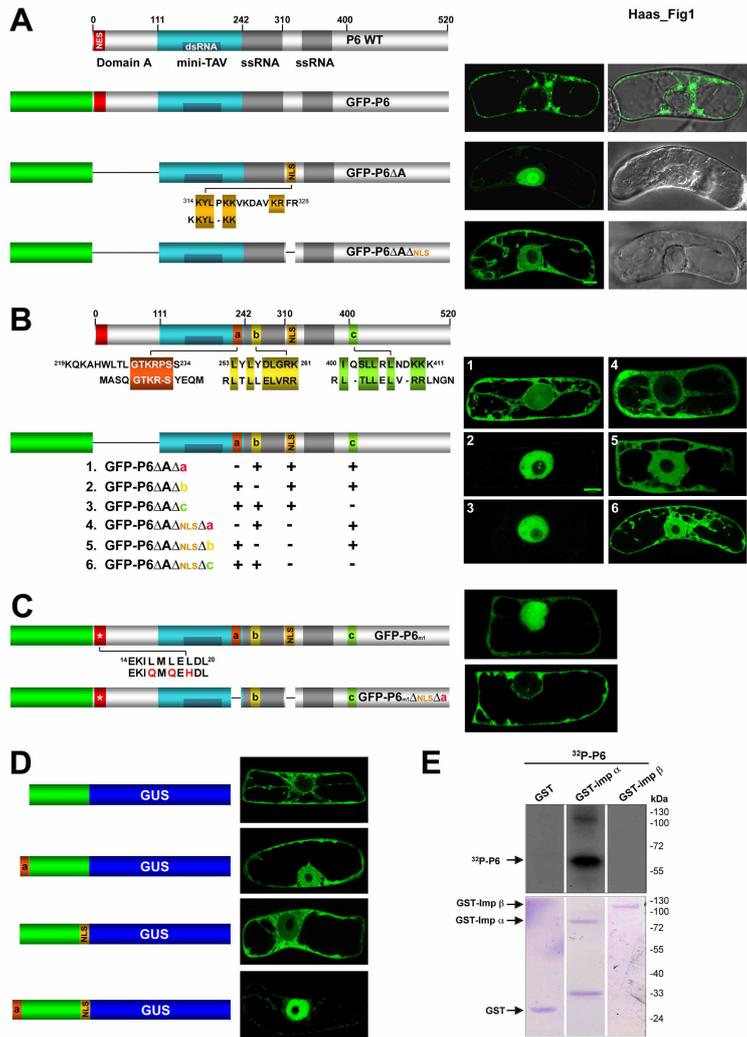
Figure 3. (A) Schematic of the PVX-GFP transgene expressed in the *Arabidopsis* AMP line. (B). Restoration of GFP accumulation upon transgenic expression of P6 and P38 in the AMP line (left panel). The red color is from chlorophyll autofluorescence under UV and signifies GFP silencing. High molecular weight (HMW) RNA and siRNA were extracted from those tissues and detected using a GFP-specific probe (right panel). rRNA: ethidium bromide

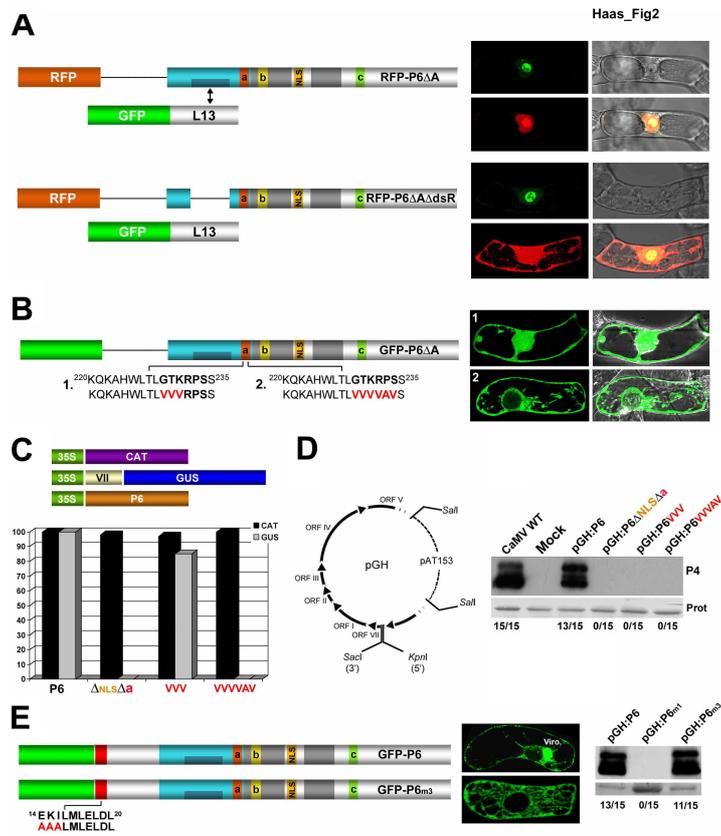
staining of ribosomal RNA; gRNA and sgRNA: genomic and subgenomic PVX-GFP RNA, respectively. (C) Leaves of AMP plants expressing P6, P6 Δ a or P6 Δ A Δ NLS under UV illumination. (D) Expression of P6 or its variants was detected by Western blot analysis using a P6 antiserum (P6, upper panel). Prot: Coomassie blue staining of total protein. PVX-GFP-derived siRNA were detected as in B (lower panel). (E) HMW RNA analysis of PVX gRNA and sgRNA in AMP lines expressing P6 and its variants, as in B.

Figure 4. (A-B) P6 transgenic Arabidopsis plants (ecotype Col-0, B) are stunted, chlorotic and exhibit leaf serration compared to their non-transgenic counterparts (A). (C) Magnified view of (B) showing the ‘silvery’ chlorosis developing on older leaves. (D) None of the P6 mutants tested induce developmental anomalies when expressed transgenically in the Col-0 ecotype. (E) Upper panel: Western blot analysis of P6 expression levels in the plants depicted in (A-D), as in Fig.3D.). Prot: Coomassie blue staining of total protein. Lower panel: low molecular weight (LMW) RNA analysis in the corresponding genotypes, using oligonucleotide probes for the endogenous tasiRNA 255, miR173 and miR156. rRNA: ethidium bromide staining of ribosomal RNA.

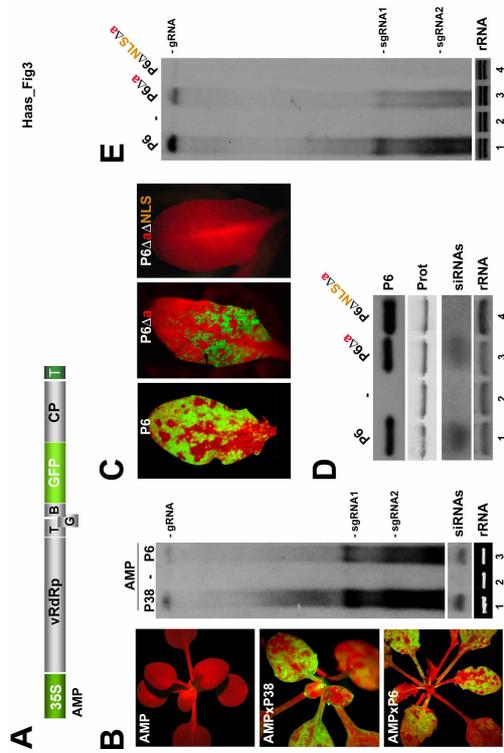
Figure 5. (A) Schematic of the SUC-SUL transgene and phenotype of progenies obtained upon introduction of the various P6 alleles used in Fig.4 in the SUC-SUL Arabidopsis line. (B) Upper panel: expression levels of P6 and its variants in the lines depicted in (A). the analysis was as in Fig. 3D and 4E. Lower panel: LMW RNA analysis in the corresponding genotypes, using a DNA probe specific for the *SUL* region of the SUC-SUL transgene. The *SUL* siRNAs accumulate as 21nt and 24nt siRNA species. (C) Upper panel: detection of CaMV-derived RNA species in wild-type (WT) and in *dcl2 dcl4* and *drb4* mutants of Arabidopsis. The DNA probe used corresponds to the full-length CaMV genome. Lower

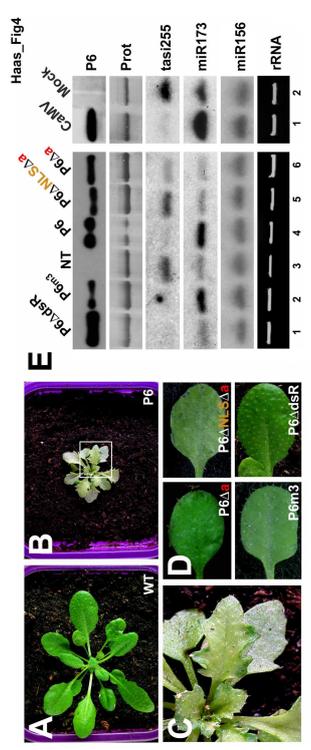
panel: low molecular weight RNA analysis in the corresponding genotypes using the same probe as for HMW analysis. rRNA: ethidium bromide staining of ribosomal RNA. (D) Detection of DRB4 by Western blot analysis of total proteins extracted from wild-type (WT) and *drb4* null mutant plants. The arrow indicates the expected migration of DRB4, according to its predicted molecular mass of 43 kDa. (E) Western blot analysis of DRB4 accumulation in Arabidopsis plants infected by CaMV or expressing the P6 protein. *drb4* and *dcl4* mutant plants were used as controls. Prot: Coomassie blue staining of total protein. (F) Immunoprecipitation of DRB4 in mock-inoculated (left) and CaMV-infected plants (right). DRB4 immunoprecipitates were subjected to Western blot analysis using a P6 antibody (upper panel). The filter was then re-hybridized with the DRB4 antibody (lower panel). The ~50kDa non-specific signal corresponds to the immunoglobulin heavy chain (Ig HC).

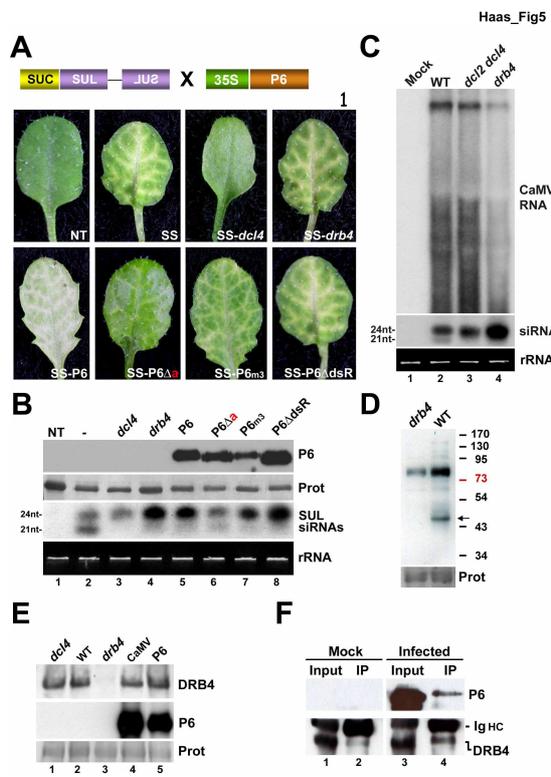




Haas_Fig2







Discussion générale et perspectives

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse, j'ai montré que les viroplasmés denses ne sont pas nécessaires pour le cycle infectieux du CaMV, renversant le dogme selon lequel ces corps d'inclusion constituent un compartiment indispensable pour la réplication virale du CaMV. J'ai aussi étudié le transport nucléocytoplasmique de la protéine P6 du CaMV, et montré qu'il est absolument requis pour l'infectivité du CaMV, attestant de l'importance de la ou des fonctions nucléaires de P6. Une de ces fonctions nucléaires a été élucidée : il s'agit de la suppression du RNA silencing.

Les viroplasmés denses

Des études réalisées dans les cellules de tabac BY-2 ont montré que la région N-terminale de P6 est nécessaire mais pas suffisante pour la formation des viroplasmés denses (Haas *et al.*, 2005). Le comportement intracellulaire de la protéine P6 délétée des NLS est variable selon les cellules, indiquant que les régions correspondantes sont impliquées dans la formation de ces corps d'inclusion sans pour autant jouer un rôle prépondérant. En effet, bien que les mutants soient majoritairement solubles, ils peuvent donner lieu dans certaines cellules à de petits agrégats voire même des viroplasmés. Ces observations sont en accord avec les travaux de Li et Leisner (2002) qui ont montré que certains domaines internes de la protéine P6, dont ceux contenant les NLS, interagissent avec la protéine complète dans des expériences de double-hybride chez la levure. Il est vraisemblable que les séquences internes contenant les NLS contribuent à renforcer les interactions P6-P6, et par conséquent, la formation des viroplasmés. Par ailleurs, nous pouvons conclure que le passage de P6 à travers le noyau n'est pas un pré-requis pour ce processus, puisque le mutant de P6 portant la double délétion des NLS est toujours capable de générer des viroplasmés, bien que leur fréquence d'apparition soit plus faible. P6 ne subit donc pas dans le noyau de modifications majeures pour former les viroplasmés denses.

Haas *et al.*, (2005) ont montré que la mutation du tripeptide EKI dans le domaine A empêche la formation de viroplasmés. Ce mutant a été mis à profit pour déterminer si l'incapacité de P6 à former ces corps d'inclusion est préjudiciable pour le pouvoir infectieux du CaMV. J'ai ainsi construit un vecteur viral dont l'ORF VI a été substitué par l'allèle muté et inoculé les plants de navet et d'*Arabidopsis thaliana* avec le génome du CaMV muté. J'ai ainsi pu démontrer que le CaMV est capable d'infecter les deux plantes hôtes systémiquement bien qu'il soit incapable de former des viroplasmés denses, indiquant que toutes les étapes du cycle infectieux s'effectuent en absence de ces corps d'inclusion, l'infection systémique ne procédant que par le biais de particules virales matures. L'absence de viroplasmés denses chez le navet et chez *Arabidopsis* infectés par le virus mutant a été

confirmée par des observations des cellules en microscopie électronique. Par contre, nous avons trouvé certains amas denses contenant des particules virales, dont l'aspect diffère de celui des petits agrégats denses sous forme de beignets (« donuts » en anglais) observés dans les cellules infectées par le virus sauvage.

Les mutations introduites dans la région N-terminale de P6 sont extrêmement stables malgré de nombreux passages sur plantes. Cette stabilité est surprenante car le motif EKI est localisé dans une région qui est conservée dans les différentes souches de CaMV, suggérant que la ou les fonctions associées à cette région sont primordiales pour le virus. La stabilité de la mutation constitue un argument indirect que le virus peut se dispenser de viroplasmés pour se répliquer.

La susceptibilité du navet et d'*A. thaliana* au CaMV mutant est différente comme le montre la symptomatologie et le profil d'expression des gènes viraux. Chez *Arabidopsis*, les symptômes apparaissent avec un léger retard comparé aux plantes infectées par le virus sauvage mais sont similaires et de même sévérité, excepté en fin de vie de la plante où les chloroses et le gaufrage des feuilles sont plus prononcés dans le cas de l'infection par le virus sauvage. Sur le plan moléculaire, les ARN viraux et les protéines virales s'accumulent normalement, comme l'atteste l'analyse des transcrits viraux et des protéines P6, P4 et P2, à part un léger délai dans la cinétique d'apparition des protéines. Toutefois, la protéine de capsid et ses formes matures sont légèrement moins abondantes que celles exprimées par le virus sauvage. Le fait que les protéines P2 et P4 soient exprimées signifie d'une part que la mutation de EKI n'altère en rien, comme on s'y attendait, la capacité de P6 à activer en *trans* la traduction des ARN polycistroniques viraux et d'autre part, que ni la réplication du génome par rétrotranscription, ni la morphogénèse virale ne sont affectées par l'absence des corps d'inclusion denses, puisque nous observons en microscopie électronique des particules virales pleines dans les cellules infectées. D'ailleurs, la détection des différents produits de clivages de la protéine de capsid montre que la morphogénèse s'est faite normalement vu que les clivages ne s'effectuent qu'au cours ou après ce processus. Himmelbach *et al.* (1996) ont proposé que la protéine P6 joue un rôle d'échafaudage de la protéine P4 lors de la morphogénèse. Si tel est le cas, nos résultats indiquent que cette activité de P6 s'opère ou peut s'opérer en dehors des viroplasmés denses.

Bien qu'infecté systémiquement par le virus recombinant, le navet semble être moins sensible à l'infection par le CaMV mutant comme le montre la faible sévérité des symptômes et, au niveau moléculaire, le taux réduit des protéines et des transcrits viraux, comparés à ceux décelés chez les plantes infectées par le virus sauvage. La faible teneur en P2 et P4 est vraisemblablement directement liée à la quantité réduite de P6. Toutefois, nous ne pouvons exclure totalement que la mutation introduite dans P6 affecte, chez le navet, l'interaction entre P6 et la machinerie traductionnelle bien qu'elle soit localisée à l'extérieur des domaines identifiés comme étant impliqués dans la fonction de

réinitiation de la traduction. Le niveau des transcrits viraux, également diminué, pourrait expliquer en partie les faibles quantités de protéines synthétisées lors de l'infection systémique.

Ainsi, il s'avère que le CaMV recombinant se multiplie difficilement chez le navet à l'inverse d'*Arabidopsis* où les étapes de multiplication ne sont pas affectées. Il est aussi envisageable que la mutation de P6 perturbe la susceptibilité du navet au virus étant donné qu'elle est localisée dans la région N-terminale, connue pour être impliquée dans la spécificité d'hôte et dans l'expression des symptômes (Wintermantel *et al.*, 1993). Il serait intéressant d'introduire cette mutation de P6 chez différentes souches de CaMV, et notamment sur les souches W260 et D4 qui infectent les solanacées pour déterminer si elle modifie leur spectre d'hôte et/ou la symptomatologie.

Le fait de disposer au laboratoire de plantes transgéniques exprimant P6 ou P6m3 ouvre des perspectives intéressantes pour déterminer si les viroplasmes séquestrent des facteurs cellulaires comme cela a été décrit pour d'autres virus formant des corps d'inclusion (Novoa *et al.*, 2005). Ainsi, des expériences d'immunoprécipitation *in vivo* à l'aide d'anticorps anti-P6 permettraient de comparer les protéines cellulaires récupérées à partir de ces plantes, tout en s'affranchissant des protéines virales qui interagissent avec P6 ou présentes dans les viroplasmes, mais surtout d'éventuels facteurs cellulaires qui pourraient interagir avec les protéines virales autres que P6. L'infection d'*Arabidopsis thaliana* en absence de viroplasmes denses soulève de nombreuses questions : 1) où se déroulent les différentes étapes du cycle viral, 2) les structures cellulaires utilisées par le virus recombinant sont-elles identiques à celles servant de supports aux autres virus, 3) le CaMV se sert-il à la fois des viroplasmes denses et de ces structures pour une réplication virale efficace et 4) pourquoi le CaMV a-t-il conservé des viroplasmes, s'ils s'avèrent inutiles pour infecter systématiquement *A. thaliana* ? Cette dernière question trouve peut-être sa réponse dans le fait que les cellules infectées dépourvues de viroplasmes denses ne possèdent plus de viroplasmes clairs, alors que la protéine P2 s'accumule à un taux normal. En d'autres termes, il est probable que les viroplasmes denses soient nécessaires à la formation des viroplasmes clairs et, par conséquent, déterminent indirectement la transmissibilité du CaMV par les pucerons ou du moins l'efficacité de la transmission. En effet, des études récentes ont montré qu'une forme de CaMV codant pour une protéine P2 déficiente pour la formation de corps clairs n'est plus transmissible (Khelifa *et al.*, 2007). Par ailleurs, les tests de transmission *in vitro* effectués en présence des protéines P2 et P3 solubles et de virions purifiés se sont toujours montrés nettement moins efficaces que ceux réalisés à l'aide d'extraits de plantes infectées (Leh *et al.*, 1999). Le lien entre la formation des viroplasmes denses et celle des viroplasmes clairs suggère qu'un événement au sein des corps denses modifie la protéine P2 pour qu'elle puisse s'agrèger. L'obtention de plantes transgéniques exprimant P2 permettrait de vérifier, par des analyses de microscopie électronique, si les viroplasmes clairs ne se forment qu'en présence de viroplasmes denses. En

parallèle, les mêmes études sur une lignée double-transgénique exprimant P6 ou le mutant P6m3 et P2, pourrait confirmer l'importance des viroplasmes pour la formation des corps clairs.

Concernant le ou les lieux possibles de la réplication du CaMV, il est envisageable d'effectuer une immunodétection de la transcriptase inverse, sur des protoplastes issus de feuilles infectées par le virus sauvage ou le virus mutant, qui permettrait de détecter la présence d'éventuelles ponctuations relatives à des sites particuliers d'accumulation de P5. Une telle étude comparative entre les cellules infectées par le virus sauvage et le virus recombinant permettrait de définir, au-delà de l'existence de ces sites de réplication, s'ils sont toujours utilisés par le CaMV ou s'ils ne sont qu'un substitut des viroplasmes denses lorsque ces derniers sont absents.

En conclusion, les viroplasmes denses de P6 ne sont ni nécessaires pour la réplication du CaMV ni pour l'infection systémique des plantes hôtes. Nous avons pu montrer récemment au laboratoire que la protéine P6 colocalise avec les ribosomes et la protéine cellulaire RISP au niveau des microtubules suggérant très fortement que le cytosquelette constitue un support pour la traduction des transcrits du CaMV. Le virus pourrait donc détourner à son profit des structures subcellulaires (cytosquelette, surfaces endomembranaires...) pour y opérer les différentes étapes du cycle infectieux (traduction, réplication, morphogénèse). Les viroplasmes denses sont sans doute une opportunité pour le CaMV de concentrer en un lieu unique, tous les composants impliqués dans la réplication virale et augmenter ainsi son rendement et/ou accroître ses chances de transmission par pucerons.

Le trafic nucléo-cytoplasmique de P6

Au cours de ma thèse, j'ai montré que P6 interagit *in vitro* avec l'importine α suggérant que l'importation nucléaire s'effectue grâce à ce transporteur, l'exportation étant réalisée par la voie CRM-1 comme l'ont montré précédemment Haas *et al.* (2005). Toutefois, il est apparu que P6 est également importée dans le noyau comme un cargo des protéines ribosomiques L13 et L18. En effet, nous avons observé que la délétion du domaine d'interaction de P6 avec L13/L18, domaine localisé dans le miniTAV, abolit partiellement l'importation de P6 dans les cellules BY-2 de tabac. L'implication de ces partenaires cellulaires dans le transport est confirmé indirectement par la présence d'un voile de fluorescence verte lorsque la protéine EGFP-P6 est déléetée de ses deux NLS. La perte de l'interaction avec L13 et L18 perturbe également la localisation nucléolaire de P6, suggérant que les protéines ribosomiques sont à l'origine de l'adressage et/ou de la rétention nucléolaire de P6. Naturellement, comme la protéine P6 interagit avec d'autres composants de la machinerie traductionnelle (Park *et al.*, 2001), nous ne pouvons pas exclure que l'importation puis la localisation nucléolaire s'effectuent également par le biais de partenaires autres que ceux que nous avons étudiés. Par ailleurs, P6 possède plusieurs domaines de fixation aux ARN (ARN simple et double brin) (De Tapia *et al.*, 1993) et de ce

fait, il n'est pas exclu que des interactions entre P6 et les ARN ribosomiques contribuent à la présence de P6 dans le nucléole après son importation. Ces processus ont déjà été décrits pour certaines protéines cellulaires ou virales (Hiscox, 2007). Cette hypothèse est par ailleurs étayée par le fait que nous n'avons pas trouvé de NoLS proprement-dit dans la séquence de P6 à part la similitude du NLS2 avec la séquence nucléolaire de la protéine ribosomique L22 humaine (Shu-Nu *et al.*, 2000). Par ailleurs, plusieurs délétions perturbent cette localisation ce qui suggère qu'elles modifient la conformation de P6 et/ou diminuent des interactions avec d'éventuels partenaires.

La protéine P6 est probablement importée dans le noyau sous forme de monomères. Cette observation conduit à se demander s'il existe deux populations distinctes de P6 se distinguant par leur conformation tridimensionnelle, l'une comprenant les molécules solubles transitant entre les compartiments nucléo-cytoplasmique et l'autre, capable de former les viroplasmes denses. Dans le cas contraire, il est vraisemblable que l'export rapide de la protéine P6 dû à la forte activité du NES, l'empêche de s'accumuler, à moins que l'interaction avec les facteurs nucléaires inhibe le processus d'assemblage (Haas *et al.*, 2005). De plus, l'agrégation de P6 sous forme de viroplasmes tend à limiter son transport nucléo-cytoplasmique ce qui suggère non seulement qu'une faible fraction de la protéine transite entre les deux compartiments, mais également que la ré-importation de P6 est un événement probablement plus rare, celle-ci étant incorporée irréversiblement dans les viroplasmes.

La régulation du transport nucléo-cytoplasmique de P6 n'a pas été abordée au cours de mon étude, mais il semblerait que la sumoylation n'intervient pas dans la localisation subcellulaire de P6, la mutation des sites putatifs de sumoylation n'ayant aucun effet. Pour confirmer ce résultat préliminaire ou voir l'implication éventuelle d'autres modifications post-traductionnelles, on pourrait réaliser des analyses en électrophorèse bi-dimensionnelle de la protéine P6 extraite de plantes infectées.

Les expériences de mutagenèse dirigée que nous avons réalisées ont permis d'identifier deux NLS impliqués dans l'importation nucléaire de P6, un NLS non conventionnel (NLS1) et un NLS basique bipartite (NLS2). Les propriétés caryophiles de ces deux séquences ont été confirmées par des expériences dites de « gain de fonction » effectuées sur une protéine à localisation strictement cytoplasmique. Le NLS basique n'a qu'une faible activité d'importation en comparaison du NLS1, comme le démontre les résultats obtenus suite à des mutations ponctuelles réalisées sur les résidus clés de ce motif. En effet, la substitution des amino acides basiques du NLS2 par des résidus apolaires ne perturbe pas l'importation nucléaire mais elle empêche par contre la localisation nucléolaire de la protéine virale. En conclusion, le NLS2 ne joue apparemment qu'un rôle mineur dans l'importation de P6. Il serait intéressant de muter les résidus non basiques afin d'évaluer leur contribution dans la localisation subcellulaire de P6.

Le NLS1 joue indéniablement un rôle prépondérant dans l'importation nucléaire de P6 puisque la mutation de l'hexapeptide GTKRPS abolit quasi complètement l'import. Ce motif est

particulièrement intéressant car il présente de fortes homologues de séquence avec le NLS non conventionnel de la nucléoprotéine NP du virus *Influenza A* (Wang *et al.*, 1997) ; cette dernière requiert pour son importation nucléaire un voire deux NLS additionnels dont un NLS basique bipartite, évoquant la situation observée ici avec P6 (Wang *et al.*, 1997 ; Weber *et al.*, 1998). En effet, comme pour P6, il a été montré que le NLS non conventionnel de la protéine NP joue un rôle prédominant dans son importation par l'importine α alors que la mutation des résidus basiques du second NLS a peu d'effet (Cros *et al.*, 2005). Enfin, le NLS non conventionnel est déterminant pour l'importation des complexes vRNPs du virus de la grippe et pour sa réplication, tandis que le NLS basique influe sur la localisation nucléolaire de la protéine NP ; sa présence est importante pour la transcription des ARN viraux (Cros *et al.*, 2005 ; Ozawa *et al.*, 2007). Nous nous sommes aussi posés la question de savoir si le NLS2 intervient de manière plus conséquente pour assurer l'importation de P6, par exemple lorsque le NLS1 est masqué suite à des interactions avec des partenaires cellulaires lors de la transactivation traductionnelle.

La mutation du dipeptide KR du motif **GTKRS** est suffisante pour diminuer drastiquement l'importation de la protéine NP (Cros *et al.*, 2005) et d'environ de moitié celle de la protéine du CaMV lorsque le tripeptide **GTK** est muté. L'importation des protéines NP et P6 est abolie quasi-complètement lorsqu'on procède à la mutation du **GTKRPS**. Par ailleurs, il apparaît que le dipeptide KR du NLS non conventionnel trouvé dans ces protéines soit d'une haute importance pour la reconnaissance par l'importine α .

L'étude de l'importance du trafic nucléo-cytoplasmique de P6 pour la multiplication du virus a nécessité une mutagenèse dirigée fine afin de découpler le transport de la fonction de transactivation traductionnelle, puisque la délétion du NLS1 conduisait à une perte de cette dernière fonction. Lorsque l'importation de P6 est limitée suite à la mutation du tripeptide **GTK** du NLS1, le virus n'est plus infectieux *in planta*, bien que P6 soit toujours capable d'activer la réinitiation de la traduction, ce qui dénote l'importance pour le CaMV de la navette entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire de P6 et *in extenso*, de sa ou ses fonctions nucléaires. De manière étonnante, la délétion du NLS basique est létale pour le CaMV bien que son rôle dans l'importation soit mineur. Des tests de transactivation traductionnelle sont actuellement en cours pour déterminer si cette activité est perturbée bien que la région du NLS2 ne soit pas connue pour y jouer un rôle. Il n'est pas exclu que ce domaine interagisse avec un partenaire cellulaire encore non identifié impliqué dans la transactivation ou, comme évoqué précédemment, qu'il soit nécessaire pour une fonction nucléaire de P6. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait élaborer un virus recombinant codant pour une forme de P6 mutée au niveau des résidus basiques du NLS2 et mesurer son effet sur la multiplication virale. Cette forme de P6 n'étant plus présente dans le nucléole, cette expérience permettrait par la même occasion de

savoir si la localisation nucléolaire de la protéine est indispensable pour le pouvoir infectieux du CaMV.

En conclusion, notre étude montre que P6 exerce deux fonctions primordiales pour le CaMV, qui sont séparées géographiquement dans la cellule hôte, la transactivation traductionnelle dans le cytoplasme et une ou plusieurs fonctions dans le noyau.

La suppression du RNA silencing

Dans la dernière partie de ma thèse, j'ai pu démontrer que P6 exerce bel et bien la fonction de suppresseur du RNA silencing, et que celle-ci constitue une fonction nucléaire de la protéine virale. En effet, les analyses moléculaires réalisées en présence de P6 ou de diverses formes mutées ont montré que l'activité de silencing n'est compromise qu'en absence des deux NLS de P6, à la fois pour la réactivation de la GFP du système amplicon, mais également pour la synthèse de siRNA endogènes. En d'autres termes, P6 supprime le silencing dans le noyau de la cellule hôte. Ces observations sont corroborées par le fait que la seule délétion du NLS1, qui ne diminue que partiellement l'efficacité de l'importation nucléaire de P6, perturbe déjà la fonction de suppression dans tous les systèmes de silencing étudiés, y compris dans le système amplicon, où malgré une réactivation de la GFP, on observe une accumulation plus faible des ARN génomiques et subgénomiques de PVX-GFP. Parmi les mutants de P6 analysés, celui portant la délétion du site putatif de fixation aux ARN double-brin – mutant qui, rappelons-le, est toujours fonctionnel pour la suppression- est d'un intérêt particulier. En effet, nous avons vu précédemment que ce domaine est impliqué dans les interactions avec les protéines ribosomiques L13 et L18 qui contribuent à retenir P6 dans le nucléole. Etant donné que la délétion de ce domaine tend à diminuer la localisation de P6 dans ce compartiment subcellulaire sans affecter la suppression, il est très probable que P6 supprime le silencing dans le nucléoplasme. Ceci pourrait être confirmé en réitérant nos analyses moléculaires sur de nouveaux transformants exprimant un des mutants ne pouvant plus être importé dans le nucléole, par exemple celui qui incorpore des mutations ponctuelles du NLS basique.

Nous notons que le domaine de fixation aux ARNdb est localisé dans le domaine miniTAV, et que sa délétion abolit la fonction de transactivation traductionnelle de P6. Ceci nous permet donc d'affirmer que cette fonction n'est aucunement liée à la suppression. Il en est de même pour le domaine de formation des viroplasmes qui est abolie par la mutation m3. Malgré tout, nous avons observé que les deux mutants correspondants de P6, P6 Δ dsR et P6m3 semblent mieux supprimer la synthèse des tasiRNA que la P6 sauvage. L'allele P6 Δ dsR a aussi un effet plus prononcé sur la suraccumulation des siRNAs de 24nt dans le système SUC-SUL. Il est probable que les mutations introduites rendent ces formes plus disponibles pour réaliser la navette entre les différents

compartiments cellulaires. Nous avons vu au cours de nos études que les viroplasmes limitent la quantité de P6 disponible pour l'import nucléaire : il est probable que la protéine P6m3 est plus libre de circuler entre le cytoplasme et le noyau, sa localisation, bien que majoritairement cytoplasmique, ne dépendant plus que des NES et NLS qu'elle renferme. Ainsi, la navette entre les compartiments s'opère probablement en continuité puisque la protéine est soluble, résultant en une quantité accrue de molécules disponibles pour la suppression de silencing dans le noyau. Dans le cas du mutant P6 Δ dsR, il est probable que la perte de l'interaction avec L13 et L18 perturbe de façon générale l'ensemble des interactions entre P6 et la machinerie traductionnelle. De plus grandes quantités de P6 pourraient ainsi plus aisément quitter le cytoplasme où elles sont normalement retenues par les complexes ribosomiques. D'autre part, la perte d'interaction avec L13 et L18, en limitant l'accès de P6 au nucléole, renforce aussi probablement la disponibilité de P6 dans le nucléoplasme, le site très probable de la suppression de RNA silencing.

Nous pouvons également dissocier la fonction de suppression exercée par P6 de l'expression des symptômes. En effet, aucun des mutants de la protéine n'induit le phénotype de chlorose et de nanisme observé par l'expression transgénique de la protéine sauvage, et pourtant la plupart d'entre eux suppriment toujours parfaitement le RNA silencing dans plusieurs systèmes rapporteurs. Au delà des symptômes chlorotiques et du nanisme, il est possible que les anomalies développementales, notamment les serrations, résultent d'une modification du transcriptome suite à une dérégulation des voies de silencing endogènes par P6 (tasiRNAs et miRNAs). Il est cependant établi que P6 modifie le niveau d'expression de certains gènes dans des plantes transgéniques (Geri *et al.*, 1999). Il n'est, par conséquent, pas improbable que cette protéine virale puisse également agir dans le noyau comme un régulateur de l'expression de gènes, indépendamment de la suppression, en engageant des interactions -directes ou indirectes- avec des protéines cellulaires, par exemple des facteurs de transcription. Il serait donc intéressant de réaliser des analyses comparatives du transcriptome de plantes exprimant P6 ou sa forme déficiente pour l'importation nucléaire afin d'élucider ce point.

Concernant le mode d'action de P6, nous avons observé que le phénotype moléculaire lié aux siRNA endogènes et sur la voie de l'IR-PTGS (système SUC-SUL) est étonnamment similaire à l'effet de la mutation *drb4* : l'efficacité de l'action de DCL4 est nettement diminuée sans toutefois être éliminée, comme l'atteste la forte diminution des niveaux des tasiRNAs et, des siRNAs de 21nt produit par le transgène SUC-SUL. Dans ce dernier cas, la diminution des siRNAs de 21nt s'accompagne d'une production massive de siRNAs de 24nt, DCL3-dépendants. Ce phénomène, dont les bases possibles ont déjà été évoquées dans l'introduction de ce chapitre (§I.2) de la thèse, est diagnostique de la mutation *drb4* (Dunoyer *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent donc que DRB4 est une cible de P6, ce qui est parfaitement en accord avec la nécessité de l'import nucléaire de P6 pour sa fonction de supprimeur, puisque des expériences de fusions à la GFP ont récemment prouvé

que DRB4 a une distribution subcellulaire entièrement nucléaire, tout comme son partenaire biologique, DCL4. DRB4 ne possédant pas de NLS conventionnel, il est très probable que son import dans le noyau se produit *via* son interaction avec DCL4, qui lui, possède un NLS clairement identifiable (Hiraguri *et al.*, 2005). Notons enfin que la suraccumulation des siRNAs de 24nt dérivés de la région leader de l'ARN 35S au cours d'infection de plantes *drb4* par le CaMV atteste d'une interaction authentique entre DRB4 et cette structure secondaire en contexte infectieux, ce qui renforce encore notre hypothèse.

L'ensemble des données obtenues permet donc de conclure que DRB4 est une cible génétique de la protéine P6 nucléaire. Mais s'agit-il d'une cible physique ? Des analyses comparatives du niveau d'accumulation de DRB4 dans des plantes saines et des plantes infectées par le CaMV ont montré que ni l'accumulation ni la migration électrophorétique de la protéine ne sont pas affectées au cours de l'infection (non présenté). Par conséquent, P6 ne perturbe ni l'expression ni la stabilité de DRB4. En revanche, des expériences préliminaires d'immunoprécipitation (IP) ont révélé que P6 est associée en complexe avec DRB4 (non présenté). Il faudrait à présent répéter ces expériences, et aussi (i) vérifier la perte de co-IP des deux protéines dans des plantes transgéniques exprimant des allèles non nucléaires de P6 et (ii) déterminer par des tests d'interactions protéine-protéine *in vitro* (GST pull-down) ou par double-hybride chez la levure, si P6 et DRB4 interagissent directement ou non. Il est peu probable que P6 interagisse avec DCL4 pour empêcher sa liaison avec DRB4. En effet, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation dirigées contre DCL4, et P6 s'est révélée absente de la fraction précipitée alors qu'elle était détectée dans les extraits bruts. En dépit du résultat négatif de cette expérience qui interdit toute conclusion formelle, les données génétiques et moléculaires suggèrent aussi très fortement une absence d'interaction entre P6 et DCL4. En effet, la suppression de DCL4 (par exemple par la protéine P38 du TCV) ou son inactivation génétique s'accompagnent invariablement de la production de tasiRNAs endogènes de 22nt (au lieu de 21nt), diagnostique du remplacement fonctionnel de DCL4 par son activité subordonnée, DCL2 (Deleris *et al.*, 2006). Or ce changement de taille caractéristique n'a été observée avec aucun des allèles de P6 analysés.

On peut à présent s'interroger sur la légitimité de cibler DRB4 au cours de l'infection, dans la mesure où son inactivation ne conduit pas à une inhibition complète de l'activité de DCL4 et, de plus, renforce très fortement l'activité de DCL3, résultant en un *dicing* nettement accru des ARN 35S et une diminution (modeste) de l'accumulation du virus. Une explication possible réside dans le fait que certains des vsRNA de 21nt dérivés de la région *leader* induisent la dégradation séquence-spécifique de transcrits cellulaires, probablement au bénéfice du CaMV (Moissiard et Voinnet, 2006). Une inhibition incomplète de DCL4 (par le ciblage de DRB4) permettrait de conserver suffisamment de vsRNA de 21 nt pour modifier le transcriptôme de l'hôte et ainsi assurer une infection optimale tout en

limitant le clivage endonucléolytique des transcrits viraux par le complexe RISC. Bien que formellement non démontrée dans le cas du CaMV, cette réaction de clivage est en effet l'apanage des produits de DCL4 au cours du PTGS. Le ciblage de DRB4 par P6, conduisant à une suraccumulation de vsRNA de 24 nt, peut enfin être légitimé par le fait que ces molécules peuvent potentiellement induire le TGS des loci endogènes ciblés par le CaMV, mais également la méthylation/condensation des minichromosomes viraux. Le noyau des cellules hôtes étant en effet constamment ré-infecté par des génomes viraux synthétisés *de novo*, la synthèse de vsRNA de 24 nt pourrait être un moyen pour le virus de favoriser son propre TGS afin de limiter l'expression de ses gènes dans le but de préserver son hôte et ainsi de perdurer. Cette possibilité est tout à fait envisageable d'autant plus qu'il avait été observé, bien avant la découverte du RNA silencing, que le génome du CaMV est transcrit abondamment en début d'infection alors que le virus est principalement sous forme de minichromosomes à des stades plus tardifs, cet état coïncidant avec une diminution de l'accumulation des transcrits viraux (Covey et Turner, 1991). Il serait donc intéressant de réaliser une banque de vsRNA à partir de tissus infectés par le CaMV afin de comparer les séquences retrouvées à celles de gènes cellulaires, puis de vérifier si celles-ci correspondent à des sites préférentiels de méthylation du génome hôte. Il serait tout aussi intéressant de vérifier si les minichromosomes du CaMV sont effectivement méthylés, notamment au niveau des cytosines asymétriques présentes dans la région *leader* et la région 5' de l'ARN 19S qui sont les sources majeures de vsRNAs.

Pour finir, la suppression du RNA silencing n'est probablement pas la seule fonction nucléaire exercée par P6. Il est par exemple tout à fait concevable que P6 régule l'épissage et/ou l'export des transcrits viraux. Car même si elle contrôle le niveau de dicing de l'ARN 35S, le fort taux d'épissage de ce dernier limite également la synthèse d'ARN pré-génomique. Des expériences de micro-injection de transcrits viraux dans un système d'oocytes de xénope sont envisagées au laboratoire afin de déterminer si P6 en affecte effectivement l'épissage et l'export.

Matériel et méthodes

I Matériel

I.1 Matériel végétal

I.1.1 Plantes hôtes du CaMV

Deux hôtes naturels du CaMV sont utilisés pour les tests d'infection : le navet (*Brassica rapa rapifera*, cultivar *Just Right* Hybride F1) et *Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia ou Landsberg).

I.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Cette plante, modèle d'étude en biologie végétale, a été utilisée pour l'obtention de lignées transgéniques de par sa facilité à être transformée, pour la multitude de mutants de silencing ou de systèmes d'étude du silencing déjà disponibles au sein de la communauté scientifique.

- Mutants *dcl*

Les gènes *dcl*, au nombre de quatre chez *Arabidopsis thaliana*, codent pour les protéines « Dicer-like » impliquées dans le RNA silencing. Les mutants *dcl2-1* (At3g03300), *dcl3-1* (At3g43920) et *dcl4-2* (At5g20320) sont disponibles dans l'écotype col-0 d'*Arabidopsis* et correspondent à des mutants d'insertion de T-DNA (Xie *et al.*, 2004). Les doubles et triples mutants *dcl*, ont été générés par croisement génétique de ces allèles dans le laboratoire de James Carrington (Oregon, USA). La sélection des mutants homozygotes a été réalisée par génotypage comme décrit par Deleris *et al.*, (2006).

- Lignées d'étude du silencing

Les lignées AMP, AMPxGFP/wt, AMPxGFG/rdr6, GFP, SUCSUL, SUCSULxdrb4 et SUCSULxdcl4 ont été obtenues comme décrit précédemment (Dalmay *et al.*, 2000 ; Dalmay *et al.*, 2000b ; Dunoyer *et al.*, 2007). Elles font l'objet d'une description détaillée dans le second chapitre de ce mémoire.

I.1.3 Culture de cellules BY-2 de tabac

Cette lignée cellulaire de tabac (*Nicotiana tabacum* L., Bright Yellow 2) (Nagata *et al.*, 1992), est cultivée dans l'obscurité à 24°C, sous agitation constante (130 rpm), dans un milieu liquide (milieu BY-2). Ce dernier se compose de milieu Murashige et Skoog basal (KH₂PO₄ 200 mg/mL, acide 2,4-

dichlorophénoxyacétique (2,4 D) 0,2 mg/mL, saccharose 30 g/L et myoinositol 100 mg/mL (Duchefa), complétement avec de la thiamine à une concentration finale de 1 mg/mL. Tous les 7 jours, 2 mL de la culture cellulaire sont réensemencés dans 100 mL de milieu frais. Les cellules BY-2 ont été utilisées pour les études de localisation subcellulaire de protéines d'intérêt fusionnées à un fluorochrome.

I.2 Isolat du CaMV

L'isolat de CaMV utilisé pour l'infection des plantes est *Cabb-JI* (John Innes Institute, Norwich). Il donne lieu à des symptômes sévères (chloroses, gaufrage, éclaircissement des nervures et nanisme) lorsqu'il infecte les plants de navets et les écotypes Columbia et Landsberg d'*A. thaliana*.

1.3 Souches bactériennes

I.3.1 *E. coli* XL1-blue

La souche d'*Escherichia coli* XL-1 blue est utilisée pour le clonage et l'amplification de plasmides recombinants car elle n'effectue pas de recombinaison entre molécules d'ADN.

I.3.2 *E. coli* BL21/DE3

Cette souche, lysogène pour le phage λ DE3, est employée pour l'expression des protéines hétérologues car sa déficience en protéases Lon et OmpT limite la dégradation des protéines qui y sont exprimées. Elle renferme dans son chromosome le gène *lacI* et celui de l'ARN polymérase du phage T7, ce dernier étant placé sous le contrôle du promoteur *lacUV5* inductible par l'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). Une souche BL21 modifiée, désignée G612, contient le plasmide PUBS520. Ce dernier porte un gène de résistance à la kanamycine, et le gène *dnaY* d'*E. coli* qui code pour un ARNt^{Arg} isoaccepteur spécifique des codons AGG et AGA (Brinkmann *et al.*, 1989). La surexpression de ce gène permet une traduction plus efficace d'ARN messagers qui renferment un nombre élevé de ces codons et qui sont habituellement peu exprimés dans la souche bactérienne originelle.

I.3.3 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

La souche GV3101 contient le gène de résistance à la rifampicine dans son chromosome. Son plasmide Ti « désarmé », porte les gènes *vir* de virulence mais il est délété des gènes oncogènes (*onc*)

et des bordures du T-DNA. Il permet le transfert en *trans* de séquences d'ADN d'intérêt, introduites entre des bordures artificielles et portées par un vecteur binaire (pBin), au sein du génome nucléaire de plante. Cette souche est utilisée pour la transgénèse d'*Arabidopsis*.

I.5 Plasmides

I.5.1 Plasmide pCK-EGFP

Le plasmide pCK-EGFP (~4,5 kpb) permet l'expression transitoire *in vivo* de protéines hétérologues fusionnées à la EGFP (Clontech) et de ce fait, l'étude de leur localisation cellulaire ou tissulaire. La EGFP diffère de la protéine GFP sauvage provenant de la méduse *Aequorea victoria* par certains acides aminés du chromophore ce qui modifie ses propriétés spectrales et augmente sa fluorescence. L'ORF de la EGFP est placé sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV dont la séquence « enhancer » a été dédoublée pour stimuler la transcription du gène d'intérêt. Les sites de restriction uniques *NcoI* et *XbaI*, localisés en aval de l'ORF de la EGFP, sont utilisés pour le clonage directionnel et en phase de la séquence d'intérêt. Le plasmide porte également le gène de la β -lactamase conférant une résistance à l'ampicilline, ce qui permet la sélection des bactéries transformées.

I.5.2 Vecteur pET-3a

Ce plasmide (~4,6 kpb), permet une bonne expression dans *E.coli* de protéines hétérologues, dépourvues de domaine de fusion (Rosenberg *et al.*, 1987). La cassette de clonage renferme les sites de restriction uniques *NdeI*, *BamHI* et *CeIII*. Elle est flanquée en 5' du promoteur $\phi 10$ du gène 10 du phage T7 reconnu par l'ARN polymérase du phage T7 suivi d'une séquence Shine-Dalgarno et en 3', du terminateur de ce même gène. Le vecteur contient également un gène de résistance à l'ampicilline.

Le vecteur pET-3a a été modifié en introduisant entre les sites *NdeI* et *BamHI*, un fragment de 15 pb dont la séquence désignée Ka code pour un pentapeptide phosphorylable *in vitro* par une protéine kinase d'origine bovine. Une séquence constituée des sites de restriction uniques *KpnI* et *SacI* séparés par une séquence aléatoire de 6 pb, a par ailleurs été insérée dans le site *BamHI*. Ce vecteur modifié appelé pET-KaKS permet d'exprimer des protéines hétérologues pouvant être marquées radioactivement *in vitro* en présence de ^{32}P - γ -ATP et de protéine kinase et ainsi, servir de sondes pour étudier *in vitro* les interactions protéine-protéine.

I.5.3 Plasmides pGEX

Les plasmides pGEX sont utilisés pour l'expression dans *E. coli* de protéines recombinantes fusionnées à leur extrémité N-terminale, à la Glutathion S-Transférase (GST). La séquence d'intérêt est clonée sous la dépendance du promoteur inductible *tac* reconnu par l'ARN polymérase du phage T7, et en fusion avec l'ORF codant pour la GST. La présence du répresseur LacI dans *E. coli* réprime la transcription du gène d'intérêt en absence d'IPTG. Ces vecteurs portent la résistance à l'ampicilline. Le plasmide pGEX-6P code pour un site de clivage reconnu par la protéase PreScission (Amersham) permettant ainsi de libérer la protéine d'intérêt de la GST. Les plasmides pGEX-6P recombinants codant respectivement pour les importines α et β de riz utilisés pour nos expériences, nous ont été fournis par le Docteur Thomas Merkle, Université de Bielefeld, Allemagne. Les ORFs correspondants ont été clonés en phase et en aval de l'ORF de la GST entre les sites de restriction uniques *EcoRI* et *SmaI* pour l'importine α , et *EcoRI* et *XhoI* pour l'importine β .

I.5.4 Plasmide pBin61

Le plasmide pBin61 (Voinnet *et al.*, 2000) est un vecteur binaire de 12,9 kpb, dérivé du plasmide pBin19 (Bevan, 1984), et est utilisé pour des expériences de transgénèse végétale *via Agrobacterium tumefaciens*. Il porte un T-DNA renfermant une cassette de clonage permettant l'expression de séquences d'intérêt sous contrôle des éléments promoteur et terminateur 35S du CaMV. Il renferme également le gène de résistance à la kanamycine.

II Méthodes

II.1 Préparation d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est préparé selon la technique de lyse alcaline puis purifié par chromatographie sur résine échangeuse d'anions.

Un volume (approprié à l'utilisation du plasmide) de milieu de culture LB (bactotryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 0,5%) contenant de l'ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) estensemencé à partir d'une colonie bactérienne recombinante. Après 12 heures d'incubation à 37°C sous agitation, le milieu de culture est centrifugé à 5 000 rpm pendant 10 minutes, puis le culot bactérien est remis en suspension et traité selon les instructions du fournisseur (Macherey-Nagel). La concentration en ADN

est déterminée par spectrophotométrie, sachant qu'une unité de densité optique à 260 nm correspond, pour un trajet optique de 1 cm, à une concentration de 50 µg d'ADN double brin par mL.

Les cultures sont réalisées dans un volume de 2 mL, 100 mL et 500 mL lorsque l'ADN plasmidique est destiné respectivement au séquençage, au clonage, à la transfection ou à l'inoculation de plantes par un vecteur viral. Ces volumes permettent des rendements moyens respectifs de l'ordre de 4 µg, 350 µg et 1 mg d'ADN.

II.2 Techniques de clonage

II.2.1 Amplification de séquences d'ADN par PCR

L'amplification *in vitro* des fragments d'ADN par PCR (« Polymerase Chain Reaction ») est effectuée grâce à l'ADN polymérase thermostable, isolée de *Thermus aquaticus* (Taq). Elle requiert deux amorces oligodésoxyribonucléotidiques spécifiques de la séquence à amplifier. Les réactions de PCR sont réalisées dans le milieu suivant :

| | |
|---|--------|
| ADN (0,1 µg/µL) | 1 µL |
| Tampon d'amplification x10 | 5 µL |
| Mélange des quatre dNTP (10 mM) | 3 µL |
| Oligonucléotide 1 (10 µM) | 4 µL |
| Oligonucléotide 2 (10 µM) | 4 µL |
| Taq polymérase (2 U/µL) [Dynazyme, Biolabs] | 0,5 µL |
| H ₂ O qsp | 50 µL |

La composition du tampon d'amplification x1 est la suivante : Tris-HCl 20 mM pH 8,8, MgCl₂ 1,5 mM et Triton X-100 0,1%. La séquence d'ADN est amplifiée au cours d'une série de 35 cycles, comprenant chacun, une étape de dénaturation de l'ADN matriciel à 95°C, d'hybridation des amorces à une température égale à T_m - 5°C (T_m : température de fusion de l'hybride avec l'amorce ayant le plus faible contenu en G+C), et d'élongation des amorces à 72°C. Chaque étape a une durée d'une minute sauf lors du dernier cycle, où l'étape d'élongation est réalisée pendant 5 minutes afin de compléter les brins d'ADN dont la synthèse a été amorcée. La taille des fragments d'ADN amplifiés et le rendement de la réaction sont déterminés en analysant une fraction aliquote (5 µL) du milieu réactionnel par électrophorèse en gel d'agarose 1,5%. Ce dernier est préparé dans le tampon TBE (Tris-borate 45 mM et EDTA 2 mM, pH 8,6) et renferme 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium.

Le milieu réactionnel est ensuite traité au phénol/chloroforme (v/v), puis l'ADN est précipité en présence de 0,1 volume d'acétate de potassium 3 M pH 5,5 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu, à -

80°C pendant 20 minutes. L'ADN est sédimenté par une centrifugation de 30 minutes à 4°C et 13500 rpm, puis lavé dans l'éthanol 70%, séché et repris dans 50 µL d'eau stérile.

II.2.2 Hydrolyse de l'ADN à l'aide d'endonucléases de restriction

L'ADN plasmidique et les fragments d'ADN amplifiés sont hydrolysés par une ou deux endonucléases de restriction, selon les recommandations du fournisseur. Le milieu de digestion a la composition suivante :

| | |
|------------------------------------|--------|
| ADN (100 ng) | 1 µL |
| Tampon x10 | 10 µL |
| Enzyme(s) de restriction (10 U/µL) | 1 µL |
| H ₂ O qsp | 100 µL |

La réaction enzymatique est effectuée pendant trois heures à 37°C. Après élimination des enzymes par un traitement au phénol/chloroforme, les produits d'hydrolyse sont précipités en présence d'éthanol et repris dans 20 µL d'eau stérile. Lorsque le plasmide est hydrolysé en vue de son utilisation comme vecteur de clonage, il est également déphosphorylé au cours de l'incubation à 37°C en présence de 2 unités de phosphatase alcaline d'intestin de veau, pour éviter sa recircularisation lors de la réaction de ligation.

II.2.3 Ligation

La réaction de ligation est réalisée dans un volume réactionnel final de 20 µL, en présence de 2 unités d'ADN ligase du phage T4 et en utilisant un rapport molaire insert sur vecteur égal à 3, la quantité totale d'ADN étant inférieure à 200 ng. Elle s'effectue pendant une heure à température ambiante dans le tampon suivant : Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM et ATP 1 mM. Les produits de ligation sont ensuite extraits au phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol absolu et repris dans 10 µL d'eau stérile.

II.2.4 Transformation des bactéries

Un µL de la solution d'ADN issue de la réaction de ligation est mélangé à 40 µL de bactéries compétentes. Le mélange est transféré dans une cuve de 0,2 cm de section et soumis à une décharge électrique de 280 V/cm, sous une capacitance de 25 µF et une résistance de 200 Ohms. Après addition de 0,5 mL de milieu LB, les bactéries sont incubées pendant 30 minutes à 37°C pour permettre la régénération de leur paroi. Elles sont ensuite étalées à raison de 150 µL sur milieu LB gélosé

complémenté avec le ou les antibiotique(s) approprié(s) afin de sélectionner les bactéries transformées, et incubées une nuit à 37°C.

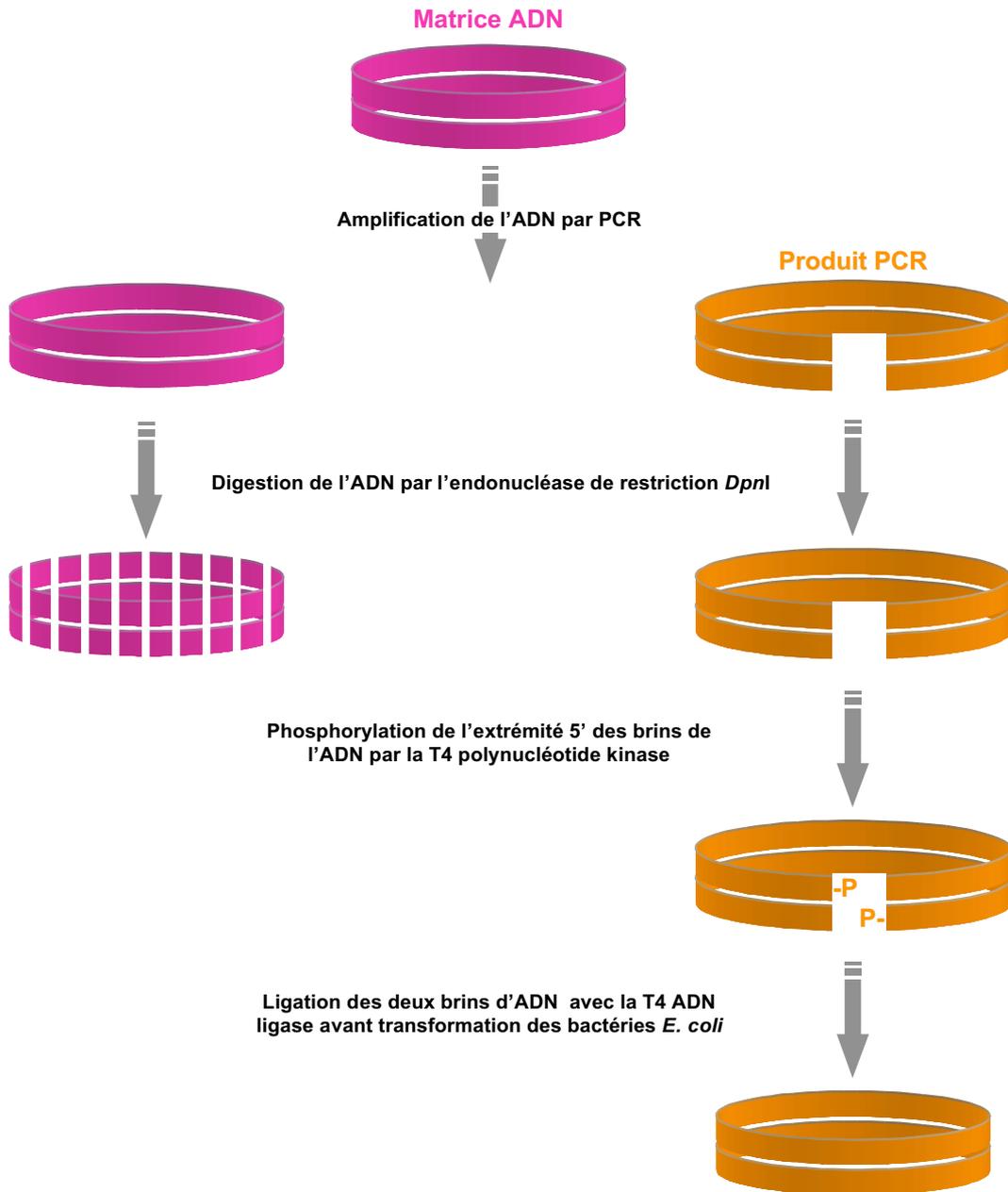
II.2.5 Analyse des plasmides recombinants

Les plasmides recombinants sont analysés par électrophorèse après une PCR réalisée directement sur les colonies bactériennes. Après repiquage sur milieu gélosé en boîte de Pétri, chaque colonie est transférée dans un microtube à l'aide d'un cure-dent puis mise en suspension dans le milieu de réaction de PCR contenant les amorces oligonucléotidiques spécifiques du fragment d'ADN cloné. Les conditions de la PCR sont identiques à celles décrites précédemment (§ II.2.1). Lors de la première étape du cycle de PCR, sous l'effet de la chaleur, les bactéries sont lysées et l'ADN plasmidique libéré est dénaturé. Après la réaction, les produits de PCR sont mis à migrer en gel d'agarose 1,5% afin d'identifier les plasmides recombinants. La séquence des plasmides sélectionnés est vérifiée par séquençage automatique selon la méthode des didésoxyribonucléotides, dans le service de séquençage de l'institut.

II.3 Mutagenèse dirigée par PCR

Cette technique permet d'introduire diverses mutations (délétion, insertion, mutation ponctuelle) dans une séquence d'intérêt préalablement clonée dans un vecteur plasmidique, grâce à une PCR réalisée en présence de deux amorces oligonucléotidiques qui s'hybrident de part et d'autre de la séquence à éliminer comme illustré dans la figure 57 ou contenant la ou les mutations désirées. La réaction est réalisée dans le milieu décrit précédemment (§ II.2.1) en présence de l'ADN matriciel (50 à 100 ng) et de la Taq polymérase *isis* (Q.Biogen). Cette enzyme se caractérise par sa fidélité due à une activité 3'-5' exonucléasique et par sa processivité élevée ce qui permet d'amplifier des ADN plasmidiques de 6 à 12 kpb. La PCR comprend une série de vingt cycles. Les étapes s'effectuent comme décrit précédemment mais la température de dénaturation peut être augmentée à 99°C pour favoriser la dénaturation d'ADN matriciel de grande taille. Après vérification du rendement de la réaction par analyse d'une fraction aliquote sur gel d'agarose 0,8%, l'ADN est traité par l'enzyme de restriction *DpnI* qui digère les brins parentaux. En effet, l'ADN plasmidique extrait d'*E. coli* est méthylé et sera sensible à *DpnI* contrairement à l'ADN néosynthétisé au cours de la PCR qui est dépourvu de groupements méthyles. Les extrémités 5' de l'ADN amplifié sont ensuite phosphorylées dans le milieu réactionnel suivant :

A.



B.

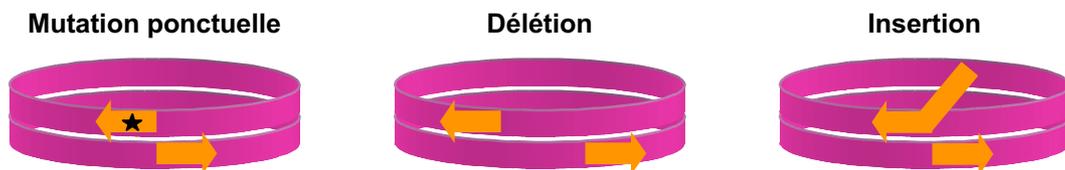


Figure 57 : Représentation schématique des différentes étapes de mutagenèse dirigée selon la technique décrite par Stratagène (2004). A. Représentation schématique des différentes étapes du protocole. B. Schématisation des amorces oligonucléotidiques choisies selon le type de mutation à réaliser.

| | |
|------------------------------------|-----------|
| ADN | 10 ng |
| Tampon 10x | 5 µL |
| T4 polynucléotide kinase (10 U/µL) | 1 µL |
| ATP (10 mM) | 5 µL |
| H ₂ O | qsp 50 µL |

La composition du tampon de phosphorylation x1 est la suivante : Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, spermidine 0,1 mM et EDTA 1mM. L'étape de ligation subséquente est réalisée comme décrite précédemment (§ II.2.3). Enfin, un µL de produit de ligation est finalement mélangé à 40 µL de bactéries *E. coli* X-L1 blue compétentes pour la transformation par électroporation (§ II.2.4). Les clones recombinants sont identifiés après séquençage de leur ADN plasmidique.

II.4 Préparation et analyses d'ARN

II.4.1 Extraction des ARN

Cent mg de tissu végétal sont réduits en poudre fine avec de l'azote liquide dans un mortier puis broyés en présence de 1 mL de TRIZOL® (Invitrogen), une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine. Après transfert dans un tube, 200 µL de chloroforme sont ajoutés puis le mélange est homogénéisé pendant 15 à 20 secondes, puis laissé 2 minutes à température ambiante. Les phases aqueuse et organique sont alors séparées par 15 minutes de centrifugation à 14000 rpm et 4°C. La phase supérieure aqueuse (~600 µL) est transférée dans un nouveau tube, mélangée avec 1 volume d'isopropanol 100% et incubée 5 minutes à température ambiante. Ensuite, l'ARN est sédimenté par centrifugation (14000 rpm, 4°C, 15 minutes), le surnageant est éliminé et le culot lavé dans de l'éthanol 80%. Les ARN sont alors remis en suspension dans 20-40 µL de formamide 50%.

La concentration des échantillons est déterminée en mesurant la DO d'une dilution au 1/100, à l'aide d'un spectrophotomètre. La qualité des extraits totaux d'ARN et l'équivalence de charge entre les échantillons sont évaluées en déposant un volume contenant à 0,5 µg sur un gel d'agarose 1% pour comparer les quantités d'ARN ribosomiques 28S et 5S.

II.4.2 Northern Blot sur des ARN de haut poids moléculaire

Un gel d'agarose 1% dénaturant est préparé en faisant fondre 2 g d'agarose dans 150 mL d'eau désionisée. Vingt mL de tampon HEPES 10X (HEPES 200 mM, EDTA 10 mM, KOH 0,17 M, pH 7,8) sont additionnés puis la solution est laissée jusqu'à ce qu'elle soit à température ambiante. Trente-deux mL de formaldéhyde 100% sont ajoutés et le mélange est coulé pour former le gel.

Chaque échantillon d'ARN (5-10 μ g) est complété par 3 volumes de tampon de charge ARN (200 μ L de HEPES 10X, 1 mL de formamide désionisée, 320 μ L de formaldéhyde, 120 μ L d'un mélange glycérol 50%, 0,1% bleu de bromophénol, 8 μ L de bromure d'éthidium 0,5%). Les échantillons sont dénaturés à 65°C pendant 10 minutes puis mis 5 minutes dans la glace. Après leurs dépôts sur le gel, la migration s'effectue à 80 V, pendant 5 à 6 heures dans un tampon HEPES 1X. Après migration, l'équivalence de charge des ARNr est contrôlé sous lumière UV et le gel photographié. Les ARN sont alors transférés par capillarité sur une membrane de nylon Hybond™-NX (Amersham) pendant une nuit dans un tampon SSC 20X (Citrates de sodium trisodique 0,3 M, NaCl 3 M). Puis les ARN sont fixés aux UV à l'aide d'un stratalinker® (1200 Joules x100).

II.4.3 Northern Blot sur des ARN de faible poids moléculaire

Le gel de polyacrylamide 17,5% dénaturant est préparé en mélangeant 12,6 g d'urée, 13,1 mL d'acrylamide/bis-acrylamide 19:1, et 1,5 mL de TBE 10X. Après dissolution de l'urée à 37°C, le volume est ajusté à 30 mL avec de l'eau. Après ajout de 96 μ L de persulfate de potassium 25% préparé extemporanément et 11 μ L de TEMED, le mélange est homogénéisé et coulé entre les plaques du système Biorad Protein-III.

Les ARN (15-25 μ g/échantillon) sont dénaturés pendant 4 minutes à 95°C et placés 10 minutes dans la glace, avant d'ajouter 4 μ L de tampon de charge (glycérol 50%, Tris-HCl 50 mM pH 7,7, EDTA 5 mM, bleu de bromophénol 0,03%). Après une pré-migration du gel pendant 30 minutes à 80V dans un tampon TBE 0,5X, les puits sont lavés avec du tampon de migration et les échantillons d'ARN sont déposés et mis à migrer pendant 3 à 4 heures à 80 V.

Les ARN sont transférés sur une membrane de nylon Hybond™-NX (Amersham) dans du tampon TBE 0,5X à 80 V (350 mA) pendant une heure à 4°C à l'aide d'un appareil à électro-transfert Biorad. La membrane est équilibrée avec du SSC 2X pendant 10 à 20 minutes sur du papier Whatmann préalablement imbibée avec cette solution et les ARN fixés avec un stratalinker comme décrit précédemment (§ II.4.2). L'équivalence de charge est déterminée par détection du snRNA U6.

II.4.4 Hybridation des ARN

Les ARN sont hybridés avec une sonde ADN marquée soit par "random-priming" soit par phosphorylation de son extrémité 5' lorsqu'elle est constituée d'un oligonucléotidique.

- Préparation de sondes par "random-priming" (Prime-a-gene labelling kit, Promega)

Cinquante ng d'ADN issu d'un produit PCR correspondant à la séquence à détecter sont dénaturés dans 30 μ L d'eau, à 95°C pendant 5 minutes, puis placés 5 minutes dans la glace. Le marquage isotopique est réalisé pendant une heure à 37°C dans le milieu réactionnel suivant :

| | |
|--|-------------|
| ADN | 50 ng |
| Tampon 10X | 5 μ L |
| dATP | 20 μ M |
| dGTP | 20 μ M |
| dTTP | 20 μ M |
| ³² P- γ -CTP (110 TBq/mmol ; 10 μ Ci/ μ L) | 2,5 μ L |
| BSA (20 μ g/ μ L) | 1 μ L |
| Klenow DNA polymerase (100 U/ μ L) | 1 μ L |
| H ₂ O qsp | 50 μ L |

Les nucléotides non-incorporés sont éliminés en filtrant le milieu réactionnel sur une colonne de séphadex G-50 par 2 minutes de centrifugation à 2000 rpm. La colonne a été préparée préalablement en asséchant 300 μ L de sephadex G-50 par 2 minutes de centrifugation à 2000 rpm. La sonde ainsi purifiée, est dénaturée à 95°C pendant 5 minutes et placée 5 minutes dans la glace avant hybridation.

- Préparation de sondes phosphorylées à l'extrémité 5' (New England Biolabs)

Le marquage des oligonucléotides s'effectue pendant 45 minutes à 37°C dans le milieu suivant :

| | |
|--|-------------|
| Oligonucléotide (10 μ M) | 2 μ L |
| Tampon PNK 10X | 2 μ L |
| ³² P- γ -ATP (110 TBq/mmol ; 10 μ Ci/ μ L) | 2,5 μ L |
| T4 Polynucléotide kinase (10 u/ μ L) | 1 μ L |
| H ₂ O qsp | 20 μ L |

Les nucléotides non-incorporés sont éliminés comme précédemment mais sur une colonne de sephadex G-25 (Amersham).

- Hybridation

Les membranes sont pré-hybridées à la température d'hybridation pendant au minimum 10 minutes dans du tampon PerfectHyb Plus (SIGMA), puis la sonde est introduite dans le tampon. Les étapes d'hybridation se réalisent pendant la nuit à 65°C ou 42°C pour respectivement, les ARN de haut et de faible poids moléculaire.

- Lavages

Les membranes sont lavées à deux reprises pendant 15 minutes à 65°C dans le tampon de faible stringence SSC 2X, SDS 0,1% pour les ARN de haut poids moléculaire et à 50°C dans le tampon SSC 2X, SDS 2% pour les ARN de faible poids moléculaire. Si nécessaire, un lavage supplémentaire de 15 minutes peut être réalisé dans un tampon de forte stringence (SSC 0,5X, SDS 0,1%).

II.5 Analyses de protéines

II.5.1 Expression des protéines hétérologues dans la souche *E. coli* G612

Les bactéries recombinantes sont mises en culture sous agitation à 37°C, dans 50 mL de milieu LB additionné d'ampicilline (100 µg/mL) et de kanamycine (50 µg/mL) jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase exponentielle de croissance (DO_{600 nm} de 0,4 environ). Après addition d'IPTG à une concentration finale de 1 mM pour induire l'expression de la protéine hétérologue, la culture est mise sous agitation à 28°C pendant 3 heures supplémentaires. Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, puis le culot est repris dans 2 mL de tampon HMK (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 12 mM et NaCl 100 mM). Les bactéries sont lysées par sonication trois fois pendant 20 secondes, à une puissance de 50 W, puis le lysat est centrifugé 15 minutes à 13000 rpm. Après prélèvement du surnageant, le culot comprenant les corps d'inclusion est repris dans 0,5 mL de tampon HMK.

II.5.2 Extraction de protéines de plante infectée ou transgénique

Deux disques de feuilles (~ 5 mg) sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce et broyés dans 100 µl d'une solution d'urée 8M/Laemmli 2X (v/v). L'analyse des protéines virales produites au cours de l'infection ou exprimées à partir d'un transgène est réalisée par la technique de « western blot » (§ II.5.3 et § II.5.4).

II.5.3 Fractionnement des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes, en présence de SDS 0,1% et d'un tampon de pH discontinu. Une solution d'acrylamide à 37,5% et de bisacrylamide à 1% est utilisée pour préparer le gel de concentration constitué de

polyacrylamide 5% dans le tampon Tris-HCl 125 mM pH 6,8, et le gel de résolution constitué de polyacrylamide 12% dans le tampon Tris-HCl 345 mM pH 8,8. Les deux gels contiennent du SDS 0,1%. Les échantillons protéiques sont additionnés d'un volume de tampon de dénaturation (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4%, β -mercaptoéthanol 10%, glycérol 20% et bleu de bromophénol 0,05%), puis chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Après leur dépôt, la migration a lieu pendant 2 heures à 150 V dans le tampon d'électrophorèse Tris 25 mM, glycine 192 mM pH 8,3 et SDS 0,1%. Les protéines, séparées selon leur poids moléculaire, sont colorées au bleu de Coomassie (éthanol 45% (v/v), bleu de Coomassie R250 0,2%), l'excès de colorant étant ensuite éliminé à l'aide d'un mélange d'éthanol 25% (v/v) et d'acide acétique 7,5% (v/v) ou peuvent être transférées sur membrane pour réaliser des expériences d'immunodétection (« western blot »).

II.5.4 Immunodétection des protéines par la technique de « western blot »

Le gel de polyacrylamide est mis en contact avec une membrane d'Immobilon-P (Millipore), préalablement perméabilisée dans de l'éthanol 70% puis saturée dans le tampon de transfert. Il est maintenu en place à l'aide de deux plaques de Plexiglass ajourées, de "Scotch brit" et de papier Whatman 3 MM. Le transfert des protéines est effectué à 80 V, à température ambiante pendant une heure dans le tampon Tris 25 mM, glycine 25 mM pH 8,3, éthanol 25% (v/v).

La membrane d'immobilon est ensuite lavée 15 minutes dans le tampon PBS-Tween 1% (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 1,8 mM, KH_2PO_4 1,8 mM pH 7,3 et Tween 20 1%), puis 30 minutes dans le tampon de saturation constitué de PBS-Tween 1% et de lait écrémé 5%. L'interaction des protéines avec l'anticorps primaire est effectuée dans le tampon de saturation, sous agitation, à 4°C pendant 4 heures au minimum. Les molécules d'anticorps en excès sont éliminées par 3 lavages de 10 minutes dans le tampon PBS-Tween 1%, puis la membrane est incubée pendant encore 2 heures à 4°C dans le tampon de saturation additionné de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase. Après 2 lavages comme décrit ci-dessus, si l'anticorps secondaire est couplé à la phosphatase alcaline, la membrane est équilibrée durant 30 minutes dans une solution de diéthanolamine 0,1 M pH 9,6, puis les complexes immuns sont révélés en présence de NBT (chlorure de bleu de 4-nitrotétrazolium) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et de MgCl_2 3 mM. Lorsque l'anticorps secondaire est conjugué à la peroxydase, la révélation se fait par réaction de chimio-luminescence (lumi-light PLUS ; Roche).

II.5.5 Marquage *in vitro* des protéines au phosphore ³²P

La phosphorylation des protéines exprimées à partir du vecteur pET-KaKS est réalisée en présence d'une protéine kinase d'origine bovine (Sigma) et de ³²P-γ-ATP dans le milieu suivant :

| | |
|---|-------|
| Protéine (~ 0,1 µg/µL) | 10 µL |
| Tampon HMK x1 | 75 µL |
| ³² P-γ-ATP (110 TBq/mmol ; 10 Ci/µL) | 5 µL |
| Protéine kinase bovine (20 U) | 10 µL |

Le milieu réactionnel est incubé une heure à température ambiante puis après addition de 100 µL de tampon HMK, filtré à travers une colonne de Sephadex G-50 coulée dans une pipette Pasteur afin d'éliminer les molécules d'ATP non incorporées. Après filtration, l'éluat (500 µL) est traité par 50 µg de RNase pancréatique (Sigma) et 10 unités de DNase (Promega) pendant 30 minutes à 37°C, afin de dégrader les acides nucléiques contaminant les protéines.

La mesure de la radioactivité incorporée dans les protéines se fait de la manière suivante : 20 µL de l'éluat sont déposés sur un disque de papier Whatman 3MM qui est ensuite plongé dans un bain d'acide trichloroacétique (TCA) 5% froid. Après 15 minutes, les disques sont lavés à deux reprises d'abord dans du TCA 5% puis dans de l'éthanol 95% froid, séchés et enfin, placés dans des fioles à scintillation. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation.

II.5.6 Mise en évidence *in vitro* d'interactions protéine-protéine : technique du « GST-pulldown »

Environ 1 µg de protéine de fusion GST-importine est introduit dans 50 µL de tampon PBS renfermant des billes de Sépharose 4B couplées au glutathion. Le mélange est additionné de 450 µL de tampon PBS-Tween 1% et incubé pendant une heure à 4°C sous agitation douce. Les billes sont ensuite soumises à 3 lavages par des centrifugations brèves (2000 rpm) dans un mL de tampon précédent puis, mélangée à 30 µL d'extrait protéique bactérien contenant la protéine P6 ou ses dérivés préalablement marqués *in vitro* au phosphore 32 (§ II.5.5). Le mélange est ajusté à un volume final de 500 µL avec du tampon PBS-Tween 1% et incubé pendant 3 heures à 4°C sous agitation douce. Les billes sont alors lavées comme décrit auparavant et finalement remises en suspension dans 20 µL de tampon de dissociation. Après 5 minutes de chauffage à 100°C puis centrifugation à 13 000 rpm pendant 2 minutes, les protéines du surnageant sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant et révélées par autoradiographie.

II.6 Microscopie

II.6.1 Expression *in vivo* de protéines hétérologues dans des cellules de tabac BY-2 transfectées par bombardement à l'aide d'un canon à particules

Trois mL d'une culture de cellules BY-2 (§ I.2) âgée de 5 jours sont aspirés à travers un filtre en papier stérile, à l'aide d'un appareil de filtration Buchner pour recueillir une couche de cellules homogène. Le filtre est alors déposé dans une boîte, sur du milieu BY-2 gélosé.

Les billes de tungstène utilisées pour le bombardement des cellules sont préparées de la manière suivante. Deux mg de billes sont placés dans un microtube, désagrégés et stérilisés par une forte agitation dans un mL d'éthanol absolu pendant 3 minutes. Après élimination de l'éthanol, les billes sont séchées sous vide puis recouvertes par l'ADN plasmidique, en ajoutant successivement dans le tube et sous agitation continue, 33 µL de glycérol 50%, 10 µg d'ADN, 33 µL de CaCl₂ 2 M et 15 µL de spermidine 0,5 M. L'ensemble est laissé à température ambiante pendant 30 minutes. Les billes sont ensuite sédimentées par centrifugation à 800 rpm pendant une minute et, après élimination du surnageant, additionnées de 150 µL d'éthanol 70%. Cette opération est renouvelée en présence d'éthanol absolu, puis les billes sont séchées sous vide, mélangées à 30 µL d'éthanol absolu et finalement placées dans la glace.

Le bombardement des cellules BY-2 grâce au canon à particules s'effectue à une distance de 11 cm, sous une pression de 7 bars pendant 25 millisecondes. La boîte contenant le filtre recouvert de cellules, est surmontée d'une grille afin de disperser l'onde de choc causée par le tir. Elle est placée dans la chambre à 11 cm de la tête de seringue (buse) où ont été déposés 6 µL de billes recouvertes d'ADN. Le tir est réalisé dès que la chambre du canon est sous vide. Chaque boîte est soumise à deux bombardements successifs, puis incubée à 24°C, à l'obscurité pendant 12 à 72 heures.

II.6.2 Analyse de la localisation intracellulaire de protéines fusionnées à la EGFP par microscopie confocale

La localisation intracellulaire de protéines fusionnées à la EGFP est déterminée, après transfection de cellules de tabac BY-2, par observation au microscope confocal à balayage laser ZEISS LSM 510. Les cellules, entre lame et lamelle, sont observées à l'aide d'un objectif 63X à immersion à eau. L'excitation de la EGFP s'effectue à 488 nm à l'aide d'un laser Argon, dont le trajet optique est dévié à partir de la source par un miroir dichroïque qui envoie vers les cellules, les longueurs d'ondes inférieures ou égales à 488 nm. La fluorescence émise entre 505-545 nm par la EGFP excitée, est sélectionnée par un filtre d'émission BP505-530 puis recueillie par un

photomultiplicateur. Des images en contraste interférentiel différentiel (DIC) sont obtenues simultanément grâce à l'activation d'un second photomultiplicateur.

II.6.3 Analyse de tissu en microscopie électronique

Les feuilles de navet ou d'*Arabidopsis* sont coupées en lamelles de 1 mm x 10 mm à l'aide d'une lame de rasoir. Celles-ci sont placées dans un tube pendant 2 heures à température ambiante dans une solution de glutaraldéhyde 4% préparée dans un tampon phosphate 0,15 M pH 7,2. La préparation est incubée à 4°C pendant la nuit après addition d'acide picrique saturé à une concentration finale de 10%. Les échantillons sont alors lavés trois fois 15 minutes dans le tampon phosphate précédent puis incubés 2 heures dans un tampon phosphate 0,15M additionné de tetroxyde d'osmium 0,1%. Après trois lavages de 15 minutes chacun, les lamelles de feuilles sont placées dans une solution d'acétate d'uranyl pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont lavés par trois bains successifs de 30 minutes dans de l'eau stérile puis déshydratés, par des immersions de 30 minutes dans de l'éthanol de concentration croissante, 50%, 70%, et 90%. La dernière étape de déshydratation se fait par trois bains de minimum 30 minutes dans de l'éthanol 100%. Les lamelles sont alors placées successivement dans une solution d'oxyde de propylène/éthanol 100% (v/v), d'oxyde de propylène, de propylène/époxy (v/v) et d'époxy pure, chaque étape durant environ une demi-heure. Les échantillons de feuilles sont ensuite déposés dans un moule, recouverts d'époxy pure et laissés une nuit à 25°C. Enfin, la polymérisation se fait en incubant le moule à 60°C pendant 48 heures.

Les échantillons sont ensuite coupés en section de 90 µm d'épaisseur à l'aide d'un ultramicrotom (ultracut E microtom, Reichert), déposés sur grille et analysés avec un microscope électronique (Hitachi H-600) opérant à 75 kV.

II.7 Ingénierie de plantes

II.7.1 Transformation d'*Arabidopsis* par la méthode du « floral dip »

Ce protocole décrit précédemment par (Bechtold et Pelletier, 1998) présente certaines modifications.

Une colonie d'*Agrobacterium tumefaciens* transformée avec le plasmide approprié ou 20 µL d'un "glycérol-stock" sontensemencés dans 10 mL de milieu LB contenant l'antibiotique adéquat et mis à pousser toute la nuit à 28°C. Deux mL de cette pré-culture sont réensemencés dans 250 mL de LB complémenté par l'antibiotique de sélection et incubés une nuit à 28°C. Les bactéries sont ensuite

sédimentées par 15 minutes de centrifugation à 5000 rpm et remises en suspension dans un volume identique de milieu d'infiltration dont la composition est la suivante :

| | |
|----------------------------------|-------------|
| Milieu ½ Murashige et Skoog (MS) | 0,54 g |
| 5% saccharose | 12,5 g |
| Silvet L-77 | 125 μ l |
| Acétosyringone | 50 μ M |
| H ₂ O qsp | 250 ml |

Les plantes d'*Arabidopsis* en fleurs sont alors immergées pendant 90 secondes dans ce milieu puis placées dans une maxi-serre recouverte d'un film opaque pour maintenir l'humidité, pendant 48 heures.

II.7.2 Croisement génétique de plantes d'*Arabidopsis*

Des bourgeons floraux d'*Arabidopsis* sont émasculés pour éviter l'auto-fertilisation avant le croisement. Vingt-quatre heures plus tard, ces fleurs sont fertilisées avec le pollen d'une plante de génotype différent en frottant les sacs polliniques sur les carpels de la plante « femelle ». Environ trois semaines plus tard, les siliques issues du croisement sont récupérées et les graines semées.

II.7.3 Semis d'*Arabidopsis*

- Semis de graines en terre

Les graines d'*Arabidopsis* sont semées en terre et mises à pousser pendant 3 semaines (photopériode jour/nuit de 12/12 heures ; 20°C) puis transférées pendant 2 à 3 semaines dans des conditions de jour court (photopériode jour/nuit de 8/16 heures ; 18-20°C) pour favoriser le développement des rosettes.

- Semis de graines *in vitro*

Les graines d'*Arabidopsis* sont stérilisées par un premier lavage de 10 minutes dans de l'éthanol 70%, puis par un second lavage de 10 minutes dans de l'eau de javel 30%. Elles sont ensuite sédimentées pendant 15 secondes à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse et étalées sur une boîte de milieu de culture *in vitro*. Cette dernière est préparée avec du milieu Murashige et Skoog (MS) pour culture *in vitro* contenant des vitamines (MO222 Duchefa) et complétement avec du saccharose (BDH AnalarR, 10g/L), du MES (acide morpholino-2-ethanesulfonique) 0,5 g/L et de l'agar (Agar-agar, Merck, 8g/L) puis ajusté à pH 5,7 avec du KOH 1M. Le milieu est stérilisé avant l'ajout de l'antibiotique adéquat pour la sélection du transgène.

Les graines sont alors vernalisées pendant 48 heures à 4°C, puis les boîtes sont placées dans une chambre de culture *in vitro* pendant 2 à 3 semaines (photopériode jour/nuit 16/8 heures, 20-22°C,

2500 lux). Les transformants sont alors transférés en terre pendant 2 à 3 semaines supplémentaires dans des conditions de jour court (photopériode jour/nuit de 8/16 heures ; 18-20°C).

II.7.4 Inoculation mécanique de plantes par le CaMV

Le plasmide recombinant PMD324 contient le génome du CaMV (Cabb-JI), cloné dans le site de restriction *SaI*I présent dans l'ORF V (Delseny et Hull, 1983). Lorsque celui-ci sert d'inoculum, il est préalablement linéarisé par l'enzyme de restriction *SaI*I puis après vérification de l'efficacité de la digestion par analyse d'une fraction aliquote sur gel d'agarose, 2 µg d'ADN par plante sont inoculés mécaniquement à l'aide d'un abrasif (célite), saupoudré préalablement sur les feuilles pour provoquer des micro-blessures. Le CaMV peut également être inoculé à partir d'un broyat de feuilles infectées (100 mg) réduit en poudre fine dans de l'azote liquide puis repris dans 1 mL d'eau stérile.

Bibliographie

- Adenot, X., T. Elmayan, et al. (2006). "DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7." *Curr Biol* **16**(9): 927-32.
- Agama, K., S. Beach, et al. (2002). "The 5'-third of cauliflower mosaic virus gene VI conditions resistance breakage in *Arabidopsis* ecotype Tsu-0." *Phytopathology* **92**: 190-196.
- Al-Kaff, N. S. and S. N. Covey (1995). "Biological diversity of cauliflower mosaic virus isolates expressed in two *Brassica* species." *Plant Pathology* **44**: 516-526.
- Al-Kaff, N. S., S. N. Covey, et al. (1998). "Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen." *Science* **279**(5359): 2113-5.
- Al-Kaff, N. S., M. M. Kreike, et al. (2000). "Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene." *Nat Biotechnol* **18**(9): 995-9.
- Allen, E., Z. Xie, et al. (2005). "microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants." *Cell* **121**(2): 207-21.
- Allen, N. P., L. Huang, et al. (2001). "Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins." *J Biol Chem* **276**(31): 29268-74.
- Anjos, J. R., U. Jarlfors, et al. (1992). "Soybean mosaic potyvirus enhances the titer of two comoviruses in dually infected soybean plants." *Phytopathology* **82**: 17-23.
- Armour, S. L., U. Melcher, et al. (1983). "Helper component for aphid transmission encoded by region II of cauliflower mosaic virus DNA." *Virology* **129**: 25-30.
- Arts, G. J., M. Fornerod, et al. (1998). "Identification of a nuclear export receptor for tRNA." *Curr Biol* **8**: 305-314.
- Arts, G. J., S. Kuersten, et al. (1998b). "The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNA." *Embo J* **17**: 7430-7441.
- Ban, N., P. Nissen, et al. (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution." *Science* **289**(5481): 905-20.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* **116**(2): 281-97.
- Baulcombe, D. (2004). "RNA silencing in plants." *Nature* **431**(7006): 356-63.
- Baumberger, N. and D. C. Baulcombe (2005). "Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(33): 11928-33.
- Bayliss, R., S. W. Leung, et al. (2002). "Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats." *Embo J* **21**(12): 2843-53.
- Bayliss, R., T. Littlewood, et al. (2000). "Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking." *Cell* **102**(1): 99-108.
- Bayliss, R., T. Littlewood, et al. (2002b). "GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta." *J Biol Chem* **277**(52): 50597-606.
- Bayliss, R., K. Ribbeck, et al. (1999). "Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP." *J Mol Biol* **293**(3): 579-93.
- Bechtold, N. and G. Pelletier (1998). "In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration." *Methods Mol Biol* **82**: 259-66.
- Bednenko, J., G. Cingolani, et al. (2003). "Importin beta contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport." *J Cell Biol* **162**(3): 391-401.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* **409**(6818): 363-6.
- Bevan, M. (1984). "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation." *Nucleic Acids Res* **12**(22): 8711-21.
- Bisaro, D. M. (2006). "Silencing suppression by geminivirus proteins." *Virology* **344**(1): 158-68.
- Blanc, S., I. Schmidt, et al. (1993b). "Paracrystalline structure of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor produced both in plants and in a heterologous system and relationship with a solubilized active form." *Virology* **197**(1): 283-92.
- Blevins, T., R. Rajeswaran, et al. (2006). "Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing." *Nucleic Acids Res* **34**(21): 6233-46.
- Bollman, K. M., M. J. Aukerman, et al. (2003). "HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis." *Development* **130**(8): 1493-504.
- Bonneville, J. M., H. Sanfacon, et al. (1989). "Posttranscriptional trans-activation in cauliflower mosaic virus." *Cell* **59**: 1135-1143.
- Borsani, O., J. Zhu, et al. (2005). "Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*." *Cell* **123**(7): 1279-91.
- Bortolamiol, D., M. Pazhouhandeh, et al. (2007). "The Pterovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing." *Curr Biol*.
- Bouche, N., D. Laussergues, et al. (2006). "An antagonistic function for *Arabidopsis* DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs." *Embo J* **25**(14): 3347-56.
- Brennan, C. M., I. E. Gallouzi, et al. (2000). "Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo." *J Cell Biol* **151**(1): 1-14.
- Brigneti, G., O. Voinnet, et al. (1998). "Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*." *Embo J* **17**(22): 6739-46.
- Brinkmann, U., R. E. Mattes, et al. (1989). "High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product." *Gene* **85**(1): 109-14.
- Brodersen, P. and O. Voinnet (2006). "The diversity of RNA silencing pathways in plants." *Trends Genet* **22**(5): 268-80.
- Bureau, M. (2004b). Etude de la protéine P6 du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) :

- localisation cellulaire et identification de partenaires d'interaction. Paris, Université Paris VI. **Thèse de Doctorat.**
- Bureau, M., V. Leh, et al. (2004). "P6 protein of Cauliflower mosaic virus, a translation reinitiator, interacts with ribosomal protein L13 from *Arabidopsis thaliana*." J Gen Virol **85**(Pt 12): 3765-75.
- Caceres, J. F., G. R. Screaton, et al. (1998). "A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm." Genes Dev **12**(1): 55-66.
- Cao, X. and S. E. Jacobsen (2002). "Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes." Proc Natl Acad Sci U S A **99** Suppl 4: 16491-8.
- Carmell, M. A. and G. J. Hannon (2004). "RNase III enzymes and the initiation of gene silencing." Nat Struct Mol Biol **11**(3): 214-8.
- Carrington, J. C. and V. Ambros (2003). "Role of microRNAs in plant and animal development." Science **301**(5631): 336-8.
- Cecchini, E., Z. Gong, et al. (1997). "Transgenic *Arabidopsis* lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotypes and accumulate inclusion bodies." Mol Plant Microbe Interact **10**(9): 1094-101.
- Cerritelli, S. M., O. Y. Fedoroff, et al. (1998). "A common 40 amino acid motif in eukaryotic RNases H1 and caulimovirus ORF VI proteins binds to duplex RNAs." Nucleic Acids Res **26**(7): 1834-40.
- Champagne, J., M. E. Laliberte-Gagne, et al. (2007). "Phosphorylation of the termini of Cauliflower mosaic virus precapsid protein is important for productive infection." Mol Plant Microbe Interact **20**(6): 648-58.
- Chan, S. W., I. R. Henderson, et al. (2005). "Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*." Nat Rev Genet **6**(5): 351-60.
- Chapdelaine, Y., D. Kirk, et al. (2002). "Mutation of capsid protein phosphorylation sites abolishes cauliflower mosaic virus infectivity." J Virol **76**(22): 11748-52.
- Chellappan, P., R. Vanitharani, et al. (2005). "MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(29): 10381-6.
- Chellappan, P., R. Vanitharani, et al. (2004). "Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences." J Virol **78**(14): 7465-77.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, et al. (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." Nature **436**(7051): 740-4.
- Cheng, R. H., N. H. Olson, et al. (1992). "Cauliflower mosaic virus: a 420 subunit (T = 7), multilayer structure." Virology **186**(2): 655-68.
- Chow, C. W., M. Rincon, et al. (1997). "Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway." Science **278**(5343): 1638-41.
- Chuang, C. F. and E. M. Meyerowitz (2000). "Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4985-90.
- Cokol, M., R. Nair, et al. (2000). "Finding nuclear localization signals." EMBO Rep **1**(5): 411-5.
- Conti, E. and J. Kuriyan (2000). "Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha." Structure **8**(3): 329-38.
- Conti, E., M. Uy, et al. (1998). "Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha." Cell **94**(2): 193-204.
- Covey, S. N., N. S. Al-Kaff, et al. (1997). "Plants combat infection by gene silencing." Nature **385**: 781-782.
- Covey, S. N. and D. S. Turner (1991). "Comparison of viral nucleic acid intermediates at early and late stages of cauliflower mosaic virus infection suggests a feedback regulatory mechanism." J Gen Virol **72** (Pt 10): 2603-6.
- Cronshaw, J. M., A. N. Krutchinsky, et al. (2002). "Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex." J Cell Biol **158**(5): 915-27.
- Cros, J. F., A. Garcia-Sastre, et al. (2005). "An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein." Traffic **6**(3): 205-13.
- Cullen, B. R. (2003b). "Nuclear mRNA export: insights from virology." Trends Biochem Sci **28**(8): 419-24.
- Dalmay, T., A. Hamilton, et al. (2000b). "Potato virus X amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing." Plant Cell **12**(3): 369-79.
- Dalmay, T., A. Hamilton, et al. (2000). "An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus." Cell **101**(5): 543-53.
- Dargemont, C. and L. C. Kuhn (1992). "Export of mRNA from microinjected nuclei of *Xenopus laevis* oocytes." J Cell Biol **118**: 1-9.
- Dautel, S., T. Guidasci, et al. (1994). "The full-length product of cauliflower mosaic virus open reading frame III is associated with the viral particle." Virology **202**(2): 1043-1045.
- De Tapia, M., A. Himmelbach, et al. (1993). "Molecular dissection of the cauliflower mosaic virus translation transactivator." Embo J **12**(8): 3305-14.
- Deleris, A., J. Gallego-Bartolome, et al. (2006). "Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense." Science **313**(5783): 68-71.
- Delseny, M. and R. Hull (1983). "Isolation and characterization of faithful and altered clones of the genomes of cauliflower mosaic virus isolates Cabb B-JI, CM4-184, and Bari I." Plasmid **9**(1): 31-41.
- Diaz-Pendon, J. A., F. Li, et al. (2007). "Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs." Plant Cell **19**(6): 2053-63.

- Ding, S. W. and O. Voinnet (2007). "Antiviral immunity directed by small RNAs." *Cell* **130**(3): 413-26.
- Dixon, L. K. and T. Hohn (1984). "Initiation of translation of the cauliflower mosaic virus genome from a polycistronic mRNA: evidence from deletion mutagenesis." *Embo J* **3**(12): 2731-2736.
- Drucker, M., R. Froissart, et al. (2002). "Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2422-7.
- Dunoyer, P., C. Himber, et al. (2007). "Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways." *Nat Genet* **39**(7): 848-56.
- Dunoyer, P., C. Himber, et al. (2005). "DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal." *Nat Genet* **37**(12): 1356-60.
- Dunoyer, P., C. Himber, et al. (2006). "Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections." *Nat Genet* **38**(2): 258-63.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel, et al. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* **15**(2): 188-200.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, et al. (2001b). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." *Embo J* **20**(23): 6877-88.
- Fahlgren, N., T. A. Montgomery, et al. (2006). "Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*." *Curr Biol* **16**(9): 939-44.
- Fahrenkrog, B. and U. Aepli (2003). "The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(10): 757-66.
- Fischer, U., J. Huber, et al. (1995). "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs." *Cell* **82**(3): 475-83.
- Fontes, M. R., T. Teh, et al. (2000). "Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha." *J Mol Biol* **297**(5): 1183-94.
- Formerod, M., M. Ohno, et al. (1997). "Crm1 is an export receptor for leucine rich nuclear export signals." *Cell* **90**: 1051-1060.
- Forstemann, K., Y. Tomari, et al. (2005). "Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein." *PLoS Biol* **3**(7): e236.
- Franck, A., H. Guilley, et al. (1980). "Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA." *Cell* **21**(1): 285-94.
- Fridell, R. A., U. Fischer, et al. (1996). "Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1 Rev." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(7): 2936-40.
- Fried, H. and U. Kutay (2003). "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory." *Cell Mol Life Sci* **60**(8): 1659-88.
- Froissart, R., M. Uzest, et al. (2004). "Splicing of Cauliflower mosaic virus 35S RNA serves to downregulate a toxic gene product." *J Gen Virol* **85**(Pt 9): 2719-26.
- Fusaro, A. F., L. Matthew, et al. (2006). "RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway." *EMBO Rep* **7**(11): 1168-75.
- Futterer, J., K. Gordon, et al. (1990). "Positive and negative control of translation by the leader sequence of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA." *Embo J* **9**(6): 1697-707.
- Futterer, J. and T. Hohn (1991). "Translation of a polycistronic mRNA in the presence of the cauliflower mosaic virus transactivator protein." *Embo J* **10**(12): 3887-96.
- Gadal, O., D. Strauss, et al. (2001). "Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p." *Mol Cell Biol* **21**(10): 3405-15.
- Gandikota, M., R. P. Birkenbihl, et al. (2007). "The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings." *Plant J* **49**(4): 683-93.
- Gascioli, V., A. C. Mallory, et al. (2005). "Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs." *Curr Biol* **15**(16): 1494-500.
- Gazzani, S., T. Lawrenson, et al. (2004). "A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*." *Science* **306**(5698): 1046-8.
- Geri, C., E. Cecchini, et al. (1999). "Altered patterns of gene expression in *Arabidopsis* elicited by cauliflower mosaic virus (CaMV) infection and by a CaMV gene VI transgene." *Mol Plant Microbe Interact* **12**(5): 377-84.
- Gorlich, D., P. Henklein, et al. (1996). "A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus." *Embo J* **15**(8): 1810-7.
- Gruenbaum, Y., R. D. Goldman, et al. (2003). "The nuclear lamina and its functions in the nucleus." *Int Rev Cytol* **226**: 1-62.
- Gruter, P., C. Taberner, et al. (1998). "TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus." *Mol Cell* **1**(5): 649-59.
- Guerra-Peraza, O., M. de Tapia, et al. (2000). "Interaction of the cauliflower mosaic virus coat protein with the pregenomic RNA leader." *J Virol* **74**(5): 2067-72.
- Guo, H. S. and S. W. Ding (2002). "A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal." *Embo J* **21**(3): 398-407.
- Gwizdek, C., E. Bertrand, et al. (2001). "Terminal minihelix, a novel RNA motif that directs polymerase II transcripts to the cell cytoplasm." *J Biol Chem* **276**: 25910-25918.

- Haas, M., A. Geldreich, et al. (2005). "The open reading frame VI product of Cauliflower mosaic virus is a nucleocytoplasmic protein: its N terminus mediates its nuclear export and formation of electron-dense viroplasm." *Plant Cell* **17**(3): 927-43.
- Haasen, D., C. Kohler, et al. (1999). "Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* **20**(6): 695-705.
- Haasen, D. and T. Merkle (2002). "Characterization of an *Arabidopsis* homologue of the nuclear export receptor CAS by its interaction with importin α ." *Plant Biol* **4**: 432-439.
- Hamilton, A., O. Voinnet, et al. (2002). "Two classes of short interfering RNA in RNA silencing." *Embo J* **21**(17): 4671-9.
- Hamilton, A. J. and D. C. Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." *Science* **286**(5441): 950-2.
- Hamm, J., E. Darzynkiewicz, et al. (1990b). "The trimethylguanosine cap structure of U1 snRNA is a component of a bipartite nuclear targeting signal." *Cell* **62**(3): 569-77.
- Hamm, J. and I. W. Mattaj (1990). "Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus." *Cell* **63**(1): 109-18.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, et al. (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." *Nature* **404**(6775): 293-6.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *Nature* **418**(6894): 244-51.
- Havelda, Z., C. Hornyik, et al. (2003). "In situ characterization of *Cymbidium* Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*." *J Virol* **77**(10): 6082-6.
- Hebrard, E., M. Drucker, et al. (2001). "Biochemical characterization of the helper component of Cauliflower mosaic virus." *J Virol* **75**(18): 8538-46.
- Hedges, J., M. West, et al. (2005). "Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p." *Embo J* **24**(3): 567-79.
- Hemmings-Mieszczak, M., T. Hohn, et al. (2000). "Termination and peptide release at the upstream open reading frame are required for downstream translation on synthetic shunt-competent mRNA leaders." *Mol Cell Biol* **20**(17): 6212-23.
- Henderson, I. R. and S. E. Jacobsen (2007). "Epigenetic inheritance in plants." *Nature* **447**(7143): 418-24.
- Henderson, I. R., X. Zhang, et al. (2006). "Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning." *Nat Genet* **38**(6): 721-5.
- Hernandez-Pinzon, I., N. E. Yelina, et al. (2007). "SDE5, the putative homologue of a human mRNA export factor, is required for transgene silencing and accumulation of trans-acting endogenous siRNA." *Plant J* **50**(1): 140-8.
- Himber, C., P. Dunoyer, et al. (2003). "Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing." *Embo J* **22**(17): 4523-33.
- Himmelbach, A., Y. Chapdelaine, et al. (1996). "Interaction between cauliflower mosaic virus inclusion body protein and capsid protein: implications for viral assembly." *Virology* **217**(1): 147-57.
- Hiraguri, A., R. Itoh, et al. (2005). "Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Mol Biol* **57**(2): 173-88.
- Hiscox, J. A. (2007). "RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus." *Nat Rev Microbiol* **5**(2): 119-127.
- Ho, J. H. and A. W. Johnson (1999). "NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **19**(3): 2389-99.
- Ho, J. H., G. Kallstrom, et al. (2000). "Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit." *J Cell Biol* **151**(5): 1057-66.
- Ho, T., D. Pallett, et al. (2006). "A simplified method for cloning of short interfering RNAs from *Brassica juncea* infected with Turnip mosaic potyvirus and Turnip crinkle carmovirus." *J Virol Methods* **136**(1-2): 217-23.
- Hopper, A. K. and E. M. Phizicky (2003). "tRNA transfers to the limelight." *Genes Dev* **17**: 162-180.
- Huang, Y., R. Gattoni, et al. (2003). "SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export." *Mol Cell* **11**(3): 837-43.
- Huang, Y. and J. A. Steitz (2005). "SRprises along a messenger's journey." *Mol Cell* **17**(5): 613-5.
- Huang, Z., V. M. Andrianov, et al. (2001). "Identification of *Arabidopsis* proteins that interact with the cauliflower mosaic virus (CaMV) movement protein." *Plant Mol Biol* **47**(5): 663-75.
- Hull, R. (1970). *Matthews' plant virology*.
- Hull, R. and S. N. Covey (1983). "Characterisation of cauliflower mosaic virus DNA forms isolated from infected turnip leaves." *Nucleic Acids Res* **11**(6): 1881-95.
- Hunter, C. A., M. J. Aukermann, et al. (2003). "PAUSED encodes the *Arabidopsis* exportin-t ortholog." *Plant Physiol* **132**(4): 2135-2143.
- Hurt, E., S. Hannus, et al. (1999). "A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants." *J Cell Biol* **144**(3): 389-401.
- Itaya, A., X. Zhong, et al. (2007). "A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation." *J Virol* **81**(6): 2980-94.
- Izaurrealde, E., U. Kutay, et al. (1997). "The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus." *Embo J* **16**(21): 6535-47.
- Izaurrealde, E., J. Lewis, et al. (1995). "A cap-binding protein complex mediating U snRNA export." *Nature* **376**(6542): 709-12.
- Jackson, J. P., L. Johnson, et al. (2004). "Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for

- DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*." Chromosoma **112**(6): 308-15.
- Jacquot, E., A. Geldreich, et al. (1998). "Mapping regions of the cauliflower mosaic virus ORF III product required for infectivity." Virology **242**(2): 395-402.
- Jans, D. A., M. J. Ackermann, et al. (1991). "p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins." J Cell Biol **115**(5): 1203-12.
- Jones-Rhoades, M. W. and D. P. Bartel (2004). "Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA." Mol Cell **14**(6): 787-99.
- Joshua-Tor, L. (2006). "The Argonautes." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **71**: 67-72.
- Kalderon, D., W. D. Richardson, et al. (1984b). "Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen." Nature **311**(5981): 33-8.
- Kalderon, D., B. L. Roberts, et al. (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." Cell **39**(3 Pt 2): 499-509.
- Kanno, T., M. F. Mette, et al. (2004). "Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation." Curr Biol **14**(9): 801-5.
- Karsies, A., T. Merkle, et al. (2002). "Regulated nuclear targeting of cauliflower mosaic virus." J Gen Virol **83**(Pt 7): 1783-90.
- Khan, M. A. and J. W. Demski (1982). "Identification of turnip mosaic and cauliflower mosaic viruses naturally infecting collards." Plant Dis **66**: 253-256.
- Khelifa, M., S. Journou, et al. (2007). "Electron-lucent inclusion bodies are structures specialized for aphid transmission of cauliflower mosaic virus." J Gen Virol **88**(Pt 10): 2872-80.
- Kiraly, L., A. B. Cole, et al. (1999). "Systemic cell death is elicited by the interaction of a single gene in *Nicotiana glauca* and gen VI of cauliflower mosaic virus." Mol Plant Microbe Interact **12**: 919-925.
- Kiss-Laszlo, Z., S. Blanc, et al. (1995). "Splicing of cauliflower mosaic virus 35S RNA is essential for viral infectivity." Embo J **14**(14): 3552-62.
- Kobayashi, K. and T. Hohn (2003). "Dissection of cauliflower mosaic virus transactivator/viroplasm reveals distinct essential functions in basic virus replication." J Virol **77**(15): 8577-83.
- Kobe, B. (1999). "Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha." Nat Struct Biol **6**(4): 388-97.
- Koffa, M. D., J. B. Clements, et al. (2001). "Herpes simplex virus ICP27 protein provides viral mRNAs with access to the cellular mRNA export pathway." Embo J **20**(20): 5769-78.
- Kohler, A. and E. Hurt (2007). "Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 761-73.
- Kopito, R. R. (2000). "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation." Trends Cell Biol **10**(12): 524-30.
- Kozak, M. (1986). "Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes." Cell **47**(4): 481-3.
- Kozak, M. (2002). "Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation." Gene **299**(1-2): 1-34.
- Kunzler, M. and E. C. Hurt (1998). "Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast." FEBS Lett **433**(3): 185-90.
- Kurihara, Y., Y. Takashi, et al. (2006). "The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis." Rna **12**(2): 206-12.
- Kurihara, Y. and Y. Watanabe (2004). "Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12753-8.
- Kutay, U., F. R. Bischoff, et al. (1997). "Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor." Cell **90**(6): 1061-71.
- Kutay, U., G. Lipowsky, et al. (1998). "Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor." Mol Cell **1**(3): 359-369.
- Lakatos, L., G. Szittyá, et al. (2004). "Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses." Embo J **23**(4): 876-84.
- Latorre, P., D. Kolakofsky, et al. (1998). "Sendai virus Y proteins are initiated by a ribosomal shunt." Mol Cell Biol **18**(9): 5021-31.
- Le Hir, H., D. Gatfield, et al. (2001). "The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay." Embo J **20**(17): 4987-97.
- Le Hir, H., E. Izaurralde, et al. (2000). "The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions." Embo J **19**(24): 6860-9.
- Leclerc, D., L. Burri, et al. (1998). "The open reading frame III product of cauliflower mosaic virus forms a tetramer through a N-terminal coiled-coil." J Biol Chem **273**(44): 29015-21.
- Leclerc, D., Y. Chapdelaine, et al. (1999). "Nuclear targeting of the cauliflower mosaic virus coat protein." J Virol **73**(1): 553-60.
- Lee, S. J., Y. Matsuura, et al. (2005). "Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP." Nature **435**(7042): 693-6.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-9.
- Lee, Y., I. Hur, et al. (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." Embo J **25**(3): 522-32.
- Leh, V., E. Jacquot, et al. (1999). "Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein." Embo J **18**(24): 7077-85.
- Leh, V., P. Yot, et al. (2000). "The cauliflower mosaic virus translational transactivator interacts with the 60S ribosomal subunit protein L18 of *Arabidopsis thaliana*." Virology **266**(1): 1-7.
- Li, F. and S. W. Ding (2006). "Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity." Annu Rev Microbiol **60**: 503-31.

- Li, J., Z. Yang, et al. (2005). "Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis." *Curr Biol* **15**(16): 1501-7.
- Li, Y. and S. M. Leisner (2002). "Multiple domains within the Cauliflower mosaic virus gene VI product interact with the full-length protein." *Mol Plant Microbe Interact* **15**(10): 1050-7.
- Lin, X., B. Sun, et al. (2003). "Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding." *Mol Cell* **11**(5): 1389-96.
- Lipowsky, G., F. R. Bischoff, et al. (1999). "Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA." *Rna* **5**(4): 539-49.
- Lippman, Z. and R. Martienssen (2004). "The role of RNA interference in heterochromatic silencing." *Nature* **431**(7006): 364-70.
- Liu, J., M. A. Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* **305**(5689): 1437-41.
- Liu, Q. and G. Dreyfuss (1995). "In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2800-8.
- Llave, C., K. D. Kasschau, et al. (2002). "Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants." *Plant Cell* **14**(7): 1605-19.
- Llave, C., Z. Xie, et al. (2002b). "Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA." *Science* **297**(5589): 2053-6.
- Love, A. J., B. W. Yun, et al. (2005). "Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species." *Plant Physiol* **139**(2): 935-48.
- Lund, E. and J. E. Dahlberg (1998). "Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus." *Science* **282**: 2082-2085.
- Lund, E., S. Guttlinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science* **303**(5654): 95-8.
- Macara, I. G. (2001). "Transport into and out of the nucleus." *Microbiol Mol Biol Rev* **65**(4): 570-94, table of contents.
- Macrae, I. J., F. Li, et al. (2006). "Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**: 73-80.
- Mahajan, R., C. Delphin, et al. (1997). "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2." *Cell* **88**(1): 97-107.
- Marion, M. J. and C. Marion (1987). "Localization of ribosomal proteins on the surface of mammalian 60S ribosomal subunits by means of immobilized enzymes. Correlation with chemical cross-linking data." *Biochem Biophys Res Commun* **149**(3): 1077-83.
- Martinière, A., D. Gargani, et al. (2007). *Le Cauliflower mosaic virus utilise les microtubules pour permettre la formation d'un corps d'inclusion spécialisé dans la transmission*. 11èmes Rencontres de Virologie végétale, Aussois, France.
- Matunis, M. J., E. Coutavas, et al. (1996). "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex." *J Cell Biol* **135**(6 Pt 1): 1457-70.
- Matzke, M., A. J. Matzke, et al. (2001). "RNA: guiding gene silencing." *Science* **293**(5532): 1080-3.
- Mazzolini, L., P. Dabos, et al. (1989). "Further evidence that viroplasm are the site of cauliflower mosaic virus genome replication by reverse transcription during viral infection." *J. Gen. Virol.* **70**: 3439-3449.
- Melcher, U. (1989). "Symptoms of cauliflower mosaic virus infection in *A. thaliana* and turnip." *Bota gaz* **150**: 139-147.
- Merai, Z., Z. Kerenyi, et al. (2005). "Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity." *J Virol* **79**(11): 7217-26.
- Metzlaff, M., M. O'Dell, et al. (1997). "RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia." *Cell* **88**(6): 845-54.
- Michael, W. M. and G. Dreyfuss (1996). "Distinct domains in ribosomal proteins L5 mediate 5S rRNA binding and nucleolar localization." *J Biol Chem* **271**: 11571-11574.
- Michael, W. M., P. S. Eder, et al. (1997). "The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein." *Embo J* **16**(12): 3587-98.
- Moissiard, G. (2007). Induction, suppression and amplification of RNA silencing during viral infection. *IBMP*. Strasbourg, Université Louis Pasteur.
- Moissiard, G., E. A. Parizotto, et al. (2007). "Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins." *Rna*.
- Moissiard, G. and O. Voinnet (2006). "RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(51): 19593-8.
- Molnar, A., T. Csorba, et al. (2005). "Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs." *J Virol* **79**(12): 7812-8.
- Morel, J. B., C. Godon, et al. (2002). "Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance." *Plant Cell* **14**(3): 629-39.
- Moy, T. I. and P. A. Silver (1999). "Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins." *Genes Dev* **13**(16): 2118-33.
- Nagata, T., Y. Nemoto, et al. (1992). "Tobacco BY-2 cells lines as the "Hela" cell in the cell biology of higher plants." *Int Rev Cytol* **132**: 1-30.
- Nakazawa, Y., A. Hiraguri, et al. (2007). "The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway." *Plant Mol Biol* **63**(6): 777-85.
- Nakielny, S., U. Fischer, et al. (1997). "RNA transport." *Annu Rev Neurosci* **20**: 269-301.
- Napoli, C., C. Lemieux, et al. (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of

- Homologous Genes in trans." *Plant Cell* **2**(4): 279-289.
- Nemergut, M. E. and I. G. Macara (2000). "Nuclear import of the ran exchange factor, RCC1, is mediated by at least two distinct mechanisms." *J Cell Biol* **149**(4): 835-50.
- Novoa, R. R., G. Calderita, et al. (2005). "Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis." *Biol Cell* **97**(2): 147-72.
- Nykanen, A., B. Haley, et al. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell* **107**(3): 309-21.
- Ohno, M., A. Segref, et al. (2000). "PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation." *Cell* **101**(2): 187-98.
- Onodera, Y., J. R. Haag, et al. (2005). "Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation." *Cell* **120**(5): 613-22.
- Ozawa, M., K. Fujii, et al. (2007). "Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication." *J Virol* **81**(1): 30-41.
- Palanichelvam, K., A. B. Cole, et al. (2000). "Agroinfiltration of Cauliflower mosaic virus gene VI elicits hypersensitive response in Nicotiana species." *Mol Plant Microbe Interact* **13**(11): 1275-9.
- Palauqui, J. C., T. Elmayan, et al. (1996). "Frequencies, Timing, and Spatial Patterns of Co-Suppression of Nitrate Reductase and Nitrite Reductase in Transgenic Tobacco Plants." *Plant Physiol* **112**(4): 1447-1456.
- Pantaleo, V., G. Szittyá, et al. (2007). "Molecular bases of viral RNA targeting by viral small interfering RNA-programmed RISC." *J Virol* **81**(8): 3797-806.
- Parizotto, E. A., P. Dunoyer, et al. (2004). "In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA." *Genes Dev* **18**(18): 2237-42.
- Park, H. S., K. S. Browning, et al. (2004). "Eucaryotic initiation factor 4B controls eIF3-mediated ribosomal entry of viral reinitiation factor." *Embo J* **23**(6): 1381-91.
- Park, H. S., A. Himmelbach, et al. (2001). "A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery." *Cell* **106**(6): 723-33.
- Park, M. Y., G. Wu, et al. (2005). "Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3691-6.
- Park, W., J. Li, et al. (2002). "CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana." *Curr Biol* **12**(17): 1484-95.
- Parker, J. S., S. M. Roe, et al. (2004). "Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity." *Embo J* **23**(24): 4727-37.
- Peragine, A., M. Yoshikawa, et al. (2004). "SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis." *Genes Dev* **18**(19): 2368-79.
- Perbal, M. C., C. L. Thomas, et al. (1993). "Cauliflower mosaic virus gene I product (P1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts." *Virology* **195**(1): 281-5.
- Pfeffer, S. and O. Voinnet (2006). "Viruses, microRNAs and cancer." *Oncogene* **25**(46): 6211-9.
- Plant, A. L., S. N. Covey, et al. (1985). "Detection of a subgenomic mRNA for gene V, the putative reverse transcriptase gene of cauliflower mosaic virus." *Nucleic Acids Res* **13**(23): 8305-21.
- Plisson, C., M. Uzest, et al. (2005). "Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy." *J Mol Biol* **346**(1): 267-77.
- Pooggin, M. M., T. Hohn, et al. (2000). "Role of a short open reading frame in ribosome shunt on the cauliflower mosaic virus RNA leader." *J Biol Chem* **275**(23): 17288-96.
- Pooggin, M. M., L. A. Ryabova, et al. (2006). "Mechanism of ribosome shunting in Rice tungro bacilliform pararetrovirus." *Rna* **12**(5): 841-50.
- Pruss, G., X. Ge, et al. (1997). "Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses." *Plant Cell* **9**(6): 859-68.
- Qi, Y., X. He, et al. (2006). "Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation." *Nature* **443**(7114): 1008-12.
- Qiu, S. G. and J. E. Schoelz (1992). "Three regions of cauliflower mosaic virus strain W260 are involved in systemic infection of solanaceous hosts." *Virology* **190**(2): 773-82.
- Rajagopalan, R., H. Vaucheret, et al. (2006). "A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana." *Genes Dev* **20**(24): 3407-25.
- Rand, T. A., S. Petersen, et al. (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." *Cell* **123**(4): 621-9.
- Rao, A., C. Luo, et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." *Annu Rev Immunol* **15**: 707-47.
- Ratcliff, F., B. D. Harrison, et al. (1997). "A similarity between viral defense and gene silencing in plants." *Science* **276**: 1558-1560.
- Reed, R. and E. Hurt (2002). "A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing." *Cell* **108**(4): 523-31.
- Remm, M., A. Remm, et al. (1999). "Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism." *J Virol* **73**(4): 3062-70.
- Ribbeck, K. and D. Gorlich (2001). "Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes." *Embo J* **20**(6): 1320-30.
- Richert-Poggeler, K. R. and R. J. Shepherd (1997). "Petunia vein-clearing virus: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function." *Virology* **236**(1): 137-46.

- Robbins, J., S. M. Dilworth, et al. (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." *Cell* **64**(3): 615-23.
- Roberts, K. and D. H. Northcote (1970). "Structure of the nuclear pore in higher plants." *Nature* **228**(5269): 385-6.
- Rochow, W. F. and A. F. Ross (1955). "Virus multiplication in plants doubly infected by potato viruses X and Y." *Virology* **1**: 10-27.
- Rosenberg, A. H., B. N. Lade, et al. (1987). "Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase." *Gene* **56**(1): 125-35.
- Rosenblum, J. S., L. F. Pemberton, et al. (1998). "Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein." *J Cell Biol* **143**(4): 887-99.
- Rothnie, H. M., Y. Chapdelaine, et al. (1994). "Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies." *Adv Virus Res* **44**: 1-67.
- Rout, M. P., J. D. Aitchison, et al. (2003). "Virtual gating and nuclear transport: the hole picture." *Trends Cell Biol* **13**(12): 622-8.
- Russo, G., G. Ricciardelli, et al. (1997). "Different domains cooperate to target the human ribosomal L7a protein to the nucleus and to the nucleoli." *J Biol Chem* **272**: 5229-5235.
- Rutjes, S. A., E. Lund, et al. (2001). "Identification of a novel cis-acting RNA element involved in nuclear export of hY RNA." *RNA* **7**: 741-752.
- Ryabova, L. A., M. M. Pooggin, et al. (2000). "Continuous and discontinuous ribosome scanning on the cauliflower mosaic virus 35 S RNA leader is controlled by short open reading frames." *J Biol Chem* **275**(47): 37278-84.
- Ryabova, L. A., M. M. Pooggin, et al. (2002). "Viral strategies of translation initiation: ribosomal shunt and reinitiation." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 1-39.
- Ryabova, L. A., M. M. Pooggin, et al. (2006). "Translation reinitiation and leaky scanning in plant viruses." *Virus Res* **119**(1): 52-62.
- Sanfacon, H., P. Brodmann, et al. (1991). "A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal." *Genes Dev* **5**(1): 141-149.
- Sanfacon, H. and T. Hohn (1990). "Proximity to the promoter inhibits recognition of cauliflower mosaic virus polyadenylation signal." *Nature* **346**(6279): 81-4.
- Schoelz, J. E., R. J. Shepherd, et al. (1986). "Gene VI of CaMV encodes a host range determinant." *J. Mol. Cell. Biol.* **6**: 2632-2637.
- Schwach, F., F. E. Vaistij, et al. (2005). "An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal." *Plant Physiol* **138**(4): 1842-52.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." *Cell* **115**(2): 199-208.
- Segref, A., K. Sharma, et al. (1997). "Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores." *Embo J* **16**(11): 3256-71.
- Sen, N., F. Cao, et al. (2004). "Translation of duck hepatitis B virus reverse transcriptase by ribosomal shunting." *J Virol* **78**(21): 11751-7.
- Shalla, T. A., R. J. Shepherd, et al. (1980). "Comparative cytology of nine isolates of *Cauliflower mosaic virus*." *Virology* **102**: 1267-1276.
- Shen, B. and H. M. Goodman (2004). "Uridine addition after microRNA-directed cleavage." *Science* **306**(5698): 997.
- Shepherd, R. J., G. E. Bruening, et al. (1970). "Double-stranded DNA from cauliflower mosaic virus." *Virology* **41**(2): 339-47.
- Shu-Nu, C., C. H. Lin, et al. (2000). "An acidic amino acid cluster regulates the nucleolar localization and ribosome assembly of human ribosomal protein L22." *FEBS Lett* **484**(1): 22-8.
- Sijen, T., J. Fleenor, et al. (2001). "On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing." *Cell* **107**(4): 465-76.
- Silhavy, D., A. Molnar, et al. (2002). "A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs." *Embo J* **21**(12): 3070-80.
- Siomi, H. and G. Dreyfuss (1995). "A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein." *J Cell Biol* **129**(3): 551-60.
- Song, J. J., S. K. Smith, et al. (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." *Science* **305**(5689): 1434-7.
- Souret, F. F., J. P. Kastenmayer, et al. (2004). "AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets." *Mol Cell* **15**(2): 173-83.
- Staelin, L. A. (1997). "The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains." *Plant J* **11**(6): 1151-65.
- Staginnus, C. and K. R. Richert-Poggeler (2006). "Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome." *Trends Plant Sci* **11**(10): 485-91.
- Stavolone, L., M. E. Villani, et al. (2005). "A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17): 6219-24.
- Stewart, M. (2007). "Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle." *mol Cell Biol* **8**: 195-208.
- Stoffler, D., B. Feja, et al. (2003). "Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport." *J Mol Biol* **328**(1): 119-30.
- Strasser, K. and E. Hurt (2001). "Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p." *Nature* **413**(6856): 648-52.
- Strasser, K., S. Masuda, et al. (2002). "TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export." *Nature* **417**(6886): 304-8.
- Strom, A. C. and K. Weiss (2001). "Importin-beta-like nuclear transport receptors." *Genome Biol* **2**: 3008.1-3008.9.
- Stutz, F. and E. Izaurralde (2003). "The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export." *Trends Cell Biol* **13**(6): 319-27.

- Sun, X. Y., I. Frazer, et al. (1995). "Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6B L2 protein." *Virology* **213**(2): 321-7.
- Sunkar, R. and J. K. Zhu (2004). "Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis." *Plant Cell* **16**(8): 2001-19.
- Szittyá, G., A. Molnár, et al. (2002). "Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus." *Plant Cell* **14**(2): 359-72.
- Tabara, H., E. Yigit, et al. (2002). "The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*." *Cell* **109**(7): 861-71.
- Takai, Y., T. Sasaki, et al. (2001). "Small GTP-binding proteins." *Physiol Rev* **81**(1): 153-208.
- Talcott, B. and M. S. Moore (2000). "The nuclear import of RCC1 requires a specific nuclear localization sequence receptor, karyopherin alpha3/Qip." *J Biol Chem* **275**(14): 10099-104.
- Thomas, C. L. and A. J. Maule (1995). "Identification of structural domains within the cauliflower mosaic virus movement protein by scanning deletion mutagenesis and epitope tagging." *Plant Cell* **7**(5): 561-72.
- Thomas, C. L. and A. J. Maule (1999). "Identification of inhibitory mutants of Cauliflower mosaic virus movement protein function after expression in insect cells." *J Virol* **73**(9): 7886-90.
- Tomari, Y., C. Matranga, et al. (2004). "A protein sensor for siRNA asymmetry." *Science* **306**(5700): 1377-80.
- Torruella, M., K. Gordon, et al. (1989). "Cauliflower mosaic virus produces an aspartic proteinase to cleave its polyproteins." *Embo J* **8**(10): 2819-25.
- Tsuge, S., K. Kobayashi, et al. (1999). "Cauliflower mosaic virus ORF III product forms a tetramer in planta: its implication in viral DNA folding during encapsidation." *Microbiol Immunol* **43**(8): 773-80.
- Uzest, M., A. Fereres, et al. (2007). *Caractérisation du récepteur d'un virus non-circulant chez son insecte vecteur*. 11èmes Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
- Vance, V. B. (1991). "Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y." *Virology* **182**(2): 486-94.
- Vance, V. B., P. H. Berger, et al. (1995). "5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco." *Virology* **206**(1): 583-90.
- Vargason, J. M., G. Szittyá, et al. (2003). "Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor." *Cell* **115**(7): 799-811.
- Vaucheret, H. (2005). "RNA polymerase IV and transcriptional silencing." *Nat Genet* **37**(7): 659-60.
- Vaucheret, H. (2006). "Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations." *Genes Dev* **20**(7): 759-71.
- Vazquez, F. (2006). "Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways." *Trends Plant Sci* **11**(9): 460-8.
- Vazquez, F., V. Gascioli, et al. (2004). "The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing." *Curr Biol* **14**(4): 346-51.
- Vazquez, F., H. Vaucheret, et al. (2004b). "Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs." *Mol Cell* **16**(1): 69-79.
- Verdel, A., S. Jia, et al. (2004). "RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex." *Science* **303**(5658): 672-6.
- Voinnet, O. (2005). "Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections." *Nat Rev Genet* **6**(3): 206-20.
- Voinnet, O. (2005b). "Non-cell autonomous RNA silencing." *FEBS Lett* **579**(26): 5858-71.
- Voinnet, O., C. Lederer, et al. (2000). "A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*." *Cell* **103**(1): 157-67.
- Voinnet, O., Y. M. Pinto, et al. (1999). "Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 14147-52.
- Voinnet, O., P. Vain, et al. (1998). "Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA." *Cell* **95**(2): 177-87.
- Wang, P., P. Palese, et al. (1997). "The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal." *J Virol* **71**(3): 1850-6.
- Wassenegger, M., S. Heimes, et al. (1994). "RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants." *Cell* **76**(3): 567-76.
- Wassenegger, M. and G. Krczal (2006). "Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases." *Trends Plant Sci* **11**(3): 142-51.
- Weber, F., G. Kochs, et al. (1998). "A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins." *Virology* **250**(1): 9-18.
- Weis, K., U. Ryder, et al. (1996). "The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import." *Embo J* **15**(8): 1818-25.
- West, M., J. B. Hedges, et al. (2005). "Defining the order in which Nmd3p and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits." *Mol Cell Biol* **25**(9): 3802-13.
- Whittaker, G. R. and A. Helenius (1998). "Nuclear import and export of viruses and virus genomes." *Virology* **246**(1): 1-23.
- Williams, L., C. C. Carles, et al. (2005). "A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the Arabidopsis ARF2, ARF3, and ARF4 genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(27): 9703-8.
- Wintermantel, W. M., E. J. Anderson, et al. (1993). "Identification of domains within gene VI of cauliflower mosaic virus that influence systemic infection of *Nicotiana glauca* in a light-dependent manner." *Virology* **196**(2): 789-98.

- Wolff, B., J. J. Sanglier, et al. (1997). "Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA." *Chem Biol* **4**(2): 139-47.
- Wolff, T., G. Unterstab, et al. (2002). "Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import." *J Biol Chem* **277**(14): 12151-7.
- Wood, L. D., B. J. Irvin, et al. (2003). "Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3257-62.
- Wu, J., M. J. Matunis, et al. (1995). "Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region." *J Biol Chem* **270**(23): 14209-13.
- Wurch, T., D. Kirchherr, et al. (1990). "The cauliflower mosaic virus open reading frame VII product can be expressed in *Saccharomyces cerevisiae* but is not detected in infected plants." *J Virol* **64**(6): 2594-2598.
- Xie, Z., E. Allen, et al. (2005). "Expression of Arabidopsis MIRNA genes." *Plant Physiol* **138**(4): 2145-54.
- Xie, Z., E. Allen, et al. (2005b). "DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in Arabidopsis thaliana." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(36): 12984-9.
- Xie, Z., L. K. Johansen, et al. (2004). "Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants." *PLoS Biol* **2**(5): E104.
- Yang, J., J. Liu, et al. (1997). "Subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors in vitro: chromatin recycling and nuclear export." *J Cell Biol* **137**(3): 523-38.
- Yang, Q., M. P. Rout, et al. (1998). "Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications." *Mol Cell* **1**(2): 223-34.
- Yang, Z., Y. W. Ebright, et al. (2006). "HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide." *Nucleic Acids Res* **34**(2): 667-75.
- Yao, W., D. Roser, et al. (2007). "Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2." *Mol Cell* **26**(1): 51-62.
- Ye, K., L. Malinina, et al. (2003). "Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing." *Nature* **426**(6968): 874-8.
- Ye, K. and D. J. Patel (2005). "RNA silencing suppressor p21 of Beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure." *Structure* **13**(9): 1375-84.
- Yi, R., Y. Qin, et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev* **17**(24): 3011-6.
- Yoshikawa, M., A. Peragine, et al. (2005). "A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis." *Genes Dev* **19**(18): 2164-75.
- Yu, B., Z. Yang, et al. (2005). "Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis." *Science* **307**(5711): 932-5.
- Yueh, A. and R. J. Schneider (2000). "Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA." *Genes Dev* **14**(4): 414-21.
- Zeng, Y. and B. R. Cullen (2004). "Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5." *Nucleic Acids Res* **32**(16): 4776-85.
- Zenkhusen, D., P. Vinciguerra, et al. (2002). "Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p." *Mol Cell Biol* **22**(23): 8241-53.
- Zhang, X., Y. R. Yuan, et al. (2006). "Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense." *Genes Dev* **20**(23): 3255-68.
- Zheng, X., J. Zhu, et al. (2007). "Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing." *Embo J* **26**(6): 1691-701.
- Zhou, Z., M. J. Luo, et al. (2000). "The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans." *Nature* **407**(6802): 401-5.
- Zijlstra, C. and T. Hohn (1992). "Cauliflower Mosaic Virus Gene VI Controls Translation from Dicistronic Expression Units in Transgenic Arabidopsis Plants." *Plant Cell* **4**(12): 1471-1484.
- Zilberman, D., X. Cao, et al. (2003). "ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation." *Science* **299**(5607): 716-9.

Etude de l'importation nucléaire de la protéine P6 du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et de son rôle dans la suppression du RNA silencing antiviral.

La protéine P6 du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), un pararétrovirus de plante, est un composant clé du cycle de multiplication du CaMV. Cette protéine multifonctionnelle est impliquée dans le déterminisme du spectre d'hôte, dans l'expression des symptômes de la virose, et dans la synthèse des autres protéines virales à partir d'un ARN polycistronique, selon un mécanisme non canonique. En outre, cette protéine forme des corps d'inclusion cytoplasmiques, les viroplasmes denses, considérés comme un compartiment viral où résident les étapes principales de la multiplication virale. Enfin, des données récentes ont montré que P6 est une protéine nucléo-cytoplasmique, laissant entrevoir qu'elle exerce une ou plusieurs fonctions au sein du noyau. Afin d'élucider le rôle nucléaire de P6, nous avons étudié la voie d'importation de cette protéine. Des expériences de mutagenèse dirigée et d'interaction protéine-protéine *in vitro* ont révélé que P6 est importée dans le noyau par l'importine α grâce à deux signaux de localisation nucléaire (NLS), l'un classique et l'autre atypique. Des expériences menées *in planta* ont également révélé que le transport nucléo-cytoplasmique de la protéine est essentiel pour l'infectivité du virus, attestant de l'importance de la ou des fonctions nucléaires de P6. Grâce à des études génétiques, nous avons pu démontrer qu'une des fonctions nucléaires de P6 est de supprimer le RNA silencing, un mécanisme paneucaryotique de régulation de l'expression des gènes, impliqué dans la défense contre les infections virales, dans le développement, et dans le maintien de l'intégrité du génome nucléaire.

Mots clés : virus, signal de localisation nucléaire, RNA silencing, suppresseur

Study of nuclear import of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) P6 protein and its role in RNA silencing suppression

The P6 protein of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), a plant pararetrovirus, is a key component of the CaMV replication cycle. This multifunctional protein is involved in host specificity, symptoms expression, and in viral proteins synthesis from a polycistronic viral RNA through a non-canonical strategy. It also forms cytoplasmic inclusion bodies, called viroplasm, which are considered as viral factories. Finally, recent studies indicate that P6 shuttles between the nucleus and the cytoplasm, suggesting that the protein has one or several nuclear functions. To elucidate this aspect, we first studied the nuclear import properties of P6. Directed mutagenesis experiments combined to protein-protein interaction assays revealed that P6 contains one canonical and one non-conventional nuclear localization signal (NLS), both of which are cooperatively required for its import through the importin α pathway. In addition, *in planta* experiments showed that P6 nucleocytoplasmic shuttling is essential for virus infectivity demonstrating the importance of its nuclear function(s). Through genetic approaches, we have uncovered one of these functions: nuclear P6 suppresses RNA silencing, a paneukaryotic mechanism for regulation of gene expression, involved in antiviral defence, in development and in maintenance of nuclear genome integrity.

Key words: virus, nuclear localization signal, RNA silencing, suppressor