

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG I - FRANCE
2008**

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: Sciences du Vivant,
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Diane BORTOLAMIOL

Les Polerovirus : Mode d'Action de leur Suppresseur et Approche Génétique du Tropisme Phloémien

Soutenue publiquement le 4 novembre 2008 devant la Commission d'Examen:

**Pr. Jean-Luc IMLER
Pr. Fernando GARCIA-ARENAL
Pr. Christophe ROBAGLIA
Dr. Olivier VOINNET
Dr. Véronique ZIEGLER-GRAFF**

**Rapporteur Interne
Rapporteur Externe
Rapporteur Externe
Examineur
Directrice de Thèse**

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (CNRS-IBMP UPR 2357)



Sommaire

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Sommaire | 1 |
| Acronymes, abréviations | 5 |
| Introduction | 8 |
| Première partie : les <i>Luteoviridae</i> | 9 |
| I-1) Particularités biologiques – classification | 9 |
| I-2) Gamme d’hôtes et symptômes | 11 |
| I-3) Processus épidémiologique et stratégies de contrôle des épidémies | 12 |
| I-4) Cycle viral | 15 |
| <u>I-4-1) Mouvement dans la plante (hôte)</u> | 15 |
| a) Mouvement de cellule à cellule | 15 |
| b) Mouvement à longue distance | 17 |
| c) Cas des <i>Luteoviridae</i> | 20 |
| <u>I-4-2) Mouvement dans le puceron (vecteur)</u> | 23 |
| a) Protéines du puceron impliquées dans la transmission | 26 |
| b) Méthodes d’inoculation artificielles | 27 |
| I-5) Expression des gènes des <i>Luteoviridae</i> | 29 |
| <u>I-5-1) Organisation génomique</u> | 29 |
| <u>I-5-2) Stratégies d’expression</u> | 29 |
| <u>I-5-3) Fonctions connues des différentes protéines virales</u> | 32 |
| a) La protéine P0 | 32 |
| b) La protéine P1 | 32 |
| c) La protéine P2 | 33 |
| d) La protéine P3 ou protéine majeure de capsid (CP) | 33 |
| e) La protéine P4 | 34 |
| f) La protéine P5 ou protéine mineure de capsid | 36 |
| g) Autres protéines virales putatives | 38 |
| Deuxième partie : le RNA silencing ou interférence à RNA | 39 |
| II-1) Protéines majeures du RNA silencing chez <i>Arabidopsis thaliana</i> | 40 |
| <u>II-1-1) DICER</u> | 40 |
| <u>II-1-2) ARGONAUTE</u> | 41 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <u>II-1-3) RDR</u> | 43 |
| <u>II-1-4) SGS3</u> | 44 |
| <u>II-1-5) SDE3</u> | 45 |
| <u>II-1-6) POL IV</u> | 45 |
| <u>II-1-7) HEN1</u> | 46 |
| <u>II-1-8) DRB</u> | 46 |
| <u>II-1-9) HASTY</u> | 47 |
| II-2) Les différentes voies du RNA silencing chez <i>Arabidopsis thaliana</i> | 48 |
| <u>II-2-1) sRNA endogènes</u> | 48 |
| a) Voie des miRNA (ou microRNA) | 48 |
| b) Voie des tasiRNA (trans-acting short interfering RNA) | 49 |
| c) Voie des nat-siRNAs (natural cis-antisense transcripts-associated siRNAs) | 50 |
| d) Voie des ha-siRNA (heterochromatin-associated short interfering RNA) | 51 |
| <u>II-2-2) sRNA exogènes</u> | 53 |
| a) Voie des siRNA (ou short interfering RNA) | 53 |
| b) RNA silencing antiviral | 54 |
| <u>II-2-3) Transitivité et maintenance du silencing</u> | 57 |
| <u>II-2-4) Mouvement du signal du RNA silencing</u> | 58 |
| a) Mouvement à courte distance | 59 |
| b) Mouvement local étendu | 60 |
| c) Mouvement systémique | 61 |
| II-3) Suppresseurs viraux du RNA silencing | 62 |
| <u>II-3-1) Inhibition de l'activité Dicer : exemple de la protéine P38 du TCV</u> | 63 |
| <u>II-3-2) Séquestration des sRNA : exemple de la protéine P19 des tombusvirus</u> | 64 |
| <u>II-3-3) Inhibition de l'activité d'Argonaute : exemple de la protéine 2b du CMV</u> | 65 |
| <u>II-3-4) Interférence avec l'activité RDR ? : exemple de la protéine V2 du TYLCV</u> | 67 |
| <u>II-3-5) Inhibition du mouvement du RNA silencing : exemple de la protéine P25 du PVX</u> | 67 |

Résultats et Discussion

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Chapitre I : Etude du mode d'action de la protéine P0 des polerovirus | 69 |
| A) Introduction à la protéine P0 des polerovirus | 69 |
| 1) Généralités sur la protéine P0 | 69 |
| 2) La protéine P0 est un « facteur de pathogénicité » | 70 |
| 3) La protéine P0 est un suppresseur de RNA silencing | 71 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4) La protéine P0 est une protéine à F-box | 72 |
| <u>4-1) les protéines ASK et la voie « ubiquitine-protéasome »</u> | 73 |
| a) La voie de dégradation par le protéasome dépendante de l'ubiquitine | 73 |
| b) Le complexe SCF | 75 |
| <u>4-2) le motif F-box de la protéine P0 est nécessaire à son activité de suppresseur</u> | 75 |
| B) Résultats | 76 |
| 1) La protéine P0 agit en aval de l'activité Dicer | 76 |
| 2) La protéine P0 mime les effets d'une mutation <i>ago1</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i> | 78 |
| 3) La protéine P0 induit la dégradation d'AGO1 <i>in planta</i> | 79 |
| 4) Les protéines P0 et AGO1 interagissent entre elles | 80 |
| Publication : | |
| The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing | |
| Article addendum : | |
| Viral suppression of RNA silencing by destabilization of ARGONAUTE 1 | |
| 5) Le protéasome est-il responsable de la dégradation d'AGO1 induite par P0 ? | 82 |
| 6) Effet de la protéine P0 en contexte viral | 84 |
| 7) Conclusions, discussion et perspectives | 86 |
| | |
| Chapitre II : Approche génétique du tropisme phloémien des polerovirus | 89 |
| 1) Problématique | 89 |
| 2) Les produits de DICER sont-ils responsables du tropisme des polerovirus ? | 90 |
| <u>2-1) Initiation du projet de recherche</u> | 90 |
| <u>2-2) Infection de mutants <i>dcl</i></u> | 91 |
| a) Analyse phénotypique | 91 |
| b) Analyse du titre en virus | 93 |
| c) Inoculation mécanique | 94 |
| <u>2-3) Localisation tissulaire du BWYV dans les mutants <i>dcl</i></u> | 94 |
| a) Immunolocalisation sur des empreintes de pétioles | 95 |
| b) Immunolocalisation <i>in situ</i> | 95 |
| c) Localisation des particules virales par microscopie électronique | 96 |
| <u>2-4) Analyse moléculaire des extraits de mutants <i>dcl</i> infectés</u> | 99 |
| a) Protéines virales | 99 |
| b) RNA viraux | 100 |
| c) siRNA viraux | 101 |
| <u>2-5) Conclusions et hypothèses de travail</u> | 103 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3) Le RNA viral est-il capable de sortir du phloème sous une forme différente des virions ? | 104 |
| <u>3-1) Construction d'un virus « rapporteur »</u> | 104 |
| <u>3-2) Analyse des virus « rapporteur »</u> | 106 |
| <u>3-3) Infection des mutants <i>dcl</i> par le virus BW95hp</u> | 109 |
| 4) Les polerovirus codent-ils pour un deuxième suppresseur de RNA silencing ? | 111 |
| <u>4-1) Etude de l'effet de l'infection virale sur l'expression des gènes <i>DCL</i></u> | 111 |
| <u>4-2) Recherche du deuxième suppresseur potentiel</u> | 113 |
| <u>4-3) Analyse de l'activité de suppresseur de RNA silencing de P4 sur <i>N. benthamiana</i></u> | 116 |
| 5) Conclusions, discussion et perspectives | 116 |
| Conclusion générale | 120 |
| Matériel et méthodes | 130 |
| I) Matériel | 130 |
| I-1) Milieux de culture | 130 |
| I-2) Bactéries | 131 |
| I-3) Plasmides | 131 |
| I-4) Virus | 132 |
| I-5) Plantes | 132 |
| II) Méthodes | 133 |
| II-1) Clonage | 133 |
| II-2) Expériences avec les plantes | 136 |
| II-3) Détection <i>in situ</i> de protéines virales | 138 |
| II-4) Extraction et analyse de protéines | 139 |
| II-5) Extraction et analyse de RNA | 142 |
| II-6) RT-PCR et purification de DNA séparé sur gel de polyacrylamide | 145 |
| Références bibliographiques | 147 |

Acronymes, abréviations

| | |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| A : Ampère | ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay |
| AGO : ARGONAUTE | F : farad |
| APC : Anaphase Promoting Complex | g : gramme |
| ARF : auxin responsive factor | GAPDH3 : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase |
| ASK : <i>Arabidopsis</i> SKP1-like protein | GFP : Green Fluorescent Protein |
| ATP : adénosine tri phosphate | GST : glutathione S-transferase |
| BCIP : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate | GUS : β -glucuronidase |
| BET : bromure d'éthidium | ha-siRNA : heterochromatin-associated short interfering RNA |
| BiFC : bimolecular fluorescence complementation | HcPro : helper component proteinase |
| BSA : bovine serum albumin | HECT : Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus |
| BTE : BYDV cap-independent translation element | HEN1 : Hua Enhancer 1 |
| CAF1 : CCR4 associated factor 1 | HEPES : N-2 hydroxyethyl piperazine acid N'-2ethane sulfate |
| CCR4 : Chemokine (C-C motif) receptor 4 | HR : Hypersensitive Response |
| cf : confère | HYL1 : Hyponastic Leaves 1 |
| CIP : calf intestinal phosphatase | ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses |
| CLSY1 : Classy1 | IR-PTGS : inverted-repeat PTGS |
| CMT3 : Chromomethylase 3 | kb : kilobase |
| CP : Coat Protein | kDa : kiloDalton |
| CR : cofactor for RNA2 replication | KO : knock out |
| cv : cultivar | KYP : Kryptonite |
| dATP : désoxyadénine triphosphate | LMP : Low Melting Point |
| DCL : DICER-like protein | M : molaire |
| DCP2 : decapping enzyme | MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid |
| dCTP : désoxycytidine triphosphate | MET1 : Methyltransferase 1 |
| DEA : diéthanolamine | MID : middle |
| dGTP : désoxyguanine triphosphate | miRNA : microRNA |
| DNA : Desoxyribonucleic acid | MP : movement protein |
| dNTP : désoxynucléotide triphosphate | MYB : myeloblastosis |
| DO : densité optique | nat-siRNAs : natural cis-antisense transcripts-siRNAs |
| DRB : double-stranded RNA binding protein/domain | NBT : Nitro Blue Tetrazolium chlorid monohydrat |
| DRM2 : domains rearranged methyltransferase 2 | NLS : Nuclear Localization Signal |
| DTT : Dithiothréitol | NoLS : Nucleolar Localization Signal |
| dTTP : désoxythymine triphosphate | NP40 : Nonidet P40 : octyl phenoxyloxyethoxyethanol |
| EDTA : acide éthylène-diamine-tétra-acétique | |
| eIF : eukaryotic initiation factor | |

| | |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| NRP : nuclear RNA polymerase | SGS3 : Supressor of Gene Silencing 3 |
| nt : nucléotide | siRNA : short interfering RNA |
| ORF : open reading frame | SKP1 : S-phase Kinase-associated protein 1 |
| PABPC1 : cytoplasmic polyA binding protein 1 | SNF2 : Sucrose Non-Fermenting 2 |
| PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis | S-PTGS : sense PTGS |
| PAZ : Piwi/Argonaute/Zwille | sRNA : short RNA |
| pBin : plasmide binaire | SSC : salt sodium citrate |
| PCR : polymerase chain reaction | TAS : gène codant pour des tasiRNA |
| PDR : parasite-derived resistance | tasiRNA : trans-acting short interfering RNA |
| PDS : phytoène désaturase | TBE : tris borate EDTA |
| PEG : polyethylene glycol | T-DNA : DNA de transfert |
| PGPH : peptidylglutamyl peptide-hydrolyzing | TEMED : NNNN'-tetramethyl ethylene diamine |
| PME : pectin methylesterase | tRNA : RNA de transfert |
| PNK : polynucléotide kinase | UV : ultra violet |
| PPR : pentatricopeptide repeat protein | V : volt |
| PTGS : Posttranscriptional gène silencing | VIGS : virus-induced gene silencing |
| PVP : polyvinyl pyrrolidone | viRNA : virus-derived short interfering RNA |
| qsp : quantité suffisante pour | VPg : viral protein linked to the genome |
| Rack-1 : Receptor for activated kinase 1 | VSM1 : Virus Systemic Movement 1 |
| rap1 : replication-associated protein 1 | XRN : exoribonuclease |
| RBX : Ring Box protein/domain | |
| RdRP ou RDR : RNA dependant RNA polymerase | |
| RING : Really Interessant New Gene | |
| RISC : RNA induced silencing complex | |
| RITS : RNA-induced transcriptional silencing | |
| RNA : RiboNucleic Acid | |
| RNase : ribonucléase | |
| rpm : rotation par minute | |
| RTD : readthrough domain | |
| RTP : readthrough protein | |
| RT-PCR : reverse transcriptase, polymerase chain reaction | |
| Rx : gène de Résistance contre le pvX | |
| S : svedberg | |
| SaM : <i>Sitobion avenae</i> protein binding MAV | |
| SAR : Systemic Acquired Résistance | |
| SCF : SKP1, F-box protein, Culline1 | |
| SDE3 : Silencing Defective Protein 3 | |
| SDN1 : small RNA degrading nuclease | |
| SDS : sodium dodecyl sulfate | |
| sgRNA : subgenomic RNA | |

Virus

| | |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| ACMV : African Cassava Mosaic Virus | SPLSV : Sweet Potato Leaf Speckling Virus |
| BChV : Beet chlorosis Virus | TBSV : Tomato Bushy Stunt Virus |
| BGMV : Bean Golden Mosaic Virus | TCV : Turnip Crinckle Virus |
| BLRV : Bean LeafRoll Virus | TEV : Tobacco Etch Virus |
| BMV : Beet mild yellowing virus | TGMV : Tomato Golden Mosaic Virus |
| BSMV : Barley Stripe Mosaic Virus | TMV : Tobacco Mosaic Virus |
| BWYV : Beet Western Yellows Virus | TNDV : Tobacco Necrotic Dwarf Virus |
| BYDV : Barley Yellow Dwarf Virus | ToCV : Tomato Chlorosis Virus |
| BYV : Beet Yellows Virus | TRV : Tobacco Rattle Virus |
| CABYV : Cucurbit Aphid-Born Yellows Virus | TuYV : Turnip Yellows Virus |
| CaMV : Cauliflower Mosaic Virus | TVCV : Turnip Vein-Clearing Virus |
| CMV : Cucumber Mosaic Virus | TVDV : Tobacco Vein Distorting Virus |
| CPMV : CowPea Mosaic Virus | TYLCV : Tomato Yellow Leaf Curl Virus |
| CpSDaV : Chickpea Stunt Disease associated Virus | |
| CrTMV : Cruciferae Tobacco Mosaic Virus | |
| CtRLV : Carrot Red Leaf Virus | |
| CTV : Citrus Tristeza Virus | |
| CYDV : Cereal Yellows Dwarf Virus | |
| CymRSV : Cymbidium Ringspot virus | |
| GRAV : Groundnut Rosette Assistor Virus | |
| GRV : Groundnut Rosette Virus | |
| ISDV : Indonesian Soybean Dwarf Virus | |
| PCV : Peanut Clump Virus | |
| PEMV : Pea Enation Mosaic Virus | |
| PLRV : Potato LeafRoll Virus | |
| PVA : Potato Virus A | |
| PVX : Potato Virus X | |
| RCNMV : Red Clover Necrotic Mosaic Virus | |
| RSDaV : Rose Spring Dwarf associated Virus | |
| RYMV : Rice Yellow Mottle Virus | |
| SbDV : Soybean Dwarf Virus | |
| SCYLV : Sugarcane Yellow Leaf Virus | |

Introduction

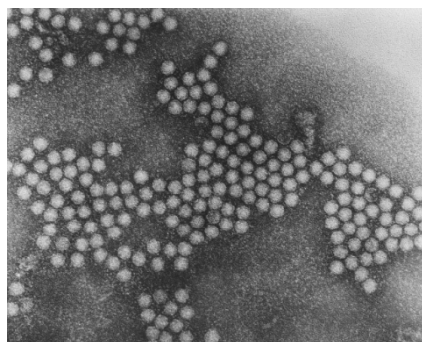
Dans la nature, les plantes sont soumises à l'agression de nombreux agents pathogènes. Dans la plupart des cas, le pathogène ne peut pas établir d'infection car il est confronté, dans un premier temps à des barrières physiques représentées par la cutine recouvrant les végétaux, l'écorce des arbres ou encore la paroi cellulaire. S'il traverse ces obstacles, par le biais d'une blessure ou grâce à un vecteur, le pathogène peut être détecté par la plante qui met en place une réaction de défense dite hypersensible (HR) menant à la mort programmée de la cellule infectée ce qui conduit au confinement du pathogène au site d'infection. Cette réaction est rapidement suivie par un signal systémique immunisant la plante contre des infections postérieures (SAR : systemic acquired resistance). Ce type d'interaction plante-pathogène est appelée interaction incompatible. A l'opposé, quand le pathogène n'est pas reconnu ou lorsqu'il est capable de contourner ces défenses, on parle de réaction compatible conduisant à l'établissement d'une maladie.

Parmi les agents phytopathogènes, les virus représentent les organismes les plus « simples » pouvant infecter des végétaux. Ces sont des parasites obligatoires, ils sont incapables de se multiplier en dehors de leur hôte. Ils ne sont en général pas reconnus comme des organismes vivants puisqu'une entité virale est composée d'acides nucléiques et de protéines et non de cellules.

L'étude des phytovirus et en particulier, l'étude des interactions entre la plante et son virus agresseur a pour but de mieux les comprendre pour mieux combattre ces pathogènes parasites. Leur simplicité d'organisation en fait également un excellent outil, facile à manipuler, pour l'étude de divers processus fondamentaux endogènes de la plante : ses mécanismes de défenses, bien sûr, mais aussi le transport des macromolécules, l'expression des gènes, le développement de la plante ou encore le « RNA silencing ».

L'objectif de cette thèse est d'élucider les mécanismes par lesquels un genre de phytovirus, les polerovirus, est capable de neutraliser les défenses de la plante en détournant certaines fonctions cellulaires essentielles. Cette étude m'amène à développer dans l'introduction, d'une part les caractéristiques des *Luteoviridae*, famille à laquelle appartiennent les polerovirus, et d'autre part, le RNA silencing qui participe à la défense antivirale.

Figure 1 : particules virales du BWYV
 Les particules présentent une symétrie icosaédrique.
 Leur diamètre est d'environ 25nm.
 Source : Catherine Reinbold (INRA, Colmar)



| Genre | Espèce |
|-------------|--------------------------------------------------|
| Luteovirus | Barley yellow dwarf virus–MAV (BYDV-MAV) |
| Luteovirus | Barley yellow dwarf virus–PAS (BYDV-PAS) |
| Luteovirus | Barley yellow dwarf virus–PAV (BYDV-PAV) |
| Luteovirus | Bean leafroll virus (BLRV) |
| Luteovirus | Soybean dwarf virus (SbDV) |
| Polerovirus | Beet chlorosis virus (BChV) |
| Polerovirus | Beet mild yellowing virus (BMV) |
| Polerovirus | Beet western yellows virus (BWYV) |
| Polerovirus | Cereal yellow dwarf virus – RPS (CYDV-RPS) |
| Polerovirus | Cereal yellow dwarf virus–RPV (CYDV-RPV) |
| Polerovirus | Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) |
| Polerovirus | Potato leafroll virus (PLRV) |
| Polerovirus | Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) |
| Polerovirus | Turnip yellows virus (TuYV) (=ancien BWYV-FL1) |
| Enamovirus | Pea enation mosaic virus-1 (PEMV-1) |
| Non classé | Barley yellow dwarf virus–GPV (BYDV-GPV) |
| Non classé | Barley yellow dwarf virus – RMV (BYDV-RMV) |
| Non classé | Barley yellow dwarf virus – SGV (BYDV-SGV) |
| Non classé | Carrot red leaf virus (CtRLV) |
| Non classé | Chickpea stunt disease associated virus (CpSDaV) |
| Non classé | Groundnut rosette assistor virus (GRAV) |
| Non classé | Indonesian soybean dwarf virus (ISDV) |
| Non classé | Sweet potato leaf speckling virus (SPLSV) |
| Non classé | Tobacco necrotic dwarf virus (TNDV) |
| Non classé | Tobacco vein distorting virus (TVDV) |

Table 1 : classification de la famille *Luteoviridae*

Selon l'« ICTV Master Species List, 8th Report, June 2005 »

En rouge, les membres types de chaque genre ; en bleu, les polerovirus fréquemment utilisés au laboratoire. »

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/ICTV8thReport%20Master%20species%20list.htm>

Première partie : les *Luteoviridae*

Les virus utilisés lors de cette étude appartiennent au genre polerovirus (famille : *Luteoviridae*). Le principal membre analysé est le BWYV (Beet Western Yellow Virus) souche FL1, nouvellement nommé TuYV (Turnip Yellow Virus) à cause des différences observées avec les autres souches du BWYV (la première étant qu'il n'infecte que très difficilement la betterave). Pour des raisons de commodité, j'utiliserai néanmoins l'acronyme BWYV pour faire référence à ce virus dans toute la partie « résultats » de ce manuscrit. Le CABYV (Cucurbit Aphid-borne Yellow Virus) est un autre virus disponible au laboratoire, utilisé de manière ponctuelle au cours de mes expériences. Ces deux virus sont très proches d'un point de vue génétique, le CABYV a donc principalement servi de confirmation pour les résultats obtenus avec le BWYV. Les deux virus ont cependant des gammes d'hôtes très différentes.

I-1) Particularités biologiques - classification

Les *Luteoviridae* sont des phytovirus à RNA simple brin de polarité positive. Ils forment des capsides icosaédriques de petite taille (25 nanomètres de diamètre environ) (**figure 1**). Lors de l'infection, ces virus sont restreints aux cellules du phloème et leur transmission de plante à plante ne peut se faire que par l'intermédiaire d'un insecte vecteur, le puceron, selon un mode persistant.

Ces propriétés biologiques, ainsi que leur sérologie et les caractéristiques physicochimiques de leurs particules ont permis à Fenner, en 1976, de réunir les premiers membres (BYDV-RPV, BYDV-RMV, BYDV-SGV, BWYV et SbDV) dans le groupe « luteovirus », nommé ainsi en raison des jaunisses observées sur les plantes infectées (*luteo* signifie « jaune » en latin) .

Le cinquième rapport de l'ICTV (Francki *et al.*, 1991) reconnaît ensuite deux sous-groupes au genre luteovirus dont le membre type était, à l'origine, le BYDV-MAV: le sous-groupe I (nouveau membre type : BYDV-PAV) et le sous groupe II (membre type : PLRV).

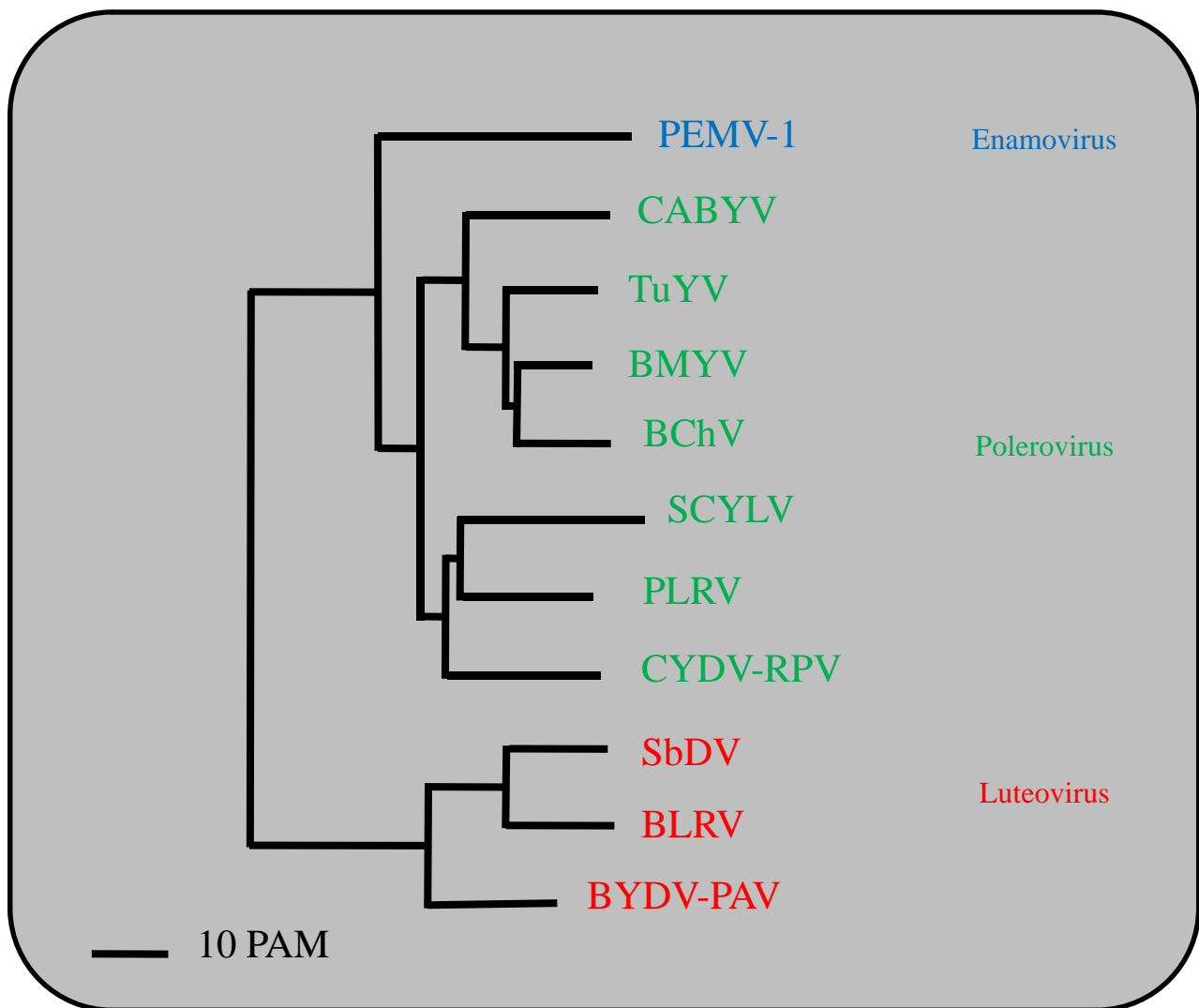


Figure 2 : arbre phylogénétique des *Luteoviridae*

Cet arbre illustre la distance existant entre luteovirus et polerovirus, en raison notamment des grandes dissemblances de leur RNA polymérase RNA dépendante. L'arbre a été réalisé à partir des séquences génomiques complètes de *Luteoviridae* sur <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>. Une unité PAM correspond à 1% de mutation.

La classification actuelle (définie lors de l'ICTV Master Species, 8th Report, en juin 2005) considère les *Luteoviridae* comme une famille n'appartenant à aucun ordre défini et divisée en trois genres : les luteovirus, les polerovirus et les enamovirus (**table 1**). Le nouveau genre « luteovirus » conserve le nom de l'ancien genre puisque le BYDV-MAV en fait partie. Le membre type des luteovirus est le BYDV-PAV. Le genre « polerovirus » tient son nom de son membre type, le **potato leafroll virus** (PLRV) ; de même, le nom « enamovirus » vient de **pea enation mosaic virus** (PEMV). Le regroupement des *Luteoviridae* en une famille est basé sur les propriétés biologiques de ces virus et sur le degré d'homologie de séquence de leur protéine de capsid. Ce type de classification n'est pas traditionnel car il ne prend pas en compte les grandes différences existant entre les RNA polymérases des genres luteovirus et polerovirus (la polymérase des luteovirus se rapproche de celle des carmovirus et celle des polerovirus est du type sobemovirus), résultant probablement d'événements de recombinaison. Ces dissemblances auraient dû, théoriquement, considérer les deux groupes comme relativement éloignés comme cela est illustré en **figure 2** par l'arbre phylogénétique issu de l'analyse des séquences complètes de certains *Luteoviridae* (Mayo et d'Arcy, 1999). La classification a donc privilégié le pragmatisme en réunissant des virus aux caractéristiques biologiques très proches (les luteovirus et les polerovirus étant plus proches entre eux qu'ils ne le sont d'aucun autre genre) aux critères taxonomiques classiques qui auraient considéré polerovirus et luteovirus comme des genres appartenant à des familles distinctes et distantes au regard de leurs polymérases. La subdivision en genre découle essentiellement de l'organisation génétique des virus (voir paragraphe I-5-1 pour les différences entre les groupes par rapport à l'organisation génomique).

C'est souvent l'absence de séquence complète qui empêche de classer un *Luteoviridae* dans un genre. Quelques fois, certains virus présentent des similarités avec les deux genres comme c'est le cas du SbDV qui possède une région 5' semblable aux luteovirus alors que la séquence de sa partie 3' est plus proche de celle des polerovirus. Il a finalement été considéré comme un luteovirus mais son existence tend à prouver que des événements de recombinaison inter-genre au sein des *Luteoviridae* ont eu lieu.

Le genre enamovirus est composé d'un seul membre, le PEMV-1. Son organisation génétique est similaire à celle des polerovirus mais il ne possède pas d'équivalent de leur ORF4. Il est capable de se répliquer seul ; cependant, il nécessite l'assistance d'un autre virus pour infecter une plante de manière systémique. Il était auparavant considéré comme l'un des deux RNA du PEMV. Toutefois, la nouvelle classification indique que la maladie de l'énation et de la mosaïque du pois est provoquée par la co-infection de deux virus : le PEMV-1

| Virus | Hôtes |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BWYV | <i>Beta vulgaris</i> , <i>Spinacia oleracea</i> , (Chénopodiacées) <i>Helianthus annuus</i> , <i>Lactuca sativa</i> (Astéracées) <i>Brassica napus</i> , <i>Brassica campestris</i> , <i>Brassica nigra</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Crambe abyssinica</i> (Brassicacées) <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucurbita pepo</i> (Cucurbitacées) <i>Cicer arietinum</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Trifolium subterraneum</i> , <i>Vicia faba</i> (Fabacées) <i>Phlox drummondii</i> (Polémoniacées) <i>Capsicum annuum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> (Solanacées) |
| CABYV | Cucurbitacées |
| PLRV | Solanacées |
| SCYLV | Poacées |
| BYDV | Poacées |
| SbDV | Fabacées |
| PEMV | Fabacées |

Table 2 : Familles de plantes hôtes des *Luteoviridae*

La liste des plantes hôtes du BWYV est non exhaustive et ne présente que des plantes d'intérêt agronomique

(enamovirus) et le PEMV-2, un umbravirus qui est également dépendant d'une co-infection sans laquelle le virus n'est pas transmissible.

Une autre caractéristique des virus de cette famille, c'est qu'ils sont capables d'interagir avec d'autres agents infectieux comme les umbravirus, ou encore des RNA satellites¹ et des viroïdes². Ceci est dû à la capacité de leurs protéines de capsidation à empaqueter des RNA hétérologues. Par exemple, la co-infection du PLRV et du *Potato spindle tuber viroid* permet à ce dernier d'être transmis par puceron (Querci *et al.*, 1997). Le RNA satellite circulaire de 332 nucléotides parfois trouvé lors de l'infection par le CYDV-RPV dépend du polerovirus pour son encapsidation, sa dissémination mais aussi pour sa réplication (Miller *et al.*, 1991). On peut également noter l'existence de la souche ST9 du BWYV (BWYV ST9) qui, dans la nature, est retrouvée associée à un RNA de 2,8 kb. Il ne s'agit pas d'un RNA satellite puisqu'il code pour sa propre RNA polymérase et est donc capable de se répliquer seul dans des protoplastes. Néanmoins, son association avec le BWYV ST9 lui permet d'être encapsidé par les protéines du polerovirus et donc d'être transmis par puceron. En contrepartie, la présence du RNA associé induit une forte aggravation des symptômes causés par le BWYV ST9 et une augmentation du titre viral de l'ordre de 10 fois par rapport à celui constaté lors d'une infection sans RNA associé (Sanger *et al.*, 1994).

I-2) Gamme d'hôtes et symptômes

Les *Luteoviridae* sont reconnus comme étant la famille de virus végétaux ayant le plus grand impact économique en raison de leur important succès écologique. Si la plupart d'entre eux voit sa gamme d'hôte restreinte à une famille de plantes (par exemple, le PLRV infecte principalement les solanacées, le BYDV, les poacées...), certains membres peuvent coloniser des espèces appartenant à de nombreuses familles de plantes, comme le BWYV qui se réplique dans plus de 150 espèces appartenant à 23 familles (voir **table 2**).

¹ RNA accompagnant certains phytovirus. Ils codent pour leur propre protéine de capsidation mais sont répliqués par la polymérase du virus assistant.

² Parasite végétal constitué d'un RNA circulaire ne codant pour aucune protéine.

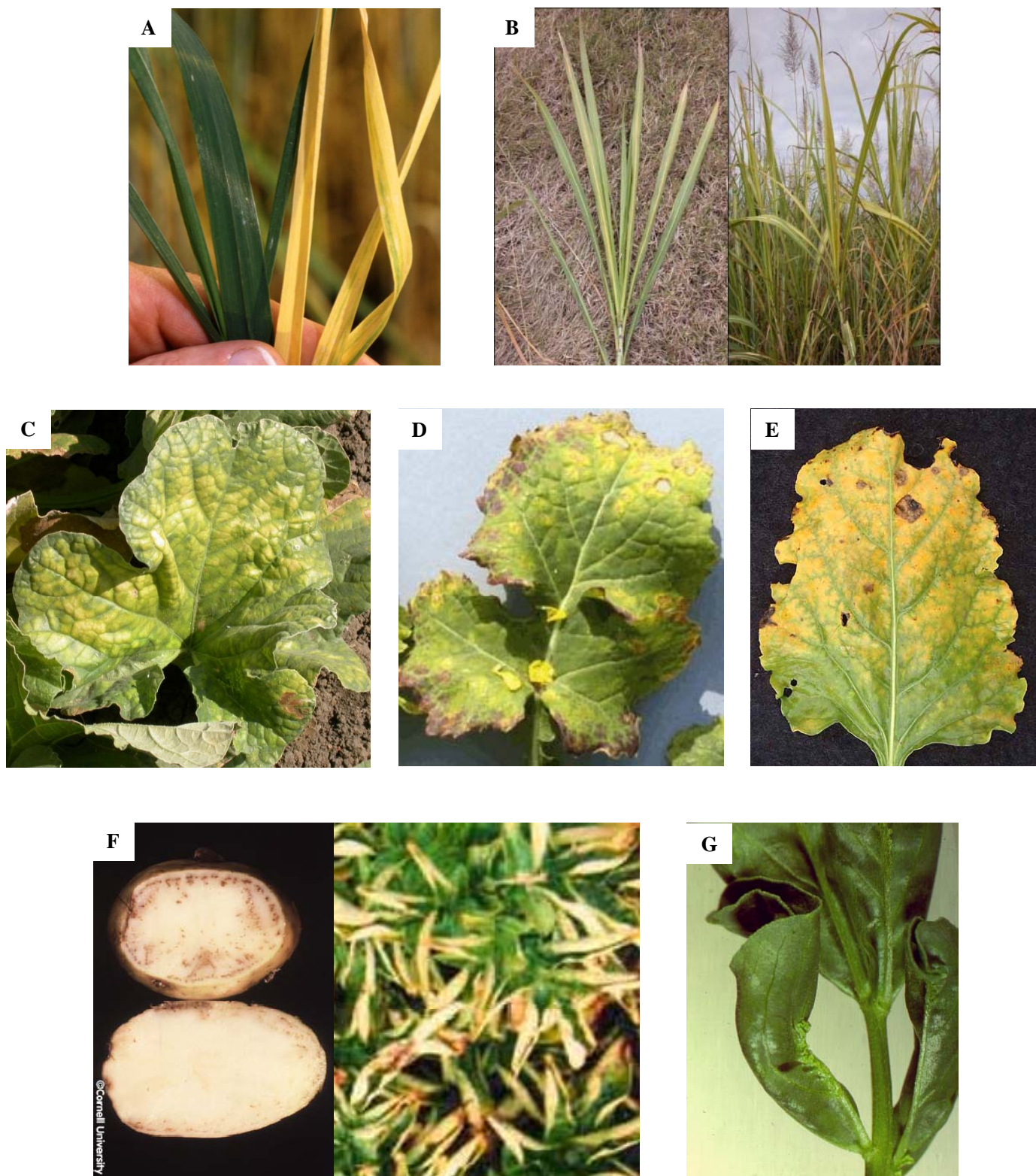


Figure 3 : Symptômes apparaissant suite à l'infection par un *Luteoviridae* sur des hôtes caractéristiques

Sources : **A)** jaunisse du blé infecté par le BYDV (en comparaison avec du blé sain, à gauche) (source : Wikipédia). **B)** SCYLV infectant des plants de canne à sucre (source : Sugarcane Yellow Leaf Disease, J. C. Comstock et R. A. Gilbert, UF/IFAS). **C)** Infection par le CABYV de melon d'hiver (source : L. Tomassoli et M. Meneghini, 2007). **D)** Effet du TuYV sur une feuille de colza (source : <http://www.bayercropscience.co.uk/>). **E)** Feuille de betterave présentant les symptômes suite à l'infection par le BMYV (source : www.rothamsted.bbsrc.ac.uk). **F)** Nécroses du tubercule (gauche) (source : Cornell university) et enroulement et jaunisse des feuilles (droite) (source : Potato Facts par Steven B. Johnson de plants de pommes de terre infectés par le PLRV). **G)** Fève infectée par le PEMV, des étiations (excroissances de tissus foliaires) sont visibles sur la nervure principale, à la base des feuilles (source : Thorben Lundsgaard, Dept. of Plant Biology, KVL, Denmark).

Les symptômes provoqués par les *Luteoviridae* sont principalement des jaunisses mais on peut également observer des rougissements ou un enroulement des feuilles ainsi qu'un retard de croissance des plantes infectées (**figure 3**). Certaines plantes deviennent « sucrées » au goût et craquantes au toucher à cause de la dégénérescence du phloème (perturbation du métabolisme des carbohydrates) (Harrison, 1999). Parce que ces symptômes peuvent avoir diverses causes comme la déficience en nutriments ou les dommages infligés par des insectes, l'origine virale des maladies provoquées par les *Luteoviridae* n'a été comprise que tardivement et on identifie encore régulièrement de nouveaux *Luteoviridae* (comme par exemple le « rose spring dwarf associated virus » ou RSDaV caractérisé pour la première fois en 2008 par Salem *et al.*).

Ces symptômes peuvent être très dommageables aux cultures agricoles ; la récolte peut être détruite lorsque l'infection se produit sur des plantes dont on consomme les feuilles (salades, choux...), mais elle est également affectée par exemple lorsque le PLRV colonise des plants de pommes de terre : le retard de croissance entraîne une diminution de la taille et du nombre de tubercules. Lors d'infections de concombre par le CABYV, la production est réduite de moitié en raison de l'avortement de nombreuses fleurs mais les fruits arrivés à terme sont néanmoins propres à la consommation. La sévérité des symptômes dépend du moment de l'infection ; plus elle est précoce, plus les symptômes sont dramatiques.

I-3) Processus épidémiologique et stratégies de contrôle des épidémies

Les *Luteoviridae* ne se transmettent pas à la descendance des plantes infectées ou par le pollen. Au laboratoire, l'utilisation d'extraits de plantes infectées ne permet pas d'inoculer une plante saine. De plus, ni les RNA extraits des virions, ni les transcrits obtenus *in vitro* ne sont infectieux. Les seuls moyens d'induire une nouvelle épidémie dans une culture sont donc l'émergence de pucerons infectieux ou, dans le cas des pommes de terre, l'utilisation de boutures ou de tubercules infectés pendant l'année ou la saison précédente. C'est ce qu'on appelle l'infection primaire. La dispersion se fait ensuite majoritairement de proche en proche, par l'intermédiaire de pucerons aptères. C'est l'apparition des pucerons ailés qui permettra l'infection à plus longue distance, vers d'autres champs cultivés ou vers des plantes sauvages, en d'autres termes, une nouvelle infection primaire. Les pucerons ailés émergeant en général trois fois par an (printemps, été et automne), il est difficile d'échapper à la primo-infection (Robert et Lemaire, 1999).

Pendant trop longtemps, la seule stratégie utilisée pour contrôler l'infection par les *Luteoviridae* a été l'emploi de produits chimiques insecticides. Disséminés au moment de la plantation ainsi que pendant la culture, l'objectif de ces substances toxiques est d'éliminer la prolifération de pucerons vecteurs et donc la dissémination du virus. Néanmoins, l'apparition de pucerons résistants, la modification des populations d'insectes liée aux changements climatiques et les effets délétères sur la biocénose³ encouragent les chercheurs et les cultivateurs à développer des méthodes alternatives pour endiguer l'infection.

Une méthode complémentaire à l'utilisation d'insecticides est la prévention du risque. Celle-ci est plus contraignante car elle demande une analyse fine de nombreuses données comme les événements épidémiologiques des années précédentes, les données climatiques, les dates de migration des pucerons, l'incidence du virus... Cela permet d'établir des modèles prévenant les infections à grande échelle, mais ils ne sont valables que dans l'environnement géographique d'où proviennent les données analysées. La prévention commence aussi avec l'utilisation de graines pour la multiplication des cultures, plutôt que l'usage de plantules obtenues par reproduction végétative à partir de plantes ayant pu être infectées. Quand cela est difficile, comme pour les cultures de pommes de terre, la destruction systématique des plants montrant des symptômes de l'infection par le PLRV devrait être une priorité afin d'éviter d'apporter un tubercule servant de « réservoir de virus » dans la culture de l'année suivante. Ces précautions n'empêchent cependant pas la transmission par un puceron ayant acquis le virus ailleurs.

Une autre alternative pour éviter l'infection de plantes d'intérêt agronomique est l'utilisation de cultivars résistants. Ces résistances peuvent être dirigées contre le virus dont l'infection sera inhibée de manière précoce (blocage de la multiplication) ou plus tardive (blocage de la propagation dans la plante), ou encore, contre le puceron vecteur (inhibition de la dissémination). Peu de gènes conférant ces caractéristiques ont pour l'instant été identifiés dans le système *Luteoviridae*/puceron vecteur/plantes hôtes, la résistance étant principalement évaluée en fonction de la présence et de la sévérité des symptômes sur une plante donnée. De plus, peu de cultivars possédant une résistance significative contre les *Luteoviridae* sont disponibles dans le commerce (Robert et Lemaire, 1999). Certaines variétés d'orge, par

³ ensemble des êtres vivants coexistant dans un espace défini, un biotope. Un biotope et sa biocénose constituent un écosystème

exemple, possèdent le gène Yd2 (identifié par Rasmussin et Schaller en 1959) capable de diminuer la virulence (titre du virus et symptômes) du BYDV-MAV et du BYDV-PAV mais l'expression de ce gène n'a aucun effet sur la plupart des isolats du CYDV-RPV. De plus son efficacité est supérieure dans son cultivar d'origine (l'orge d'Ethiopie) que dans les cultivars dans lesquels il a été introduit. Son effet pourrait même différer selon la localisation de la plantation.

En 1985, Sanford et Johnston ont développé le concept « PDR » pour « parasite-derived resistance ». Il repose sur le fait d'intégrer dans une plante sensible tout ou partie du génome d'un virus dans le but de l'immuniser contre une infection par ce virus et d'autres virus apparentés. Dans le cas des *Luteoviridae*, on peut citer le gène de la protéine de capsid (CP) du PLRV qui a été introduit dans des plants de pommes de terre dès 1990 par Kawchuk *et al*, mais ce n'est que plus tard que le mécanisme de cette résistance a été compris. En 1996, David Baulcombe en propose un premier modèle. Dans certains cas, la résistance peut être due à l'incapacité du virus à se décapsider en présence d'un excès de CP (cas du TMV ou Tobacco Mosaic Virus par exemple). L'utilisation de mutants dominants négatifs de protéines de mouvement pourrait aussi entraîner une compétition avec les protéines virales sauvages pour la localisation aux plasmodesmes, inhibant ainsi le mouvement du virus de cellule à cellule. Ces résistances reposent sur la synthèse des protéines exprimées à partir du transgène.

Dans la plupart des autres cas, la résistance est induite par le mécanisme de RNA silencing : la cellule va reconnaître le RNA messenger du transgène comme aberrant et induire sa dégradation ainsi que celle de tout RNA homologue présent dans la cellule (pour plus de détails, voir introduction, deuxième partie). En 2001, Vasquez *et al*. ont montré que des plantes exprimant un transgène codant pour la réplicase d'une souche du PLRV pouvaient résister à l'infection d'autres souches du même virus, que la protéine soit ou non exprimée, prouvant que la résistance était liée à la présence du RNA. Ce type de transgénèse a permis de synthétiser des plants de pommes de terre capables de faire face à l'infection de différents isolats du PLRV dans diverses parties du monde. La démocratisation de ces plantes est néanmoins freinée pour le moment (principalement en Europe), en raison des considérations éthiques liées à l'usage de plantes génétiquement modifiées.

I-4) Cycle viral

I-4-1) Mouvement dans la plante (hôte)

Afin d'établir une infection systémique, les virus doivent se déplacer, du site d'inoculation vers le reste de la plante. Pour cela, deux types de mouvement ont été développés par les phytovirus : le mouvement de cellule à cellule utilisant les plasmodesmes (mouvement à courte distance) et le transport dans la sève, par le système vasculaire (mouvement à longue distance). Le site d'infection primaire est souvent situé à la surface d'une feuille où le virus pénètre dans les cellules de l'épiderme puis rejoint celles du mésophylle pour atteindre la gaine périvasculaire et finalement, les cellules du phloème parenchymien et les cellules compagnes qui permettent l'accès aux tubes criblés où circule la sève élaborée et dans laquelle le transport pourra se faire avec les fluides de la plante (pour revue, voir Waigmann *et al.*, 2004).

a) Mouvement de cellule à cellule

Le mouvement de cellule à cellule d'un virus fait toujours intervenir des protéines virales (protéines de mouvement, MP) mais leur mode d'action diffère selon les virus.

Il existe deux grands types de mode d'action de protéines de mouvement impliquées dans le mouvement à courte distance. Le premier type est décrit ci-après par l'exemple du TMV. Dans ce cas, la MP (30K) agit en s'associant au génome viral, formant un complexe ribonucléoprotéique différent de la forme encapsidée du virus. C'est ce complexe qui va transiter à travers les plasmodesmes. Le deuxième type est représenté ici par la MP du CPMV (CowPea Mosaic Virus). Cette protéine forme des structures tubulaires traversant la paroi végétale, probablement au niveau des plasmodesmes. Ces conduits serviront de voie de transport pour les particules virales.

- La protéine 30K du TMV (représentative de la « superfamille 30K » regroupant de nombreuses MP aux fonctions similaires), ou MP^{TMV} possède deux domaines de liaison aux acides nucléiques simple brin non séquence-spécifique. La fixation non coopérative de MP^{TMV} tout le long du génome viral, *via* ces domaines de liaison, induit un changement conformationnel du RNA génomique : « le diamètre » du complexe ribonucléique se réduit à 1,5 à 2 nm alors que le RNA viral, sous sa forme native mesure 10 nm de diamètre (Citovsky *et al.*, 1992). La

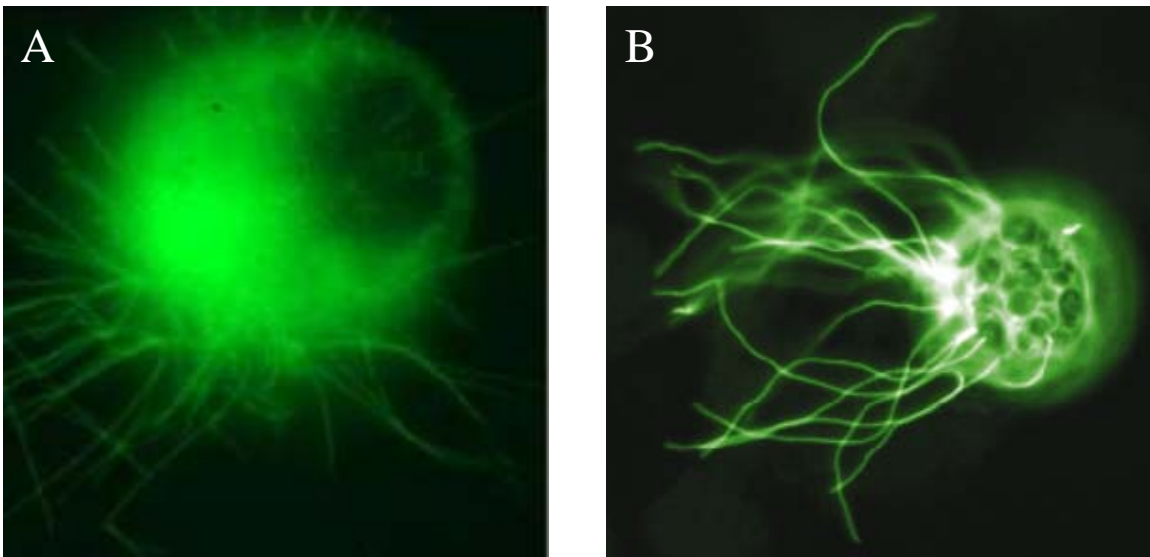


Figure 4 : illustration de la synthèse de tubule par des protéines de mouvement virales

A) Infection d'un protoplaste de niébé par le CPMV et immunomarquage de sa protéine de mouvement (Source : Joan Wellink, Wageningen University, Pays-Bas). B) Transfection d'un protoplaste d'*Arabidopsis thaliana* par une construction comportant la protéine de mouvement du CaMV en fusion avec la GFP (Huang *et al.*, 2001).

fixation de la MP permet donc de réduire l'encombrement du RNA nu. La protéine MP^{TMV} possède, de plus, un domaine de localisation aux plasmodesmes (Boyko *et al.*, 2000) et un domaine induisant la dilatation de ces structures permettant le passage de molécules d'un diamètre allant jusqu'à 4,3 nm (Waigmann *et al.*, 1994). Cette propriété de la MP permettrait donc le passage, à travers les plasmodesmes dilatés, du complexe ribonucléoprotéique composé de MP et du génome viral. Le mouvement de cellule à cellule, dans ce cas, ne requiert donc pas l'encapsidation du génome viral.

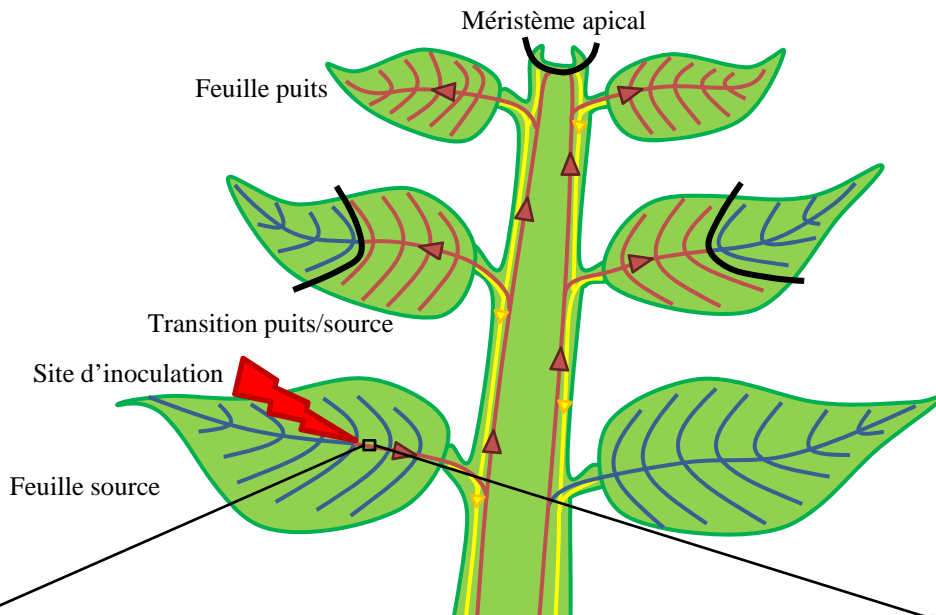
La MP du TMV est nécessaire et suffisante au mouvement du virus de cellule à cellule et sa liaison aux acides nucléiques, qui est indépendante de la séquence, lui permet même de promouvoir le mouvement de virus hétérologues qui sont, dans la nature, incapables de transiter à travers les plasmodesmes (Atabekov *et al.*, 1999).

Chez certains virus, ces fonctions sont portées par trois protéines distinctes généralement rassemblées sur le génome en un « triple gene block » (cas des hordeivirus, potexvirus, benyvirus ou encore pomovirus). Une des protéines se fixe au génome viral, les deux autres participeraient de manière coopérative au ciblage du complexe vers les plasmodesmes (Waigmann *et al.*, 2004).

- La MP du CPMV (MP^{CPMV}) possède un signal de localisation vers la membrane plasmique dans sa partie N-terminale (Bertens *et al.*, 2000). La dimérisation voire l'homomultimérisation serait un pré-requis pour le ciblage vers la périphérie de la cellule (Pouwels *et al.*, 2003). La protéine s'accumulerait alors, formant des corps ponctués, des granules (visibles grâce à l'expression de la protéine en fusion avec la GFP), probablement grâce à l'interaction avec des protéines cellulaires (Pouwels *et al.*, 2002). C'est au niveau de ces punctuations que s'initierait la formation de tubules, probablement en remplaçant le desmotubule qui traverse en temps normal les plasmodesmes des cellules végétales. La formation de ce tubule ne nécessite aucune autre protéine virale puisque il est visible à la surface de protoplastes exprimant la seule MP^{CPMV} (voir **figure 4**). La fonction du tubule est de permettre le passage de particules virales de la cellule infectée vers la cellule voisine saine (van Lent *et al.*, 1990). En effet, la protéine de mouvement du CPMV possède, dans sa partie C-terminale, un domaine capable d'interagir avec la protéine de capsid (Bertens *et al.*, 2000). Le désassemblage du tubule serait finalement nécessaire au relargage des particules virales dans la cellule saine, permettant le commencement d'un nouveau cycle infectieux (Pouwels *et al.*, 2003).

En 2004, Carvalho *et al.* ont pu montrer que MP^{CPMV}, comme les protéines de mouvement de la superfamille 30K, a la capacité de fixer des acides nucléiques simple brin, *in*

A



B

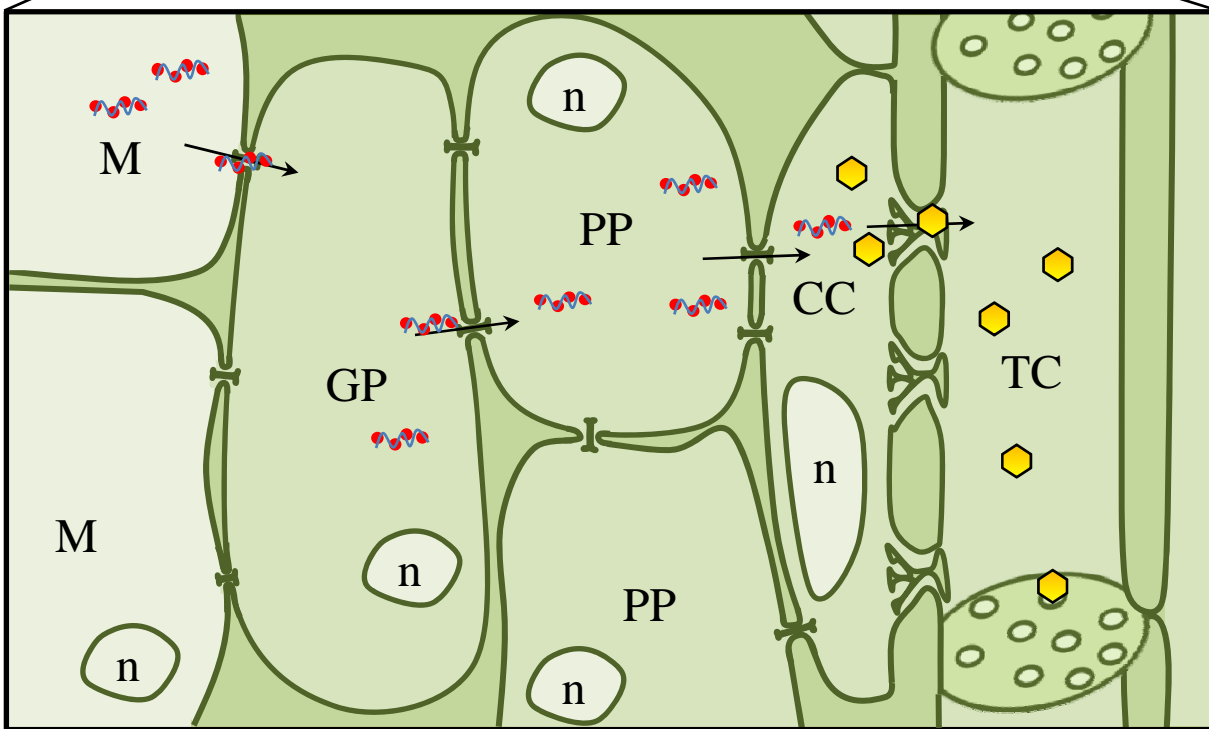




Figure 5 : Représentation schématique du trajet des virus lors de l'infection systémique.

A) L'initiation de l'infection se fait au niveau d'une feuille source. Après avoir traversé les cellules présentées dans B) (des cellules du mésophylle au tube criblé, les virus transitent principalement par le phloème interne (rouge) et plus modérément par le phloème externe (jaune). Le virus prend la direction de feuilles puits où il peut quitter le phloème au niveau de veines principales. Il initie ainsi l'infection de jeunes feuilles systémiques. Le méristème ainsi que les feuilles, au niveau de leur transition puits/sources, sont isolés par une barrière infranchissable par les virus (ligne noire). Les veines non accessibles au virus sont représentées en bleu. (d'après Waigmann *et al.*, 2004)

B) Les cellules végétales sont connectées les unes aux autres par des plasmodesmes permettant le passage de molécules cellulaires ou de complexes ribonucléiques viraux après action d'une ou plusieurs protéines virales. Les plasmodesmes liant les cellules compagnes (CC) aux tubes criblés (TC) sont branchés et s'ouvrent sur un pore dans le tube criblé ; leur taille limite d'exclusion est supérieure à celle des autres plasmodesmes. Le tube criblé est composé de cellules vivantes dont le noyau et la plupart des organites ont dégénéré. Elles survivent grâce aux protéines synthétisées par les cellules compagnes. La séparation transversale entre deux cellules du tube criblé est une membrane perforée permettant la circulation passive de la sève et de ses composants. GP : cellule de la gaine périvasculaire ; PP : parenchyme phloémien ; M : mésophylle ; n : noyau.  : particule virale ;  : complexe ribonucléo-protéique (génomme viral + protéines virales non structurales)

in vitro. Les auteurs proposent plusieurs applications à cette fonction inattendue (puisque le virus transite sous forme encapsidée) : la formation d'un complexe RNA génomique-MP^{CPMV} pourrait avoir un rôle dans le mouvement à longue distance ; la fonction n'est pas requise pour la protéine de mouvement mais sert à la protéine CR dont l'ORF est en phase avec celui de la MP ; le domaine de fixation aux acides nucléiques est un vestige provenant d'un ancêtre utilisant un mode d'action proche de celui de la superfamille 30K mais qui n'a plus de fonction pour les protéines de mouvement formant des tubules. L'étude, en contexte viral, de mutants dans ce domaine d'interaction, pourrait apporter des réponses quant à l'importance de l'interaction avec des acides nucléiques pour le cycle viral et plus particulièrement pour le transport.

Le mouvement de cellule à cellule d'un virus est hôte-spécifique. Certains virus peuvent ainsi se répliquer dans les protoplastes d'une plante résistante, la résistance est alors due à une incapacité du virus à se déplacer, à sortir du site d'inoculation.

b) Mouvement à longue distance

Les mécanismes du mouvement à longue distance sont moins bien compris. On peut le subdiviser en cinq étapes (voir **figure 5**):

- 1) entrée du virus dans le parenchyme phloémien à partir des cellules de la gaine périvasculaire
- 2) pénétration dans le complexe cellules compagnes/tube criblé
- 3) transport rapide dans la sève vers d'autres organes de la plante (le flux de sève brut dans le phloème est estimé à 1 mètre par heure en moyenne)
- 4) sortie du complexe tube criblé/cellules compagnes vers des cellules saines du parenchyme vasculaire
- 5) invasion de nouvelles cellules du mésophylle après franchissement de la gaine périvasculaire

Ce trajet suit celui des photo-assimilats⁴ synthétisés dans les feuilles sources (productrices d'hydrates de carbone) et à destination des organes puits (jeunes feuilles encore

⁴ Composés carbonés résultant de la photosynthèse

incapables de réaliser de manière efficace la photosynthèse, méristèmes, racines). Les virus ne voyagent jamais en sens inverse (feuille puits vers feuille source) et utilisent principalement le phloème interne dont le flux mène au sommet de la plante. Le phloème externe autorise un transport beaucoup plus lent vers la partie basale de la plante (**figure 5-A**).

Dans certains cas, les virus peuvent utiliser des voies sensiblement différentes de celles des produits de la photosynthèse : si le virus transite toujours de manière symplastique, les photo-assimilats de certaines espèces (par exemple, *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*...) utilisent la voie apoplastique. Dans ces plantes, il existe pourtant des plasmodesmes connectant les cellules compagnes et les cellules du parenchyme phloémien aux cellules de la gaine périvasculaire. Ces connexions constituent un « talon d'Achille » exploité par les phytovirus dans un système autrement hermétiquement clos (Cruz, 1999).

L'étape limitante dans l'invasion du système vasculaire est souvent l'entrée dans les cellules phloémiennes. En effet, certains virus mutants sont capables de se déplacer de cellule à cellule mais ne peuvent pas infecter une plante de manière systémique, ce qui prouve que les deux types de mouvement impliquent des mécanismes bien différents. Chez certains virus, comme les geminivirus et les cucumovirus, une même protéine est impliquée dans les deux modes de circulation (Jeffrey *et al.*, 1996 ; Kaplan *et al.*, 1997). Cependant, des expériences de mutagenèse dirigée ont souvent permis de découpler les deux activités, confirmant que leur fonction est différente selon le cas (Wang *et al.*, 1998). Chez d'autres virus ces fonctions sont portées par des protéines distinctes. Par exemple, les tobamovirus (TMV) n'ont pas besoin de leur MP pour voyager à longue distance. Si cette dernière est capable de s'accumuler au niveau des plasmodesmes reliant la gaine périvasculaire aux cellules du phloème parenchymien, elle n'en modifie pas la taille limite d'exclusion (Ding *et al.*, 1992). Cette fonction pourrait être portée par une autre protéine, la protéine 126K (Waigmann *et al.*, 2004).

Il a été montré que la plupart des virus, y compris le TMV, transitent dans la sève sous leur forme encapsidée. Pourtant, il existe plusieurs mutants de la CP du TMV (CP^{TMV}) toujours capable de former des particules virales mais celles-ci sont déficientes dans le mouvement systémique (Culver *et al.*, 1995 ; Dawson *et al.*, 1988). Cette protéine pourrait donc agir autrement qu'en protégeant le génome viral. Des études montrent qu'une fonction de CP^{TMV} pourrait être de promouvoir le passage du complexe ribonucléo-protéique viral des cellules du parenchyme vasculaire vers les cellules compagnes (Ding *et al.*, 1996). Sur les quatre protéines

codées par le TMV, trois porteraient donc des fonctions impliquées dans le mouvement du virus.

La protéine de capsid des potyvirus intervient, elle aussi, dans le mouvement à longue distance, indépendamment de sa fonction d'encapsidation : des mutations dans l'extrémité N-terminale ou dans la partie C-terminale de la protéine n'empêchent pas la formation de virions *in vivo* mais abolissent le mouvement systémique du TEV (Tobacco Etch Virus), un potyvirus. Cette protéine est également impliquée dans le mouvement de cellule à cellule, les potyvirus ne codant pas pour une protéine spécialement dédiée au mouvement, mais il est possible, expérimentalement, de séparer chacune des trois fonctions (Dolja *et al.*, 1994).

D'autres virus peuvent transiter naturellement dans la sève sans être encapsidés. Les umbravirus, par exemple, ne codent pas pour une protéine de capsid mais développent une infection systémique en voyageant dans la sève sous forme de complexe ribonucléo-protéique, associé avec leur MP spécialisée dans le mouvement à longue distance, le produit de l'ORF3 (Talianky *et al.*, 2003). Par contre, ils sont dépendants d'une co-infection avec un membre de la famille des *Luteoviridae* pour leur transmission de plante à plante (Ryabov *et al.*, 1999). De plus, l'absence d'activité ribonucléase dans la sève en fait une route idéale pour le cheminement des virus à travers la plante, même si le RNA viral n'est pas protégé à l'intérieur d'une capsid (Sasaki *et al.*, 1998). L'encapsidation, même si elle est courante, n'est donc pas un prérequis à l'infection systémique.

Les facteurs viraux connus pour promouvoir l'infection systémique sont principalement impliqués dans le franchissement des différentes barrières cellulaires menant aux vaisseaux, chacune de ces étapes nécessitant potentiellement des fonctions différentes (un virus pénétrant la gaine périvasculaire n'est pas forcément capable d'entrer dans les cellules du phloème parenchymien ; de même, une fois dans ces cellules, le virus peut être bloqué et ne pas entrer dans les cellules compagnes). Par contre, une fois à l'intérieur de la sève, le trajet semble être passif.

Jusqu'à présent, peu de gènes cellulaires impliqués dans le transport des virus à longue distance ont été identifiés. On peut noter le gène *VSM1* (pour virus systemic movement) qui semble être nécessaire à l'entrée de certains tobamovirus (TVCV ou Turnip Vein-Clearing Virus, TMV) dans le système vasculaire de l'hôte (Lartey *et al.*, 1998). Par contre, cette protéine n'est pas strictement nécessaire à la systémie du CaMV (Cauliflower Mosaic Virus).

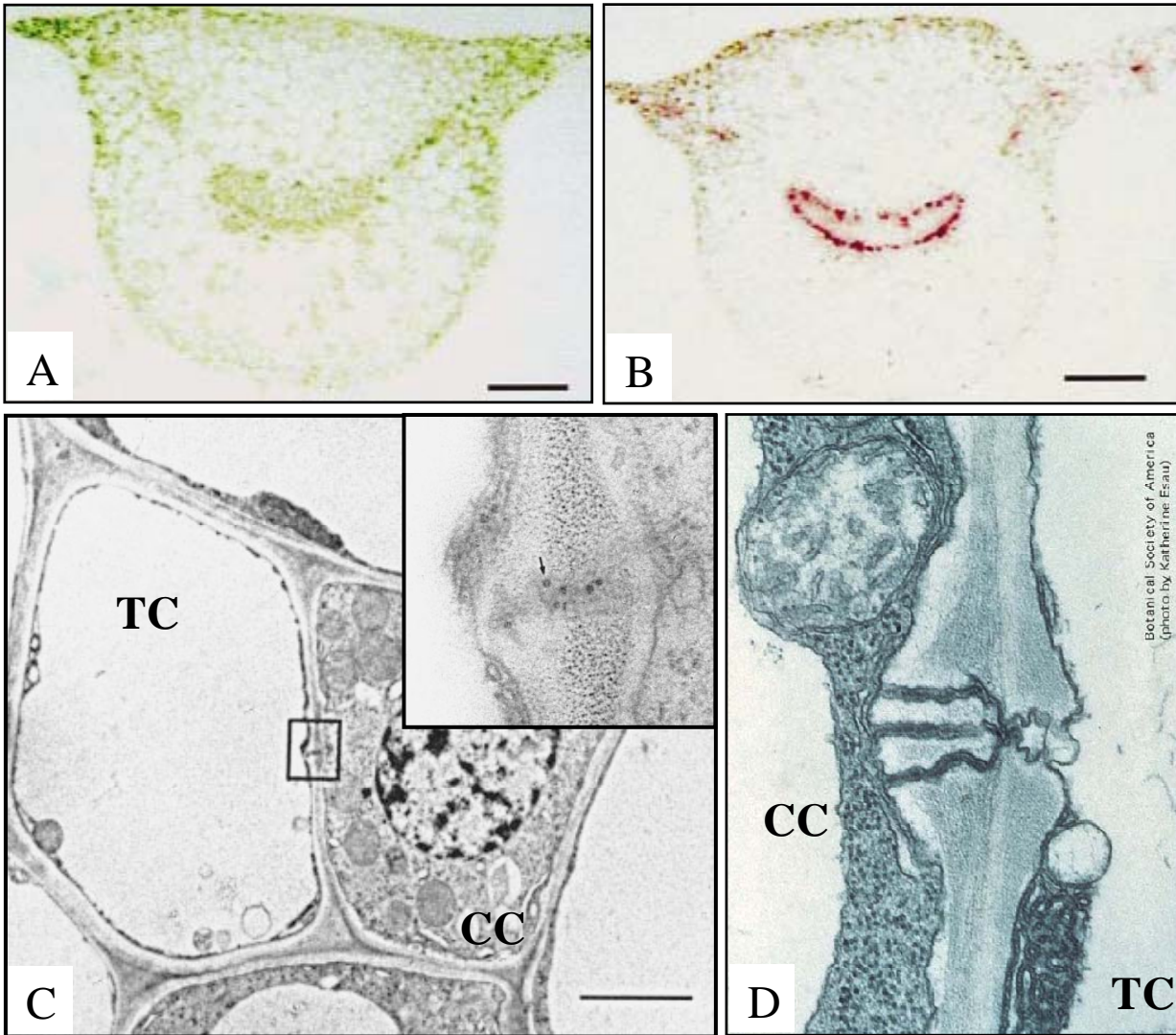


Figure 6 : localisation des *Luteoviridae* : l'infection est restreinte au phloème de l'hôte

Immunomarquage des protéines structurales du BWYV sur des pétioles de *N. clelandii* sur A) une plante saine et B) une plante infectée. Seul le système vasculaire de la plante infectée contient des particules virales. C) visualisation en microscopie électronique de particules virales dans les plasmodesmes branchés reliant les cellules compagnes (CC) aux tubes criblés (TC). Le transport des *Luteoviridae* dans la sève se fait sous forme de virion. (A-C : Mutterer *et al.*, 1999). D) image en microscopie électronique d'un plasmodesme branché d'une plante saine.

Un autre gène impliqué dans le mouvement des tobamovirus est le gène *PME* (pectin methylesterase) codant pour une protéine de la paroi végétale. Cette protéine, impliquée à la fois dans le mouvement à longue distance et dans le déplacement de cellule à cellule, est nécessaire à la sortie du TMV de la sève mais lorsqu'elle est mutée, le transport des photo-assimilats dans le phloème n'est pas perturbé (Chen et Citovsky, 2003). Ceci indique que les facteurs impliqués dans l'entrée et la sortie des tubes criblés sont différents et que ce transport se fait de manière active.

L'interaction directe entre une protéine isolée à partir de la sève de concombre (p48) et les particules virales du CMV (Cucumber Mosaic Virus) suggèrent que p48 pourrait être impliquée dans le transport à longue distance du virus (Requena *et al.*, 2006). Cependant, son rôle exact (augmentation de la stabilité des particules ou encore facilitation de l'entrée dans les tubes criblés) et sa nécessité lors de l'établissement de l'infection systémique restent à déterminer.

Les facteurs de l'hôte empêchant la systémie sont mieux connus et plus étudiés car ils sont souvent à l'origine du caractère de résistance naturelle à l'infection. Ils sont en général très spécifiques d'une famille de virus.

c) Cas des *Luteoviridae*

La particularité des *Luteoviridae* est qu'ils sont introduits par leur vecteur directement dans la sève de l'hôte et que leur infection est limitée aux cellules du phloème (cellules du phloème parenchymien et cellules compagnes) (voir **figure 6-B**). Leur mouvement à courte distance est restreint à quelques types cellulaires, ils utilisent donc majoritairement le mouvement à longue distance dans le système vasculaire. Leur passage à travers des plasmodesmes est néanmoins requis afin d'entrer et de sortir des cellules compagnes où le virus se réplique pour atteindre le tube criblé par lequel il transite.

La restriction au phloème n'est pas due à une incapacité du virus à se répliquer dans les autres cellules puisqu'on a pu visualiser l'amplification du RNA génomique de plusieurs *Luteoviridae* dans des protoplastes issus de cellules du mésophylle (exemples : PLRV par Barker et Harrison en 1982, BYDV-PAV par Young *et al.* en 1991 ou encore BWYV par Veidt *et al.*, 1992).

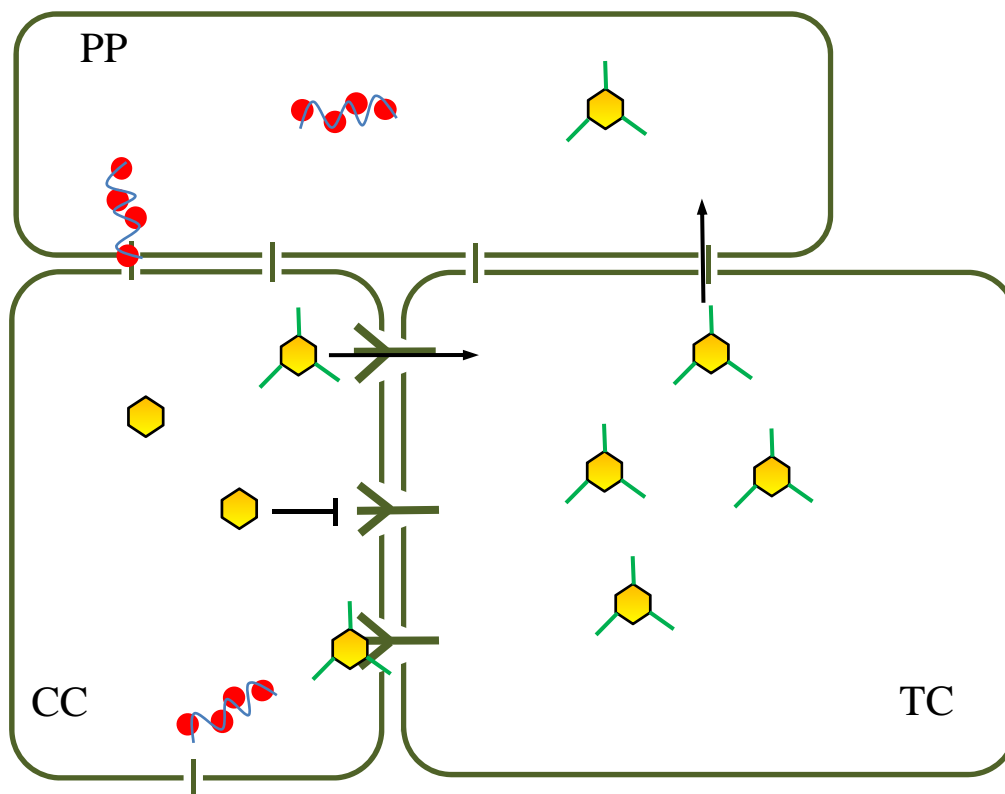


Figure 7 : modèle pour le mouvement à longue distance des *Luteoviridae*.

Le virus pourrait circuler d'une cellule nucléée à l'autre (parenchyme phloémien : PP et cellule compagne : CC) sous forme de RNA viral associé à P4 (cercles rouge). Pour traverser les plasmodesmes branchés et atteindre le tube criblé (TC), le virus est sous forme encapsidé et la protéine de readthrough (ligne verte) associée à la capside virale augmenterait considérablement l'efficacité de ce transfert dans les deux sens. Les particules dépourvues de protéine de readthrough resteraient majoritairement confinées dans les cellules où elle sont synthétisées. (adapté de Ziegler-Graff *et al.*, 1996)

⬡ : particule virale ; ●●●● : complexe ribonucléo-protéique (génomme viral + protéines virales non structurales)

Deux protéines virales putativement impliquées dans ce mouvement ont pu être identifiées chez les *Luteoviridae*. Une de ces protéines, P4, possède de nombreuses caractéristiques partagées par des MP d'autres virus (pour plus de détails, voir section I-5-3-e). Pourtant, un virus ne synthétisant pas cette protéine conserve son caractère infectieux sur certains hôtes, comme c'est le cas du BWYV ou du PLRV infectant *N. clevelandii*. Une des propriétés de P4 est sa capacité à se lier aux acides nucléiques ; il a toutefois été montré que le mouvement à longue distance nécessite que le virus soit sous sa forme encapsidée (Ziegler *et al.*, 1996). Cette fonction de P4 pourrait donc être impliquée dans le trafic intracellulaire, ou dans le passage direct d'une cellule nucléée du phloème (cellules compagnes et cellules du parenchyme phloémien) à une autre plutôt que pour le passage vers les tubes criblés. Son mode d'action dans le mouvement à longue distance (sur les plantes où elle est requise) reste donc à élucider.

L'autre protéine virale importante dans le mouvement (outre la protéine majeure de capsid) est la protéine P5. Exprimée en fusion avec la protéine de capsid, elle est présente à la surface de la particule virale et pourrait participer à la stabilité des virions dans la sève (Brault *et al.*, 1995 ; Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Elle pourrait également intervenir dans le transport des virions à travers les plasmodesmes reliant les cellules compagnes aux tubes criblés (Mutterer *et al.*, 1999) (voir **figure 6-C**). Les fonctions de ces deux protéines virales pourraient donc être complémentaires mais aussi redondantes lors de l'absence de l'une d'elles. Ces données ont permis d'établir un modèle du mouvement des *Luteoviridae* dans le phloème (voir **figure 7**) sans toutefois apporter des éléments de réponse à la restriction du virus à ce tissu.

Une explication à ce phénomène pourrait tenir dans la nature des plasmodesmes utilisés par les *Luteoviridae*. En effet, les connections existant entre un tube criblé et les cellules compagnes l'entourant sont différentes des autres plasmodesmes de part leur structure et leur physiologie. Elles sont branchées et ont une taille limite d'exclusion plus grande (jusqu'à 60 kDa, contre 1 kDa pour les plasmodesmes reliant les cellules du mésophylle ; Stadler *et al.*, 2005) (voir illustration en **figure 6-D**). Leur franchissement pourrait requérir des protéines de mouvement virales aux fonctionnalités différentes. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la sortie du phloème des *Luteoviridae* et leur inoculation mécanique peuvent être rendues possibles par une co-infection avec un virus ayant la faculté d'envahir les cellules du mésophylle : c'est le cas du PLRV co-inoculé avec le PVX (Potato Virus X) (Barker, 1987) ou

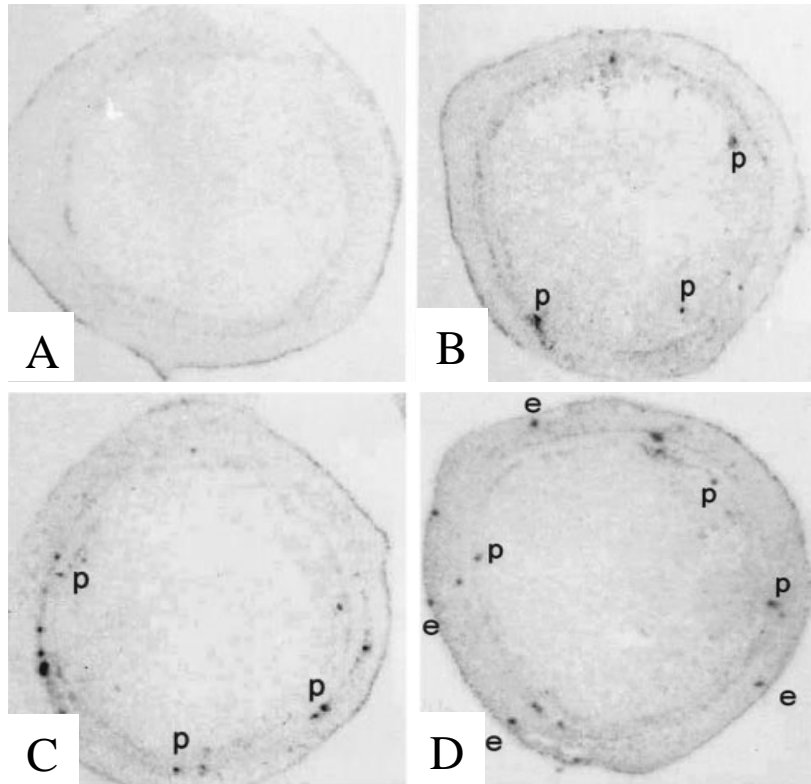


Figure 8 : immunolocalisation du PLRV sur des plants de *N. benthamiana*

A) Plante saine sauvage. B) Plante infectée par le PLRV. C) et D) plantes transgéniques exprimant le cDNA du PLRV sous dépendance du promoteur 35S. L'infection est restreinte aux cellules du phloème (p). L'expression de génome viral sous un promoteur constitutif ne permet pas la synthèse de protéines virales dans tous les types cellulaires; seules quelques cellules épidermiques (e) sont marquées. D'autres facteurs que la fonctionnalité des protéines de mouvement sont impliqués dans le tropisme phloémien des polerovirus. (Franco-Lara *et al.*, 1999)

avec le PEMV-2 ou le GRV (Groundnut Rosette Virus) (Ryabov *et al.*, 2001) (dans le premier cas, l'inoculation mécanique reste impossible). Les expériences réalisées par Ryabov *et al.* montrent néanmoins que tout virus n'a pas la capacité de promouvoir la sortie du phloème des polerovirus. En effet, une co-infection PLRV-CMV ne permet pas l'infection des cellules du mésophylle par le PLRV alors que le CMV n'est pas restreint au phloème. Par contre, lorsqu'on substitue la protéine de mouvement du GRV (ORF4) à celle du CMV, le PLRV se comporte comme lors d'une co-infection avec le GRV.

Ces observations suggèrent que la restriction au phloème serait due à un défaut de protéine de mouvement fonctionnelle pour le franchissement des jonctions intercellulaires des cellules du mésophylle. Une étude réalisée sur le PLRV tend toutefois à montrer que d'autres facteurs sont impliqués dans le tropisme tissulaire des *Luteoviridae*. Franco-Lara *et al.* (1999) ont transformé des plants de pommes de terre et de tabac par le cDNA codant pour le génome complet du PLRV sous dépendance du promoteur 35S du CAMV, un promoteur fort et constitutif. Même si, théoriquement, chaque cellule renferme le transgène, ils ont pu constater que seules quelques cellules du mésophylle étaient capables d'accumuler des protéines virales alors que leur expression dans les cellules phloémiennes était comparable à celle observée lors d'une infection virale (voir **figure 8**). La déficience dans le mouvement de cellule à cellule des *Luteoviridae* ne semble donc pas être la seule cause de la limitation de l'infection au phloème de l'hôte. Cette hypothèse est également appuyée par les travaux de Ryabov *et al.* (2001) qui montrent que l'ORF4 du GRV exprimée par le PVX ne confère pas les mêmes propriétés au PLRV que le CMV recombinant exprimant cette même protéine ; la complémentation par une protéine de mouvement n'est donc pas suffisante à l'invasion des cellules mésophylliennes par les *Luteoviridae*.

L'étude du mouvement des *Luteoviridae* au sein de leur plante hôte est un aspect très intéressant et en fait également un modèle pour la dissection du mouvement à longue distance. Elle reste cependant complexe en raison de l'impossibilité d'intégrer au génome du virus le gène d'une protéine fluorescente comme cela est réalisé pour l'analyse de nombreux autres virus (Oparka *et al.*, 1998). L'utilisation d'un virus recombinant PVX-GFP a, par exemple, permis à Roberts *et al.* (1997) de comparer le mouvement des photo-assimilats au trajet effectué par le virus pendant l'infection systémique sur *N. benthamiana*. Le même type d'expérience a également pu être mené sur l'orge, grâce à l'utilisation du virus BSMV (Barley Stripe Mosaic Virus) exprimant la GFP en fusion avec la protéine virale γ b (Haupt *et al.*, 2001).

| Virus | Vecteur(s) |
|----------|-----------------------------------------------------------------|
| BYDV-MAV | <i>Sitobion avenae</i> |
| BYDV-RMV | <i>Rhopalosiphum maidis</i> |
| BYDV-SGV | <i>Schizaphis graminum</i> |
| BYDV-PAV | <i>Sitobion avenae, Rhopalosiphum padi</i> |
| SbDV | <i>Myzus persicae</i> |
| PLRV | <i>Myzus persicae, Macrosiphum euphorbiae, Myzus nicotianae</i> |
| BWYV | <i>Myzus persicae</i> |
| CABYV | <i>Myzus persicae, Aphis gossypii</i> |
| CYDV-RPV | <i>Rhopalosiphum padi, Schizaphis graminum</i> |
| ScYLV | <i>Melanaphis sacchari</i> |
| PEMV-1 | <i>Acyrtosiphum pisum, Myzus persicae</i> |

Table 4 : principales espèces vectrices des *Luteoviridae*

Figure 9 : transmission des *Luteoviridae* par puceron

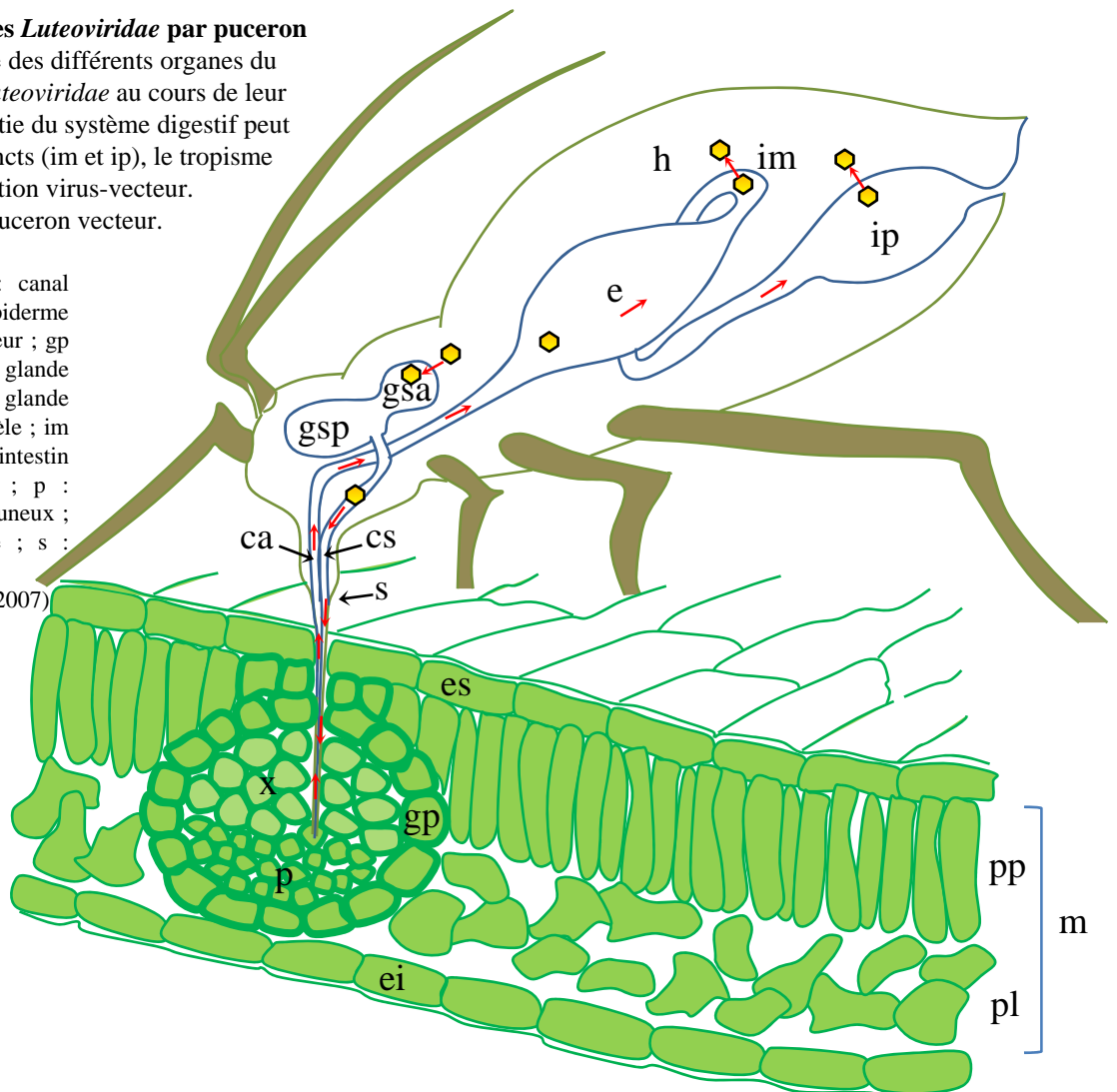
Représentation schématique des différents organes du puceron traversés par les *Luteoviridae* au cours de leur « phase de latence ». La sortie du système digestif peut se faire à deux endroit distincts (im et ip), le tropisme étant spécifique de l'interaction virus-vecteur.

→ trajet du virus dans le puceron vecteur.

● virion

ca : canal alimentaire ; cs : canal salivaire ; e : estomac ; ei : épiderme inférieur ; es : épiderme supérieur ; gp : gaine périvasculaire ; gsa : glande salivaire accessoire ; gsp : glande salivaire principale ; h : hémocèle ; im : intestin moyen ; ip : intestin postérieur ; m : mésophylle ; p : phloème ; pl : parenchyme lacuneux ; pp : parenchyme palissadique ; s : stylet ; x : xylème.

Figure adaptée de Brault *et al.* (2007)



Chez les *Luteoviridae*, l'addition de séquences extravirales au génome est limitée par l'espace disponible à l'intérieur de leur capsidie icosaédrique et la plupart de leurs protéines est nécessaire à l'établissement de l'infection systémique. On ne peut donc ni ajouter, ni substituer le gène de la GFP à un gène viral sans affecter sérieusement la survie du virus.

I-4-2) Mouvement dans le puceron (vecteur)

La transmission des *Luteoviridae* d'une plante infectée vers une plante saine nécessite l'intervention d'un vecteur, le puceron. Cette étape du cycle viral est dite circulante et non propagative car le virus transite à travers l'insecte sans pour autant s'y multiplier. Elle est aussi considérée comme une « phase de latence ». Le virus va donc rester sous sa forme encapsidée pendant toute la durée du transfert. Seules les protéines structurales pourront jouer un rôle à l'intérieur du puceron, ce qui a pu être démontré par des expériences d'hétéro-encapsidation ; la spécificité d'interaction virus-vecteur est indépendante du contenu en RNA de la capsidie (Rochow and Muller, 1975). Cette spécificité est très stricte, la plupart des *Luteoviridae* n'étant transmis que par une ou deux espèces de pucerons (voir **table 4**). Pour une revue concernant ce chapitre, voir Gray et Gildow (2003) et Brault *et al.* (2007).

La transmission peut être subdivisée en quatre étapes (voir **figure 9**) :

- 1) ingestion du virus par le puceron lors de la prise alimentaire dans le phloème, passage du phloème de la plante vers le canal alimentaire du puceron. (1 à 5 minutes après pénétration dans le phloème). Etape non spécifique.
- 2) Acquisition du virus à travers les cellules épithéliales du tube digestif (12 à 16 heures, transport actif, première sélection).
- 3) Rétention du virus dans l'hémocoel, hémolymphe, milieu extracellulaire, diffusion jusqu'aux glandes salivaires (plusieurs semaines).
- 4) Passage à travers les cellules des glandes salivaires (très virus spécifique, récepteur différent de la première sélection) et injection dans le phloème d'une plante hôte, avec la salive lors d'une nouvelle prise alimentaire.

(Cycle complet : au minimum 24 heures mais plutôt 3 à 4 jours)

1) Lors de la prise alimentaire, le puceron utilise ses pièces buccales modifiées en stylet qui pénètrent la feuille de manière intercellulaire, à travers la lamelle moyenne séparant les cellules épidermiques des cellules du mésophylle. Avant de s'alimenter, le puceron réalise plusieurs « piqûres d'essai » qui pourraient servir de phase d'acquisition aux virus étant transmis selon un mode non circulant (voir Hébrard *et al.*, 1999). Une fois les vaisseaux du phloème atteints, le stylet traverse la paroi et la membrane des cellules phloémiennes, le puceron peut commencer à se nourrir. Les molécules ingérées ainsi que les particules virales se retrouvent alors dans le canal alimentaire de l'insecte. Cette étape est non spécifique et de nombreux virus n'étant pas naturellement transmis par puceron peuvent être absorbés. Ils seront néanmoins incapables de se stabiliser ou de sortir du canal alimentaire par une autre voie que le système excréteur.

2) Le virus doit alors traverser une première barrière cellulaire pour quitter le système digestif et accéder à l'hémolymphe. Cette étape d'acquisition est le premier niveau de sélection qui déterminera la spécificité d'interaction virus-vecteur (voir **table 4**). En effet, parmi les *Luteoviridae*, on peut distinguer deux lieux distincts où se fait l'acquisition. Pour le BYDV, le CYDV, et le SbDV, le virus atteint l'hémocèle en traversant les cellules épithéliales de l'intestin postérieur alors que le PLRV et le BWYV franchissent les cellules de l'intestin moyen. Le CABYV peut, lui, être acquis indifféremment aux deux endroits (Brault *et al.*, 2005). Ces constatations suggèrent la présence de récepteurs à différentes localisations du tube digestif capables d'interagir spécifiquement avec certains *Luteoviridae*. De plus, le même vecteur, *Mysus persicae*, est capable de transmettre aussi bien le CABYV et le BWYV que le SbDV. Il doit donc posséder au moins deux types de récepteurs se localisant aux sites d'acquisition respectifs de ces virus.

Pourtant, les mécanismes cellulaires permettant la traversée de la barrière épithéliale semblent être communs aux différents membres de la famille : les virions se retrouvent au niveau de la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales du tube digestif. Il est ensuite possible de les visualiser dans le cytoplasme de ces cellules, toujours à l'intérieur de vésicules dont la structure membranaire est similaire à celles observées lors d'endocytoses induites par des récepteurs. Les vésicules fusionnent alors avec des endosomes, formant finalement des vésicules tubulaires contenant plusieurs particules virales qui migrent vers la membrane basale de la cellule afin de permettre le relargage des virions par exocytose au

niveau de la lamelle basale qui devra être franchie afin d'atteindre l'hémocèle. (Voir **figure 10**). Ce transport actif dure de 12 à 16h.

3) Une fois dans l'hémocèle, le virus peut y persister plusieurs semaines. Là, les particules virales seraient stabilisées grâce à l'interaction entre les protéines de capsid et des protéines du vecteur. Pour l'instant, seule l'une d'entre elles a pu être identifiée. Il s'agit de la symbionine qui est, en réalité, synthétisée en grande quantité par des bactéries endosymbiotiques de l'insecte (*Buchnera aphidicola*). Ce sont des protéines chaperonnes qui sont impliquées dans le repliement des protéines, la translocation à travers les membranes et la récupération après un stress. L'interaction entre la symbionine et les particules virales protégerait ces dernières contre le système immunitaire du puceron et pourrait également permettre de maintenir la structure tertiaire des protéines de capsid et faciliter le mouvement du virus vers les glandes salivaires. Cette interaction n'est pas spécifique à un couple virus-vecteur donné puisqu'elle a pu être vérifiée pour le PLRV, le BLRV, le BWYV, le CABYV, le SDV, le PEMV (Van Den Heuvel *et al.*, 1997) et le BYDV (Filichkin *et al.*, 1997).

4) Arrivé au niveau des glandes salivaires, le virus doit une nouvelle fois franchir une barrière de cellules. Le mécanisme est similaire à celui utilisé lors de l'entrée dans l'hémocèle mais se déroule en sens inverse : le virion doit, dans un premier temps, traverser la lamelle basale extracellulaire. Cette matrice sécrétée par les cellules adjacentes est composée de collagène, de glycoprotéines et de nombreuses autres molécules. Sa taille limite d'exclusion étant de 20 nm, les particules virales (25 nm) doivent posséder une caractéristique permettant de modifier la structure de la lamelle, probablement grâce à l'interaction spécifique entre les protéines de capsid et des molécules localisées dans le réseau protéique.

Au niveau de la membrane plasmique des cellules des glandes salivaires accessoires (aucun *Luteoviridae* n'a pu être observé en périphérie de la glande salivaire principale) c'est à nouveau par un mécanisme d'endocytose-exocytose, par le biais de vésicules, que le virus va être capable d'atteindre la lumière du canal salivaire.

Ces deux étapes semblent impliquer différents récepteurs. En effet, des études ont montré que le BYDV-MAV pouvait traverser efficacement la lamelle basale et la membrane plasmique des cellules des glandes salivaires accessoires dans les espèces vectrices alors que le virus n'a jamais été observé à ces endroits dans les pucerons incapables de le transmettre. Par contre, le CYDV-RPV s'accumule dans la lamelle basale de *S. avenae* (qui n'est pas vecteur pour ce

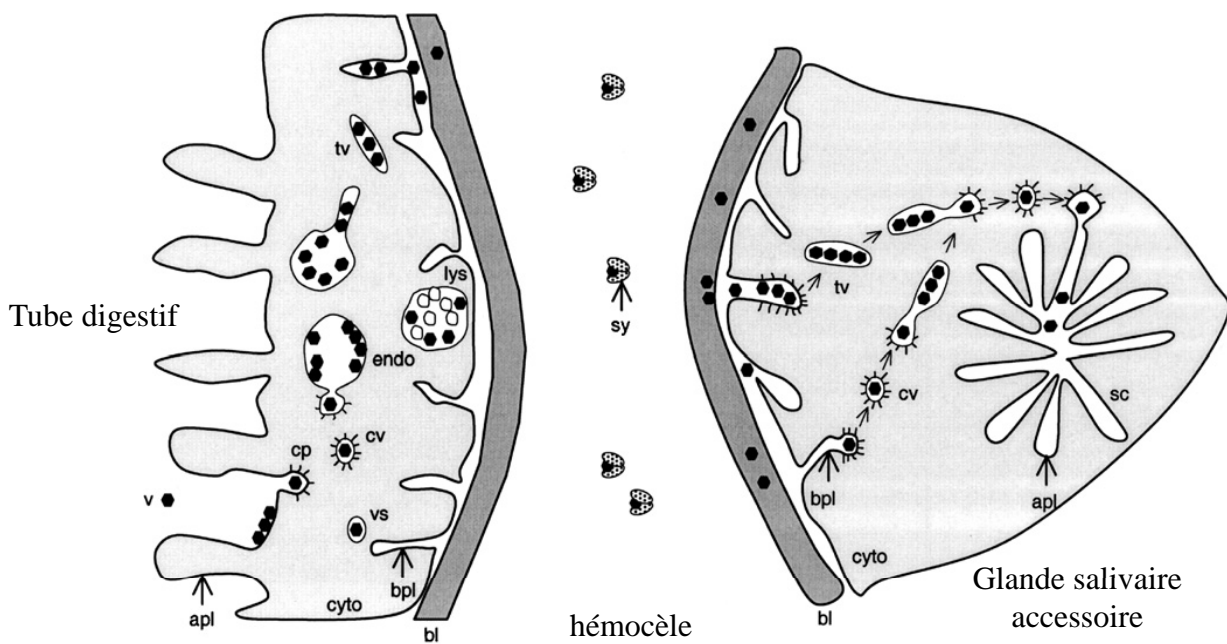


Figure 10: modèle du transport transcellulaire des *Luteoviridae* selon Brault *et al.*, 2007

Les virions (v) localisés dans la lumière du tube digestif sont endocytés dans les cellules épithéliales par l'intermédiaire d'invaginations de type « coated pits » (cp). Dans ces cellules, les particules virales sont observées dans différents types de vésicules : vésicules couvertes de clathrine (cv), vésicules non couvertes (vs), vésicules tubulaires (tv), endosomes (endo) ou encore lysosomes (lys). Après exocytose, les virions traversent la lamelle basale (bl) pour arriver dans l'hémolymphe où ils interagissent avec la symbionine (sy). Le même processus se produit en sens inverse au niveau des glandes salivaires accessoires. Les virions sont finalement exocytés au niveau de la membrane plasmique apicale (apl) afin de rejoindre le canal salivaire (sc).

virus) mais est bloqué au niveau du franchissement de la membrane plasmique. L'entrée dans les glandes salivaires accessoires constitue ainsi l'étape la plus sélective du mécanisme de transmission ; seuls les *Luteoviridae* capables d'entrer dans ces cellules sont transmis. (Voir **figure 10**).

Pendant une nouvelle prise alimentaire, le puceron injecte, directement dans le phloème, sa salive contenant des enzymes mais également les particules virales ayant réussi à atteindre le canal salivaire. Le virus peut alors commencer un nouveau cycle d'infection, à condition que la plante dans laquelle il est injecté soit une plante hôte.

a) Protéines du puceron impliquées dans la transmission

En raison de la faible connaissance du génome des pucerons, seul un petit nombre de protéines importantes dans la spécificité d'interaction virus-vecteur a pu être identifié à ce jour.

En étudiant le couple BYDV-MAV / *Sitobion avenae*, Li *et al.* (2001) ont pu isoler deux protéines de l'insecte (SaM35 et SaM50) capables de se lier spécifiquement et avec une grande affinité aux particules virales du BYDV-MAV. Ces protéines sont absentes des espèces non vectrices. Elles ont été isolées à partir d'extraits de têtes de puceron ce qui permet aux auteurs de suggérer que ce sont des récepteurs potentiels localisés au niveau des glandes salivaires ; néanmoins, la nature exacte de ces protéines reste à déterminer.

En 2004, Seddas *et al.* ont pu caractériser trois protéines issues de *M. persicae* capables d'interagir avec les protéines de capsid du BWYV. Il s'agit de la protéine Rack-1 (Receptor for activated kinase 1), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH3) et l'actine.

Rack-1 est une protéine multifonctionnelle, impliquée notamment dans la régulation des récepteurs de surface et des protéines kinases intracellulaires. Mais l'absence de la protéine dans le milieu extracellulaire indique qu'elle n'est probablement pas un des récepteurs de surface permettant l'endocytose des particules virales.

Lorsqu'elle est phosphorylée, la GAPDH3 peut se lier aux membranes et y réguler l'endocytose. Sa localisation, en partie extracellulaire suggère qu'elle pourrait capter les particules virales localisées dans la lumière du tube digestif ou dans l'hémolymphe, facilitant leur endocytose. GAPDH3 est également capable de se lier à la fibronectine, un des

composants de la lamelle basale, il n'est donc pas exclu qu'elle permette le franchissement de cette barrière extracellulaire par le virus.

Enfin, l'interaction directe entre les protéines structurales du BWYV et l'actine suggère un mouvement du virus le long du cytosquelette lors de la traversée des cellules épithéliales. Pourtant, les particules virales n'ont jamais été observées libres dans le cytoplasme, mais toujours entourées des membranes provenant de l'endocytose. La réalité biologique de cette interaction reste à démontrer.

Très récemment, Yang *et al.* (2008) ont pu caractériser des nouvelles protéines spécifiques de la transmission du CYDV-RPV par *Schizaphis graminum*. Par analyse comparée du protéome de deux types de pucerons (vecteur et non vecteur, tous deux appartenant à la même espèce, *S. graminum*), seules quatre protéines ont pu être associées à la capacité à transmettre le CYDV. A l'inverse, aucune protéine caractéristique des lignées non vectrices n'a été mise en évidence ce qui indique que l'aptitude à transmettre spécifiquement un virus serait due à la présence d'un récepteur, plutôt qu'à l'absence d'un inhibiteur de la transmission. Ces quatre protéines ont pu être immunoprécipitées par des particules virales du CYDV-RPV, ce qui indique une interaction, qu'elle soit ou non directe. Parmi ces protéines, seules deux ont été identifiées par spectrométrie de masse : S4 (une luciférase) et S29 (une cyclophiline). La luciférase est adressée aux vésicules intracellulaires entourées d'une seule membrane et la cyclophiline joue un rôle dans le transport de molécules le long du cytosquelette microtubulaire dans le vecteur. Ces propriétés suggèrent l'implication de ces protéines dans le mouvement du virus mais d'autres études devront être réalisées avant de valider leur rôle et de comprendre leurs fonctions précises.

b) Méthodes d'inoculation artificielles

L'utilisation de pucerons vecteurs a longtemps été la seule méthode d'inoculation disponible au laboratoire. En 1992, Leiser *et al.* ont adapté aux *Luteoviridae* la méthode d'agro-inoculation utilisée jusque là pour les virus à DNA circulaire.

Cette méthode repose sur la capacité de l'agent de la galle du collet, *Agrobacterium tumefaciens* à transférer une portion de son DNA plasmidique (T-DNA pour DNA de transfert) dans les cellules des plantes qu'il infecte. Au laboratoire, les bactéries utilisées sont dites désarmées car elles ne possèdent plus les gènes capables d'induire des tumeurs. Le plasmide Ti

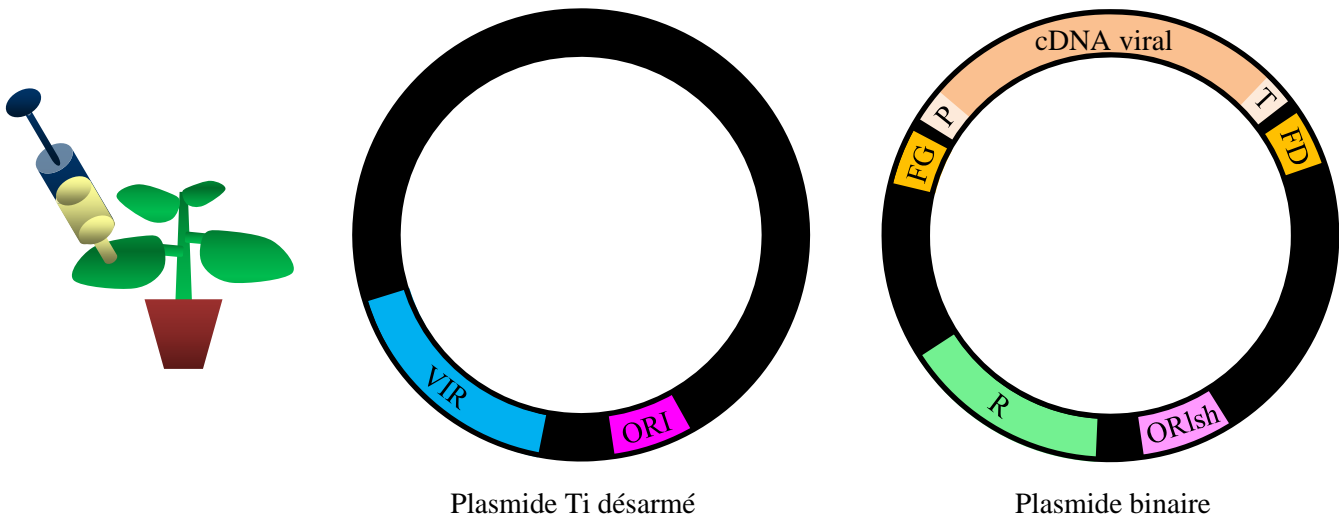
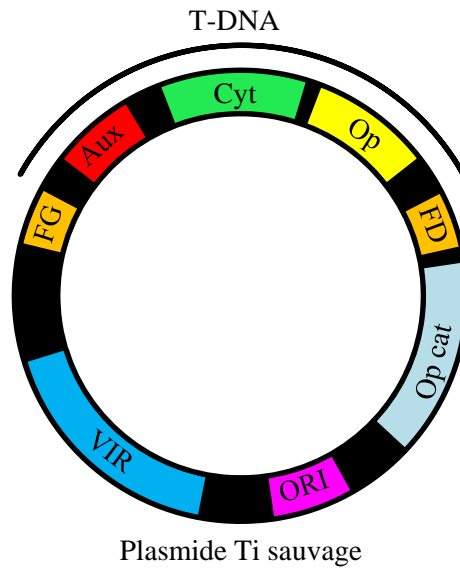


Figure 11: représentation schématique des plasmides utilisés pour l'agroinfection

Une solution d'agrobactéries contenant le plasmide Ti désarmé et le plasmide binaire d'intérêt est infiltrée dans une feuille à l'aide d'une seringue sans aiguille. Les gènes VIR du plasmide Ti désarmé permettent le transfert en trans du DNA situé entre les frontières droite et gauche du plasmide binaire. Après transcription dans la cellule végétale, le RNA, quasiment identique au RNA viral, peut initier l'infection. Aux : auxine ; Cyt : cytokinine ; FD : frontière droite ; FG : frontière gauche ; ORI : origine de répllication ; ORIsh : originine de répllication à large spectre d'hôte (fonctionne dans *E. coli* où est réalisé le clonage et dans *A. tumefaciens*) ; Op : opine ; Opcat : catabolisme des opines ; P : promoteur de la transcription ; R : gène de résistance utilisé pour le clonage ; T : terminateur de la transcription (facultatif dans le cas de l'agroinoculation) ; VIR : gènes de virulence.

(voir **figure 11**) est modifié de manière à permettre le transfert, vers la cellule végétale, d'une portion d'un plasmide binaire portant le cDNA codant pour le génome complet du virus d'intérêt, ici, le BWYV-FL1, sous la dépendance d'un promoteur fort et constitutif et éventuellement, d'un terminateur de la transcription. Une fois ce DNA transféré dans une cellule de la plante, sa transcription permet la synthèse d'un RNA très proche du génome naturel du virus (il possède un nucléotide supplémentaire en 5' et de un à 156 nt additionnels en 3', suivant la méthode utilisée pour terminer la transcription : ajout d'un ribozyme⁵ ou d'une portion de séquence de la cassette du terminateur NOS additionnée d'une queue polyA, respectivement). Ce RNA est traduit, synthétisant les protéines virales et donc sa propre réplicase, induisant ainsi l'infection virale.

Cette méthode a été utilisée avec succès pour de nombreux *Luteoviridae* et c'est la technique d'inoculation majoritairement utilisée lors des expériences présentées dans ce manuscrit. Elle est potentiellement applicable à tous les virus à RNA.

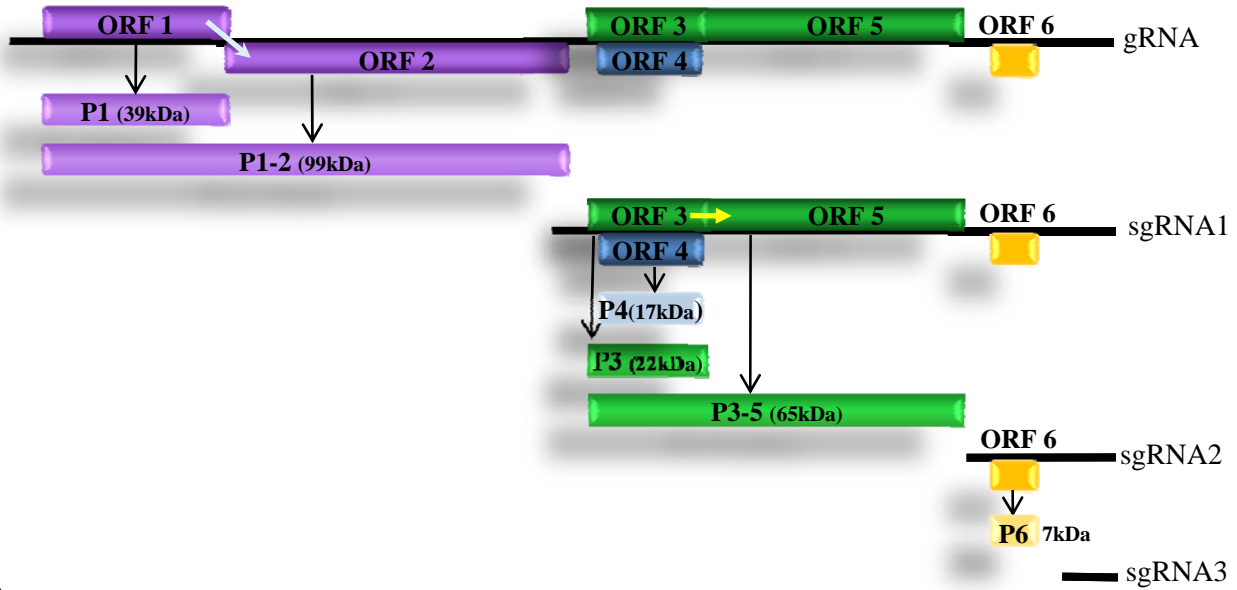
Une autre méthode a été développée par Hoffman *et al.* en 2001. Afin d'inoculer des plantes hôtes par le PLRV et le BWYV, cette équipe a adapté la technique de biolistique qui consiste à bombarder des cellules végétales avec des billes enrobées de DNA dans le but d'obtenir l'expression transitoire des gènes codés par le DNA.

L'intérêt majeur de cette technique est qu'outre l'utilisation directe de transcrits, il est possible de faire pénétrer des particules virales purifiées directement dans les cellules aptes à initier l'infection. Ainsi, cette méthode permet d'étudier l'évolution du génome viral après plusieurs générations et transferts dans différentes plantes tout en s'affranchissant de l'utilisation des pucerons (et donc de l'élevage et du travail fastidieux et délicat consistant à transférer les pucerons d'une plante à une autre, tout en laissant le vecteur suffisamment longtemps sur chaque plante pour que la transmission soit efficace). Cette méthode permet enfin d'éviter la présence dans la plante infectée d'un deuxième pathogène, *Agrobacterium tumefaciens*, utilisé pour l'agroinfection.

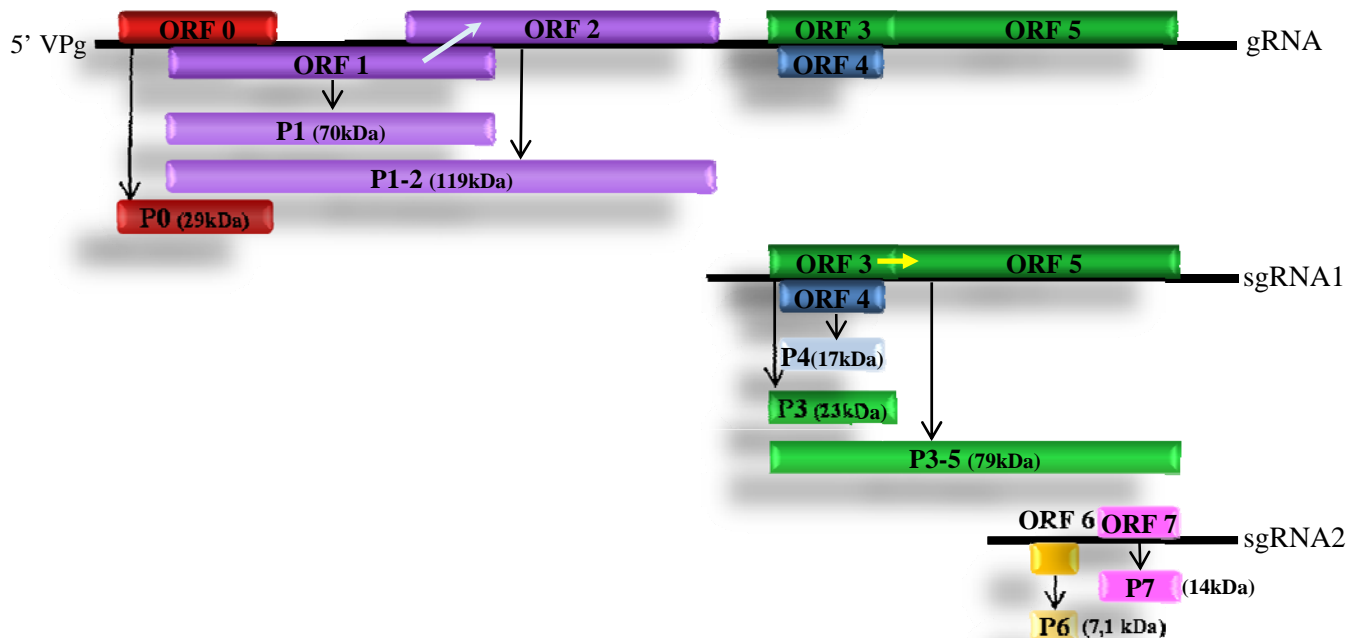
Néanmoins, la biolistique reste plus lourde à employer que l'agro-inoculation, la purification de particules virales étant plus laborieuse (le rendement est très faible, de l'ordre de 500 µg de virus par kg de plante ; l'inoculation d'une plante nécessite 10 à 20 µg de virions) que l'inoculation d'un milieu de culture bactérien par un stock de bactéries congelées.

⁵ RNA portant une activité catalytique. Ici, l'action du ribozyme permet le clivage en cis de la partie 3' superflue du transcrit

Luteovirus



Polerovirus



Enamovirus

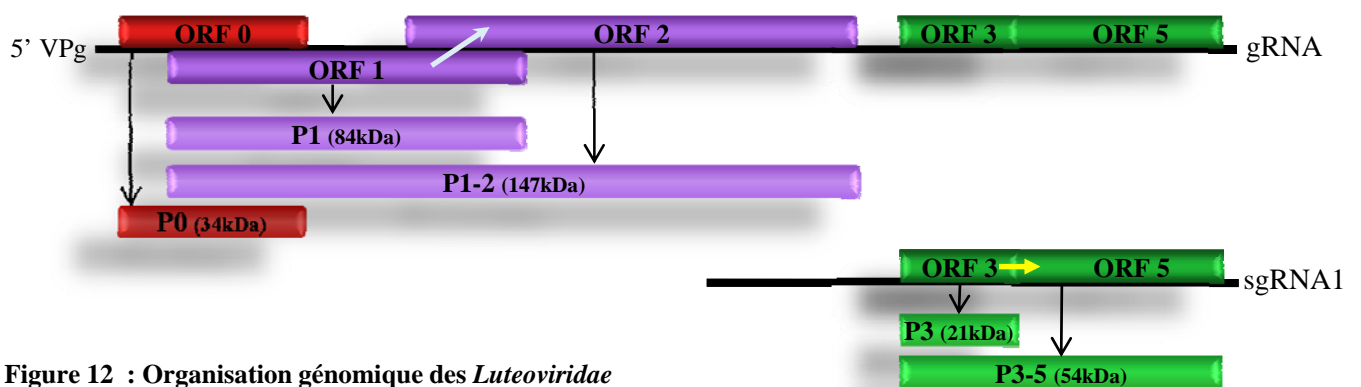




Figure 12 : Organisation génomique des *Luteoviridae*

 Mécanisme de frameshift – 1 permettant la synthèse de P2 en fusion avec P1.

 Mécanisme de translocation permettant la production de P5 en fusion avec P3. Les masses moléculaires des différentes protéines virales sont indiquées. Elles correspondent à la masse théorique calculée d'après la séquence du membre type de chaque genre. gRNA : RNA génomique ; sgRNA : RNA subgénomique (Adapté de Braut *et al.*, 2001)

L'efficacité de l'infection (nombre de plantes infectées / nombre de plante inoculées) est également moindre. Cette technique nécessite de plus des équipements coûteux ajoutés aux coûts de fonctionnement (billes d'or, synthèse des transcrits...).

I-5) Expression des gènes des *Luteoviridae*

I-5-1) Organisation génomique

Les trois genres composant la famille des *Luteoviridae* sont définis par leur structure et leur séquence génomique. Bien que leur organisation génomique soit globalement similaire, on peut noter des caractéristiques spécifiques à chaque genre. Ainsi, les plus évidentes sont la présence d'un ORF supplémentaire en 5' du génome, l'ORF 0, chez les polerovirus et les enamovirus et l'existence d'un ORF 6 à l'extrémité 3' du RNA génomique des membres des luteovirus. La présence des ORF 6 et 7 chez les polerovirus n'a pour l'instant été envisagée que pour le PLRV (Ashoub *et al.*, 1998). Les enamovirus, quant à eux, ne possèdent pas d'ORF 4. Les polerovirus et les enamovirus codent, de plus, pour une protéine VPg se fixant à l'extrémité 5' du génome alors qu'aucune modification n'a été observée chez les luteovirus (ni VPg, ni coiffe) (voir **figure 12**). Les degrés d'homologie de séquence de la partie 5' du génome et plus particulièrement, la séquence de la RNA polymérase RNA dépendante (voir paragraphe I-1) permet également de différencier les trois genres (pour revue, voir Miller *et al.*, 1995 ; Mayo et Miller, 1999 et Brault et Herrbach, 2006).

I-5-2) Stratégies d'expression

Les virus ont développé de multiples stratégies d'expression de leurs protéines. Ces stratégies non canoniques ont pour but d'échapper aux mécanismes de régulation cellulaire et aussi de favoriser l'expression des protéines virales par rapport aux protéines cellulaires. Elles peuvent également, dans un certain nombre de cas, permettre de compacter au maximum leur information génétique, diminuant ainsi l'encombrement du génome viral (pour revue, voir Maia *et al.*, 1996).

L'originalité des *Luteoviridae* provient du fait qu'ils ont réussi le tour de force de mettre en place un grand nombre de ces stratégies sur un génome de très faible taille (moins de 6 Kb).

| | Premier ORF : ORF0 | Second ORF : ORF1 | Premier ORF : ORF3 | Second ORF : ORF4 | contexte d'initiation consensus chez les : |
|----------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------------------------------|
| BWYV | UUG AUG CA | AUAAUG UA | UU AAUG AA | UC AAUG GA | dicotylédones |
| PLRV | CAU AUG AU | AUCAUG AA | UU AAUG AG | GA AAUG UC | AN ^A _C AUGGC |
| CYDV | CGC AUG UU | AAA AUG AA | UU AAUG AG | C CAAUGGC | monocotylédones |
| BYDV-PAV | | | UG AAUG AA | AAA AUGGC | RC NAUGGC |

Figure 13: Contexte d'initiation de la traduction d'ORF se chevauchant

Le codon AUG initiateur de la traduction est représenté en caractères gras. Les caractères rouges indiquent les positions des nucléotides par rapport à la séquence consensus utilisée par leur hôte (BWYV et PLRV infectent les dicotylédones, CYDV et BYDV, les monocotylédones) (les séquences consensus sont celles identifiées par Cavener et Ray en 1991). Les séquences retrouvées dans les seconds ORF sont toujours plus proches de la séquence consensus que celles du premier ORF ce qui permet leur expression par le mécanisme de « leaky scanning » (les ribosomes ne détectent pas systématiquement le premier codon AUG). R=A ou G.

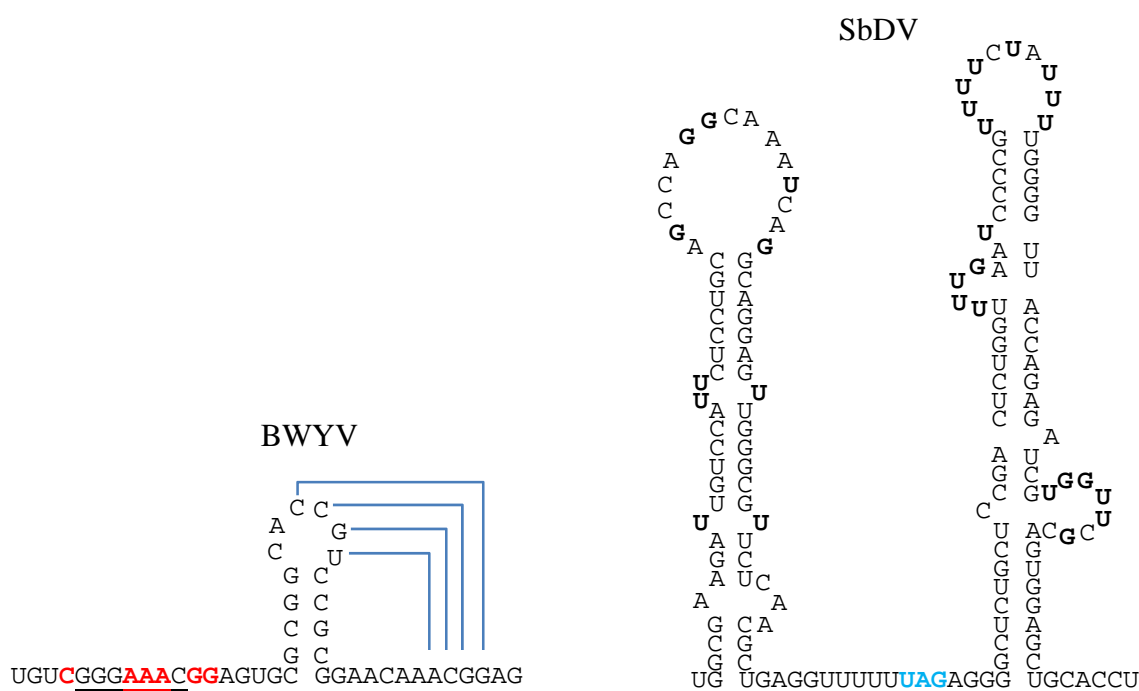


Figure 14: structure secondaire du RNA génomique au niveau du frameshift -1

Chez un polerovirus (BWYV) et un luteovirus (SbDV). L'heptanucléotide facilitant le glissement du ribosome est souligné. En rouge, des nucléotides conservés chez tous les polerovirus. Le pseudonoed est schématisé par les lignes bleues. La particularité des luteovirus, outre la complexité de leur structure en épingle à cheveux, est que le frameshift s'opère quelques nucléotides avant le codon stop de l'ORF1 (en bleu), contre 475 à 628 pour les polerovirus. (d'après Miller *et al.*, 1995)

En effet, parmi les stratégies d'expression connues, seules l'utilisation du brin complémentaire comme matrice et la technique du saut du ribosome n'ont pour l'instant été identifiées sur aucun *Luteoviridae*. Les mécanismes nécessaires à l'expression de chaque protéine virale sont présentés ci-dessous.

L'ORF codant pour la protéine P0 est situé à l'extrémité 5' du génome viral, la protéine P0 est donc exprimée de manière classique, grâce à une lecture du RNA par un ribosome qui initie la traduction au premier codon AUG rencontré. Néanmoins, ce codon est situé dans un contexte défavorable à l'initiation de la traduction, c'est pourquoi, dans la majorité des cas, le ribosome va continuer la lecture du génome jusqu'au codon AUG suivant, permettant ainsi l'expression de l'ORF1 par un mécanisme dit de « leaky scanning » (**figure 13**). La protéine P1 ainsi synthétisée est, chez les poliovirus, une protéine portant plusieurs domaines fonctionnels dont un domaine protéase capable de couper P1 en *trans* (Li *et al.*, 2000), libérant ainsi une nouvelle protéine.

L'ORF2 est exprimé par un mécanisme de décalage de la phase de lecture ou « frameshift » -1. C'est la structure secondaire du RNA, sous la forme d'un pseudonoeud, qui bloque l'avancée du ribosome lors de la traduction de l'ORF1. La présence d'un heptanucléotide (XXXYYYYZ avec X = A, G, U; Y = A, U; Z = A, C, U) en amont de cette structure facilite le glissement du ribosome d'un nucléotide en direction de l'extrémité 5', changeant ainsi la phase de lecture, ce qui va permettre la production d'une protéine de fusion P1-P2 (**figure 14**). L'efficacité de synthèse de la protéine P1-P2 du BYDV a été évaluée à 1%, par rapport à celle de la protéine P1 seule (Brault et Miller, 1992). Cette estimation réalisée à l'aide d'un système de gènes rapporteurs peut néanmoins être sensiblement différente en contexte viral.

Les ORF 3, 4 et 5, situés dans la partie 3' terminale du génome viral, sont exprimés à partir d'un RNA subgénomique. Celui-ci est vraisemblablement produit à partir du brin - servant également de matrice pour l'amplification virale, mais l'initiation de la transcription se fait au niveau d'un promoteur interne. En effet, une séquence d'une quinzaine de nucléotides (ACAAAA suivi d'une région riche en U) homologue à l'extrémité 5' du RNA génomique, a été identifiée à l'extrémité 5' du RNA subgénomique. Elle pourrait servir de séquence promotrice pour la réplicase virale (Miller *et al.*, 1995).

L'AUG initiateur de l'ORF3 est le premier rencontré par le ribosome lors de la lecture du RNA subgénomique. Comme pour l'ORF0, le gène codant pour la protéine P3 est situé dans un contexte d'initiation de la traduction défavorable (voir **figure 13**). C'est donc également par un mécanisme de leaky scanning que le produit de l'ORF4 est synthétisé. L'ORF5, comme l'ORF2, ne possède pas d'AUG initiateur qui lui soit propre. Il est traduit en fusion avec la protéine P3 par un mécanisme de translecture du codon stop ambre de l'ORF3. Celui-ci est reconnu par un tRNA suppresseur qui va permettre l'insertion d'un acide aminé et la poursuite par le ribosome de la lecture du RNA viral jusqu'au codon de terminaison de l'ORF5.

D'autres stratégies d'expression ont été récemment mises en évidence pour certains *Luteoviridae*. Par exemple, la présence d'un site interne d'entrée du ribosome fonctionnel (IRES : internal ribosome entry site) permettrait la synthèse d'une petite protéine appelée Rap1 dont le gène est situé à l'intérieur de la séquence codant pour la protéine P1 du PLRV (Jaag *et al.*, 2003).

Il a également été démontré que le BYDV était capable d'induire la synthèse d'au moins deux petits RNA subgénomiques supplémentaires (sgRNA2 et sgRNA3). La structure secondaire de leurs promoteurs est très différente de celle du promoteur permettant l'expression du premier RNA subgénomique (sgRNA1). De plus, ils sont placés en aval du site d'initiation de la transcription alors que le promoteur du sgRNA1 est majoritairement situé en amont du site d'initiation (Koev et Miller, 2000). Ces RNA pourraient d'ailleurs servir à une autre particularité des luteovirus : la traduction indépendante de la coiffe.

Ce mécanisme requiert une séquence localisée en 3' du génome et nommée BTE (BYDV cap-independent translation element) qui interagit avec une séquence retrouvée en 5' du génome viral et en 5' du sgRNA1, permettant ainsi leur circularisation et le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction. Lorsqu'une délétion est effectuée dans cette région, l'efficacité de traduction est réduite de 20 à 30 fois. Cette défaillance peut être complétée *in vitro* par l'addition d'une coiffe lors de la transcription (Miller *et al.*, 1995).

In vivo, une fois la synthèse de la réplicase achevée, son activité provoquerait une suraccumulation du sgRNA2. Ce RNA subgénomique portant la séquence BTE à son extrémité 5' inhiberait alors la traduction des ORF exprimés à partir du RNA génomique, de manière plus efficace que celle des ORF3, 4 et 5, portés par le sgRNA1. Cela aurait donc pour effet une transition de l'expression des gènes précoces vers les gènes tardifs impliqués dans la structure et le mouvement des virions. Une mutation empêchant l'expression de l'ORF6 des luteovirus,

porté par le sgRNA2 n'inhibe pas sa fonction, ce qui indique que la molécule active est bien le RNA. Les luteovirus semblent donc avoir développé une stratégie inédite de l'expression des gènes et une nouvelle fonction de régulateur de traduction a pu être attribuée à un RNA subgénomique (Wang *et al.*, 1999 ; Shen *et al.*, 2006).

I-5-3) Fonctions connues des différentes protéines virales

a) La protéine P0

La protéine P0 a d'abord été identifiée comme facteur de pathogénicité puisque l'expression de la protéine P0 du PLRV dans des plants de pommes de terre provoque des dommages semblables aux symptômes observés lors de l'infection virale (van der Wilk *et al.*, 1997). En 2002, Pfeffer *et al.* ont démontré l'activité de suppresseur de RNA silencing de cette protéine. Des précisions plus détaillées sur la fonction et les caractéristiques de cette protéine seront exposées dans le premier chapitre des résultats, puisque P0 a fait l'objet d'une partie des travaux de recherches effectués durant ma thèse.

b) La protéine P1

La protéine P1 est une polyprotéine contenant plusieurs domaines fonctionnels. Elle possède un site de fixation aux RNA ainsi qu'un domaine hélicase. La protéine P1 des polerovirus porte une activité protéase de type « chymotrypsin-like serin proteinase » capable d'induire le clivage, en *trans*, de la protéine P1, libérant son extrémité C-terminale (Mayo et Miller, 1999 ; Li *et al.*, 2000). Ce produit de clivage contient la protéine VPg (viral protein genome-linked) des polerovirus et des enamovirus, nécessaire à la réplication virale.

Cette petite protéine (environ 17 kDa pour la VPg du CYDV, 7 kDa pour celle du PLRV ; Mayo *et al.*, 1982; Murphy *et al.*, 1989) se lie de manière covalente à l'extrémité 5' du génome viral. La manière dont la protéine VPg est maturée (clivage de l'extrémité C-terminale de la protéine P1) est inconnue à ce jour. Des études menées sur le CYDV suggèrent que la protéine VPg, liée à deux nucléotides, pourrait également servir d'amorce à la synthèse du brin négatif lors de la réplication virale (Osman *et al.*, 2006).

NLS / NoLS

```

1                                     130
BWVY-FL1 MNTVVGRRII NG---RRRP RRQTRRAQRP QVVVVVQISR ATQ RRFRRR RRGNNRTGR VPTRGAGSSE TFVFSKDNLA GSSSGAITFG PSLSDCPAFS NGMLKAYHEY KISMVILEFV SEASSQNSGS
CABYV MNTVAARNQN AG---RRR- RRNQRPAARD RVVVVNPIGG PPR RRQRN RRRPNRGG- ---RRGSPGE TFVFSKDNLT GSSTGSITFG PSLSESPAFS SGILKAYHEY KIIMVQLEFI SEASSTSSGS
PLRV MSTVVVKGNV NGGVQQPRMR RRQSLRRRAN RVQPVVMVTA PGQ RRRRRR RGGNRRSRR GVPRGRGSSSE TFVETKDNLV GNTQGSFTFG PSLSDCPAFK DGLLKAYHEY KITSILLQFV SEASSTSSGS
CYDV-RPV MSTVVLRSNG NGS---RRRR QRVARRRPAA RTQPVVVVTIS NGP RRGRRR RRVGPRRGR PRSGGGRSRE TFVFSKDSLK GNSGGSITFG PSLSEYPAFQ NGVLKAYHEY KITNCVLQFV SEASSTAAGS
BYDV-MAV MNSVGRNN- -----RR-- RNGPRRRARV SAVRRMVVVQ PNR GPKRRR RRRTRGGGA LISGPAGRTE VFVFSVDNLK ANSSGTIKFG PDLQCPALS GGILKSYHLY KITNVKVEFK SHASASTVGA
BYDV-PAV MNSVGRRGF-----RRAN QNGTRRRRR- RTVRPVVVVQ PNR GPRRRN GRRKGRGGA PVFRPTGGTE VFVFSVDNLK ANSSGAIKFG PSLQCPALS DGLKSYHRY KITSIRVEFK SHASATTAGA
PEMV1 MPTRSK SKANQRRRR RRAVVVAPSM AQP TQSRPP RRRSKRGGG ----NGSHTV DFSMVHGPFN GNAIGIVKFG PS-SDCQIK -GNLAAYQKY RIVNLRVVYQ SEAAADRGC
Consensus m..v..r... ..rR... ..yyyyy. r..vvv.... ...RR. rrr.rgG. ....gs.te .Fvfs.d.l. gns.G.!kfg Psl$cpa... .G.LkaYh.Y kI....v.% SeAsat..G.

131                                     210
BWVY-FL1 IAYELDPHC- KLNLSLSTIN KFGITKPGKR AFTASYINGT ENHDVAEDQF RILYKNGSS S-IAGSFRII IKCQFHNP
CABYV IAYELDPHC- KLSSLQSTIN KFGITKSGLR RWTAKQINGM EWHDATEDQF KILYKNGSS S-VAGSFRII IKCQVQNP
PLRV IAYELDPHC- KVSLSQSYVN KFQITKGGAK TYQARMINGV EWHDSDEDQF RILWKNGKS SDSAGSFRTI IKVALQNP
CYDV-RPV IAYELDPHC- KASSLASTIN KFTIITKGAR SFPKMINGL EWHPSDEDQF RILYKNGAS S-VAGSFKII LRVLQNP
BYDV-MAV MFIELDTWC- SQSTLGSYIN SFTISKSATK TFTAQQIDGK EFRSTVWQF YMLYKANGST SDTAGQFIIT IRVANMTP
BYDV-PAV IFVELDTAC- KQSALASYIN SFTISRTASK VFRAEAIN GK EFKESTIDQF WMLYKANGIT TDTAGQFIIT MSVSLMTAK
PEMV1 IAYHVDTSTI KKAADVLLD TWNIRSNGSA TFGREILGDQ PWYESNKDQF FFLYRGTGGT -DVAGHYRIS GRQLMNASL
Consensus iayelDc.c. k.s.l.s.i# .f.i.k.g.. tf.a..ing. ew.#s..#QF ..LYkng.t sdvAG.*rIt .r.qlmpk.

```

Figure 15 : Alignement de séquence de la protéine majeure de capsid de différents *Luteoviridae*

Les acides aminés en rouge conservés à plus de 90% et en bleu, à plus de 50% montre la forte identité de séquence de la protéine P3 des *Luteoviridae*. Le cadre rouge souligne la présence d'un signal de localisation nucléaire (NoLS) potentiellement également responsable de la localisation nucléaire de la protéine (NLS).

Alignements réalisés sur <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

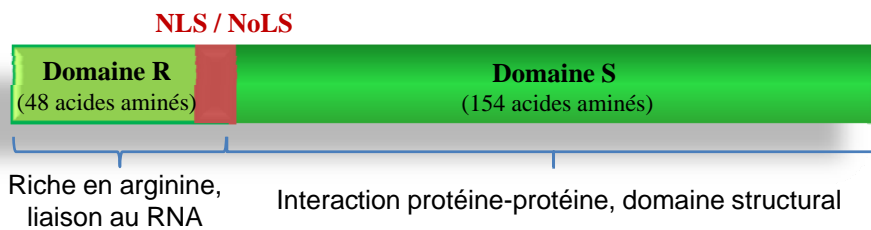


Figure 16 : domaines fonctionnels de la protéine majeure de capsid

Les tailles des domaines correspondent à la protéine P3 du BWYV

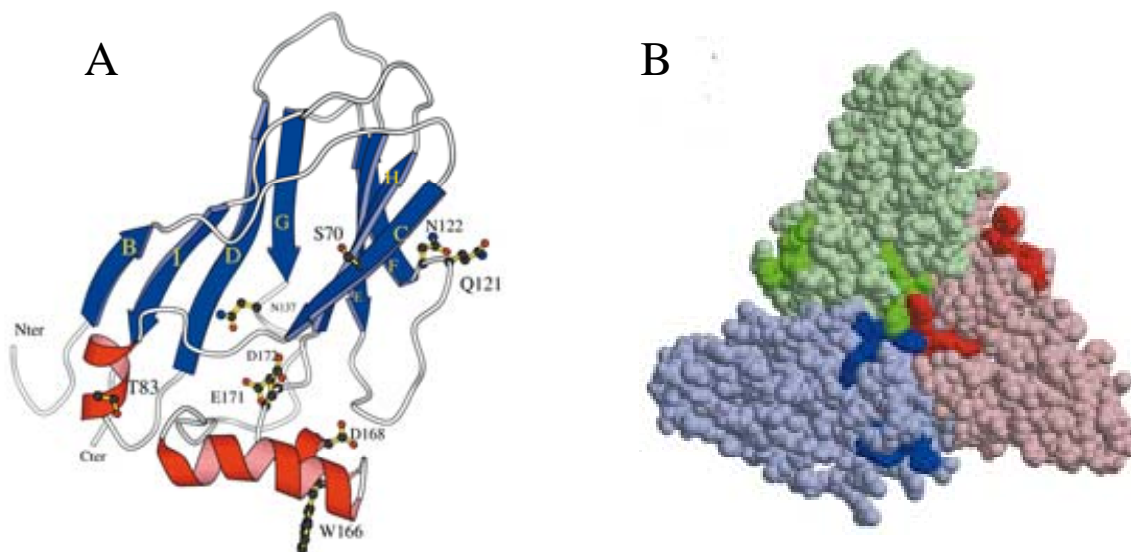


Figure 17 : Modélisation structurale du domaine S de la protéine majeure de capsid du BWYV

A) Monomère B) Association trimérique (Brault *et al.*, 2003)

Aucune modification de l'extrémité 5' du génome des luteovirus n'a été mise en évidence jusqu'à présent : ni VPg, ni coiffe. De plus, la protéine P1 des luteovirus ne possède pas de séquence caractéristique d'une activité protéase (Mayo et Ziegler-Graff, 1996).

c) La protéine P2

La protéine P2 possède un domaine RNA polymérase RNA dépendante (RdRP) situé dans la partie C-terminale de la protéine et caractérisé par un motif GDD (Veidt *et al.*, 1992). Etant toujours exprimée en fusion avec la protéine P1, P1-P2 serait capable de fixer le RNA, de le dérouler et de le répliquer, il semble donc que cette protéine porte la fonction répliquative.

De plus, il a été montré que les protéines P1 et P1-P2 sont les seules protéines indispensables à l'amplification du BWYV dans une cellule végétale isolée (protoplaste), elles sont donc nécessaires et suffisantes à la répllication du génome viral (Reutenauer *et al.*, 1993).

d) La protéine P3 ou protéine majeure de capsid (CP)

La protéine P3 (ou CP) est la protéine majeure de capsid. 180 exemplaires de la protéine s'assembleraient selon une symétrie T=3 afin de former une particule icosaédrique d'environ 25 nm de diamètre (Waterhouse *et al.*, 1988) permettant d'empaqueter le génome viral (les RNA subgénomiques ne sont pas encapsidés). La **figure 15** montre la forte homologie de séquence de cette protéine à travers les *Luteoviridae*. L'organisation générale de la protéine est donc conservée au sein de la famille : l'extrémité N-terminale est riche en arginine (et donc appelée domaine R) et se situerait à l'intérieur de la capsid virale où elle interagirait avec le RNA génomique. Le domaine R est suivi d'un domaine S (pour shell) qui constitue la partie structurale proprement dite (voir **figure 16**) (Rossmann et Johnson, 1989).

Aucune structure cristallographique de la protéine ou du virus n'a été résolue pour le moment. Néanmoins, il existe plusieurs études analysant l'effet de mutations dans la protéine de capsid du PLRV (Lee *et al.*, 2005 ; Kaplan *et al.*, 2007) et du BWYV (Brault *et al.*, 2003) ainsi que des modèles structuraux établis par comparaison avec des protéines de capsid d'autres virus à RNA dont la structure est connue et proche de celle des *Luteoviridae* (Terradot *et al.*, 2001 ; Brault *et al.*, 2003). Ces expériences tendent à montrer que malgré leur forte similarité de séquence, la structure des protéines de capsid des différentes espèces pourraient

varier sensiblement. La **figure 17** présente le modèle établi pour le domaine S du BWYV par Brault *et al.* (2003).

L'encapsidation du virus, et donc, la protéine P3, est requise à l'infection systémique des plantes hôtes (Ziegler-Graff *et al.*, 1996) et à sa transmission par le puceron vecteur (voir section I-4-2).

En 2005, Haupt *et al.* ont pu montrer qu'en dehors de sa localisation cytoplasmique au sein des particules virales, la protéine P3 du PLRV, sous une forme libre, a également une forte localisation nucléolaire. Cette localisation, régie par le NoLS (signal de localisation nucléolaire) PRRRRRQSLRRRANR localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine (et peut-être également à l'origine de la localisation nucléaire de la protéine puisqu'aucun autre NLS n'a été identifié), suggère que P3 pourrait posséder une activité autre que sa fonction structurale. En effet, la localisation du NoLS dans le domaine supposé interagir avec le génome viral, à l'intérieur de la particule, indique que la fonction putative de P3 dans le nucléole est indépendante de son rôle dans l'encapsidation. Des études récentes menées au laboratoire par Julia De Cillia démontrent que les protéines P3 du BWYV et du CABYV sont également adressées au nucléole (communication personnelle). De plus, il a été montré que bien que le virus soit capable de se répliquer dans des protoplastes en absence de la protéine P3, l'accumulation du RNA viral est quatre fois moins efficace (Reutenauer *et al.*, 1993). Cette diminution peut être expliquée par une instabilité accrue du RNA en absence de capsid mais n'exclut pas une fonction de P3 au sein du nucléole ou elle pourrait, par exemple, perturber l'expression des gènes de l'hôte afin de placer le virus dans un contexte plus propice à la réplication.

e) La protéine P4

La protéine P4 est une petite protéine d'environ 20 kDa caractérisée par un domaine N-terminal acide, chargé négativement, formant trois hélices alpha, et un domaine C-terminal basique, chargé positivement et possédant une structure en feuillets bêta (Mayo and Ziegler-Graff, 1996). Elle n'est pas nécessaire à la réplication du RNA viral dans les protoplastes (Reutenauer *et al.*, 1993). Il a été montré, pour le PLRV, que la portion C-terminale de la protéine est capable de fixer le RNA et le DNA simple brin, sans spécificité de séquence (Tacke *et al.*, 1991). La partie N-terminale est, elle, impliquée dans des interactions protéine-protéine permettant la formation d'homo-dimères P4-P4 (Tacke *et al.*, 1993) et contribuant à la

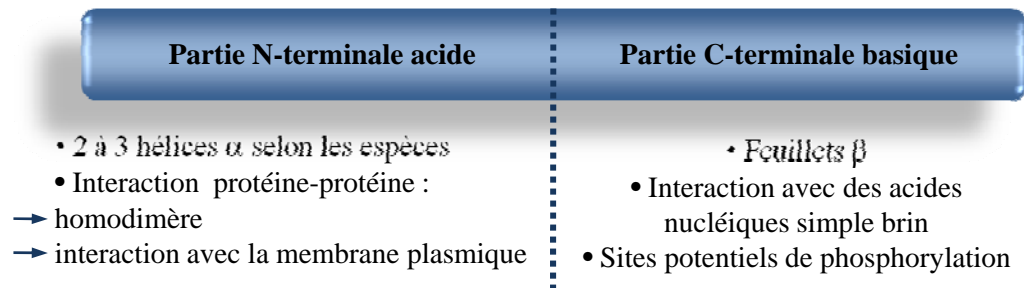


Figure 18 : domaines fonctionnels de la protéine P4

D'après des études réalisées majoritairement sur la protéine P4 du PLRV

| Virus | Hôte | Infection par un mutant P4- | Référence |
|----------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| BWYV | <i>Nicotiana clevelandii</i> | + | Ziegler-Graff <i>et al.</i> 1996 |
| BWYV | <i>Nicotiana benthamiana</i> | +/- | Brault et Ziegler-Graff, non publié |
| BWYV | <i>Arabidopsis thaliana</i> | +/- | Brault et Ziegler-Graff, non publié |
| PLRV | <i>Solanum tuberosum</i> | - | Lee <i>et al.</i> , 2002 |
| PLRV | <i>Physalis floridana</i> | - | Lee <i>et al.</i> , 2002 |
| PLRV | <i>Nicotiana benthamiana</i> | + | Lee <i>et al.</i> , 2002 |
| PLRV | <i>Nicotiana clevelandii</i> | + | Lee <i>et al.</i> , 2002 |
| BYDV-PAV | Orge | - | Chay <i>et al.</i> 1996 |

Table 5 : importance de la protéine P4 dans l'infection systémique de différents hôtes

Le signe « + » indique qu'un virus mutant n'exprimant pas la protéine P4 est capable d'infecter de manière systémique la plante hôte précisée. Le signe « - » traduit l'incapacité du virus mutant à établir une infection. Le symbole « +/- » précise que le nombre de plante infectées est très réduit par rapport au virus sauvage.

liaison de la protéine aux membranes des cellules-hôtes. Dans la cellule, P4 est présente sous forme phosphorylée (Tacke *et al.*, 1993). (Voir **figure 18**).

Ces caractéristiques sont retrouvées chez d'autres protéines virales ayant pour fonction le mouvement du virus au sein de la plante (comme la protéine 30K du TMV, voir Okada, 1999 pour revue). En 1996, Chay *et al.* ont mis en évidence le caractère indispensable de la protéine P4 du BYDV-PAV pour l'infection systémique de plants d'avoine, ce qui est en faveur d'une fonction dans le mouvement. La localisation de P4 du PLRV au niveau des plasmodesmes, même en dehors du contexte viral, soutient cette hypothèse (Schmitz *et al.*, 1997). De plus, Hofius *et al.* (2001) ont montré que la protéine P4 du PLRV, exprimée dans des plantes transgéniques, augmente la taille limite d'exclusion des plasmodesmes, passant ainsi de 1 à plus de 12kDa.

Cette localisation serait également à l'origine de désordres dans le transport de molécules, notamment de sucres, d'une cellule à l'autre pouvant expliquer les phénomènes de nanisme, de blanchiment et de nécrose observés sur des plants de tabacs exprimant de manière constitutive la protéine P4 du PLRV (Herbers *et al.*, 1997). Pourtant, des plants de pomme de terre ne présentent aucun phénotype particulier lorsqu'ils expriment P4 sous la dépendance du promoteur 35S (Schmitz *et al.*, 1997).

D'autres études prouvent que cette même protéine peut être nécessaire à l'établissement d'une invasion systémique sur certaines plantes hôtes comme la pomme de terre pour le PLRV (Lee *et al.*, 2002) ou l'orge pour le BYDV-PAV (Chay *et al.*, 1996) ou au contraire superflue sur d'autres plantes comme *N. clelandii* pour le BWYV et le PLRV (Ziegler-Graff *et al.* 1996 ; Lee *et al.*, 2002) (voir **table 5**). De ce fait, il a été suggéré que l'activité de P4 est hôte-dépendante.

Outre sa fonction dans le transport intercellulaire, la protéine P4 pourrait également être impliquée dans le transfert intracellulaire du RNA viral, du cytoplasme vers le noyau, comme cela a été proposé en raison de la localisation au niveau de l'enveloppe nucléaire de la protéine P4 du BYDV-GAV (Liu *et al.*, 2005), et ce, indépendamment d'une fonction dans la réplication du RNA génomique (Chay *et al.* 1996). Dans la cellule, le transport de P4 est dépendant du cytosquelette d'actine et sa localisation aux plasmodesmes requiert l'utilisation du système sécrétoire. De plus, son expression serait régulée dans les feuilles « puits » par la machinerie de dégradation cellulaire (le proteasome 26S) selon un mécanisme mettant en jeu le réseau microtubulaire (Vogel *et al.*, 2007) .

A



B

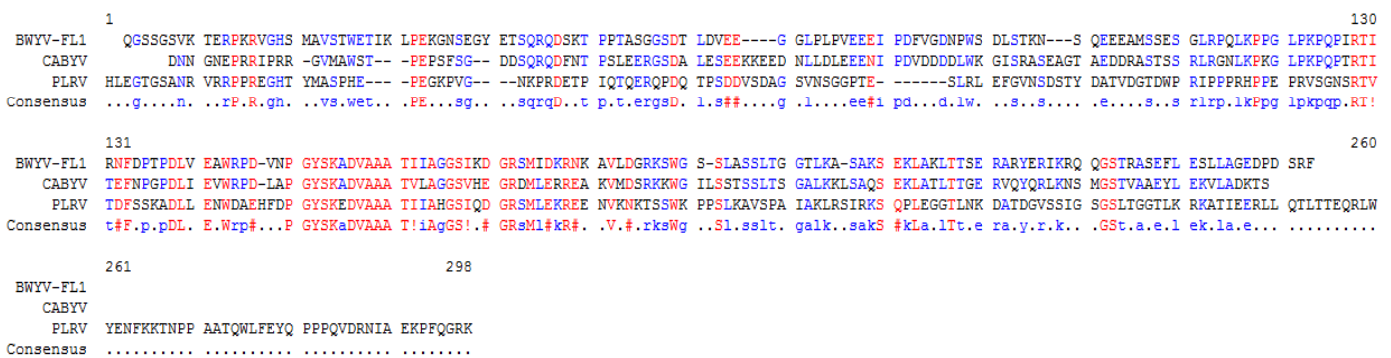


Figure 19 : alignement de séquence de la protéine mineure de capsid de différents *Luteoviridae*

Les acides aminés notés en rouge sont conservés à plus de 90%, les acides aminés bleus, à plus de 50%. A) Alignement de la séquence complète de la protéine P5. On distingue nettement le domaine conservé du domaine non conservé. B) Alignement du domaine C-terminal (non conservé) du BWYV, du CABYV et du PLRV. La forte homologie du domaine NC chez ces trois poliovirus transmis par *M. persicae* suggère que ce domaine pourrait influencer la spécificité de vecteur (Guilley *et al.*, 1994).

Alignements réalisés sur <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>

f) La protéine P5 ou protéine mineure de capsid

Le produit de l'ORF5 est aussi appelé domaine de ReadThrough ou RT en raison de sa stratégie d'expression en fusion avec la protéine de capsid. P5 n'existe donc, dans la plante, que sous la forme d'une protéine P3-P5, également nommée « protéine mineure de capsid ». Quand elle est présente au sein des particules virales (en s'y insérant par sa partie P3, la partie correspondant à l'ORF 5 étant exposée à l'extérieur de la particule), la proportion de protéine P3-P5 par rapport à P3 a été estimée à environ 1 pour 20 (Mutterer *et al.*, 1999b).

La protéine n'est pas requise pour la réplication dans une cellule isolée (Mayo et Ziegler-Graff, 1996), ni pour l'assemblage des particules virales (Reutenauer *et al.*, 1993)

- Rôle de P5 dans la plante

La partie N-terminale du produit de l'ORF 5 (environ 210 acides aminés) est très conservée au sein des *Luteoviridae* (domaine C : conservé) (voir **figure 19-A**). Des expériences de mutagenèse dirigée introduisant de petites délétions (les substitutions d'acides-amino sont difficiles à utiliser car le virus a une grande tendance à sélectionner des révertants pour ce type de mutations ; Brault *et al.*, 1995, 2000) ont montré que le domaine C porte un motif important impliqué dans l'incorporation de la protéine P3-P5 dans la capsid chez le BWYV (Bruyère *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été récemment observés chez le PLRV (Peter *et al.*, 2008). Deux séquences nucléotidiques également localisées dans cette partie conservée seraient indispensables à la translecture du codon stop de l'ORF3 et donc à la synthèse de la protéine de fusion (Brown *et al.*, 1996 ; Bruyère *et al.*, 1997).

La partie conservée de P5 semble également jouer un rôle dans le mouvement à longue distance. Même si un mutant de délétion peut infecter une plante de *Nicotiana clevelandii* de manière systémique, le nombre de cellules contenant des particules virales est très inférieur à celui observé après infection par un virus sauvage (Mutterer *et al.*, 1999). Peter *et al.* (2008) suggèrent que cette fonction de P5 dans le mouvement systémique pourrait être hôte-spécifique et qu'elle ne serait pas strictement dépendante de l'incorporation de la protéine dans la particule virale.

La partie C-terminale est, elle, beaucoup plus variable (domaine NC : non-conservé). Elle est nécessaire à l'établissement des symptômes par le BWYV chez *Nicotiana clevelandii* (Bruyère *et al.*, 1997) mais peut être éliminée sans que la survie du virus en soit trop affectée.

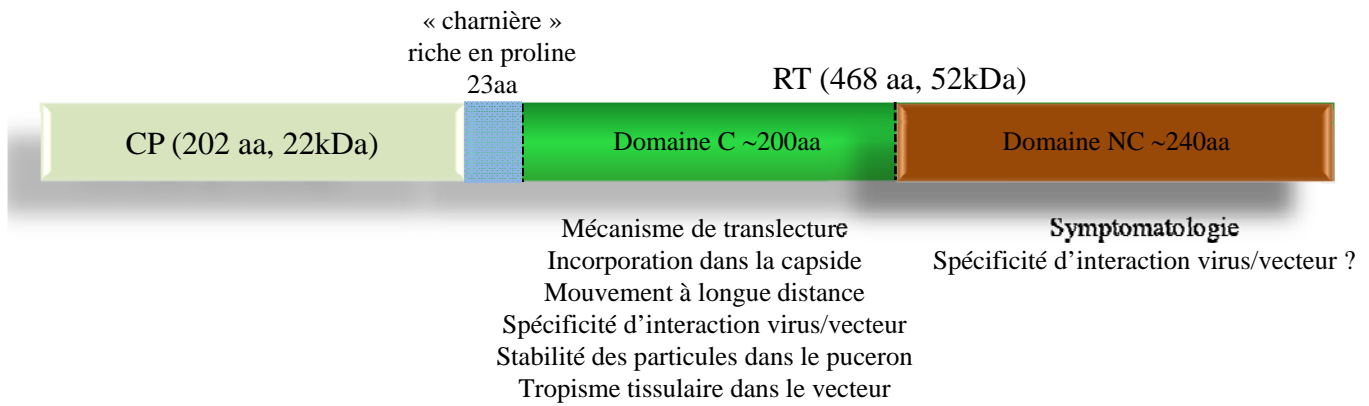


Figure 20 : domaines fonctionnels de la protéine mineure de capsid
 Les tailles des domaines correspondent à la protéine P5 du BWYV

En effet de nombreuses expériences indépendantes ont pu montrer que lors de la purification de particules virales, la protéine P3-P5 est présente sous une forme tronquée, d'un poids moléculaire apparent d'environ 55 kDa (au lieu des 74 kDa de la protéine complète pour le BWYV). Néanmoins, ces virions sont parfaitement capables d'induire l'infection d'une plante saine après avoir été transmis par leur puceron vecteur. On ne sait pas à l'heure actuelle si cette forme tronquée a une signification biologique ou si elle est produite lors de la purification des particules (PLRV : Bahner *et al.*, 1990 ; BYDV : Martin *et al.*, 1990 ; BWYV ; Brault *et al.*, 1995).

- Rôle de P5 dans le puceron vecteur

Une avancée importante dans l'étude de la transmission et des interactions virus-vecteur fut la mise en évidence de la nécessité du domaine de readthrough dans cette étape du cycle viral (Brault *et al.*, 1995, Chay *et al.*, 1996). Sa partie N-terminale conservée interagit avec une protéine chaperone, la symbionine, homologue de la protéine GroEL d'*Escherichia coli*, produite par la bactérie endosymbiotique *Buchnera aphidicola* et relarguée dans l'hémolymphe du puceron. Cette interaction assure une stabilité à la particule virale dans l'insecte (Van Den Heuvel *et al.*, 1997 ; Filichkin *et al.*, 1997). En effet, un virus ne présentant pas de protéine P5 à sa surface est dégradé à hauteur de 90% au bout de 120 heures après microinjection dans l'hémolymphe contre 67% pour un virus sauvage (Van den Heuvel *et al.*, 1997).

Le domaine C de la protéine P5 est également responsable du tropisme tissulaire du virus au sein du système digestif du puceron, ainsi que de la spécificité de l'interaction virus-vecteur (Brault *et al.*, 2005) bien qu'il semblerait que, pour ce dernier point, certains déterminants pourraient également se localiser dans la partie variable (Jolly and Mayo, 1994 ; Guilley *et al.*, 1994) (voir **figure 19-B**). Enfin, le franchissement des membranes des cellules des glandes salivaires ne peut avoir lieu sans P5 (Reinbold *et al.*, 2001) (pour plus de détails, voir le paragraphe I-4-2).

La **figure 20** schématise les domaines de la protéine de Readthrough impliqués dans ses différentes fonctions connues.

g) Autres protéines virales putatives

L'existence potentielle des protéines P6 et P7 a été suggérée pour le PLRV et le CABYV. La synthèse d'un RNA subgénomique permettant leur expression en contexte viral a été montrée (Ashoub *et al.*, 1998). Ce sont de petites protéines basiques. Des expériences *in vitro* proposent que P7 pourrait se lier au RNA viral mais leur rôle biologique reste à démontrer.

Les luteovirus ne présentent qu'un ORF 6. Sa taille varie (de 4,3 à 7,2 kDa) et sa séquence diffère d'un isolat à l'autre, même si la majorité des différences est observée sur la troisième base des codons (Chaloub *et al.*, 1994). Cette protéine peut être traduite *in vitro* (Wang *et al.*, 1999) mais n'a jamais été détectée *in vivo* et sa fonction, si la protéine est effectivement synthétisée *in planta*, est inconnue à ce jour.

Une nouvelle protéine exprimée à partir du RNA génomique a récemment pu être identifiée chez le PLRV : Rap1. Son gène est localisé à l'intérieur de la séquence codant pour la protéine P1 mais dans une autre phase de lecture. Son rôle exacte n'est pas encore connu mais des expériences utilisant une approche par génétique inverse suggèrent que la synthèse de Rap1 soit indispensable à la réplication virale (Jaag *et al.*, 2003).

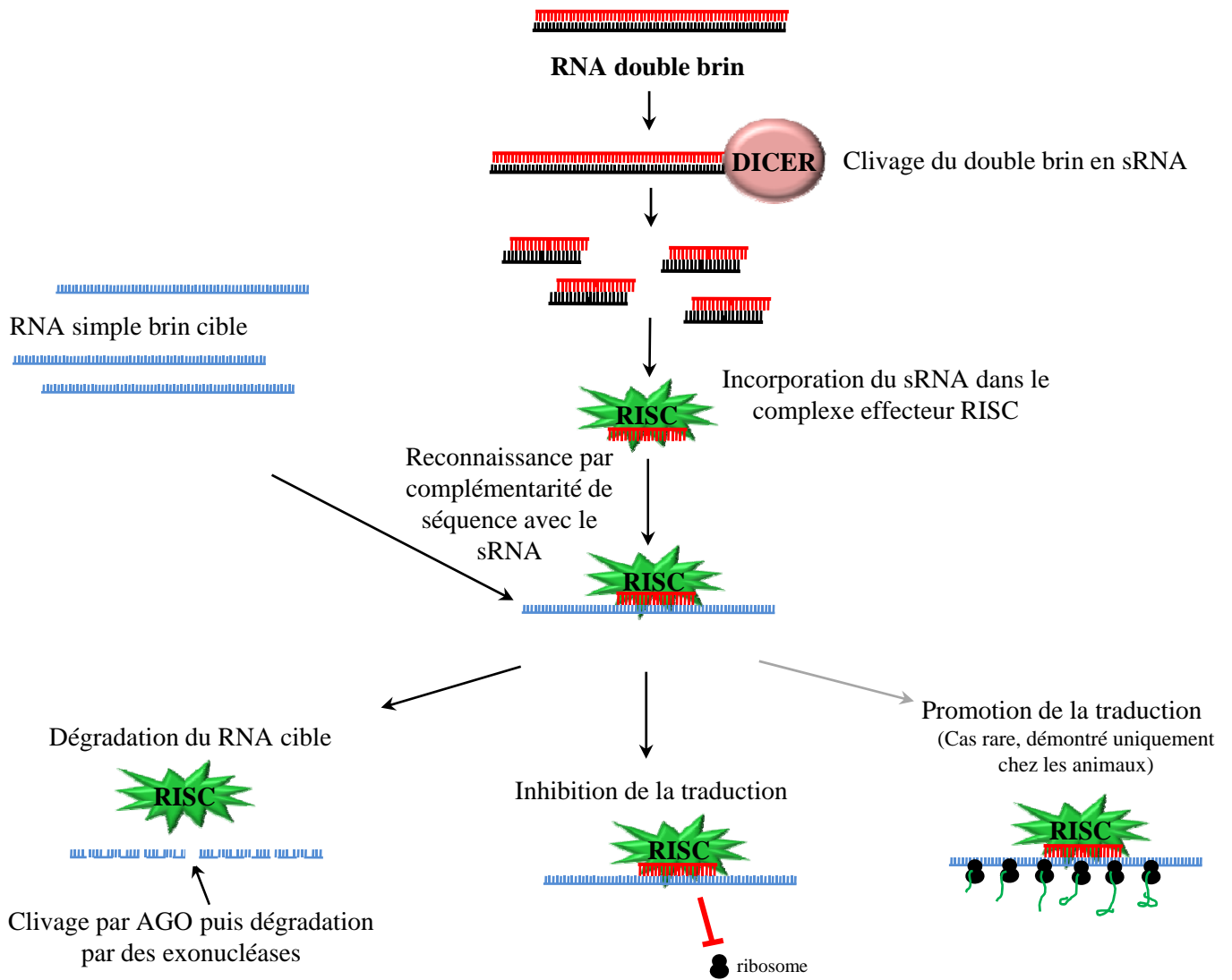


Figure 21: schéma général du RNA silencing

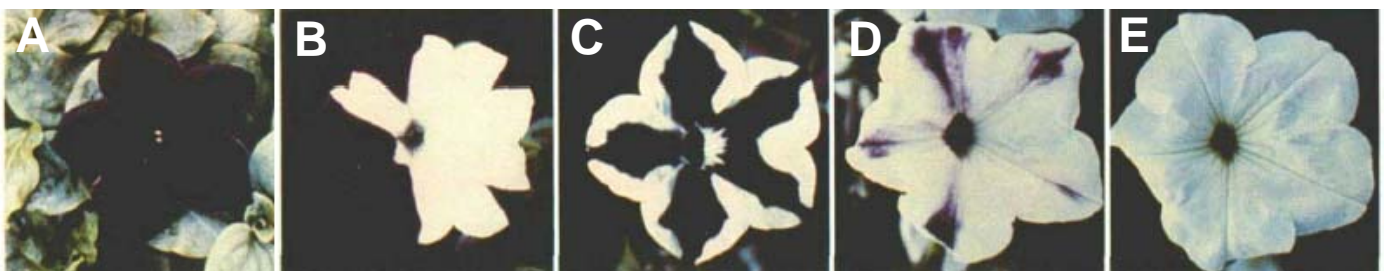


Figure 22 : première mise en évidence du RNA silencing (Napoli *et al.*, 1990)

Des plants de pétunia (A) ont été transformés par le gène de la chalcone synthèse (CHS) sous promoteur 35S. Le transgène est ciblé par le mécanisme de RNA silencing. Les sRNA produits permettent également la reconnaissance du gène CHS endogène. Au lieu d'obtenir un renforcement de la coloration dû à une sur-accumulation des anthocyanes, les fleurs deviennent blanches, avec un patron d'expression spécifique à chaque plante (B-E).

Deuxième partie : le RNA silencing ou interférence à RNA

Le RNA silencing est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes spécifique de leur séquence. La molécule qui initie le processus est un RNA double brin. Celui-ci est reconnu par une enzyme de type RNase III appelée DICER qui coupe le RNA double brin, permettant la synthèse de petits duplexes de 20 à 30 nucléotides appelés généralement « sRNA » (pour short RNA). L'un des deux brins est ensuite incorporé dans un complexe protéique « effecteur » appelé RISC (pour RNA induced silencing complex) dont l'activité catalytique est portée par une protéine, ARGONAUTE. Par complémentarité de séquence avec le sRNA, cette dernière est capable de sélectionner les acides nucléiques ciblés et de réguler leur activité selon divers processus dépendant de la nature du sRNA et de la protéine ARGONAUTE (AGO) engagés. (Voir **figure 21**). Les fonctions d'AGO connues à ce jour sont le clivage du RNA cible, l'inhibition ou encore la promotion de sa traduction, et une implication dans les régulations épigénétiques.

Le RNA silencing est un mécanisme majeur impliqué dans de nombreux processus comme la succession des étapes développementales d'un organisme, la maintenance de l'intégrité du génome, les réponses à l'environnement et la défense contre les éléments transposables et les pathogènes, notamment les virus qui nous intéressent plus particulièrement dans ce manuscrit. Il n'a pourtant été découvert que très récemment. Ses effets ont été observés pour la première fois sur des plants de pétunia en 1990. Les expérimentateurs désireux de renforcer la couleur des pétales ont voulu induire une surexpression du gène de la chalcone synthase dans ces plantes. Étonnamment, le résultat de l'introduction de ce gène impliqué dans la biosynthèse des anthocyanes dans ces plantes est l'extinction complète du transgène et du gène endogène conduisant au blanchiment des pétales (Napoli *et al.*, 1990) (voir **figure 22**). Depuis, le RNA silencing fait l'objet d'une recherche très active dans de nombreux organismes (il semble être ubiquitaire chez les eucaryotes), qui a notamment conduit à l'attribution du prix Nobel de médecine 2006 à Andrew Z. Fire et Craig C. Mello, deux spécialistes de l'interférence à RNA, nom français donné au RNA silencing chez les animaux. Pour des revues concernant ce chapitre, je citerai principalement celles de Brodersen et Voinnet, 2006, Chapman et Carrington, 2007 et Xie et Qi, 2008.

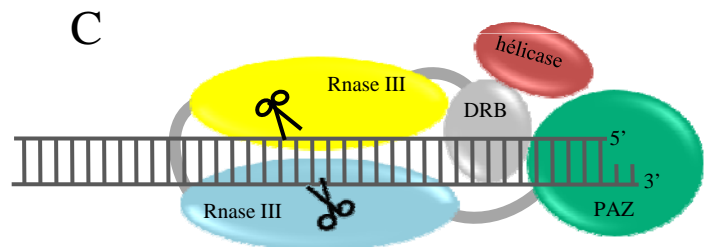
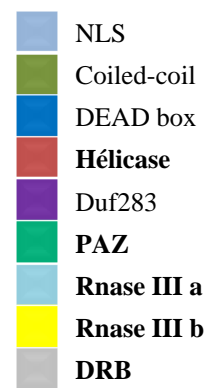
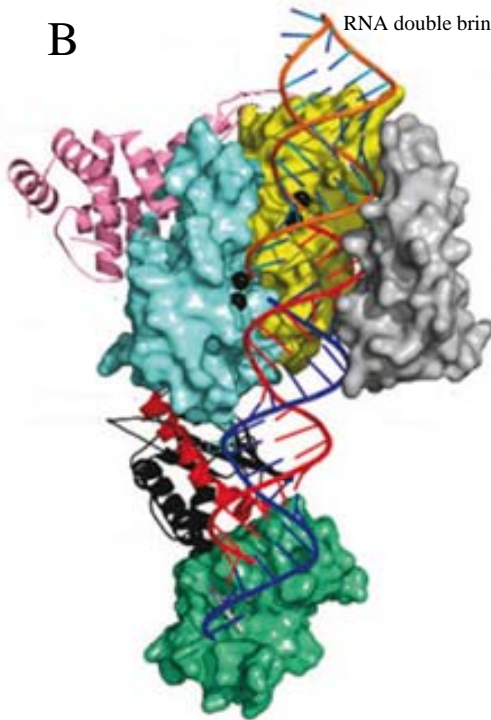


Figure 23 : DICER, structure et mode d'action

A) Organisation des différents domaines structuraux des quatre protéines DICER-like chez *Arabidopsis thaliana* d'après Vazquez, 2006. NLS : signal de localisation nucléaire, Duf : domaine de fonction inconnue, DRB : domaine de liaison au RNA double brin. B) Modèle structural de la protéine DICER en complexe avec un RNA double brin établi par Gan *et al.* (2008) à partir de structures élucidées sans RNA. La position des molécules de Mg^{2+} est précisée par des sphères noires. C) Représentation schématique de l'organisation structurale des domaines Rnase III. La disposition légèrement décalée des sites catalytiques de part et d'autre du RNA double brin conduit à la formation d'extrémités 3' sortantes de deux nucléotides. La distance entre le domaine PAZ et les sites de clivage calibre précisément la taille des sRNA produits pour chaque DICER (adapté de Hammond, 2005).

J'ai choisi de développer ce chapitre en plusieurs parties. La première décrira les caractéristiques et les fonctions des protéines majeures du RNA silencing chez la plante modèle, *Arabidopsis thaliana*. La liste présentée ne se veut pas exhaustive et nécessitera une mise à jour régulière vu les avancées rapides dans ce domaine. Une deuxième partie détaillera les diverses voies du RNA silencing connues à l'heure actuelle chez cette même plante. Je décrirais ensuite le phénomène d'amplification du RNA silencing, plus connu sous le nom de « transitivity », ainsi que le mouvement du silencing dans la plante. Enfin, une dernière partie sera consacrée à la suppression du RNA silencing par les virus végétaux.

II-1) Protéines majeures du RNA silencing chez *Arabidopsis thaliana*

II-1-1) DICER

L'enzyme DICER est responsable de la synthèse des sRNA. Le nombre de gènes codant pour ces protéines varie selon l'organisme : un seul a été identifié chez l'humain, la souris, le ver *Caenorhabditis elegans* ou la levure, on en connaît deux chez la drosophile et chez le champignon *Neurospora crassa*. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe quatre protéines homologues de DICER appelée DCL1 à DCL4 (pour DICER-like protein, DICER étant le nom attribué à une protéine isolée de la drosophile par Bernstein *et al* en 2001) allant d'environ 150 à 215kDa. Chacune de ces protéines produit des sRNA d'une taille spécifique. DCL1 et DCL4 produisent des sRNA de 21 nucléotides, DCL2 synthétise des sRNA de 22nt et DCL3 forme des sRNA de 24nt, tous ayant des fonctions particulières.

Les protéines DCL sont des enzymes RNase III de classe III (Hammond, 2005). A ce titre, elles portent toutes les domaines fonctionnels suivants, présentés en **figure 23** : un domaine de liaison au RNA double brin (DRB), deux domaines RNase III (identifiés chez tous les homologues de DICER connus à ce jour), un domaine hélicase et un domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) retrouvé, comme son nom l'indique, sur les protéines ARGONAUTE. La structure tridimensionnelle de la protéine induit la formation d'un « dimère interne » des deux domaines RNase III (voir **figure 23-B et -C**). Placés face à face, avec un léger décalage, ils permettent le clivage simultané des deux brins du RNA, produisant une extrémité 3' sortante de deux nucléotides. Les sRNA produits ont une extrémité 5' monophosphate et une extrémité

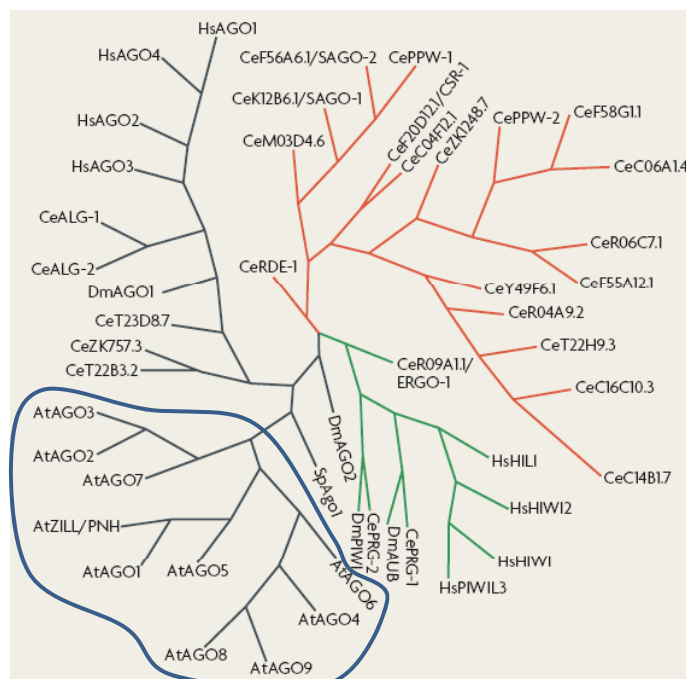


Figure 24 : Arbre phylogénétique des protéines ARGONAUTES

Les protéines de types « AGO1 » sont reliées par des branches noires, les branches vertes lient les protéines PIWI et les protéines du groupe 3, spécifiques au ver, *C. elegans*, sont jointes par des branches rouges. Les protéines d'*Arabidopsis thaliana* sont mises en évidence par le contour bleu. AtZILL/PNH correspond à ZWILLE et PINHEAD, deux noms donnés à la protéine AGO10. At : *Arabidopsis thaliana* ; Ce : *C. elegans* ; Hs : *Homo sapiens* ; Sp : *Schizosaccharomyces pombe*.

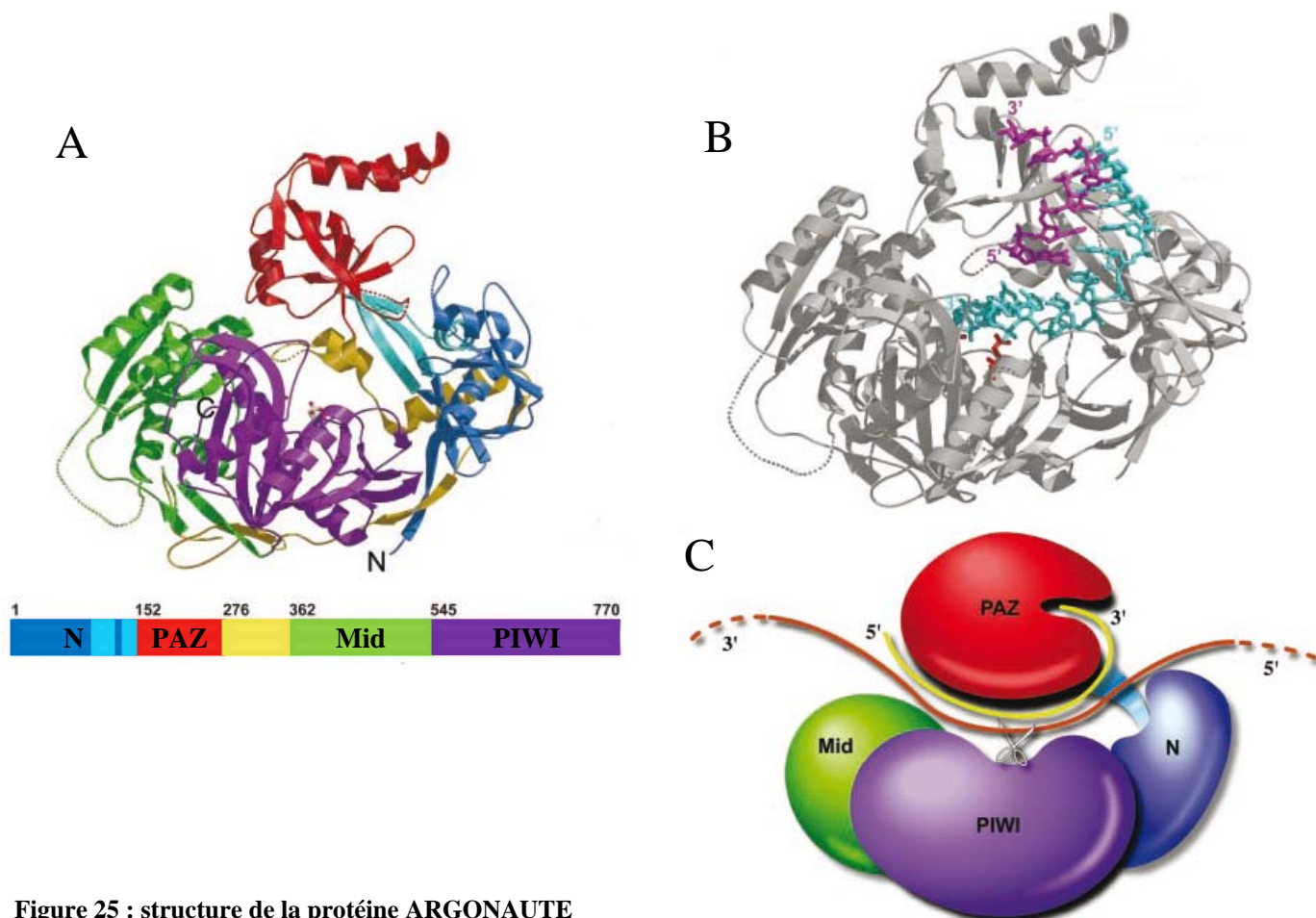


Figure 25 : structure de la protéine ARGONAUTE

Selon Song *et al.*, 2004. Structure cristallographique de la protéine ARGONAUTE de l'archéobactérie *Pyrococcus furiosus* présentant A) les différents domaines de la protéine et B) la position du sRNA (en mauve) et de son messenger cible (en bleu). C) modèle du clivage endonucléotidique par ARGONAUTE.

3'OH. Le domaine PAZ reconnaît le RNA double brin au niveau de son extrémité clivée caractéristique. Sa distance relative aux domaines RNase III est responsable de la spécificité de longueur des sRNA produits par chaque enzyme (MacRae *et al.*, 2007). Ces données ainsi que des expériences utilisant un RNA double brin dont l'extrémité est bloquée artificiellement (Zhang *et al.*, 2002) indiquent que DICER pourrait agir préférentiellement à partir d'une extrémité de son substrat. L'activité Dicer est ATP-indépendante (Zhang *et al.*, 2002) mais le clivage de chaque liaison phosphodiester nécessite deux ions Mg^{2+} (Gan *et al.*, 2008).

II-1-2) ARGONAUTE

Comme pour DICER, le nombre de représentant de la famille ARGONAUTE diffère d'un organisme à l'autre. Il existe huit gènes *Argonaute* chez l'être humain, cinq chez la drosophile, un seul chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* et au moins vingt-six gènes chez le ver *C. elegans*. *Arabidopsis thaliana* encode dix gènes *Argonaute* nommés AGO1 à AGO10. C'est un mutant d'AGO1 chez *Arabidopsis thaliana* qui a donné son nom à cette famille. En effet, le phénotype d'une plante déficiente dans ce gène rappelle la morphologie d'une pieuvre, *Argonauta argo*. La famille de protéines ARGONAUTE est subdivisée en trois groupes en fonction de leurs liens phylogénétiques et de la nature des sRNA qu'elles fixent. Le premier groupe auquel appartiennent toutes les protéines codées par *Arabidopsis thaliana* comporte les protéines AGO, en référence à AGO1. Le deuxième groupe réunit les protéines PIWI qui lient une classe de sRNA qui n'a pas été mise en évidence chez les plantes : les piRNA, des molécules principalement impliqués dans la préservation de l'intégrité du génome des cellules germinales chez les animaux (pour revue, voir Klattenhoff et Theurkauf, 2008). Enfin, les membres de la troisième classe n'ont été retrouvés que chez *C. elegans* où ils fixent spécifiquement des sRNA secondaires (décrits dans le paragraphe II-2-3) (voir arbre en **figure 24**) (pour revue, voir Vaucheret, 2008 ; Hutvagner et Simard, 2008).

Les protéines AGO ont une taille d'environ 100kDa. Elles possèdent un domaine N-terminal variable, un domaine PAZ, un domaine MID (pour middle), un domaine PIWI et une extrémité C-terminale conservée. Le domaine PAZ, similaire à celui des protéines DICER reconnaît l'extrémité 3' du sRNA simple brin alors que le domaine MID en fixe l'extrémité 5' (voir **figure 25**).

Les sRNA produits par DICER étant des molécules double brin, une sélection s'opère lors de l'incorporation dans AGO. Le choix du brin conservé serait dépendant de la stabilité thermodynamique des liaisons inter-chaînes. Ainsi, le sRNA dit « guide » est généralement le brin dont l'extrémité 5' est du côté le plus instable du sRNA double brin (Schwarz *et al.*, 2003). Ce postulat a cependant été remis en cause récemment ; Takeda *et al.* (2008) proposent que le mécanisme sélectionnant le brin guide diffère selon les AGO. Ainsi, la protéine AGO2 d'*Arabidopsis thaliana* aurait une forte affinité pour les sRNA présentant une adénine à l'extrémité 5' (caractéristique partagée par 85,7% des sRNA incorporés dans AGO2) alors que AGO5 sélectionnerait plutôt les sRNA terminés par une cytosine en 5' (à 83,5%). En plus d'être en accord avec ces observations, Mi *et al.* (2008) ajoutent que AGO4 privilégie, comme AGO2, les sRNA portant des adénines 5' terminales alors que AGO1 favorise les extrémités 5' U-terminales.

Une des fonctions des protéines ARGONAUTE est de cliver les RNA simple brin reconnus par complémentarité de séquence avec le sRNA qu'elles portent. Cette activité endonucléasique dite « slicer » a été démontré pour trois AGO d'*Arabidopsis thaliana* : AGO1 (Baumberger et Baulcombe), AGO4 (Qi *et al.*, 2006) et AGO7 (Montgomery *et al.*, 2008). Elle est localisée sur le domaine PIWI qui adopte une structure tertiaire similaire à celle des enzymes de type RNase H (Rivas *et al.*, 2005). Le domaine catalytique porte généralement un motif DDH important pour cette fonction mais néanmoins ni nécessaire, ni suffisant puisque, par exemple, la protéine AGO3 humaine porte ce motif mais ne semble pas avoir d'activité « slicer » (Meister *et al.*, 2004); réciproquement, des RNases H bactériennes compétentes pour ce clivage portent des motifs DDD ou DDE (Nowotny *et al.*, 2005). On ne peut donc pas conclure quant à l'activité « slicer » des autres protéines AGO d'*Arabidopsis* par une simple analyse de leur séquence. En plus de ces caractéristiques de la protéine, le clivage par AGO nécessite une complémentarité de séquence quasi-parfaite entre le sRNA et sa cible, dépend de la disponibilité en ions Mg^{2+} (Schwarz *et al.*, 2004) et produit une extrémité 3'OH et une extrémité 5'P (Martinez et Tuschl, 2004). La coupure du RNA s'effectue au niveau de la partie complémentaire au sRNA, entre les nucléotides 10 et 11 de celui-ci (Elbaschir *et al.*, 2001).

Longtemps considérée comme une particularité des protéines animales, l'inhibition de la traduction a récemment été démontrée chez les plantes (Brodersen *et al.*, 2008). Par contre, les mécanismes selon lesquels les protéines ARGONAUTE inhibent la traduction de leur messenger cible font encore l'objet de débats et pourraient être multiples. Les différentes hypothèses proposées par Eulalio *et al.*, (2008) et appuyées par diverses études (réalisées dans le domaine animal) sont présentées en **figure 26**. Ainsi, l'inactivation du messenger pourrait s'opérer avant

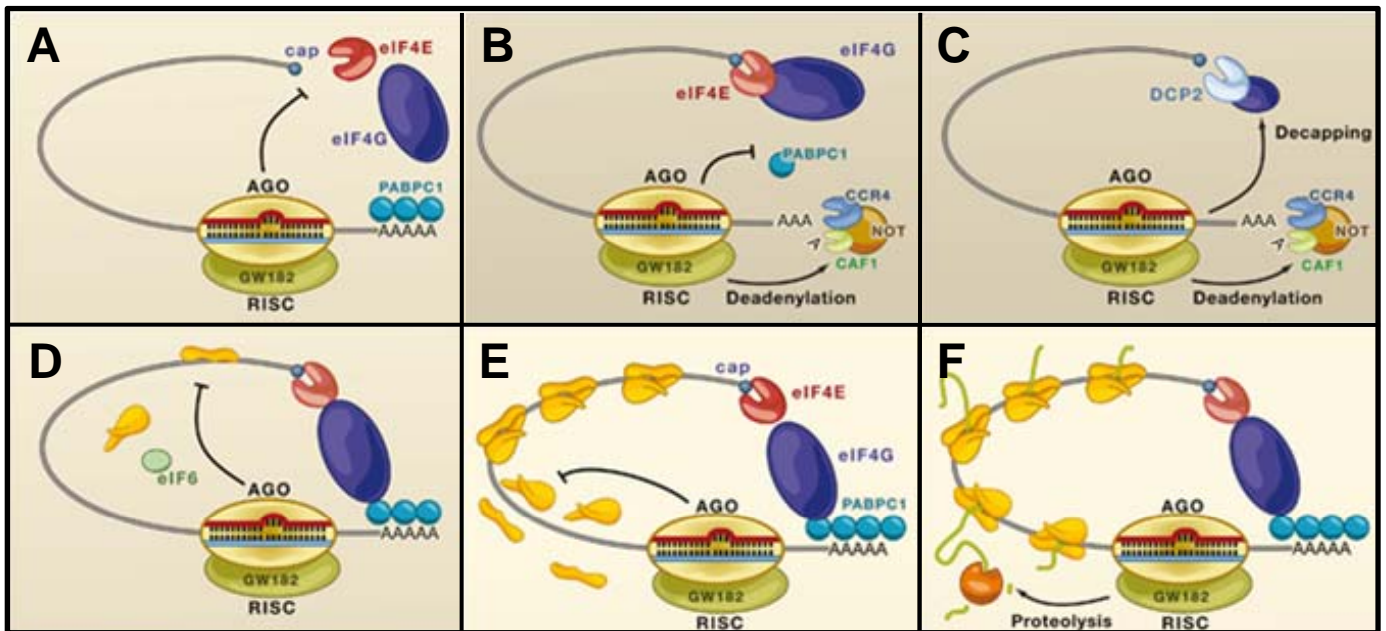


Figure 26 : modèles de l'inhibition de la traduction induite par les protéines AGO

proposés par Eulalio *et al.*, 2008 suite a des études menées par différents laboratoires, essentiellement sur des modèles animaux. A) Compétition entre AGO et les facteurs d'initiation de la traduction (eIF4E) pour la liaison à la coiffe (cap). B) AGO empêche la circularisation du RNA messenger, notamment en induisant la dégradation de la queue polyA. C) AGO promeut la dégradation de la queue polyA puis de la coiffe, déstabilisant ainsi le mRNA. D) AGO recrute eIF6 qui empêche la grande sous-unité du ribosome de rejoindre la petite sous-unité et donc la formation d'un ribosome fonctionnel. E) La traduction est bloquée par la dissociation prématurée du ribosome. F) la présence d'AGO sur le messenger ne bloque pas la traduction mais induit une protéolyse co-traductionnelle.

Cap : coiffe ; eIF4- : facteurs d'initiation de la traduction ; GW182 : protéine interagissant avec AGO, membre du complexe RISC animal ; PABPC1 : protéine liant la queue polyA ; CCR4, CAF1 et NOT : composants du complexe déadénylase majeur ; DCP2 : enzyme spécialisée dans le retrait de la coiffe.

même l'initiation de la traduction, par compétition entre la protéine ARGONAUTE et les facteurs d'initiation pour la liaison à la coiffe, ce qui pourrait prévenir la circularisation du messager indispensable à une traduction efficace (ce phénomène n'existe néanmoins probablement pas chez les plantes puisque leurs protéines AGO ne possèdent pas de domaine de fixation à la coiffe) (**fig. 26-A**). L'inhibition de la circularisation pourrait également être le résultat de la dégradation de la queue polyA grâce au recrutement d'exonucléases par le complexe effecteur (**fig. 26-B**) et du retrait de la coiffe, par l'intermédiaire d'une enzyme spécialisée (**fig. 26-C**). Si le complexe d'initiation de la traduction parvient à se mettre en place sur le messager, AGO pourrait bloquer la traduction en contrecarrant la formation du ribosome 80S, en empêchant l'association de sa grande sous-unité 60S sur la petite sous-unité 40S (**fig. 26-D**) ou en induisant sa dissociation avant la fin de la traduction (**fig. 26-E**) ce qui conduirait à la synthèse de protéines tronquées, non fonctionnelles et donc rapidement dégradées. Un dernier modèle propose qu'AGO pourrait directement induire une protéolyse co-traductionnelle (**fig. 26-F**).

II-1-3) RDR

Il existe, dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, six RNA polymérases RNA dépendantes (RdRP) nommées RDR1, RDR2, RDR6, RDR3a, RDR3b et RDR3c (pour revue, voir Voinnet, 2008). Les fonctions des trois RDR3 sont encore inconnues. RDR1, 2 et 6 présentent un motif DLDGD caractéristique des RdRP eucaryotes. Ces enzymes utilisent le RNA simple brin comme matrice, pour synthétiser le brin complémentaire, produisant ainsi un RNA double brin, substrat de DICER. Néanmoins, aucune interaction physique entre ces deux classes de protéines n'a pu être mise en évidence chez les plantes jusqu'alors (une telle interaction a été démontrée pour les protéines Dcr1 et RDRC chez *Schizosaccharomyces pombe* ; Colmenares *et al.*, 2007). Pourtant, il semble exister des liens particuliers entre certaines RDR et certaines DICER. Par exemple, RDR2 et DCL3 sont impliquées dans les mêmes voies (voir paragraphe II-2-d) et si une interaction directe reste à prouver, une colocalisation a déjà pu être mise en évidence (Li *et al.*, 2006).

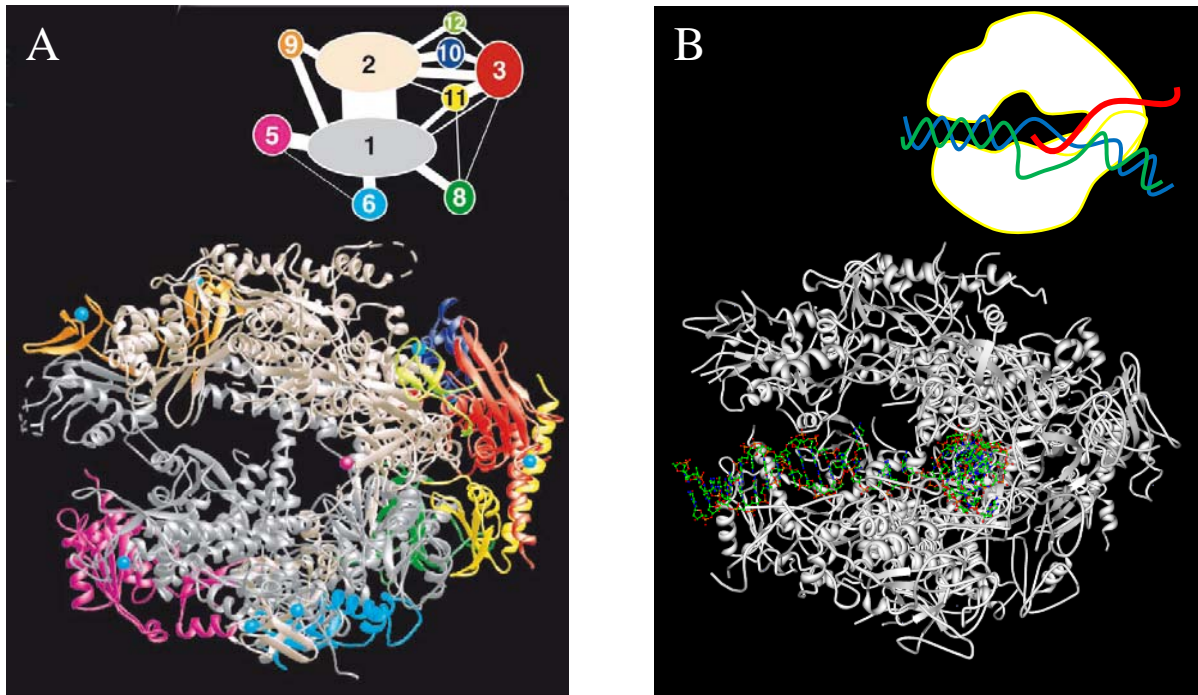
L'expression de RDR1 étant induite suite à une infection virale et après traitement par l'acide salicylique (Yu *et al.*, 2003), cette protéine est probablement impliquée dans le RNA silencing antiviral comme cela est suggéré par les travaux de Diaz-Pendon *et al.* (2007) utilisant le CMV et de Donaire *et al.* (2008) utilisant le TRV.

RDR6 a récemment fait l'objet d'une étude biochimique démontrant son activité de RdRP (Curaba et Chen, 2008). Cette activité requiert un résidu asparagine conservé en position 867 de la protéine et ne nécessite pas d'amorce (la protéine semble d'ailleurs incapable d'utiliser un sRNA comme amorce dans un système *in vitro*). L'enzyme est capable de synthétiser un RNA, que sa matrice RNA soit ou non coiffée et polyadénylée et une activité RNA polymérase DNA simple brin dépendante a même été identifiée *in vitro*. Ces données suggèrent que RDR6, *in vivo*, nécessite l'accompagnement d'autres protéines pour la reconnaissance spécifique de ses cibles.

Deux études récentes proposent un rôle direct des RdRP dans la biosynthèse des sRNA : chez le ver *C. elegans*, des protéines RDR seraient capables de produire des sRNA secondaires de 21 nucléotides indépendamment d'une activité DICER (Sijen *et al.*, 2007 et Pak et Fire, 2007). Ces sRNA se distinguent d'un produit de DICER par leur extrémité tri-phosphates. L'existence de ce type de petits RNA chez les plantes n'est pas exclue puisque jusqu'à présent, les méthodes utilisées pour séquencer les sRNA extraits de plantes sélectionnaient des sRNA aux extrémités 5' mono-phosphates, caractéristiques d'une activité Dicer. Néanmoins, la réalité des fonctions biologique de ces sRNA reste à démontrer.

II-1-4) SGS3

La protéine SGS3 (pour SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3) a été initialement découverte lors d'un criblage de mutants hypersensibles aux infections virales (Mourrain *et al.*, 2000). Elle est impliquée dans de nombreuses voies du RNA silencing, souvent en association avec RDR6, AGO1 et HEN1 et contribuerait à la production de sRNA. SGS3 possède un domaine conservé chez plusieurs homologues, notamment chez le gène X du riz (Bateman, 2002). Ce domaine a donc été appelé XS (pour gène X et SGS3). Des analyses structurales comparatives par bioinformatique ont récemment montré que sa fonction pourrait être de lier le RNA simple brin (Zhang et Trudeau, 2008). Cette observation suggère que SGS3 stabiliserait les RNA servant de matrice à RDR6, après leur clivage par AGO1, les protégeant de la dégradation par des exonucléases. Ceci est en accord avec la diminution de l'accumulation des produits de clivage des transcrits des gènes TAS1 et TAS2 dans un mutant *sgs3* (Yoshikawa *et al.*, 2005) (voir paragraphe II-2-1-b).



C

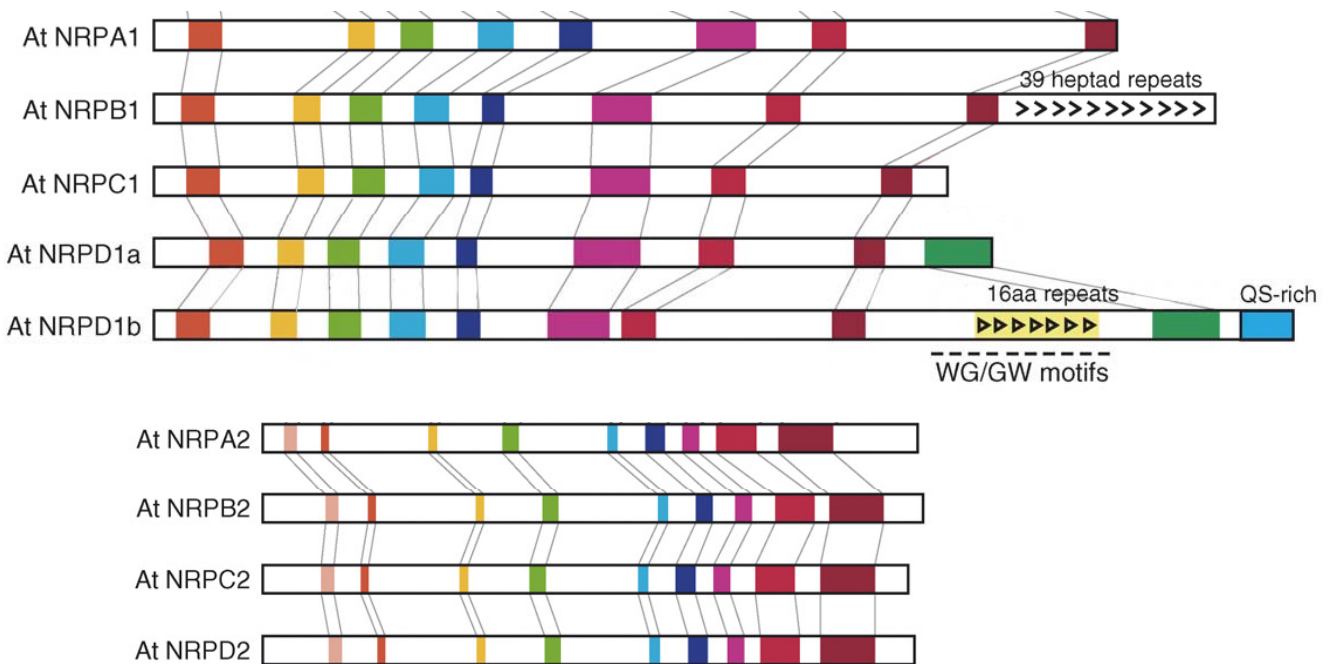


Figure 27 : Structure et organisation des RNA polymérase DNA dépendantes eucaryotiques

A) Structure cristallographique du complexe Pol II de levure par Cramer *et al.* (2001). Au dessus de l'image sont représentées schématiquement les douze sous-unités composant Pol II. Les sous-unités 1 et 2 sont homologues des sous-unités NRPD1 et NRPD2 de Pol IV, comme présenté en C). B) Structure cristallographique de Pol II en complexe avec des acides nucléiques ; au dessus, la structure est représentée schématiquement avec en bleu, le brin de DNA matrice, en rouge, le brin de RNA en cours de synthèse et en vert, le brin de DNA complémentaire. C) homologie de séquence entre les différentes grandes sous unités des RNA polymérase d'*Arabidopsis thaliana* (At). Les régions colorées correspondent aux domaines conservés chez toutes les RNA polymérase. La présence du motif WG/GW sur la grande sous-unité de Pol IVb est soulignée (Pikaard *et al.*, 2008). NRPA : Pol I ; NRPB : Pol II ; NRPC : Pol III ; NRPD : Pol IV.

II-1-5) SDE3

Cette protéine a été identifiée lors d'un criblage de mutants déficients dans le RNA silencing post-transcriptionnel (Dalmay *et al.*, 2000). SDE3 (pour SILENCING DEFECTIVE PROTEIN 3) porte un domaine hélicase mis en évidence par comparaison de séquence. Elle pourrait avoir une fonction dans la synthèse de RNA double brin mais le fait que, dans un mutant *sde3*, la perte du RNA silencing induit par un transgène n'est que partielle, indique que ce rôle serait plus celui d'un régulateur que d'un co-facteur essentiel (Dalmay *et al.*, 2001).

II-1-6) POL IV

En plus des trois RNA polymérase DNA dépendante (Pol) vitales pour tous les eucaryotes, les plantes encodent deux autres polymérases, Pol IVa et Pol IVb, spécialement dédiées au RNA silencing (pour revue, voir Pikaard *et al.*, 2008). Chacune est composée d'au moins deux sous-unités ; elles ont en commun l'une de leur grande sous-unité NRPD2a (dite « seconde grande sous-unité »), et se différencient par leur autre grande sous-unité : NRPD1a pour Pol IVa et NRPD1b pour Pol IVb (voir **figure 27**). Les modes d'action et fonctions de ces polymérases nouvellement identifiées sont pour l'instant peu compris.

L'analyse de leur séquence a permis d'identifier, sur la portion C-terminale de la grande sous-unité spécifique de Pol IVb, un motif WG/ GW connu pour permettre l'interaction avec les protéines AGO. Ce motif n'est pas partagé par Pol IVa et serait le site de l'interaction entre NRPD1b et AGO4 (El-Shami *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2006) ce qui suggère des fonctions différentes pour les deux Pol IV. En effet, Pol IVa est nécessaire pour la production de 94% des sRNA endogènes alors qu'en absence de Pol IVb, seul un tiers de ces siRNA est perdu (Mosher *et al.*, 2008). On suppose donc que Pol IVa transcrit des fractions du génome qui permettront la synthèse de sRNA, en utilisant des matrices très spécifiques puisque des expériences de transcription conventionnelles mettant en évidence les activités de Pol I, Pol II et Pol III sont inefficaces dans le cas de Pol IV (Onodera *et al.*, 2005). Pol IVb, quant à elle, aurait une fonction complémentaire, recrutant les effecteurs (notamment AGO4) aux sites déterminés par Pol IVa.

Si la forte homologie de Pol IV avec les autres RNA polymérases DNA dépendantes eucaryotes suggère qu'elle utilise une matrice DNA, des expériences montrent qu'un traitement RNase, contrairement à un traitement DNase, perturbe la localisation subcellulaire du complexe

protéique Pol IVa (Pontes *et al.*, 2006). De plus, l'activité polymérase de ces protéines n'a pas pu être clairement démontrée lors d'expériences *in vitro* conventionnelles utilisant du DNA double brin comme matrice. Il est donc suggéré que Pol IV pourrait utiliser une matrice RNA ou, tout du moins qu'elle sélectionne ses matrices de manière très spécifique.

II-1-7) HEN1

HEN1 est une petite RNA méthylase. Elle est responsable de la méthylation du groupement 2'OH du ribose du nucléotide situé à l'extrémité 3' des sRNA (Yang *et al.*, 2006). Elle utilise préférentiellement comme substrat, des RNA double brin possédant des extrémités 3'OH sortantes de deux nucléotides (Yu *et al.*, 2005) ce qui suppose que son activité prend place directement après le clivage par DICER. Le rôle de cette méthylation est probablement stabilisateur et empêcherait notamment l'oligo-uridylation des sRNA, une modification connue pour stimuler la dégradation des RNA (Li *et al.*, 2005) ou leur dégradation par une exoribonucléase, SDN1 (Ramachandran et Chen, 2008).

II-1-8) DRB

Comme leur nom l'indique, les DRB (ou dsRNA-binding proteins) sont des protéines se liant au RNA double brin. Cette famille compte cinq membres chez *Arabidopsis thaliana*, nommés DRB1 à DRB5, chacune possédant deux domaines de liaison au RNA double brin. DRB1 est la première de ces protéines à avoir été identifiée et ce, par l'analyse d'un mutant *drb1*. Ce mutant présente une réponse altérée aux hormones ; le nom de HYL1 pour HYPONASTY LEAVES 1, en référence à son phénotype, est souvent utilisé dans la littérature pour parler de la protéine DRB1 (Lu et Federoff, 2000). Les auteurs de cette identification suggéraient déjà en 2000 que HYL1 pouvait être impliquée dans le « RNA silencing » récemment découvert.

Des études plus récentes montrent que cette protéine est un co-facteur essentiel à DCL1 et plusieurs études prouvent une interaction directe entre les deux protéines (Hiraguri *et al.*, 2005 et Curtin *et al.*, 2008, entre autres). Il a donc été suggéré qu'une DRB s'associait à chaque DCL d'*Arabidopsis thaliana*, assistant ainsi leur fonction. De plus, la redondance d'activité existant au sein de la famille DCL (voir paragraphe II-2-2) suppose qu'il en est de même pour

les DRB ; si l'une d'entre elles est inactivée, un autre membre de la famille pourrait prendre le relais auprès de la protéine DCL « esseulée ». Néanmoins, une analyse des 5 membres de cette famille tend à prouver le contraire. Curtin *et al.* (2008) confirment que DRB1 est le co-facteur de DCL1 mais montrent qu'aucune autre DRB ne peut se substituer à DRB1 dans la voie des miRNA. Il en est de même pour l'association entre DRB4 et DCL4. De plus, si Hiraguri *et al.* ont pu montrer une interaction *in vitro* entre DCL3 et DRB2 et DRB5, toutes deux proches, phylogénétiquement de DRB3, Curtin *et al.* démontrent que l'activité DCL3 n'est pas altérée dans un triple mutant *drb2drb3drb5* et proposent que la synthèse de siRNA de 24nt est indépendante de toute DRB. De même, il semblerait que DCL2 ne nécessite pas non plus de co-facteur de ce type. DRB1 et DRB4 semblent donc être les seuls membres de cette famille impliqués dans le RNA silencing. La fonction des trois autres protéines reste à élucider.

II-1-9) HASTY

HASTY est un orthologue de l'exportine 5, une protéine de mammifère. Sa localisation au niveau de l'enveloppe nucléaire et son interaction avec RAN1, une protéine liant le GTP, essentielle pour la translocation de protéine du noyau vers le cytoplasme, supporte l'hypothèse que HASTY agit au niveau du transport nucléo-cytoplasmique (Bollman *et al.*, 2003). Néanmoins son rôle exact dans le RNA silencing doit être éclairci : l'absence de cette protéine provoque une diminution de l'accumulation de certains miRNA mais leur rétention dans le noyau n'a pas pu être observée (Park *et al.*, 2005). HASTY pourrait donc avoir une action plus complexe que celle de simple transporteur.

II-2) Les différentes voies du RNA silencing chez *Arabidopsis thaliana*

II-2-1) sRNA endogènes

a) Voie des miRNA (ou microRNA)

Malgré sa très récente découverte (en 2002 chez les plantes, notamment par Reinhart *et al.*), cette voie est probablement la plus étudiée des voies du RNA silencing car elle joue un rôle prédominant dans de nombreux aspects du développement de la plante et de ses régulations cellulaires. Les miRNA sont des régulateurs de l'expression de nombreux facteurs de transcription, ils jouent un rôle dans la différenciation des organes floraux, sont impliqués dans les réponses hormonales en régulant l'expression de leur récepteurs et sont même capables d'autorégulation puisqu'ils contrôlent l'expression de deux protéines impliquées dans leur voie de biosynthèse : DCL1 et AGO1 (Jones-Rhoades *et al.*, 2006).

Entre 500 et 1000 miRNA ont été identifiés dans les plantes, chacun étant capable de cibler un nombre discret de gènes. Une large proportion du transcriptome serait donc soumise à une influence des miRNA (pour revue, voir Chen, 2005, Brodersen et Voinnet, 2006, Jones-Rhoades *et al.*, 2006 et Mallory et Bouché, 2008).

Les miRNA sont des sRNA endogènes codés par des gènes qui possèdent leur propre unité transcriptionnelle. La présence d'une TATA box en amont de la séquence transcrite ainsi que la mise en évidence d'une coiffe en 5' et d'une queue polyA en 3' du transcrit de nombreux gènes codant pour des miRNA indique que la RNA polymérase II (Pol II) est probablement à l'origine de la synthèse d'une majorité des « pri-miRNA » (Xie *et al.*, 2005). Les mécanismes régulant l'expression de ces gènes sont peu connus mais on sait que le niveau de plusieurs miRNA varie en réponse à des hormones (Achard *et al.*, 2004) et certains peuvent être induits suite à différents stress environnementaux (Jones-Rhoades et Bartel, 2004).

Les molécules précurseurs, les pri-miRNA, sont clivées dans le noyau en deux étapes, produisant un pré-miRNA puis un duplex miRNA-miRNA*, par des mécanismes mobilisant DCL1 et DRB1. Si DCL1 a été montrée comme étant une molécule clé dans la biosynthèse des miRNA, on sait qu'elle est responsable du clivage du pri-miRNA en pré-miRNA mais on ignore encore si cette même enzyme catalyse la coupure donnant naissance au miRNA mature ou bien encore si les deux étapes sont couplées chez les plantes (Kurihara et Watanabe, 2004).

Le duplex miRNA-miRNA* est méthylé aux deux extrémités 3' sortantes par HEN1 (Yu *et al.*, 2005). Il est ensuite exporté vers le cytoplasme de manière active, grâce notamment à

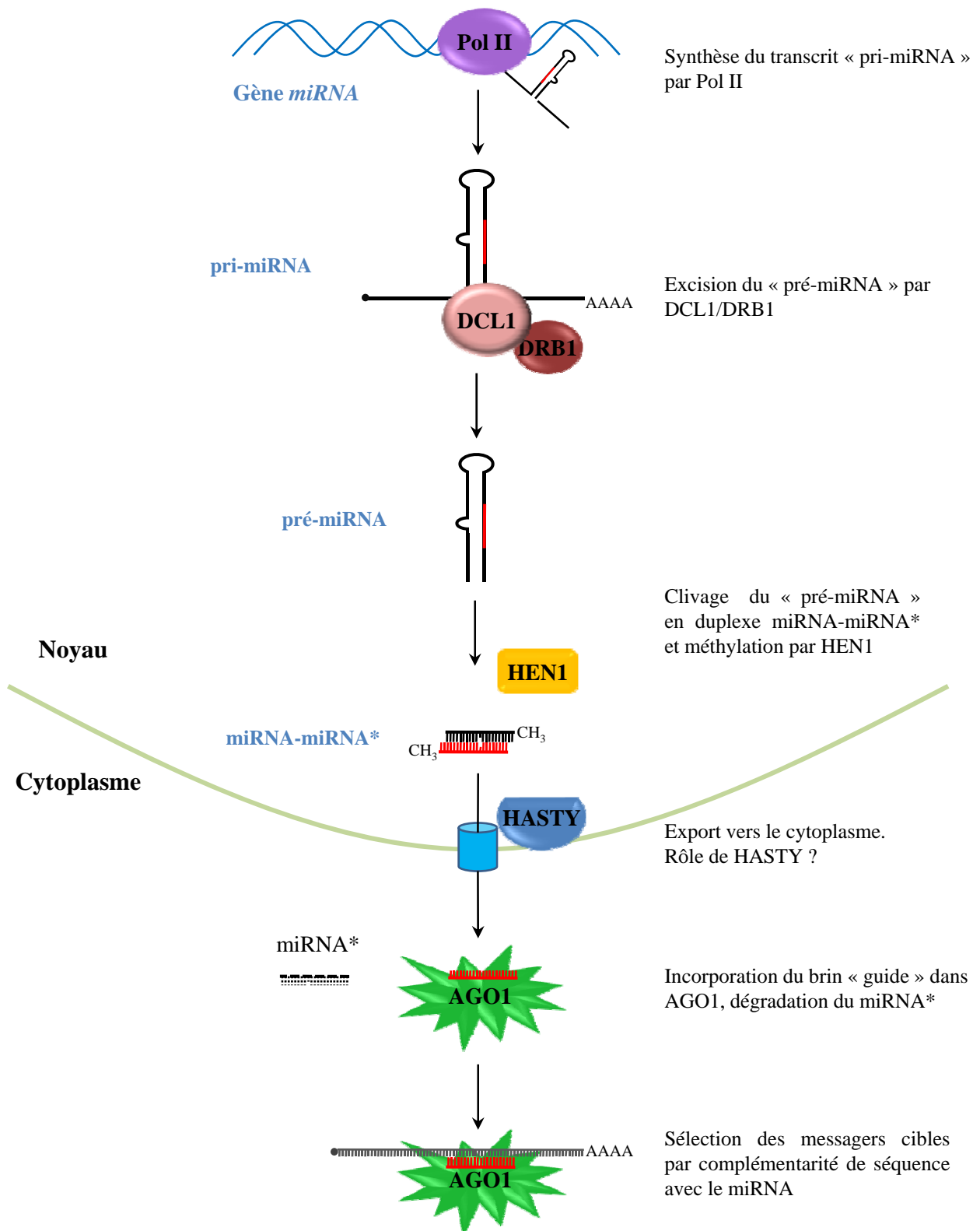


Figure 28 : Voie de biosynthèse des miRNA

l'action de la protéine HASTY (Park *et al.*, 2005). Le brin miRNA* est éliminé au moment de l'incorporation du miRNA « guide » dans un complexe RISC dont l'activité catalytique est généralement portée par AGO1 (Baumberger et Baulcombe, 2005) (il existe néanmoins des exceptions : miR390, par exemple, s'associe à AGO7 ; Montgomery *et al.*, 2008). Le complexe AGO1-miRNA peut alors cibler, en trans, un RNA messenger portant une séquence complémentaire au miRNA (voir **figure 28**).

La complémentarité quasi parfaite entre le miRNA et sa cible suggère qu'AGO1, par son domaine RNase H, induit le clivage systématique du messenger, ce qui conduit à une rapide dégradation du fragment 5' et une destruction plus lente de l'extrémité 3', probablement grâce à l'exonucléase XRN4 (Souret *et al.*, 2004). Par opposition, les complexes miRNA animaux qui ne présentent qu'une faible complémentarité de séquence avec leur cible, en particulier au niveau du site de clivage putatif, seraient incapables d'induire leur dégradation mais inhiberaient leur traduction (cf **figure 26**). Une étude récente a cependant montré que les miRNA de plantes étaient également capables de provoquer la répression de la traduction (Brodersen *et al.*, 2008). AGO1 (et dans une certaine mesure, AGO10) serait là aussi la protéine effectrice mais les mécanismes promouvant l'inhibition de la traduction au détriment de l'activité slicer sont pour l'instant inconnus. On ignore également si l'inhibition de la traduction et le clivage coexistent au sein d'une même cellule ou si ces activités différentielles de AGO1 peuvent être tissu-spécifique.

De manière encore plus surprenante, il semblerait que des miRNA soient également capable de promouvoir la traduction de certains gènes (Vasudevan, *et al.*, 2007). Cet effet n'a pour l'instant été observé que dans des cellules de mammifères où les activités inhibitrice et activatrice de la traduction par un miRNA (miR369-3) sont induites en fonction du cycle cellulaire, mais il est tout a fait envisageable que ce type de régulation positive puisse exister chez les plantes.

b) Voie des tasiRNA (trans-acting short interfering RNA)

Cette catégorie de sRNA n'est connue que chez les plantes mais est certainement présente chez d'autres organismes possédant des RDR comme *C. elegans* ou *N. crassa*. Leur synthèse dépend de la voie des miRNA ce qui élargit encore leur champ d'action (voir paragraphe précédent). Les tasiRNA contrôlent notamment la transition de la phase juvénile à la phase adulte de la plante (Peragine *et al.*, 2004) ou encore, la polarité des feuilles (Garcia *et al.*, 2006). Huit loci

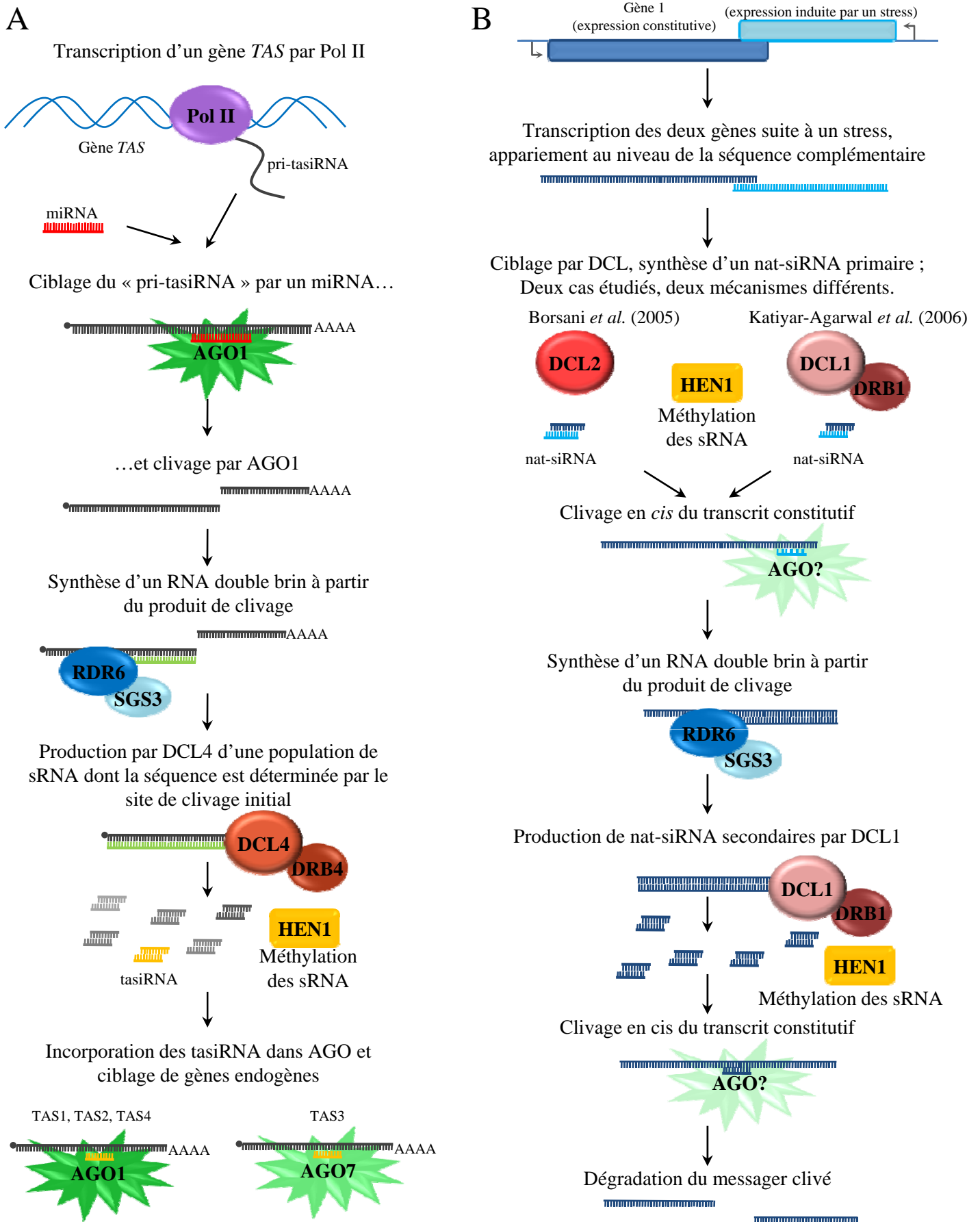


Figure 29 : modèles pour les voies de biosynthèse A) des tasiRNA et B) des nat-siRNA

généralisant des tasiRNA appartenant à quatre familles (TAS1, TAS2, TAS3 et TAS4) ont été identifiés jusqu'à présent (pour revue, voir Brodersen et Voinnet, 2006 et Xie et Qi, 2008).

Ces gènes sont transcrits par l'enzyme Pol II en « pri-tasiRNA » contenant une séquence cible de miRNA. Le miRNA reconnaissant cette séquence provoque le clivage du précurseur grâce à l'activité d'AGO1. Les produits de clivage sont convertis par RDR6-SGS3 en un RNA double brin aux extrémités précisément définies par le site de coupure. Celles-ci sont essentielles à l'exactitude de l'activité de DCL4 qui produit une population de sRNA couvrant la totalité du RNA double brin (par opposition à la synthèse de miRNA où un pré-miRNA ne produit qu'un seul miRNA mature) (voir **figure 29-A**).

Seuls certains de ces sRNA, les tasiRNA, sont incorporés dans RISC et induisent le clivage de mRNA endogènes codant, par exemple, pour des facteurs de transcription répondant à l'auxine (ARF3, ARF4), des protéines de la famille PPR (pentatricopeptide repeat) et des facteurs de transcription MYB. Les protéines AGO permettant le clivage des cibles de tasiRNA semblent différer d'une famille TAS à l'autre. En effet, si toutes sont sensibles à une mutation *ago1* en raison de l'implication de miRNA dans leur biosynthèse, seule la famille TAS3 nécessite une protéine AGO7 fonctionnelle (Allen *et al.*, 2006).

L'intérêt, pour la plante, de produire des sRNA utilisant un tel mécanisme, plutôt que de produire des miRNA ciblant directement les transcrits cibles des tasiRNA, est probablement lié au phénomène d'amplification (appelé transitivity et décrit dans le paragraphe II-2-3) permettant la production, en grand nombre, de tasi-RNA. Ces tasi-RNA pourraient ainsi bouger de cellule à cellule, créant un gradient des transcrits cibles inversement proportionnel à la quantité de tasiRNA dans les cellules adjacentes au site d'induction (la quantité de transcrit cible croît avec la distance au site d'induction, ce qui pourrait jouer un rôle majeur, notamment dans l'implication des tasi-RNA dans la polarisation des organes).

c) Voie des nat-siRNAs (natural cis-antisense transcripts-associated siRNAs)

Seuls deux exemples de cette classe de sRNA ont pu être identifiés jusqu'à présent (Borsani *et al.*, 2005 et Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). Ils sont produits à partir d'une courte séquence de RNA double brin formé par l'expression simultanée de deux gènes placés en orientations opposées dont les loci se recouvrent partiellement (voir **figure 29-B**). Dans les deux cas connus, l'un des gènes est exprimé de manière constitutive alors que le deuxième est transcrit en réponse à un stress (abiotique, forte concentration de sel pour Borsani *et al.*, 2005 ;

biotique, infection par *Pseudomonas syringae* pv *tomato* pour Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). L'appariement partiel des deux transcrits induit la formation d'une seule espèce de nat-siRNA. De manière surprenante, cette synthèse requiert des protéines différentes dans les deux exemples étudiés. En effet, le nat-siRNASRO5 (Borsani *et al.*, 2005) nécessite l'activité de DCL2. Le nat-siRNAATGB2 (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006) serait, lui, produit par l'action du complexe DCL1-HYL1. Le nat-siRNA agit en cis, sur le transcrit exprimé constitutivement, induisant son clivage. Comme pour les tasiRNA, ce clivage est suivi par la formation d'un RNA double brin impliquant RDR6 et SGS3. De la coupure de cette molécule par DCL1 résulte une population de nat-siRNA secondaires aptes à provoquer le silencing, en cis, du mRNA.

Des études bioinformatiques montrent qu'il existe, chez *Arabidopsis thaliana*, 1340 sites où deux gènes disposés en antisens se recouvrent partiellement. De plus, pour la plupart d'entre eux, l'expression de l'un des gènes est fortement supérieure à l'autre, souvent induit par un stress comme dans les cas cités précédemment (Wang *et al.*, 2005 ; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006). Il semble donc probable que le rôle de ces sRNA soit de répondre à différents facteurs environnementaux et que l'existence d'autres nat-siRNA soit révélée prochainement.

d) Voie des ha-siRNA (heterochromatin-associated short interfering RNA)

Afin de maintenir la stabilité de leur génome, les cellules doivent supprimer la mobilité des transposons et empêcher la recombinaison entre les séquences homologues répétées. Pour ce faire, les plantes, utilisent deux types de modification de l'hétérochromatine : la méthylation des cytosines d'une part et diverses modifications post-traductionnelles des histones d'autre part. La méthylation du DNA implique différents mécanismes, dont le RNA silencing.

Pour maintenir ou induire un état méthylé du DNA par le RNA silencing, la synthèse de transcrits est nécessaire. Chez *Arabidopsis thaliana*, c'est l'enzyme Pol IV qui serait majoritairement impliquée dans la fabrication de ces RNA, rapidement pris en charge par RDR2. La synthèse de RNA double brin par cette dernière promeut l'activité DCL3 (probablement au sein d'un complexe DCL3, HEN1) et donc la production de sRNA de 24 nt, les ha-siRNA (Onodera *et al.*, 2005 ; Xie *et al.*, 2004). La co-localisation de ces différents facteurs indique que ces étapes sont probablement couplées dans la cellule. La protéine ARGONAUTE principalement impliquée dans cette voie est AGO4 mais des études récentes

ha-siRNA d'origine endogène

ha-siRNA d'origine exogène

Transposons, séquences répétées, hétérochromatine...

Transgènes

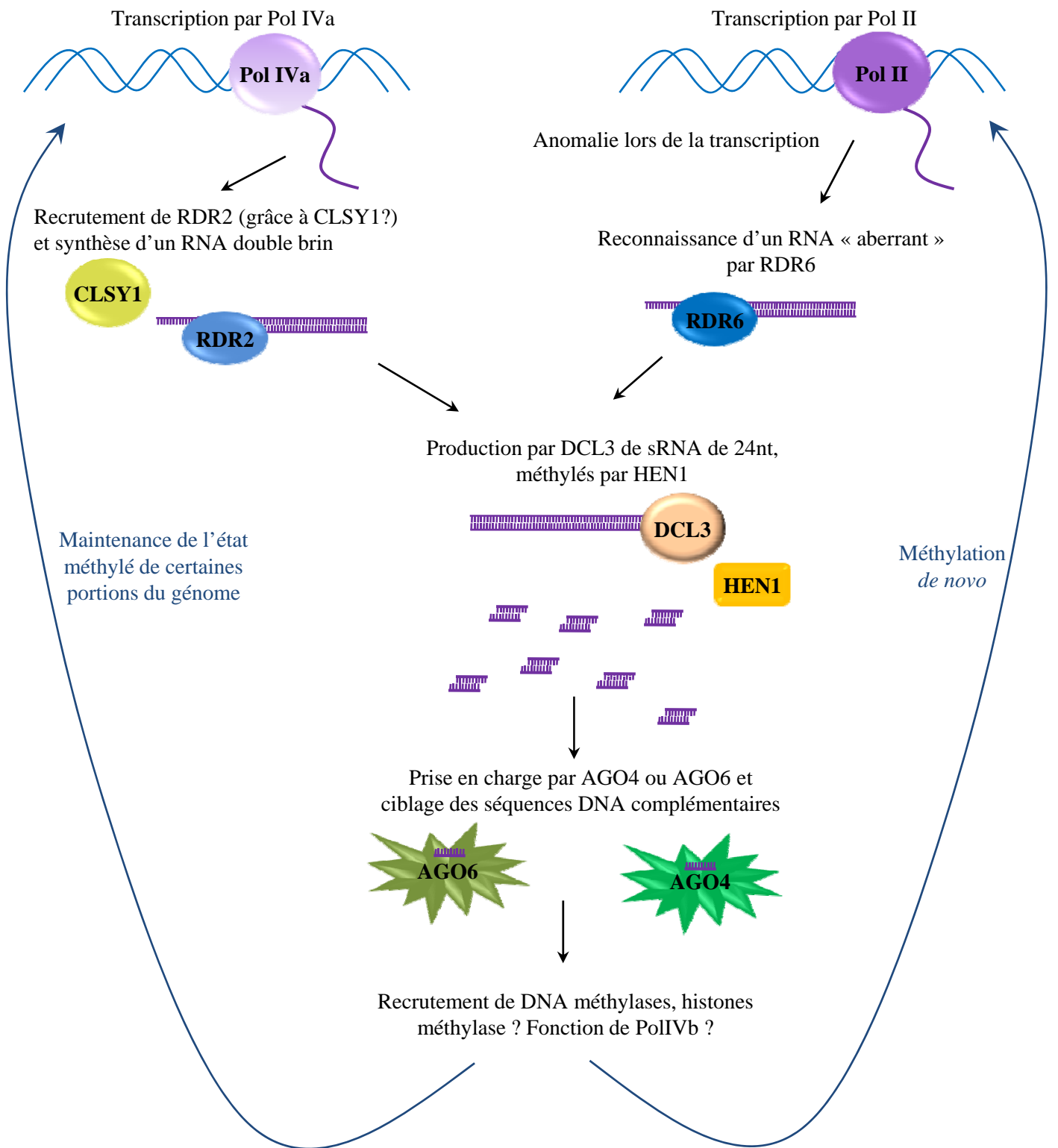


Figure 30 : Silencing de l'hétérochromatine
Modèle pour la biosynthèse des ha-siRNA

suggèrent qu'AGO6 pourrait également y jouer un rôle, de manière partiellement redondante à AGO4 (Zheng *et al.*, 2007) (voir **figure 30**).

D'autres protéines impliquées dans la biosynthèse de ces ha-siRNA ont été identifiées. On peut entre autres noter CLSY1, une ATPase appartenant à la famille SNF2. Cette protéine serait impliquée dans le remodelage de la chromatine. Elle est importante pour la localisation de RDR2 et, dans une moindre mesure, de Pol IV (Smith *et al.*, 2007).

La manière dont ces sRNA endogènes, au sein de leur complexe effecteur RITS (pour RNA-induced transcriptional silencing, équivalent du complexe RISC dans le silencing de l'hétérochromatine) agissent sur le DNA est encore inconnue. Deux hypothèses ont été proposées. La première prône une action directe du ha-siRNA sur la molécule de DNA. Dans ce cas, Pol IV pourrait, en association avec des hélicases, faciliter l'accès du siRNA sur le DNA déroulé. Une seconde possibilité pour le complexe RITS serait d'agir au niveau d'un RNA en cours de transcription, cette hypothèse étant appuyée par des expériences montrant que les acides aminés d'AGO4 nécessaires au clivage du RNA cible sont requis pour induire la méthylation de certains loci. Dans les deux cas, la localisation du complexe RITS au niveau du DNA ciblé pourrait permettre le recrutement des facteurs remodelant la chromatine (pour revue, voir Chan, 2008). Si des méthylations modifient les cytosines à l'intérieur d'un gène, le transcrit en résultant serait directement reconnu comme aberrant. Il serait alors dégradé ou servirait de matrice pour la production de nouveaux ha-siRNA (voir paragraphe II-2-3). Si la méthylation prend place au niveau du promoteur de la transcription, le gène n'est plus transcrit, on parle alors de silencing transcriptionnel ou TGS (transcriptional gene silencing) (Matzke et Birchler, 2005).

La localisation de Pol IV au niveau de sites déjà méthylés suggère que ce silencing transcriptionnel consiste essentiellement en la maintenance de l'état méthylé de portions du génome (Zhang *et al.*, 2007). En effet, la méthyltransférase MET1 est chargée de maintenir l'état méthylé du DNA lors de la réplication, son rôle est donc de transférer un groupement méthyl sur le brin néosynthétisé d'un DNA double brin hémiméthylé, au niveau d'un site symétrique CG. Les sRNA correspondants à une séquence donnée servirait donc de « sauvegarde » en cas d'erreur de MET1 ou de perte de la méthylation : lorsqu'un site reconnu par AGO4 chargé en siRNA est non méthylé, le complexe permettrait le recrutement d'une autre méthyltransférase, DRM2, qui contrairement à MET1 est capable d'induire une méthylation *de novo*. Cette hypothèse est appuyée par les faibles effets observés sur les plantes portant des mutations dans les gènes encodant les protéines spécifiquement impliquées dans cette voie du RNA silencing, en comparaison à une mutation *met1-*.

Un avantage majeur de l'utilisation par la plante du RNA silencing pour induire la méthylation du DNA est que, contrairement à la méthylation par MET1, les sites méthylés ne doivent pas être obligatoirement symétriques, seule la présence d'une cytosine dans la zone ciblée est un prérequis incontournable à l'induction d'une méthylation *de novo* par cette voie. Néanmoins, ces modifications épigénétiques ne pourront être transmises à la descendance, *via* l'activité de MET1, que lorsqu'elles sont localisées sur des dinucléotides CG et qu'elles se mettent en place dans les cellules germinales.

La manière dont Pol IV est recrutée au niveau des sites de production des siRNA et la façon dont AGO4 (ou AGO6 dans une moindre mesure) mobilise les différents facteurs permettant le remodelage de la chromatine (notamment DRM2 mais aussi d'autres DNA méthyltransférases comme CMT3 ou DRM1 ou encore des protéines induisant la méthylation des histones comme KYP) sont très peu comprises (Chan, 2008).

L'existence de sRNA de 21 et 22 nt correspondant à des fractions méthylées du génome n'exclut pas que d'autres sRNA que les produits de DCL3 soient capables de modifier la structure de l'hétérochromatine. Néanmoins, l'étude comparative de plantes sauvages et de mutants de PolIV prouve que 93% des sRNA endogènes sont issus des produits de cette dernière et la grande majorité sont des produits de DCL3 puisque 98,9% des siRNA de 24 nt sont perdus dans un mutant *nprd1a/1b* (Zhang *et al.*, 2007).

Le silencing transcriptionnel peut également s'établir au niveau de transgènes mais cette voie s'initie indépendamment de Pol IV et RDR2. Les transcrits sont des produits de Pol II reconnus comme aberrants en raison d'un grand nombre de copies ou d'un défaut de maturation (absence de coiffe en 5', de queue polyA en 3', absence partielle ou totale d'épissage...). Ils sont alors convertis en double brin par RDR6 et clivés par DCL3, ce qui conduit au chargement d'AGO4 en ha-siRNA de 24 nt et donc au ciblage en cis et à la méthylation *de novo* des transgènes desquels les ha-siRNA dérivent (Béclin *et al.*, 2002, Chan, 2008) (voir **figure 30**).

II-2-2) sRNA exogènes

a) Voie des siRNA (ou short interfering RNA) :

S-PTGS et IR-PTGS (sense et inverted-repeat Post Transcriptional Gene Silencing)

L'induction de la voie IR-PTGS consiste en l'introduction d'un transgène formant, après transcription, un RNA double brin initiant le RNA silencing (pour revue, voir Brodersen et

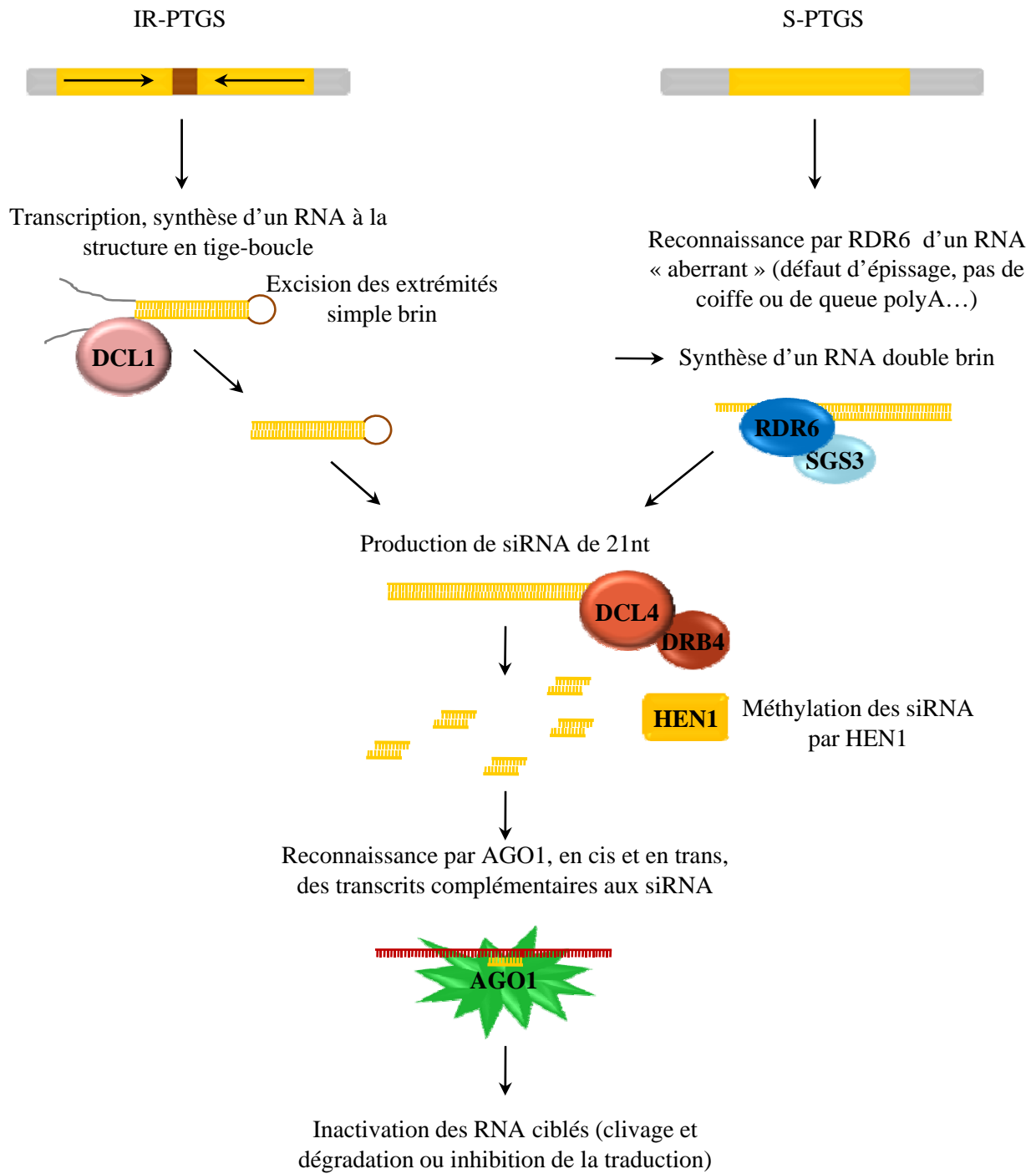


Figure 31 : IR-PTGS et S-PTGS

Voinnet, 2006). Classiquement, on utilise un transgène contenant une séquence de DNA placée en répétition inversée, les deux fragments complémentaires étant séparés par une séquence hétérologue. On obtient, après transcription, un RNA ayant une structure secondaire en tige-boucle (voir **figure 31**). Cette voie peut également être induite de manière incontrôlée et généralement non désirée, lors de l'insertion en double exemplaire et dans des directions opposées d'un transgène « sens ». Dans les deux cas, le RNA double brin va être clivé par DCL4 (ou par DCL2, lorsque DCL4 est inactive), produisant des siRNA (short interfering RNA) de 21 nt (ou de 22 nt, s'ils sont les produits de DCL2). Les siRNA sont incorporés dans la protéine AGO1 ce qui permet au complexe de reconnaître les RNA portant une séquence complémentaire au siRNA chargé, entraînant leur dégradation ou leur inactivation. Des siRNA de 24 nt sont également produits à partir de ces structures, suggérant un contrôle potentiel par des ha-siRNA, dans une voie impliquant DCL3 et AGO4 (voir paragraphe II-2-1-d). DCL1 pourrait également jouer un rôle dans cette voie, en facilitant l'accès de DCL4 au RNA en tige boucle par excision des portions simple brin de la structure (Dunoyer *et al.*, 2007)

La voie du S-PTGS est, elle, induite par un transgène sens. Elle est strictement dépendante de RDR6 pour la production de RNA double brin, puisqu'une mutation dans le domaine catalytique (GDD) de cette enzyme suffit à abolir le S-PTGS (Mourrain *et al.*, 2000). RDR6 pourrait reconnaître des RNA dit « aberrants » (voir **figure 31**) ou très abondants et les utiliser comme matrice. La synthèse des siRNA issus du S-PTGS nécessite de nombreux facteurs dont le rôle exact n'est pas toujours avéré : SGS3, WEX (une exonucléase de type RNase D), la méthyltransférase HEN1 et l'hélicase SDE3. DCL4 est probablement l'enzyme qui permet la production de ces siRNA et AGO1, la protéine effectrice qui utilise ces siRNA pour cibler des transcrits homologues.

b) RNA silencing antiviral

Les phytovirus sont eux aussi capables d'induire le mécanisme de RNA silencing (pour revue, voir Ding et Voinnet, 2007 ; Mlotshwa *et al.*, 2008). La plupart des virus de plantes ayant un génome à RNA simple brin, leur intermédiaire de réplication constitue une source potentielle de RNA double brin ciblé par les enzymes DICER. Ces molécules double brin sont majoritaires dans le RNA antiviral ciblant les virus à RNA puisqu'il a été montré que, souvent, lors d'infections virales, les viRNA (virus-derived siRNA) sens et antisens sont retrouvés dans des proportions équivalentes (Yoo *et al.*, 2004 ; Ho *et al.*, 2006). Il existe cependant des

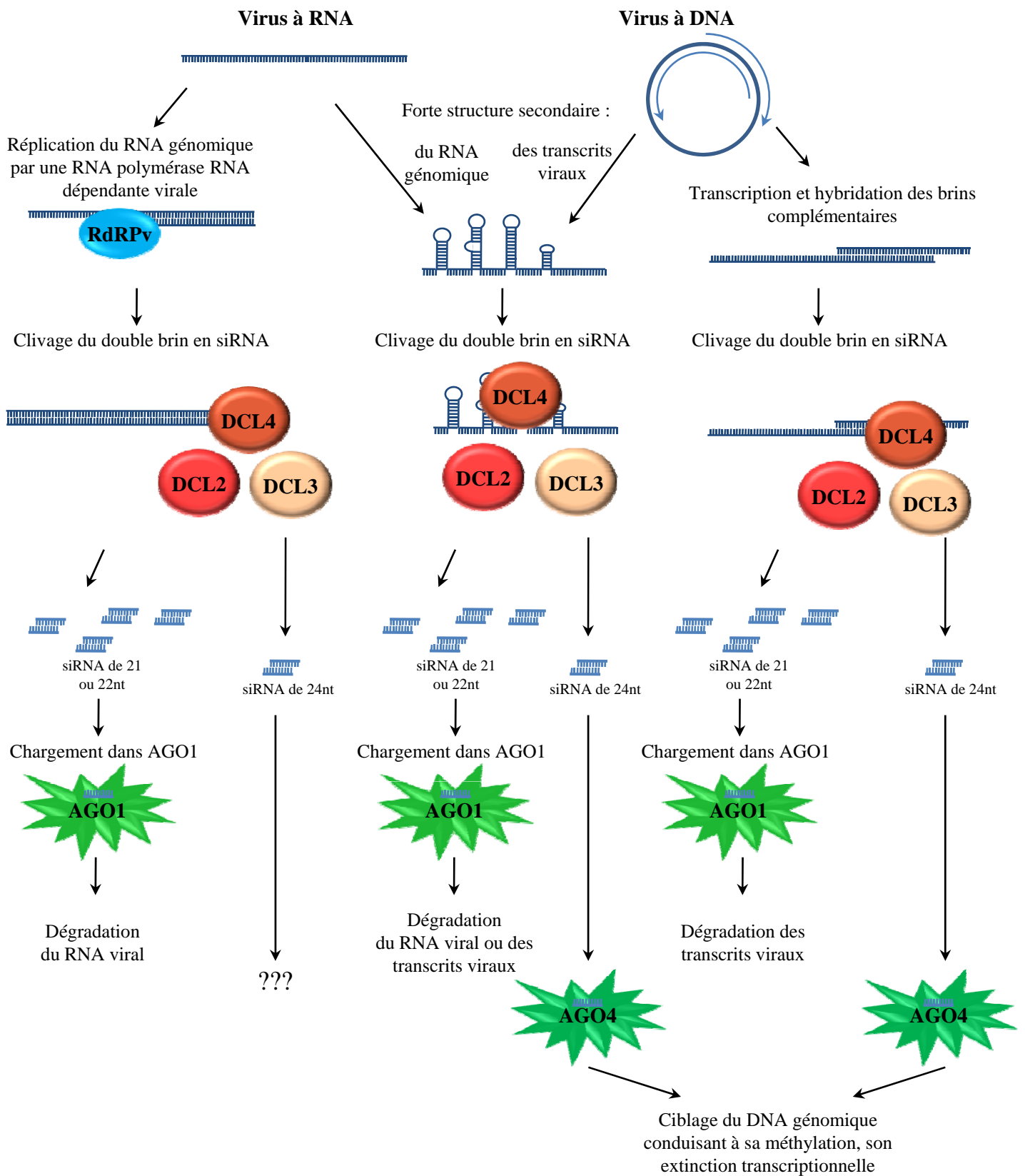


Figure 32 : RNA silencing antiviral

Modèle du mécanisme d'action du RNA silencing dans la défense antivirale chez *Arabidopsis thaliana*

exceptions : dans les cas du TCV (Turnip Crinckle Virus) ou du CymRSV (Cymbidium Ringspot virus) ou encore du virus satellite du CMV, une large majorité des viRNA produits correspond au brin sens du RNA génomique du virus (Molnár *et al.*, 2005 ; Ho *et al.*, 2006 ; Du *et al.*, 2007). Ces viRNA proviennent de portions du génome présentant une forte structure secondaire, ce qui indique que DICER ciblerait directement les structures double brin sur le génome viral. Les virus à DNA peuvent également initier le mécanisme, car la transcription bi-directionnelle de leur génome permet souvent l'appariement de ces transcrits et donc la synthèse de RNA double brin. Une étude a pu démontrer que des viRNA pouvaient également être produits à partir de structure en tige boucle intra-moléculaires de transcrits viraux d'un phytovirus à DNA (Moissiard et Voinnet, 2006) (voir **figure 32**). Ces structures secondaires, aussi bien pour les virus à DNA que pour les virus à RNA, sont probablement indispensables au cycle viral, faute de quoi, une sélection négative de ces éliciteurs des défenses de la plante aurait pu s'opérer.

Aucune des quatre protéines DCL d'*Arabidopsis thaliana* n'est strictement requise dans le RNA silencing antiviral puisqu'aucun des simples mutants *dcl1*, *dcl2*, *dcl3* ou *dcl4* ne permet d'observer d'hypersensibilité lors d'une infection virale. Cette constatation suggère une redondance de fonction entre les protéines, tout en respectant une hiérarchie d'action des protéines DCL dans cette voie.

DCL4 serait l'enzyme prioritairement mobilisée contre les virus à RNA, relayée par DCL2, quand DCL4 est inactivée. En effet, seul un double mutant *dcl2/dcl4* présente une hyper-susceptibilité aux virus et une forte réduction de l'accumulation de viRNA, ce qui suggère que les produits de DCL3 et de DCL1 n'ont que peu ou pas d'impact sur l'infection virale (Deleris *et al.*, 2006 ; Diaz-Pendon *et al.*, 2007). De plus, les viRNA produits à partir des virus utilisés (TRV ou Tobacco Rattle Virus, TCV et CMV) lors de l'infection de plantes sauvages sont majoritairement de 21 nucléotides à moins que DCL4 ne soit inactivée, auquel cas on observe des siRNA de 22 nucléotides, produits de DCL2 (voir **figure 32**).

Dans le cas d'une infection par un virus à DNA, les quatre protéines DCL pourraient agir de manière coopérative. En 2006, Moissiard et Voinnet découvrent que la triple mutation *dcl2/dcl3/dcl4* est nécessaire afin d'observer une suraccumulation du CaMV ce qui suggère que les produits de DCL3 ont également une fonction antivirale sur les virus à DNA. Ils proposent également que DCL1 pourrait favoriser les activités DCL3 et DCL4 en excisant les structures en tige boucle de la région « leader » du transcrits 35S du CaMV, de manière similaire à son activité sur les molécules précurseurs dans la voie des miRNA (voir paragraphe II-2-1-a) (voir **figure 33**).

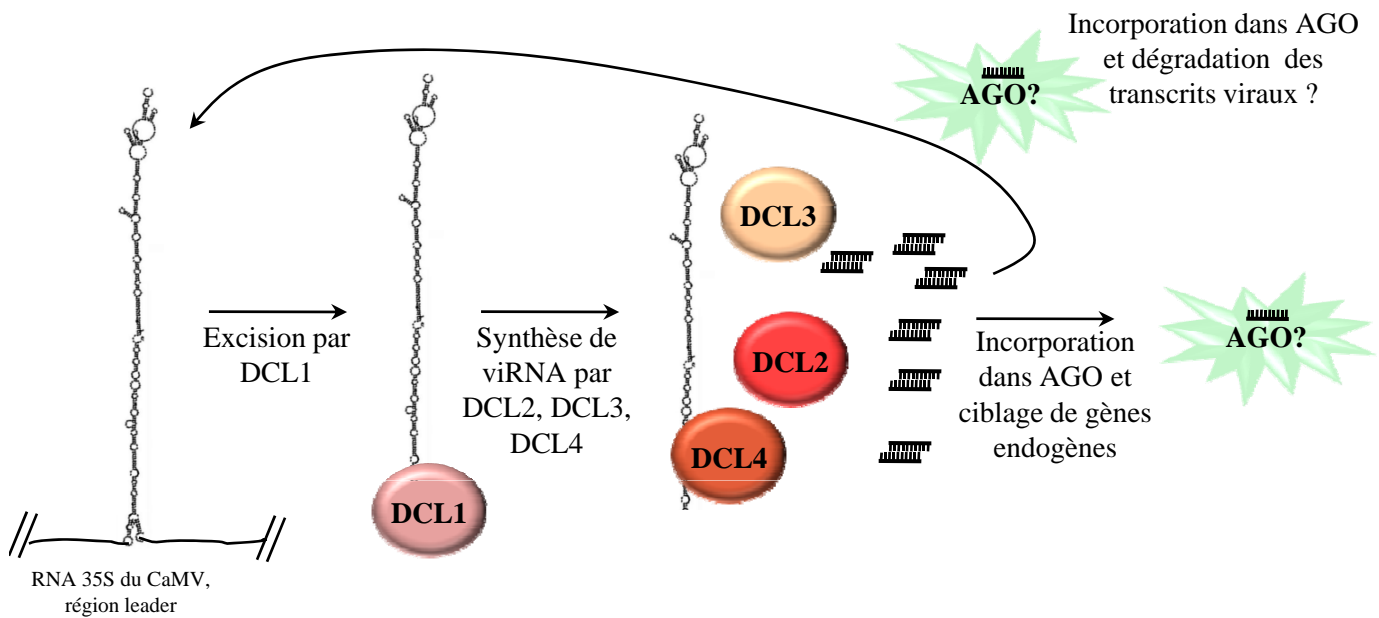


Figure 33 : Synthèse de siRNA viraux lors de l'infection par le CaMV

DCL1 pourrait faciliter l'accès à la région leader très structurée en l'excisant. Les trois autres DCL pourraient produire des viRNA capables d'inhiber l'infection virale (seul un mutant *dcl2/3/4* permet une sur-accumulation du virus). Cette action du RNA silencing pourrait pourtant être bénéfique au virus puisque certains viRNA produits ciblent et inhibent potentiellement l'expression de gènes endogènes (d'après Moissiard et Voinnet, 2006).

En théorie, le ciblage par les protéines DCL devrait être suffisant pour inhiber la réplication virale. L'existence d'un complexe effecteur RISC chargé en viRNA a cependant pu être démontrée, notamment par l'utilisation de vecteurs viraux permettant d'induire en trans l'extinction post-transcriptionnelle de gènes endogènes. En 2006, Deleris *et al.* utilisent un virus, le TRV, dans lequel est introduit le cDNA du gène de la phytoène désaturase (PDS). Après infection, on observe le blanchiment des feuilles caractéristique de l'absence de cette enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes, ce qui prouve que les viRNA TRV-PDS sont effectivement chargés dans un complexe RISC. Ce mécanisme, appelé VIGS (pour virus-induced gene silencing) est de plus en plus utilisé dans les laboratoires puisqu'il permet d'inhiber spécifiquement l'expression d'un gène endogène en s'affranchissant des étapes de transformation de la plante par un inducteur (un transgène formant un RNA en tige boucle, par exemple). Cette technique permet également d'induire le silencing de gènes nécessaires au développement de la plante, dont l'inhibition constitutive serait létale, puisque l'infection est réalisée sur des plantes adultes.

L'activité catalytique du complexe RISC antiviral est probablement portée par la protéine AGO1 puisque les mutants *ago1* sont hypersensibles aux infections (Morel *et al.*, 2002) et que des viRNA ont pu être co-immunoprécipités avec AGO1 et (Zhang *et al.*, 2006). Il n'est cependant pas impossible qu'une redondance de fonction existe entre les dix protéines AGO d'*Arabidopsis thaliana* dans le silencing antiviral, comme cela est suggéré pour AGO7 par les récents travaux de Qu *et al.* (2008).

Le complexe RISC antiviral pourrait permettre le clivage des RNA génomiques et subgénomiques des virus à RNA ou celui des transcrits des virus à DNA. Dans le cas de ces derniers, il pourrait également être à l'origine du silencing transcriptionnel du virus par ciblage du DNA viral grâce aux viRNA de 24 nucléotides produits par DCL3 (voir **figure 32**). L'activité catalytique du complexe serait alors portée par AGO4 (Bian *et al.*, 2006) (voir paragraphe II-2-1-d : hasiRNA d'origine exogène).

Si, pour contrecarrer cette voie de défense de la plante, la plupart des virus ont développé des protéines capables d'inhiber le RNA silencing (voir paragraphe II-3), certains d'entre eux l'ont détourné à leur profit. En effet, certains virus animaux encodent des miRNA capables de réguler l'expression de gènes de leur hôte (Pfeffer *et al.*, 2004 ; Gottwein *et al.*, 2007 ; Samols *et al.*, 2007 ; Stern-Ginossar *et al.*, 2007). Chez les plantes, le CaMV est pour l'instant le seul virus identifié comme étant capable d'inhiber l'expression de gènes de l'hôte *via* la synthèse de viRNA mais l'impact de cette régulation sur la réplication virale reste à déterminer (Moissiard et Voinnet, 2006) (voir voir **figure 33**).

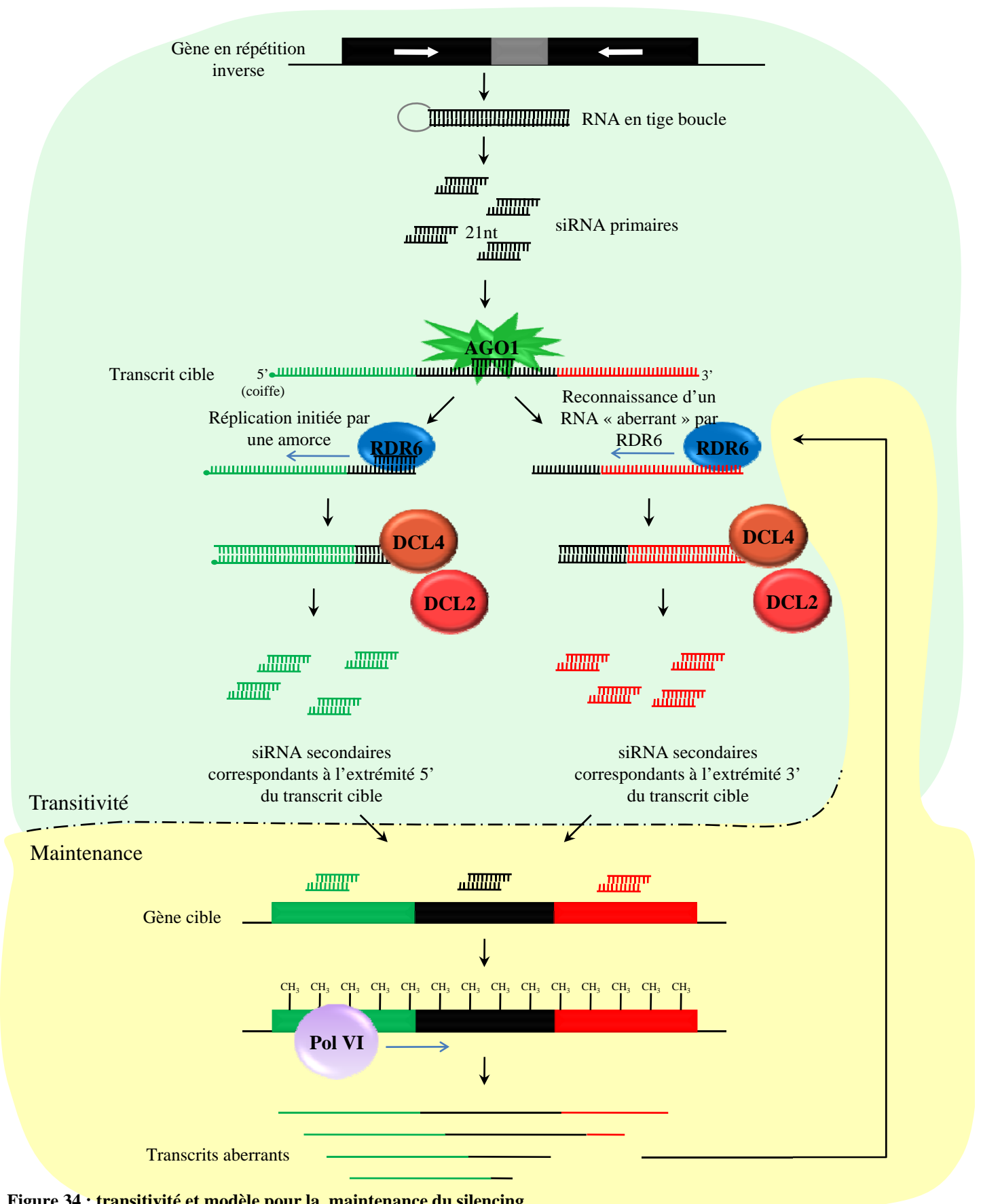


Figure 34 : transitivité et modèle pour la maintenance du silencing

Les siRNA secondaires produits lors de la transitivité permettrait, en plus de l'amplification du silencing, l'établissement de la maintenance. Les siRNA secondaires induiraient la méthylation du gène cible. Pol IV reconnaîtrait ces séquences méthylées et produirait alors des transcrits aberrants encourageant l'activité RDR6 en absence de l'inducteur, le RNA en tige boucle.

II-2-3) Transitivité et maintenance du silencing

Le phénomène de transitivité est défini par la production de siRNA dits « secondaires ». Leur synthèse fait suite à une voie du silencing. Par exemple, dans le cas de l'IR-PTGS, les siRNA « primaires » sont le résultat du clivage par DCL4 (et DCL2, lorsque DCL4 est inactivée) du RNA formant une structure en tige boucle. Ces siRNA peuvent cibler, en *trans*, des RNA portant une séquence complémentaire. Les RNA cibles sont alors clivés par AGO1 et les produits dérivés peuvent servir de matrice à RDR6. Le double brin formé par l'activité RDR est coupé par DCL4 ou DCL2, produisant des siRNA secondaires couvrant la totalité du messenger ciblé, permettant ainsi la production de siRNA de séquence différente de celle portée par le RNA en tige-boucle initiateur. En particulier, si la séquence du RNA en tige-boucle correspond à une séquence interne au RNA ciblé en *trans*, les siRNA secondaires correspondront également aux extrémités 5' et 3' du RNA messenger (voir **figure 34**) (Voinnet *et al.* 1998; Sijen *et al.* 2001; Vaistij *et al.* 2002).

Deux mécanismes pour la synthèse du RNA double brin ont été proposés : une activité dépendante d'une amorce, le siRNA primaire, et une activité RDR agissant sans amorce. Dans le premier cas, l'appariement d'un siRNA avec le messenger cible initie l'activité RDR ce qui permet la production de siRNA secondaires correspondant à l'extrémité 5' du messenger. Bien qu'une telle activité (amorce-dépendante) n'ait pas pu être démontrée *in vitro* pour RDR6 (Curaba et Chen, 2008) il n'est pas impossible que l'élongation d'amorce *in vivo* dépende du chargement du siRNA dans un complexe effecteur absent des expériences réalisées *in vitro* (Voinnet, 2008). Pour obtenir des siRNA secondaires à partir de l'extrémité 3', l'absence de siRNA, autrement dit, d'amorce correspondant à cette portion du RNA, suppose que la reconnaissance par RDR6 du RNA à répliquer utilise d'autres mécanismes. Il a été suggéré que RDR6 ciblerait le produit de clivage 3' en raison de l'absence de coiffe à son extrémité 5' (Brodersen et Voinnet, 2006), ce qui constitue un type d'aberration reconnu par les RDR (voir paragraphe II-2-1-d).

La transitivité permet d'amplifier les effets du silencing par la suraccumulation et la diversification des siRNA produits. Ce mécanisme est également celui utilisé dans les voies de biosynthèse des ta-siRNA et des nat-siRNA secondaires. Lorsqu'il prend place après le RNA silencing antiviral, la réponse défensive de la plante s'en trouve augmentée (Schwach *et al.* 2005; Wassenegger and Krczal 2006). A l'inverse, l'infection de mutants *rdr6* conduit souvent

à une amplification significative du titre viral en comparaison de celui observé dans une plante sauvage (Mourrain *et al.*, 2000).

De manière surprenante, les transcrits endogènes ne sont que très rarement soumis à la transitivity (à l'exception de ceux impliqués dans les voies ta-si et nat-siRNA). Une cible de miRNA ne permet donc pas la production de siRNA secondaires. De même, lorsqu'un transgène (ou un virus) porte une séquence ciblant un gène endogène, si son transcrit est dégradé, il n'est pas pris en charge par RDR6 (Vaistij *et al.*, 2002). Ce phénomène peut s'expliquer par une compétition existant entre les RDR et les exonucléases cellulaires chargées de contrôler la qualité des RNA. Cette compétition serait ainsi bien moins stricte sur les transgènes dépendants d'un promoteur fort en raison de l'importante production de transcrits (Voinnet, 2008).

Le mécanisme de transitivity est généralement suivi par la mise en place de la maintenance de l'état « silencé » du gène ciblé (voir **figure 34**). Cela permet de conserver les effets du silencing, même après élimination de l'inducteur (le RNA en tige boucle ou le virus, par exemple). Ces deux étapes (transitivity et maintenance) ont pu récemment être découplées (Eamens *et al.*, 2008). En effet, si elles requièrent toutes deux l'activité de RDR6, seule la maintenance requiert la présence de NRPD1a et NRPD1b (soit, les deux isoformes de Pol IV). La nécessité de ces deux enzymes supporte l'hypothèse que la maintenance agit au niveau du DNA en induisant la méthylation *de novo* du gène ciblé (voir paragraphe II-2-1-d).

II-2-4) Mouvement du signal du RNA silencing

En plus de son action dans la cellule où il est initié, le signal du RNA silencing peut circuler dans la plante et agir de manière « non cellule-autonome ». Il est possible de subdiviser ce mouvement en trois étapes : le mouvement à courte distance, le mouvement local étendu et le mouvement systémique. Cette mobilité est particulièrement intéressante dans la fonction antivirale du RNA silencing puisqu'elle permet de suivre le virus et d'inhiber sa multiplication dans les cellules nouvellement infectées, voire de l'y précéder, immunisant ainsi les cellules saines contre l'entrée de virus. (Pour une revue concernant le mouvement du RNA silencing, voir Voinnet, 2005 ; Dunoyer et Voinnet, 2008 ; Kalantidis *et al.*, 2008)

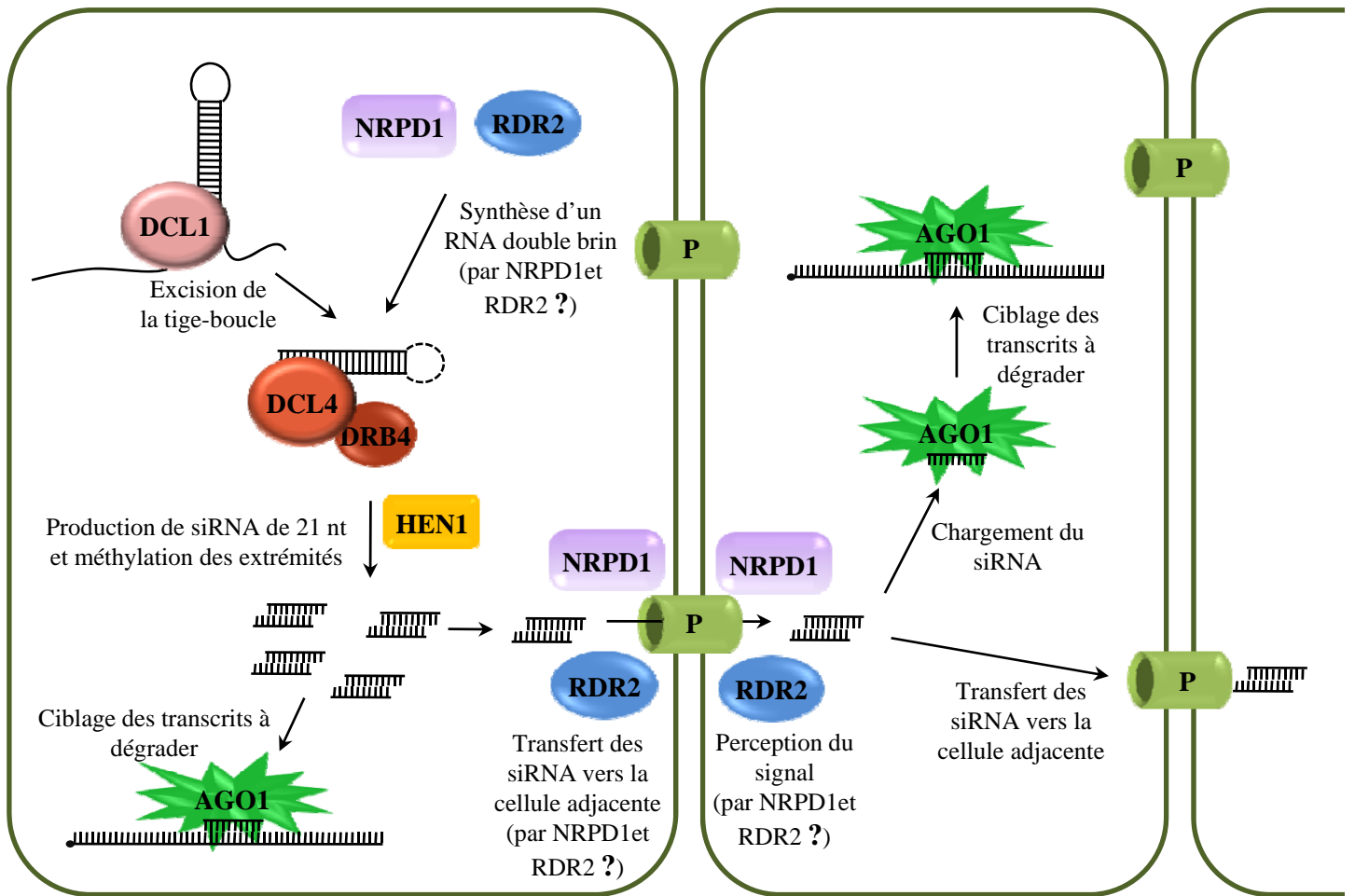


Figure 35 : modèle pour le mouvement du RNA silencing de cellule à cellule

Le transfert des siRNA d'une cellule à l'autre s'opère sur un maximum de 15 cellules. L'implication de NRPD1 (a et b) et de RDR2 dans ce mécanisme est démontrée mais leur rôle reste à déterminer. (adapté de Dunoyer *et al.*, 2007). P : plasmodesme.

a) Mouvement à courte distance

Le mouvement à courte distance est caractérisé par l'établissement du RNA silencing dans un rayon de 10 à 15 cellules autour du site d'induction (Himber *et al.*, 2003). Ce nombre suggère un contrôle strict de la propagation du signal ou encore une dilution progressive du signal circulant de cellule à cellule, excluant une étape d'amplification du RNA silencing dans les cellules ne contenant pas l'inducteur (la molécule double brin à l'origine de l'établissement du RNA silencing). L'analyse de mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients dans ce mouvement démontre que DCL4 est nécessaire à sa mise en place (Dunoyer *et al.*, 2005). Les molécules « signal » transitant d'une cellule à l'autre seraient donc probablement le produit de cette enzyme, les siRNA de 21nt. Les produits de DCL3, les siRNA de 24nt ne sont pas requis au mouvement à courte distance (Himber *et al.*, 2003), ce qui indique que la seule espèce de siRNA nécessaire est celle de 21nt. Néanmoins, il semblerait qu'au dessus d'un certain seuil de production, les produits de n'importe quel DCL (DCL2, DCL3 et même DCL1) pourraient se substituer fonctionnellement aux siRNA de 21nt, en « forçant » le chargement du complexe effecteur (Dunoyer *et al.*, 2005).

Ce signal pourrait circuler d'une cellule à l'autre à travers les plasmodesmes (voir **figure 35**). En effet, les cellules de garde des stomates, connues pour être isolées symplastiquement (et donc dépourvues de connexions cytoplasmiques avec leurs voisines ; Wille et Lucas, 1984) ne sont pas atteintes par le signal de silencing induit dans une cellule proche (Himber *et al.*, 2003). En 2007, Dunoyer *et al.* ont montré qu'AGO1 serait une fois encore la protéine effectrice, elle serait capable de capter le signal et d'induire le silencing dans les cellules adjacentes au site d'induction.

Dans cette étude (Dunoyer *et al.*, 2007) ainsi que dans un autre travail de recherche réalisé indépendamment (Smith *et al.*, 2007), deux protéines classiquement rattachées au silencing transcriptionnel, NRPD1a (une sous-unité de Pol IVa) et RDR2, ont été identifiées comme étant importantes dans le mouvement à courte distance du RNA silencing. Le rôle exact de ces protéines dans ce mécanisme n'est pas encore clairement compris. Smith *et al.* (2007) proposent que Pol IV et RDR2 pourraient assister la formation du RNA double brin clivé par DCL4. Dunoyer *et al.* (2007) favorisent plutôt une action de ces protéines en aval de l'activité DCL4, proposant un rôle dans la perception du signal, ou encore dans le transport des siRNA à travers les plasmodesmes.

D'autres gènes impliqués dans le silencing induit grâce à DCL4 ont également été identifiés lors du criblage réalisé par Dunoyer *et al.* (2007) ; ils porteraient, dans le mouvement

du signal du silencing, les mêmes fonctions que dans les autres voies du RNA silencing (DRB4 assistant DCL4 dans ses fonctions et HEN1 augmentant la stabilité de la molécule signal en méthylant les extrémités).

b) Mouvement local étendu

Ce mouvement fait référence à un mouvement à courte distance qui s'étend au-delà des 15 cellules caractérisant le mouvement de cellule à cellule défini ci-dessus. En plus des facteurs impliqués dans le mouvement de cellule à cellule (notamment DCL4), ce mécanisme dépend de l'activité RDR6 et de l'hélicase putative, SDE3 (Himber *et al.*, 2003). Ce mouvement est associé au mécanisme de transitivity et donc à la production de siRNA secondaires dans les cellules percevant le signal du silencing à courte distance. La production *de novo* de siRNA de 21 nucléotides permettrait une réinitiation du mouvement de cellule à cellule (Himber *et al.*, 2003). Ainsi, le mouvement local étendu représente une répétition successive du mouvement de cellule à cellule. Comme noté précédemment, le mécanisme de transitivity s'opère essentiellement sur les transgènes et autres RNA exogènes. Ainsi, le mouvement local étendu ne cible que peu (ou pas) les transcrits issus de gènes endogènes, même si l'inducteur est d'apport exogène.

Une particularité de mouvement local étendu est qu'il ne prend effet que dans les feuilles puits, après perception du signal de silencing systémique (Kalantidis *et al.*, 2008). Ce mouvement n'a donc jamais été observé au niveau du site d'induction initial. A cet endroit, pourtant, les siRNA de 21 nucléotides sont produits en grande quantité, ils sont capables d'induire le mouvement de cellule à cellule et les cellules réceptionnant ce signal expriment le transcrit cible qui devrait servir de matrice à RDR6, produisant le substrat de DCL4. Les facteurs qui inhibent l'amplification et donc le mouvement local étendu dans les feuilles sources où le RNA silencing est initié restent donc à déterminer.

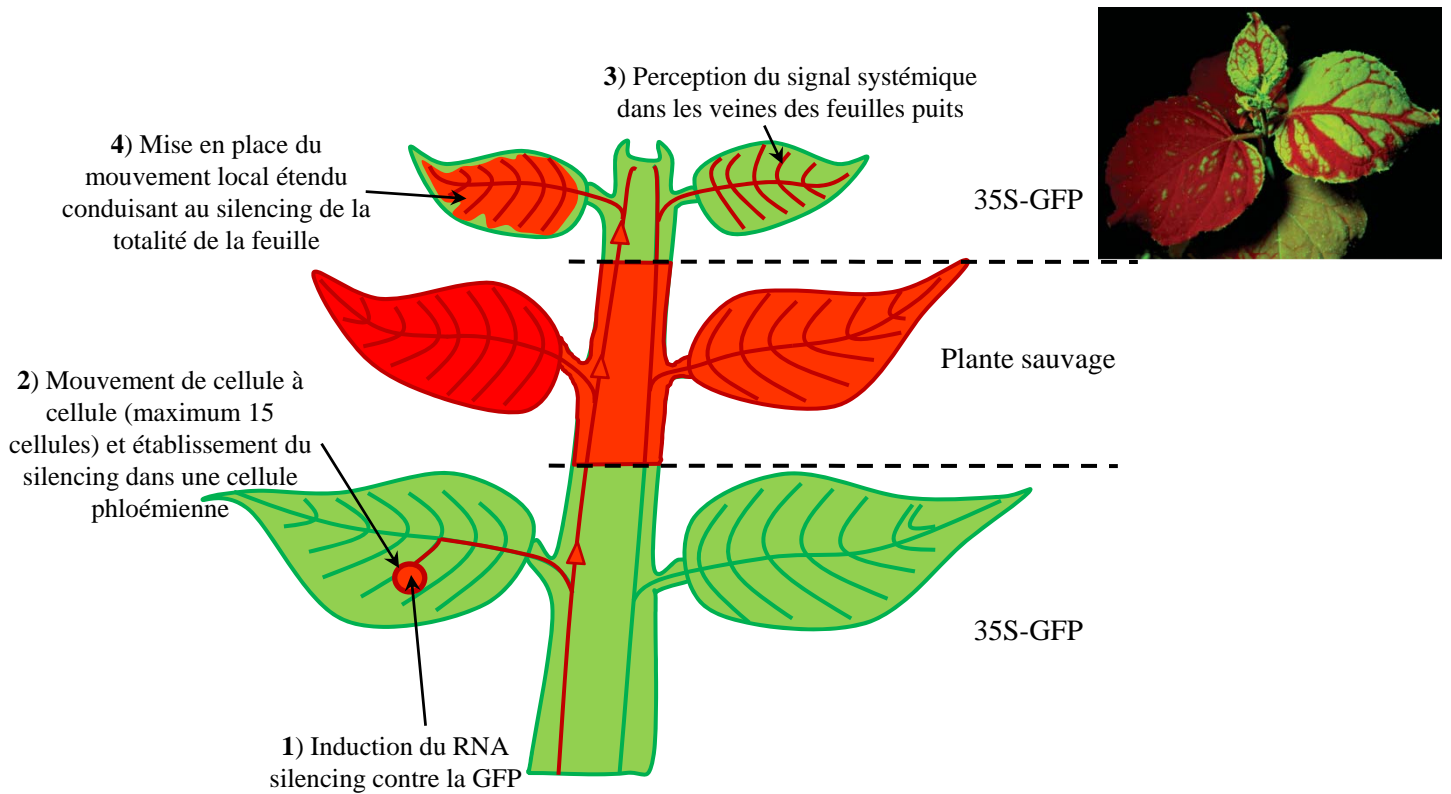


Figure 36 : Mouvement du RNA silencing

Illustration de la technique utilisée par Voinnet *et al.* (1998) pour mettre en évidence les distinctions entre les différents types de mouvement. La plante servant de porte greffe exprime la GFP de manière constitutive (35S-GFP). Il en est de même pour la portion apicale où est visualisée la systémie. Entre ces deux fragments est greffée une plante sauvage dont la couleur rouge aux ultraviolets, résultat de l'auto-fluorescence de la chlorophylle, démontre l'absence de GFP. 1) Le silencing contre la GFP est induit dans le porte-greffe. 2) Le silencing se propage à courte distance et atteint une cellule compagne du phloème. Celle-ci émet un signal qui pénètre dans le phloème, y circule, passe par la partie « sauvage » et 3) s'exprime dans un premier temps dans les veines du greffon, éteignant la florescence verte. Ce trajet exclut une étape d'amplification dans le greffon sauvage qui n'exprime pas le transgène ciblé. 4) L'amplification a lieu dans le greffon 35S-GFP ce qui permet l'établissement du mouvement local étendu. (Photographie des feuilles systémique lors d'une expérience similaire extraite de Kalantidis *et al.*, 2008)

c) Mouvement systémique

Les preuves indiscutables de l'existence d'un mouvement systémique du RNA silencing ont majoritairement été obtenues grâce à des expériences de greffes dans des plants de tabac (Palauqui *et al.*, 1997; Voinnet *et al.*, 1998). Dans ces expériences, le porte-greffe silencé est capable d'induire le silencing séquence-spécifique d'un greffon, et ce, même si l'on introduit, entre ces deux portions, un fragment de plante dépourvu du transcrit « à silencer » (voir **figure 36**). Ceci indique que le silencing systémique n'est pas un mouvement de cellule à cellule étendu puisque l'amplification est impossible dans le greffon intermédiaire. De plus, l'utilisation de molécules chimiques (le cadmium, par exemple, par Ueki et Citovsky, 2001) ou de protéines virales (ex : la protéine P1 du RYMV ou Rice Yellow Mottle Virus par Himber *et al.*, 2003) ont permis d'inhiber le silencing systémique tout en préservant le mouvement de cellule à cellule. A l'inverse le mouvement à courte distance peut être enrayé sans que la systémie du silencing en soit affectée pour autant (par la protéine virale AC2 de l'ACMV (African Cassava Mosaic Virus), par exemple, utilisée par Himber *et al.*, 2003). Ces deux types de mouvement font donc bien intervenir des mécanismes différents.

Si l'on sait que l'établissement du silencing systémique utilise un signal transitant par les vaisseaux du phloème (Voinnet *et al.*, 1998), on ignore la nature exacte de ce signal. Il semble acquis qu'il s'agisse d'un acide nucléique vu la spécificité de séquence du silencing induit par ce signal. Néanmoins, aucun produit de DCL ne paraît spécifiquement impliqué dans ce mouvement. En effet, la protéine virale HcPro, capable de séquestrer les sRNA des trois tailles connues (21, 22 et 24 nucléotides) est impuissante dans l'inhibition de la systémie du RNA silencing (Lakatos *et al.*, 2006). Plus récemment, Brosnan *et al.* (2007) ont mis au point des microgreffes entre plants d'*A. thaliana* permettant l'étude du mouvement du silencing à longue distance. Ainsi il a été montré que des portes greffe du mutant *dcl1* ou du triple mutant *dcl2dcl3dcl4* étaient toujours capables d'émettre un signal de silencing systémique. Malgré la redondance existante entre les différents DCL d'*Arabidopsis thaliana* et l'absence d'expériences réalisées dans un quadruple mutant *dcl1dcl2dcl3dcl4*, il semble vraisemblable que la molécule qui transite dans le phloème, rendant possible la systémie du silencing, serait plutôt un RNA double brin de plus grande taille.

L'étude de Brosnan *et al.* (2007) a permis d'identifier plusieurs facteurs cellulaires impliqués dans la réception du signal de silencing. En effet, jusqu'alors, les expériences de greffes ayant été effectuées sur *N. benthamiana*, la méconnaissance du génome de cette plante n'avait pas permis d'identifier les facteurs importants dans ce mécanisme. Il apparaît que les

protéines nécessaires à l'établissement du silencing dans les feuilles systémiques sont celles impliquées dans le silencing de l'hétérochromatine : DCL3, NRPD1a, RDR2, RDR6 et dans une moindre mesure AGO4 (lorsqu'un greffon porte une mutation *ago4*, l'établissement de la systémie est retardée et non abolie, contrairement aux autres protéines citées). Néanmoins, elles ne sont pas requises pour la synthèse du signal dans les feuilles sources. Le rôle exact de ces protéines dans la perception du signal n'est pas encore connu mais suggère des liens plus étroits entre silencing transcriptionnel et post transcriptionnel que ceux imaginés jusqu'à présent.

Si le signal de silencing systémique semble suivre celui des photoassimilats dans les vaisseaux du phloème, la manifestation du silencing dans les feuilles puits n'est visible que quelques jours après induction dans les feuilles sources (alors que la vitesse de la sève élaborée est de l'ordre du mètre par heure (Delrot, 2000)). Kalantidis *et al.* (2006) proposent que ce délai serait dû au temps nécessaire pour atteindre un certain seuil de molécules signal (d'un point de vue quantitatif) dans le but d'éviter une réaction disproportionnée face à une menace mineure. Ainsi, même si l'existence de systémie pour le silencing de gènes endogènes n'est pas exclue, elle est probablement réservée, de la même manière que le phénomène de transitivity, aux transcrits fortement exprimés (Kalantidis *et al.*, 2008).

II-3) Suppresseurs viraux du RNA silencing

Le mécanisme de RNA silencing étant un moyen de lutte antivirale efficace et spécifique chez les plantes, la plupart, sinon tous les phytovirus ont développé des protéines capables de protéger l'intégrité du génome viral en inhibant ce mécanisme. Ces protéines varient d'une espèce à l'autre, voire d'un virus à l'autre du point de vue de leur séquence mais aussi et surtout, de leur mode d'action. Ainsi, chaque protéine dite « suppresseur » va pouvoir cibler une ou plusieurs étapes du silencing, inhibant le RNA silencing antiviral mais aussi souvent d'autres voies du RNA silencing fondamentales au développement de la plante. Certains virus agissent de façon encore plus subtile en détournant les viRNA produits durant le silencing antiviral pour cibler des gènes endogènes (voir paragraphe II-2-2-b). Ce chapitre a pour but de présenter quelques exemples de suppresseurs viraux connus s'attaquant à différentes étapes du RNA silencing (pour une revue, voir Ding et Voinnet, 2007 ; Diaz-Pendon et Ding, 2008).

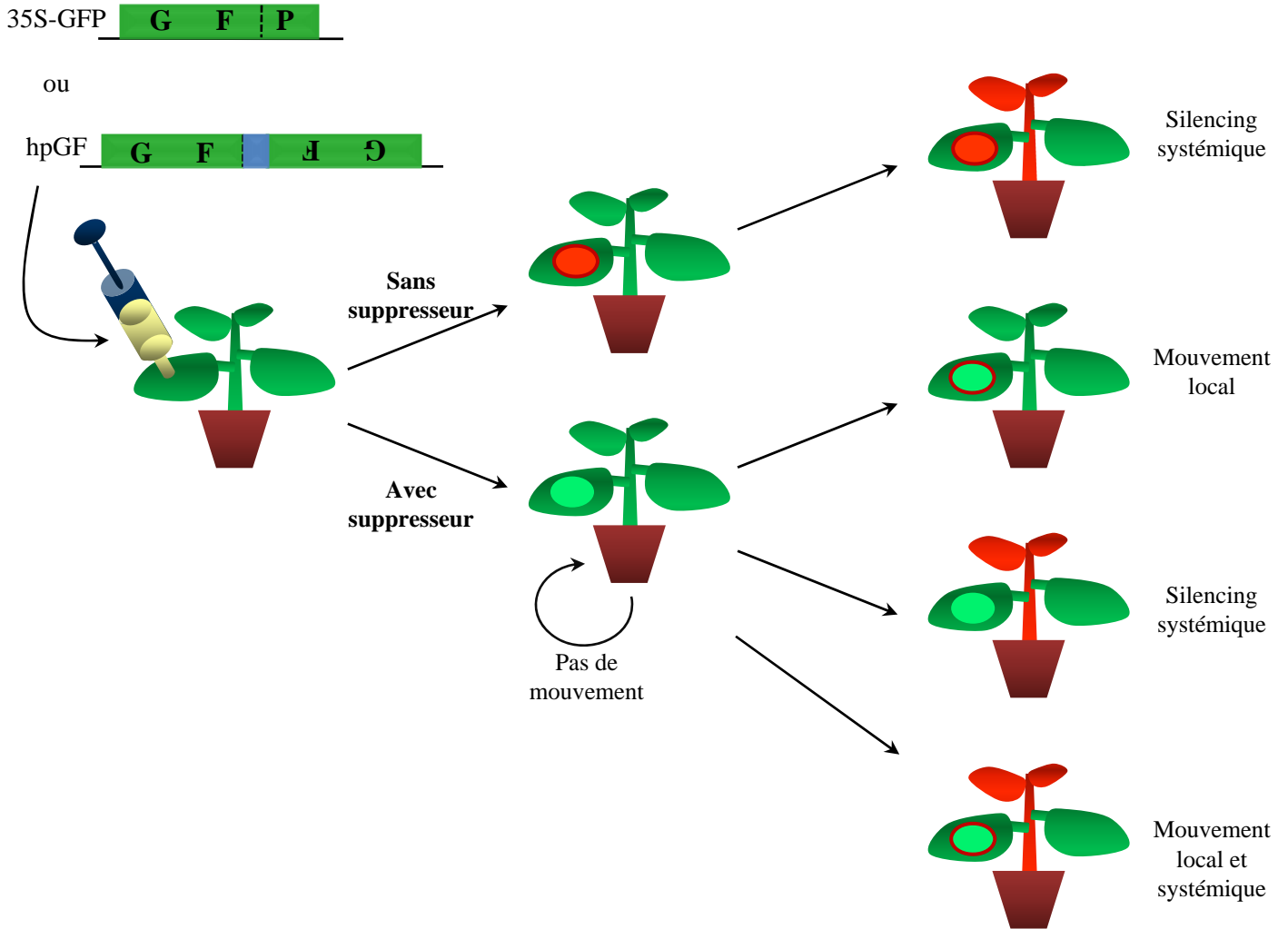


Figure 37 : « Patches test »

Cette technique est l'une des plus largement utilisée dans la recherche de l'activité de suppression d'une protéine virale. On utilise une plante de *Nicotiana benthamiana* exprimant le transgène GFP sous dépendance du promoteur 35S (lignée appelée 16C) qui fluoresce en vert sous rayons ultraviolets. Par la méthode d'agro-infiltration, on introduit le transgène 35S-GFP. Cela provoque probablement une suraccumulation du transcrite reconnu comme une aberration par la plante, ce qui conduit à la mise en place du RNA silencing contre le transgène agro-infiltré et le transgène constitutif. On peut également utiliser directement une construction qui, après transcription, formera une structure en tige boucle dont la séquence correspond à tout ou partie du gène de la GFP (hpGF pour « hairpin » correspondant à la portion 5' de la GFP). La zone infiltrée, le patch, devient rouge aux ultraviolets : la GFP n'est plus exprimée, on ne visualise plus que la chlorophylle. Quelques jours plus tard, la systémie est établie et la plantes devient complètement rouge. Si on co-infiltre avec la construction 35S-GFP ou hpGF, celle codant pour une protéine capable d'inhiber localement le RNA silencing, le patch devient vert. L'observation de la mise en place, ou non, du mouvement du silencing en présence du suppresseur permet également de mieux cerner l'étape du RNA silencing inhibée par la protéine étudiée.

II-3-1) Inhibition de l'activité Dicer : exemple de la protéine P38 du TCV

La protéine P38 est une protéine multifonctionnelle dont le rôle premier est structural puisque P38 est la protéine de capsid du TCV. Elle est impliquée dans le mouvement systémique du virus (Hacker *et al.*, 1992) et est l'éliciteur de la résistance « gène pour gène » chez un écotype d'*Arabidopsis thaliana* (Kachroo *et al.*, 2000) ; l'écotype *Columbia* classiquement utilisé au laboratoire étant sensible à l'infection par le TCV. Son activité de suppresseur de silencing a été découverte par Qu *et al.* (2003). Leurs expériences dans *N. benthamiana* démontrent que la protéine agit à un stage précoce du mécanisme de RNA silencing. En effet, son expression abolit la synthèse de siRNA dans un système d'expression transitoire de l'inducteur du silencing (ici, on introduit le cDNA de la GFP dans des plantes transformées par le gène de la GFP, ce qui conduit à l'extinction de la fluorescence à cause du mécanisme de RNA silencing dirigé contre le transgène et l'inducteur, en l'absence de suppresseur : méthode de « patch test » développée par Voinnet *et al.*, 1998 ; voir **figure 37**). La forte fluorescence observée dans ces patchs suggère que P38 est un suppresseur fort qui agit localement (par opposition à une action ciblée sur le mouvement du silencing) au niveau de l'initiation ou de la maintenance du silencing. Par contre, la protéine virale est incapable de supprimer un silencing préétabli c'est-à-dire, de lever la maintenance. L'analyse combinée de ces données suggère que P38 agit au niveau de l'activité Dicer (Qu *et al.*, 2003).

Des études récentes confortent cette hypothèse. En 2006, Mérai *et al.* ont montré que la protéine P38 était capable de lier des RNA double brin *in vitro* sans spécificité de taille ou de séquence. De plus, l'interaction n'est pas spécifique des RNA double brin aux extrémités 3' sortantes (caractéristiques de l'activité RNase III de DICER) et il semble que la fixation de la protéine se localiserait plutôt à l'intérieur du RNA qu'au niveau des ses extrémités. Ainsi la protéine, *in vivo*, pourrait lier aussi bien les molécules double brin initiatrices du RNA silencing que les siRNA produits de DICER. Cet éclairage ainsi que les résultats obtenus par Qu *et al.*, suggèrent que P38 pourrait lier le RNA double brin, entrant ainsi en compétition avec les protéines Dicer en soustrayant leur substrat. Ainsi, la production des siRNA en serait affectée et la stabilité des RNA double brin, augmentée.

La même année, l'étude de Deleris *et al.* (2006) a permis d'approfondir l'élucidation des mécanismes moléculaires utilisés par P38 pour inhiber le RNA silencing chez *Arabidopsis thaliana*. Ils ont montré que malgré la présence de P38, l'infection par le TCV génère une accumulation de siRNA de 22 nucléotides, connus pour être les produits de DCL2. De plus, dans ces plantes infectées, les ta-siRNA dont la production dépend de DCL4 sont perdus. A

l'opposé, l'utilisation d'un virus mutant où la protéine P38 a été remplacée par la GFP permet l'accumulation de siRNA viraux de 21 nucléotides, produits de DCL4. Ces données suggèrent que chez *Arabidopsis thaliana*, DCL4 et DCL2 induisent le silencing du TCV, mais qu'en présence de P38, la protéine suppresseur serait capable d'inhiber l'activité DCL4, probablement par compétition avec ses substrats, favorisant l'activité redondante mais moins efficace de DCL2.

La capacité de cette protéine à inhiber le RNA silencing sans spécificité de séquence, comme d'ailleurs la plupart des suppresseurs, indique que l'utilisation de la protéine de capsid pour créer des plantes résistantes à l'infection virale (voir paragraphe I-3) n'est pas toujours une solution idéale. Dans le cas du TCV, elle aurait plus tendance à favoriser l'infection d'un bon nombre de virus.

II-3-2) Séquestration des sRNA : exemple de la protéine P19 des tombusvirus

La protéine P19 des tombusvirus intervient dans le mouvement à longue distance du virus et a d'abord été caractérisée, comme de nombreux suppresseurs, comme étant un « facteur de pathogénicité » (Scholthof *et al.*, 1995). La première mise en évidence de l'activité de suppression de la protéine P19 a été réalisée dans un contexte viral hétérologue utilisant le PVX (PVX-P19) (Voinnet *et al.*, 1999). Le suppresseur était alors considéré comme faible et principalement actif dans les veines mais incapable de lever un silencing préétabli dans les feuilles sources.

Depuis, il a été montré que la protéine P19 est capable de lier des sRNA double brin *in vitro* (Silhavy *et al.*, 2002) et *in vivo* (Chapman *et al.*, 2004 ; Dunoyer *et al.*, 2004) mais n'a qu'une faible affinité pour les sRNA simple brin ou les RNA double brin de grande taille ce qui suggère que sa fonction est d'inhiber le chargement du complexe RISC. La compréhension du mode d'action de cette protéine a bénéficié de l'élucidation de sa structure tridimensionnelle (Vargason *et al.* 2003 ; Ye *et al.*, 2003). La protéine agit sous forme d'homodimère et est capable de fixer de manière très spécifique des sRNA double brin de 21 nucléotides, à l'image d'un compas (voir **figure 38**). Plus précisément, la protéine fixe des RNA dont la partie double brin compte exactement 19nt, les extrémités 3' sortantes typiques des produits de DICER n'étant pas nécessaires pour l'interaction. Cette fonction lui permet de séquestrer les produits de DCL4 à l'origine du silencing antiviral, mais aussi les produits de DCL1, notamment les

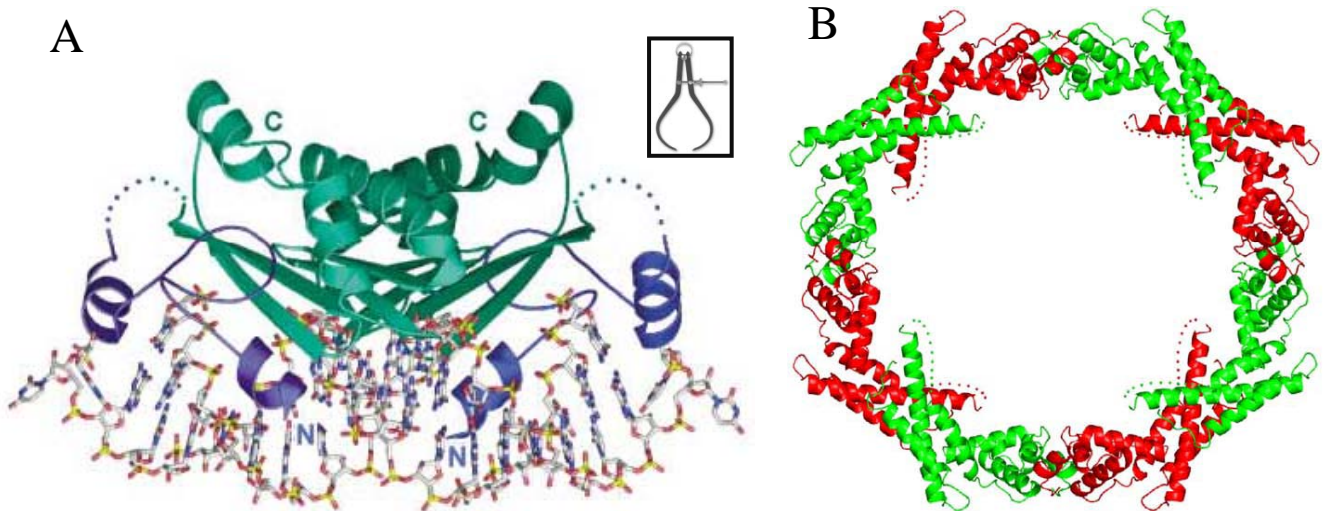


Figure 38 : Structure cristallographique de suppresseurs viraux liant les sRNA

A) Structure de la protéine P19 des tombusvirus par Vargason *et al.* (2003). La protéine est active sous forme de dimère (les extrémités N et C-terminales de chaque monomère sont indiquées sur la figure). Le complexe est capable de reconnaître et de fixer des petits RNA double brin d'exactly 19 nucléotides, indépendamment de l'existence d'extrémités 3' sortantes. Elle est ainsi comparée à un compas d'épaisseur (en encadré). B) Structure de la protéine P21 du BYV par Ye et Patel (2005). Cette protéine agit sous forme d'octamère, formant un anneau de protéines. Elle est capable de lier aussi bien les sRNA que des RNA simple ou double brin de taille supérieure.

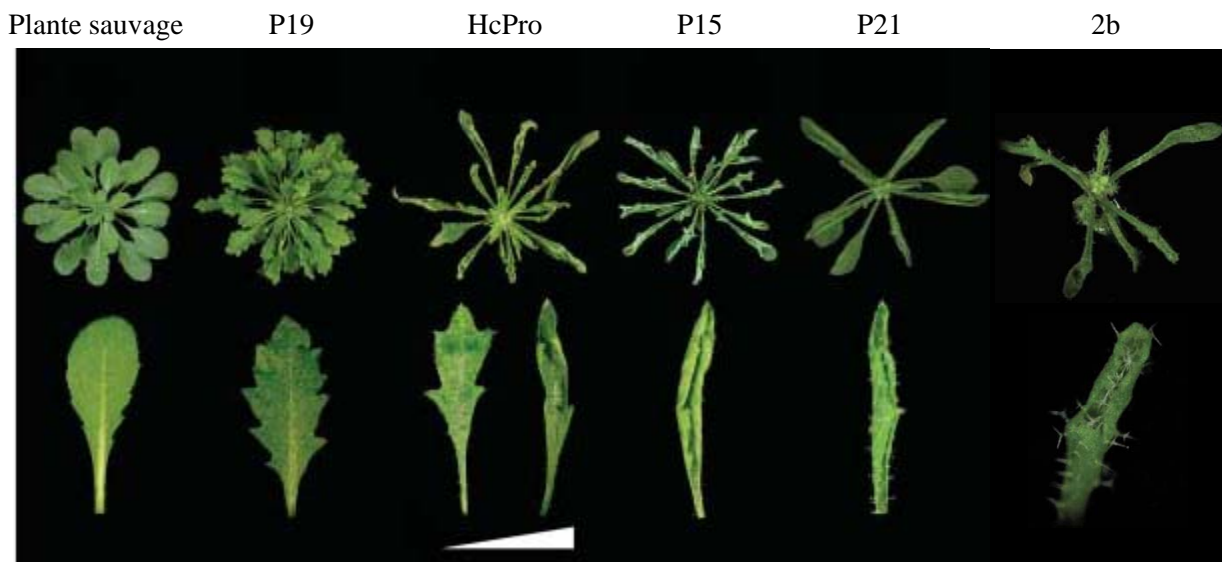


Figure 39: effet de l'expression constitutive de certains suppresseurs viraux sur des plants d'*Arabidopsis thaliana*

Les effets phénotypique de la transformation d'une plante par l'un de ces suppresseurs sont probablement dus à la perturbation de la voie des miRNA, importante dans les régulations du développement de la plante. En effet, P19, HcPro, P15 et P21 sont capables de fixer les sRNA, et donc potentiellement d'inhiber le chargement d'AGO1 par des miRNA. La protéine 2b, quant à elle, pourrait à la fois fixer les sRNA et inhiber l'activité d'AGO1 par une interaction directe avec la protéine. Les deux feuilles présentées pour HcPro proviennent de deux plantes exprimant peu (gauche) ou beaucoup (droite) de protéines. La sévérité de leur phénotype semble donc directement proportionnelle à la quantité de protéine. Adapté de Voinnet, 2005b et Zhang *et al.* (2006) pour la plante exprimant la protéine 2b.

miRNA (ce qui a pour conséquence de stabiliser les duplexes miRNA-miRNA*) (Chapman *et al.*, 2004 ; Dunoyer *et al.*, 2004). Cette propriété affectant une voie du silencing endogène est probablement à l'origine des désordres développementaux observés sur des plants d'*Arabidopsis thaliana* exprimant P19 sous dépendance d'un promoteur constitutif (voir **figure 39**).

Depuis ces travaux, de nombreux autres exemples de protéines virales capables de lier des petits RNA double brin ont été identifiés. On peut par exemple noter la protéine P21 du BYV (Beet Yellow Virus), la protéine HcPro des potyvirus ou encore la protéine P15 du PCV (Peanut Clump Virus) (Méraï *et al.*, 2006, Chapman *et al.*, 2004). Néanmoins, ces ressemblances dans le mode d'action ne reflètent pas des similarités de structure (voir **figure 38**) ce qui conforte l'hypothèse que les supprimeurs viraux ont évolué indépendamment d'une famille de virus à l'autre. Ces données supportent l'idée que la stratégie de séquestration des sRNA produits lors de l'infection virale est très répandue parmi les supprimeurs viraux, mais il est probablement rare que cette fonction soit la seule portée par la protéine virale, la plupart ayant probablement des fonctions associées, comme l'interaction avec les facteurs cellulaires produisant ou utilisant ces sRNA.

II-3-3) Inhibition de l'activité d'Argonaute : exemple de la protéine 2b du CMV

Si la protéine 2b du CMV est l'un des premiers supprimeurs à avoir été identifié, elle a d'abord été considérée comme un suppresseur faible ayant peu d'impact sur les voies endogènes du RNA silencing (Brigneti *et al.*, 1998). En 2006, Zhang *et al.*, désireux de comprendre le mode d'action de la protéine, ont préféré utiliser la protéine 2b issue d'une souche très virulente du CMV (contrairement à la souche modérée utilisée lors de la première mise en évidence de l'activité de suppresseur de la protéine). Dans des plants d'*Arabidopsis thaliana* exprimant cette protéine (voir **figure 39**), on observe une suraccumulation de plusieurs transcrits connus pour être des cibles de miRNA. Le niveau d'expression des miRNA impliqués dans la régulation de ces transcrits n'est pas altéré, mais le brin miRNA* est stabilisé, ce qui suggère que l'activité de 2b se situe en aval de l'activité Dicer, par inhibition du clivage induit par les miRNA. L'inactivation de la voie des miRNA a également été confirmée en contexte viral. Dans cette étude, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence d'interaction entre la protéine 2b et des RNA, simple ou double brin. Par contre, des expériences de co-

immunoprécipitation ont démontré que 2b interagit avec AGO1 *in vivo*. Cette interaction est spécifique et prendrait place au niveau du domaine PAZ d'AGO1. Ainsi, le mode d'action proposé par Zhang *et al.* (2006) serait que la protéine virale bloquerait directement l'activité slicer de AGO1 en interagissant avec son domaine PAZ. Comme AGO1 est l'effecteur du complexe RISC, à la fois dans la voie de silencing antiviral et dans la voie des miRNA, 2b permettrait de préserver l'intégrité du génome viral tout en perturbant les voies du silencing endogène de la plante. Cet effet sur une voie du RNA silencing endogène pourrait être non désiré par le virus et consister en un « sous-produit » inéluctable pendant l'infection virale, mais pourrait également servir au virus, par exemple en restaurant l'expression d'un facteur inhibant la mise en place de défenses antivirales, habituellement régulée par un miRNA.

Une étude ultérieure (Diaz-Pendon *et al.*, 2007) indique qu'en contexte viral, cette même protéine induit une forte diminution de l'accumulation des siRNA viraux. Ceci n'est pas incompatible avec les conclusions de Zhang *et al.* puisque cette diminution peut être due à l'inhibition de la production de siRNA secondaires qui fait suite à la perte de l'activité d'AGO1. De plus, Diaz-Pendon *et al.* (2007) montrent qu'en absence de 2b, les siRNA produits sont majoritairement dépendant d'une activité RDR, activité également impliquée en aval d'AGO1 lors du mécanisme de transitivity.

Ce modèle a été remis en cause récemment par Goto *et al.* (2007) qui démontrent que la protéine 2b du CMV est capable de fixer des RNA et que cette capacité est nécessaire à son activité de suppression. Néanmoins, la souche utilisée dans cette étude est différente de celle employée par Zhang *et al.* (2006) et Diaz-Pendon *et al.* (2007). De plus, la fixation de cette protéine aux RNA n'a été démontrée qu'*in vitro* et l'introduction d'une mutation dans la protéine permettant à la fois d'inhiber la fixation aux RNA et l'activité de suppression abolit également la localisation nucléaire de la protéine qui pourrait être nécessaire à son action sur AGO1. La réalité biologique de cette interaction reste donc à démontrer mais il n'est pas impossible que les protéines 2b de deux souches distinctes puissent agir selon des modes différents.

II-3-4) Interférence avec l'activité RDR ? : exemple de la protéine V2 du TYLCV

Le TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) appartient à la famille des *Geminiviridae*, une des rares familles de virus à DNA infectant les plantes. L'isolat le plus étudié jusqu'à présent provient de Chine. Sur ce virus, la protéine transactivatrice C2 porte une activité de suppresseur de RNA silencing (Van Wezel *et al.*, 2002). Chez l'isolat israélien utilisé par Zrachya *et al.* (2007) la protéine C2 ne semble pas avoir d'activité de suppresseur, tout du moins, dans les phases précoces du silencing testées dans cette étude. Par contre, une telle aptitude a pu être montrée pour la protéine V2 de l'isolat israélien. L'activité de V2 prendrait place en aval de l'activité Dicer puisque la présence de la protéine n'affecte pas la production de siRNA dans un système où l'on induit artificiellement le silencing de la GFP, mais le transcrite exprimant la protéine fluorescente est stable. Un premier pas vers l'élucidation du mode d'action de la protéine a été la démonstration de l'interaction entre V2 et l'homologue de SGS3 chez la tomate (Glick *et al.*, 2008). Des expériences de mutagenèse dirigée suggèrent que cette interaction est directement liée à la capacité de la protéine virale à inhiber la RNA silencing. Comme SGS3 a un rôle dans la stabilisation des matrices de RDR6, cette donnée suggère que V2 pourrait inhiber la transitivity et donc l'amplification de la synthèse de siRNA. Néanmoins, cette hypothèse n'est pas en accord avec celle de Levy *et al.* (2008) qui suggèrent que V2 agit à un stade très précoce du RNA silencing, abolissant la synthèse de siRNA primaires en inhibant l'action de RDR sur les transcrite viraux et donc la production des molécules double brin initiateurs du RNA silencing. La compréhension du mode d'action de V2 nécessite donc d'autres expériences, notamment, l'utilisation d'un système de RNA silencing permettant la distinction entre siRNA primaires et secondaires afin de prouver que l'interaction avec SGS3 est bien à l'origine d'une inhibition de la synthèse de RNA double brin RDR-dépendante. Malgré cela, V2 constitue un des rares exemples de protéines suppresseurs (avec la protéine 2b du CMV) capable d'interagir directement avec un composant protéique du RNA silencing.

II-3-5) Inhibition du mouvement du RNA silencing : exemple de la protéine P25 du PVX

La protéine P25 est une des trois protéines composant le « triple gene block » chez les potexvirus. Elle est donc impliquée dans le mouvement du virus à travers la plante (Verchot *et al.*, 1998). P25 est considérée comme un suppresseur faible ; il a d'ailleurs été longtemps

supposé que les potexvirus ne possédaient aucune protéine suppresseur. En effet, l'infection par le PVX est incapable de lever un silencing préétabli (Voinnet *et al.*, 2000). La mise en évidence de l'activité de suppresseur de la protéine P25 a été réalisée grâce à l'utilisation de plantes exprimant le transgène 35S-GFP, infectée par le PVX-GF (virus dans lequel on introduit une protion 5' du gène de la GFP). Lorsque sur ces plantes infectées on apporte un greffon d'une plante exprimant à la fois le transgène GFP et une protéine Rx responsable de la résistance contre le virus, l'infection virale est restreinte au porte-greffe. De manière surprenante, on observe également une restriction au porte-greffe du RNA silencing dirigé contre la GFP alors qu'en remplaçant le virus par un inducteur du silencing 35S-GFP, la même expérience conduit à l'extinction de la GFP dans le greffon, résultat du mouvement systémique du RNA silencing (Voinnet *et al.*, 2000). L'utilisation de mutants de délétion du PVX a permis de montrer que la protéine P25 est responsable de ce phénotype. S'il semble clair, d'après ces expériences, que la protéine P25 inhibe la diffusion du signal de silencing systémique, le mode d'action de cette protéine reste à découvrir.

En 2005, Bayne *et al.* ont pu montrer qu'exprimée sous la dépendance du promoteur 35S dans des expériences de patchs tests, la protéine P25 pouvait inhiber le RNA silencing « cellule-autonome ». La protéine virale n'empêche pas la production de siRNA dérivés d'un RNA en tige-boucle (IR-PTGS) mais supprime ceux synthétisés dans la voie du S-PTGS. Dans les deux cas, pourtant, le silencing du transgène cible est inhibé ce qui permet aux auteurs de suggérer que l'action de P25 serait plus d'interférer avec l'action du complexe effecteur RISC qu'avec l'activité d'une RDR (puisque l'établissement de l'IR-PTGS est indépendant de cette protéine). La compréhension du mécanisme d'action de la protéine P25 du PVX nécessitera de nouvelles études, notamment d'interaction avec des RNA ou des protéines impliquées dans le RNA silencing.

La compréhension des mécanismes d'action des ces puissants outils viraux utilisés pour contourner les défenses des plantes a déjà fortement contribué à décrypter les différentes voies du RNA silencing. De plus, mieux connaître ces mécanismes de suppression permet de concevoir de nouvelles approches de lutte contre les virus. L'objectif de ma thèse a été de contribuer à l'élucidation du mode d'action du suppresseur encodé par les polerovirus, virus modèles au laboratoire, la protéine P0.

A

| virus | BMYV | CABYV | PLRV | CYDV-RPV |
|-------|------|-------|------|----------|
| BWYV | 25 | 29 | 18 | 22 |
| BMYV | | 42 | 19 | 22 |
| CABYV | | | 15 | 18 |
| PLRV | | | | 27 |

B

```

1                                     70
BMYV      M QFQLKTNSTF CSLNRPLTAT ERVCNTAYFL THHLPL-ITF E-NENCIRSL LAALPLLL-S
CABYV      M QIESVQQQLT FRPTRASTE DRRLNTAHFL INHVFF-WAQ NGSETLFRLF LARLPLLI-S
BWYV      MQLAHDNFH TLQVKKVRF LHPQEVFLLA GLLLNKQFV RAIKER-MNV FKIDVFLRSL LYQLPFHL-G
PLRV      MIVLTQSGTL LFDQRFKLSK FLFVVIATGF PL-----LLQ QASLIYGNH EQIYRICRSF LYVLP LLNCK
CYDV      MFIAQPCGRV LVFDVASRTP SFFTRYSVEL SLRVLDPFPT RAVTDFRYTQ NEIDLFCVSL GFLLPILLTG
Consensus m.....g.. l..... ..f.r..... .l.n...f. .a.....y.. ..i...crsl l..LPlll..

71                                     140
BMYV      KQLDPGSLVY TPGKRQSLRL ARFYNYCGTA LPS----- --TRNVDLRV PPRKDVKRFY LARNSGRNLG
CABYV      EQLS-GDYVY TPGASKRIIL ARFHRHCGAP LPS----- --SSAVDLRL PTKDVARFF LARHYSRIMG
BWYV      SCFHDAPREL IPATEPELCA WFSLQTYAP AST----- --SGRVNLHV PGTKTSRRI IQRSFASDFS
PLRV      RGRISTSGLQ LPRHLHYECL EWGLLCGTHP AIQIVG---- -PTIVIKLDD PTAAAYRSE LLRVSSSYI
CYDV      ESYSWRGHLV LPLSYTELLV RWGLAVGYFP TFSADGDIRQ NPELRIDLST MSTRSFYEQF LLRYNTSGLA
Consensus .....l. lP.....l.l .wgl..g..p .s..... ..!dL.. p.tk..yr.. llR...s...

141                                     210
BMYV      ERLQRRGEIF FHGEAEFKKF LSVWCAESER KLRESPKINI KMDRIIMVLR DMGTLHLRLV FVEELYHRNT
CABYV      ERLQRNQTSL FRGYAEFAKF INWCVSSVSR RLRESAPRDF SSNRVFEVLS HLGDSLRLDLV FISGVHNRDA
BWYV      EKLKRFPECL FVSLELFQRL LSTWTKDVER RIFFSCREIP LGSDTLMELA NLGEFLRVMV VGEQFHNSRL
PLRV      QNAAGLSNGW GHDMEAFVRN AICLLELRER SIPQSGLRDL MGNYQHVLRS LLDACKVDHF VPLDFQHRSL
CYDV      KAIIGQQECF QSGMESFKRF LHYRLTCFES CLPRPRWESP LAPGPYLDRA FKATLLGRMV GHNQLLFTGL
Consensus e.l.r...e.. f.gme.F.rf l..wl...er .lp.s..... .....l.r. .lg..l...v .....r.l

211                                     260
BMYV      YAELAFCVHH LFGEARGMDF WRLANFPGKW FICSHETYLE NSFIQKELRL
CABYV      YARVALHVHR IYGEDGGLDF WRLANLPSKS WPFNDARYLE GSVVQKILQR
BWYV      LSRLAVHCYK IYGEDGFISF WRIANLDHFD CFLTPEEILF SSSVYTEMFV
PLRV      MLNFARLYNQ LDLQGRAKSF RALTGF--- VYVPSEDYLE GSFLQKELQE
CYDV      SSDITRYYNE LVVEGVPVAF WDAAGIT--- LHHAGEEYFS NSYIQKILQ
Consensus ....ar.yn. l.g#g....F wrlan.p... .....e.yle .S...qke$g.

```

Figure I-1 : la séquence de la protéine P0 n'est pas conservée au sein du genre polerovirus

A) Le tableau présente les pourcentages d'identités entre deux protéines P0 appartenant à deux virus différents (données issues de Mayo et Ziegler-Graff, 1996). B) Alignement multiple des séquences comparées dans le tableau A). En rouge, les acides aminés conservés à plus de 90% , en bleu, ceux conservés à plus de 50%. Alignement réalisé sur <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>.

Résultats et Discussion

Chapitre I :

Etude du mode d'action de la protéine P0 des polerovirus

A) Introduction à la protéine P0 des polerovirus

1) Généralités sur la protéine P0

Parmi les protéines encodées par les polerovirus, P0 est, de loin, la moins conservée du genre (voir **figure I-1**). Il est donc difficile d'attribuer une fonction à la protéine par la simple analyse de sa séquence (pour revue, voir Mayo et Ziegler-Graff, 1996 ; Mutterer *et al.*, 1999b). On peut néanmoins noter que la partie N-terminale de la protéine est hydrophobe et que la protéine P0 du PLRV présente, dans cette partie de la protéine, des similitudes avec des domaines protéiques associés aux membranes (Mayo *et al.*, 1989).

La protéine P0 du BWYV n'est pas essentielle à la réplication virale dans des protoplastes mais lorsqu'elle est mutée, l'accumulation de RNA viraux est réduite. De même, *in planta*, l'absence de l'expression de la protéine P0 induit une diminution significative du titre viral (Ziegler-Graff *et al.*, 1996) ce qui suggère que P0 pourrait agir comme facteur non essentiel assistant la réplication virale. Cependant, au moment où ces expériences ont été réalisées, il n'était pas exclu que les mutations introduites afin d'abolir l'expression de P0 puissent entraver la traduction de l'ORF1 codant pour la réplicase virale, puisque leurs codons initiateurs respectifs sont relativement proches (voir introduction, paragraphe I-5-2/3). Il était également envisageable que ces modifications altèrent des régions importantes du RNA

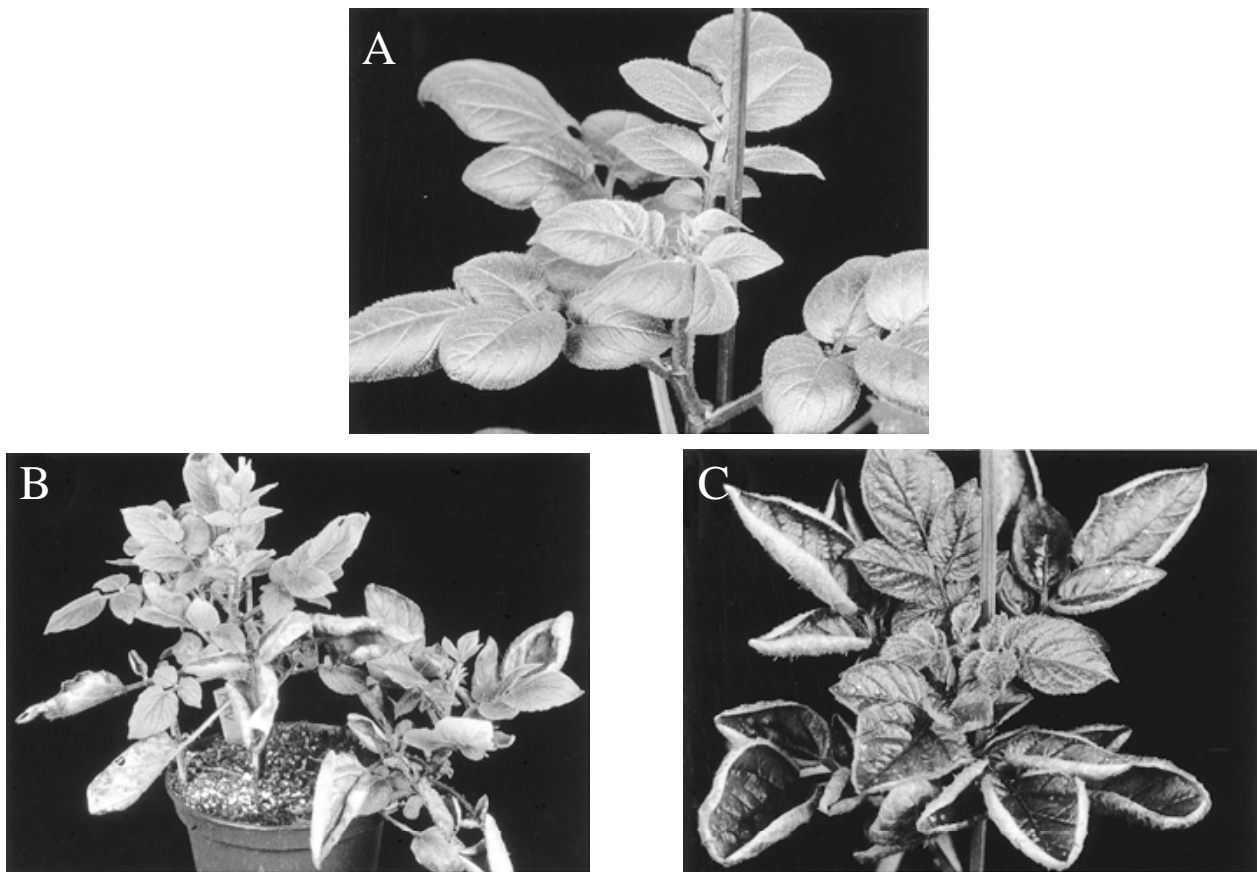


Figure I-2 : effet de l'expression constitutive de P0 dans des plants de pomme de terre

A) Plante sauvage saine. B) plante infectée par le PLRV. C) plante exprimant la protéine P0^{PL} sous dépendance du promoteurs 35S. Le phénotype de cette plante est comparable aux symptômes induits lors de l'infection.

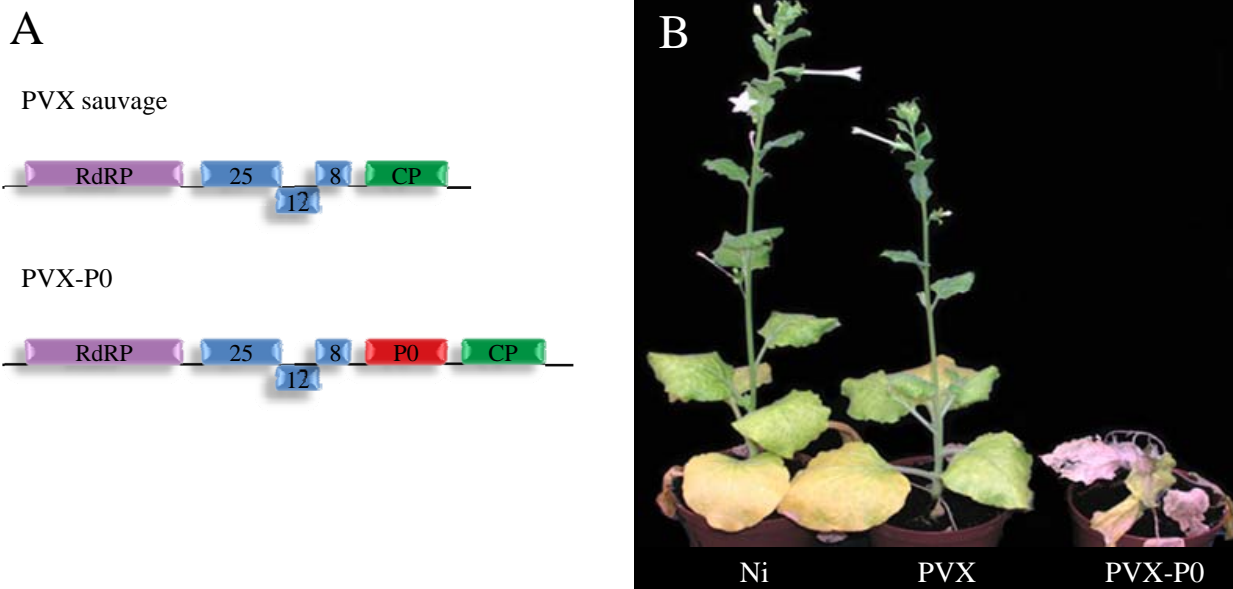


Figure I-3 : effet de l'expression de P0 par un vecteur viral hétérologue (PVX)

A) Organisation génétique du PVX et du virus recombinant PVX-P0. Afin de permettre l'expression de la protéine P0, une copie de la séquence promotrice de la synthèse du RNA subgénomique permettant l'expression de la CP a été introduite en amont du gène codant pour P0. B) Symptômes provoqués par l'infection par le PVX et le PVX-P0 en comparaison avec un plant de *N. benthamiana* sain (Ni pour non infectée). Photo réalisée au laboratoire par Maghsoud Pazhouhandeh. RdRP : réplicase virale ; 25, 12 et 8 : protéines du « triple gene block » (nécessaires au mouvement intercellulaire du virus) ; CP : protéine de capside.

génomique, provoquant une déstabilisation de la molécule ou diminuant l'efficacité d'éventuels signaux importants pour la réplication.

Le même type d'expériences a été réalisé pour le PLRV (Sadowy *et al.*, 2001). Cette fois, aucune réplication virale n'a pu être détectée suite à l'infection de disques foliaires issus de plants de pommes de terre par le virus muté dans l'ORF0. La traduction *in vitro* des ORF1 et 2 à partir de transcrits issus du clone utilisé pour l'infection montre que ce dernier n'est pas affecté dans l'expression de ces protéines virales ; mais il n'est pas exclu que les mutations perturbent sa réplication.

Par ailleurs, il a été démontré que la protéine P0 du BWYV n'est nécessaire ni à l'encapsidation du génome viral (Reutenauer *et al.*, 1993), ni à l'infection systémique de la plante hôte ou encore, à la transmission par le puceron vecteur (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). De plus, même si l'ORF0 est localisé à l'extrémité 5' du génome viral et devrait donc, en théorie, être exprimé en premier et en grande quantité, la protéine P0 n'a jamais été détectée en contexte viral dans des plantes ou même dans des protoplastes. Cette très faible expression peut s'expliquer par un contexte nucléotidique de l'AUG initiateur de la protéine P0 particulièrement défavorable à l'initiation de la traduction (Pfeffer *et al.*, 2002).

Il semble toutefois très peu probable que des virus, habituellement prompts à se débarrasser de tout élément superflu, aient conservé un ORF codant pour une protéine de près de 30 kDa, si celle-ci ne possède pas d'importantes fonctions.

2) La protéine P0 est un « facteur de pathogénicité »

C'est l'expression de la protéine P0 placée en dehors de son contexte viral qui a permis de nombreuses avancées dans la compréhension de sa fonction. En 1997, van der Wilk *et al.* ont transformé des plants de pommes de terre (cv. *Désirée*) afin qu'ils synthétisent la protéine P0 du PLRV (P0^{PL}) sous dépendance d'un promoteur constitutif (le promoteur 35S du CaMV). L'expression de la protéine dans la plante (bien que non détecté par western blot) provoque l'enroulement et le jaunissement des feuilles, stimule la production d'anthocyanes et induit un retard de croissance sévère (voir **figure I-2**). De plus, les feuilles s'épaississent et deviennent cassantes et les racines se développent difficilement. Ces anomalies phénotypiques sont similaires aux symptômes observés suite à l'infection par le PLRV et suggèrent que P0 est capable d'induire ces effets lors d'une infection virale, non seulement lorsqu'elle est exprimée par un poliovirus, mais également par un virus sans lien phylogénétique.

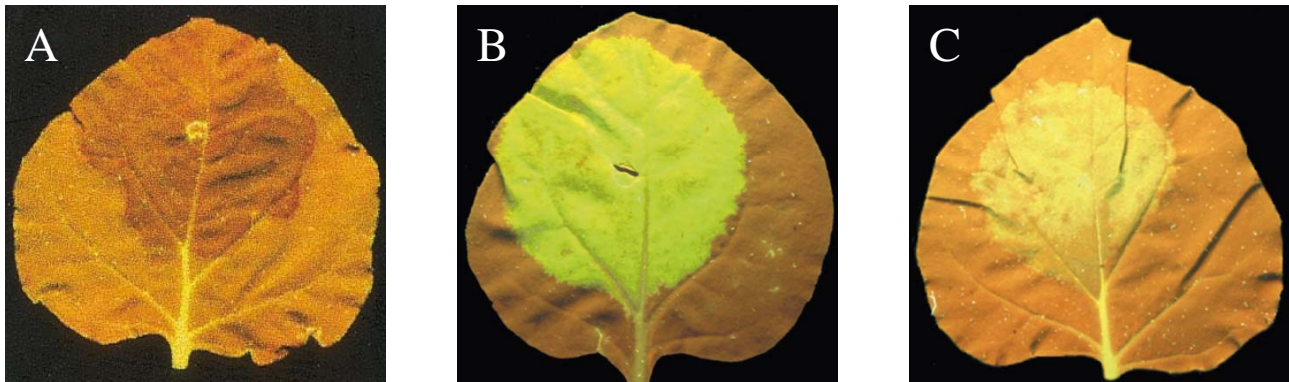


Figure I-4 : mise en évidence de l'activité de suppresseur de RNA silencing de la protéine P0 du BWYV

A) co-infiltration d'agrobactéries contenant un plasmide pBinGFP et d'agrobactéries portant un plasmide pBinØ sur des feuilles de *N. benthamiana* 16C. La fluorescence rouge indique le silencing du transcrite de la GFP. B) co-infiltration de pBinGFP et pBinP0^{BW}. La suraccumulation du transcrite GFP grâce à l'inhibition du silencing par P0^{BW} se visualise par la fluorescence verte intense. C) co-infiltration de pBinGFP et pBinBWYV. La fluorescence verte est moins forte qu'en B), la suppression de silencing semble donc moins efficace en présence du virus complet. Adapté de Pfeffer *et al.*, 2002.

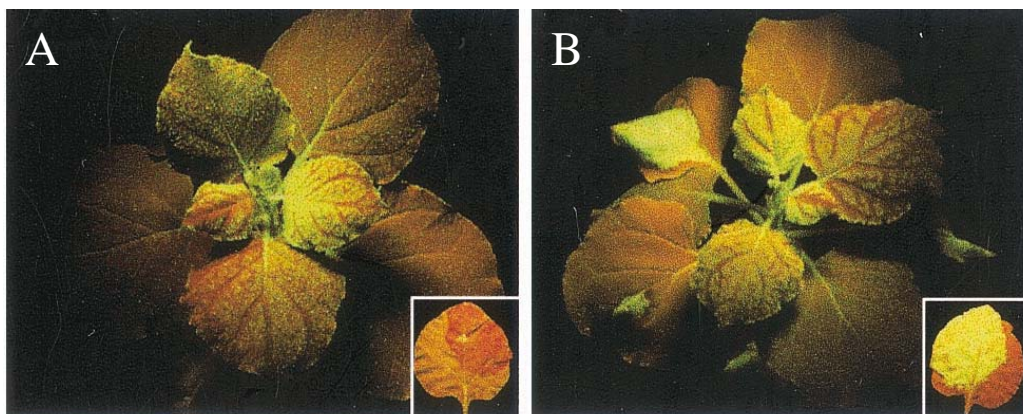


Figure I-5 : mouvement systémique du RNA silencing

A) dans une plante agro-infiltrée par pBinGFP et pBinØ et B) dans une plante agro-infiltrée par pBinGFP et pBinP0^{BW}. La protéine P0 n'a pas la capacité d'inhiber le mouvement systémique du silencing dirigé contre la GFP et représenté par la coloration rouge des nervures des feuilles apicales (Pfeffer *et al.*, 2002).

Pour tester cette hypothèse, Pfeffer *et al.* (2002) ont introduit dans le génome du PVX, le gène codant pour la protéine P0 du BWYV (P0^{BW}). L'infection de plants de *N. benthamiana* par le virus recombinant PVX-P0^{BW} provoque une forte aggravation des symptômes, en comparaison avec une plante infectée par le virus PVX sauvage (voir **figure I-3**). Les faibles lésions chlorotiques et la mosaïque modérée induites lors d'une infection par le PVX deviennent des lésions nécrotiques sévères allant jusqu'à la mort de la plante en présence de P0. La protéine P0^{BW} peut donc être considérée comme un « facteur de pathogénicité » puisqu'elle augmente le pouvoir pathogène d'un virus indépendamment des autres protéines du BWYV.

3) La protéine P0 est un suppresseur de RNA silencing

De nombreuses protéines virales identifiées comme facteurs de pathogénicité se sont révélées être des suppresseurs de RNA silencing. Ce mécanisme étant impliqué dans la défense antivirale de la plante mais aussi dans des voies de régulations endogènes, la perturbation de ces dernières peut provoquer des altérations phénotypiques reconnus alors comme des « symptômes ». Afin de tester l'activité potentielle de suppresseur de RNA silencing portée par P0, Pfeffer *et al.* (2002), au laboratoire, ont utilisé la méthode de « patch test » (décrite dans l'introduction, deuxième partie, en **figure 37**). Pour faciliter la lecture, j'utiliserai le nom donné au vecteur binaire pour parler d'« agrobactéries contenant le plasmide binaire codant pour... ».

L'agro-infiltration d'un plasmide contenant la construction 35S-GFP (pBinGFP) et d'un plasmide sans insert (pBinØ) sur des plants de *N. benthamiana* 16C (qui expriment constitutivement la protéine GFP, Ruiz *et al.*, 1998) induit le silencing du transcrit de la GFP. La fluorescence verte de la plante sous ultraviolet laisse place à une fluorescence rouge due à la chlorophylle dans la zone infiltrée (voir **figure I-4-A**). Lorsqu'un vecteur binaire portant la construction 35S-P0^{BW} (pBinP0^{BW}) est co-infiltré avec le plasmide pBinGFP, la fluorescence verte persiste et s'intensifie, en raison de la stabilisation du message de la GFP, indiquant que la protéine P0^{BW} est capable de supprimer le silencing local (voir **figure I-4-B**). En revanche, deux semaines après l'infiltration, la mise en place du RNA silencing systémique du transgène GFP s'opère, en présence ou en absence de P0 au site d'induction (voir **figure I-5**). Cette observation permet d'exclure la possibilité que P0 interfère avec le mouvement à longue distance du RNA silencing.

Dans cette étude, les propriétés de suppresseurs de RNA silencing ont également pu être mises en évidence pour des protéines P0 d'autres poliovirus (CABYV et PLRV, avec une

efficacité moindre dans ce système pour P0^{PL}), ce qui indique que malgré leur forte hétérogénéité de séquence, leur fonction semble être conservée.

La capacité d'inhibition du silencing a aussi été testée pour le virus BWYV. La **figure I-4-C** montre que, bien que la fluorescence verte de la GFP soit nettement visible, son intensité est moindre que lorsque l'expérience est réalisée avec la protéine P0 hors contexte viral. Comme pour les essais antérieurs, Pfeffer *et al.* (2002) n'ont pas réussi à détecter par western blot la protéine P0 exprimée à partir du génome viral ; les faibles quantités de protéines produites pourraient donc expliquer l'efficacité réduite du virus pour la suppression du RNA silencing. Afin d'étayer cette hypothèse, des expériences de mutagenèse dirigée ont été conduites sur le cDNA codant pour le génome viral complet, dans le but de placer l'AUG initiateur de l'ORF0 dans un contexte optimal à l'initiation de la traduction. Le virus mutant ainsi obtenu (BWYV_{5'opt}) permet une meilleure stabilité du transcrit GFP dans la zone infiltrée. Néanmoins, la protéine P0 reste indétectable, la quantité produite est donc toujours inférieure à celle obtenue grâce à pBinP0^{BW}.

Une observation intéressante réalisée lors de cette expérience est que dans la zone infiltrée, l'accumulation du RNA viral est inférieure avec le virus BWYV_{5'opt} qu'avec le virus sauvage. Par contre, cette différence disparaît dans les feuilles systémiques. Ces données, ainsi qu'une analyse par séquençage de la descendance du virus BWYV_{5'opt} montrent qu'un excès de protéine P0 est délétère à l'amplification virale et qu'au fil des cycles de réplication, le virus sélectionne les clones ne produisant que peu, voire pas de protéine P0. Une explication à ce phénomène pourrait être que la surproduction de P0 se fait au détriment de l'expression des protéines P1 et P1-P2, responsables de la réplication virale et situées en aval de P0 sur le génome viral (voir introduction, paragraphe I-5-2), une sélection s'opérerait donc en faveur du virus le plus compétitif sur le plan répliatif. Il est également possible que la présence de fortes quantités de P0 perturbe le métabolisme de la cellule, affectant directement ou indirectement des facteurs de l'hôte nécessaires à la réplication du parasite obligatoire qu'est le virus.

4) La protéine P0 est une protéine à F-box

Afin de mieux comprendre le mode d'action de la protéine P0, des études destinées à identifier des partenaires cellulaires de la protéine virale ont été entreprises. Les virus utilisés au laboratoire (CABYV et BWYV) infectent la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ce qui a rendu possible un criblage en système double hybride de levure, utilisant comme proie, la

protéine P0 et comme appât, une banque de cDNA d'*Arabidopsis*. Un seul candidat, ASK2 (voir ci-dessous), a pu être identifié lors du crible réalisé avec la protéine P0 du CABYV (P0^{CA}). Néanmoins, des expériences ultérieures utilisant la même technique ont permis de mettre en évidence l'interaction des deux protéines P0 avec ASK2 mais aussi avec ASK1 (un homologue très proche d'ASK2). Ces interactions ont pu être confirmées *in vitro* par GST-pull down, et *in vivo*, par la technique de BiFC (bimolecular fluorescence complementation) (Pazhouhandeh *et al.*, 2006).

4-1) les protéines ASK et la voie « ubiquitine-protéasome »

Il existe 21 gènes *ASK* sur le génome d'*Arabidopsis thaliana*, les protéines codées par les gènes *ASK1* et *ASK2* étant les représentants les plus abondants (Zhao *et al.*, 2003). Les protéines ASK (pour *Arabidopsis SKP1-like protein*) sont les orthologues de la protéine SKP1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette protéine est un composant du complexe SFC (SKP1, F-box protein, Cullin1), un type d'ubiquitine ligase (ou E3) et joue donc un rôle dans la voie ubiquitine-protéasome.

a) La voie de dégradation par le protéasome dépendante de l'ubiquitine

Cette voie, utilisée pour induire la dégradation spécifique de protéines ciblées, fait intervenir de nombreuses enzymes (pour revue, voir Kornitzer et Ciechanover, 2000 ; Smalle et Vierstra, 2004).

Dans un premier temps, une enzyme dite d'activation, E1, réalise une liaison thioester avec une petite protéine de 74 acides aminés, l'ubiquitine, grâce à l'énergie apportée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Chez la levure, où la voie ubiquitine-protéasome est bien caractérisée, un seul gène codant pour une enzyme d'activation de l'ubiquitine est recensé et dans la plupart des organismes étudiés, ce type d'enzyme est généralement codé par un très petit nombre de gènes (deux gènes chez *Arabidopsis thaliana*).

L'ubiquitine activée est transférée par trans-estérification sur une cystéine d'une enzyme E2, l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. Chez la levure, on dénombre 11 gènes codant pour des enzymes E2 ; il en existe 37 chez *Arabidopsis thaliana*.

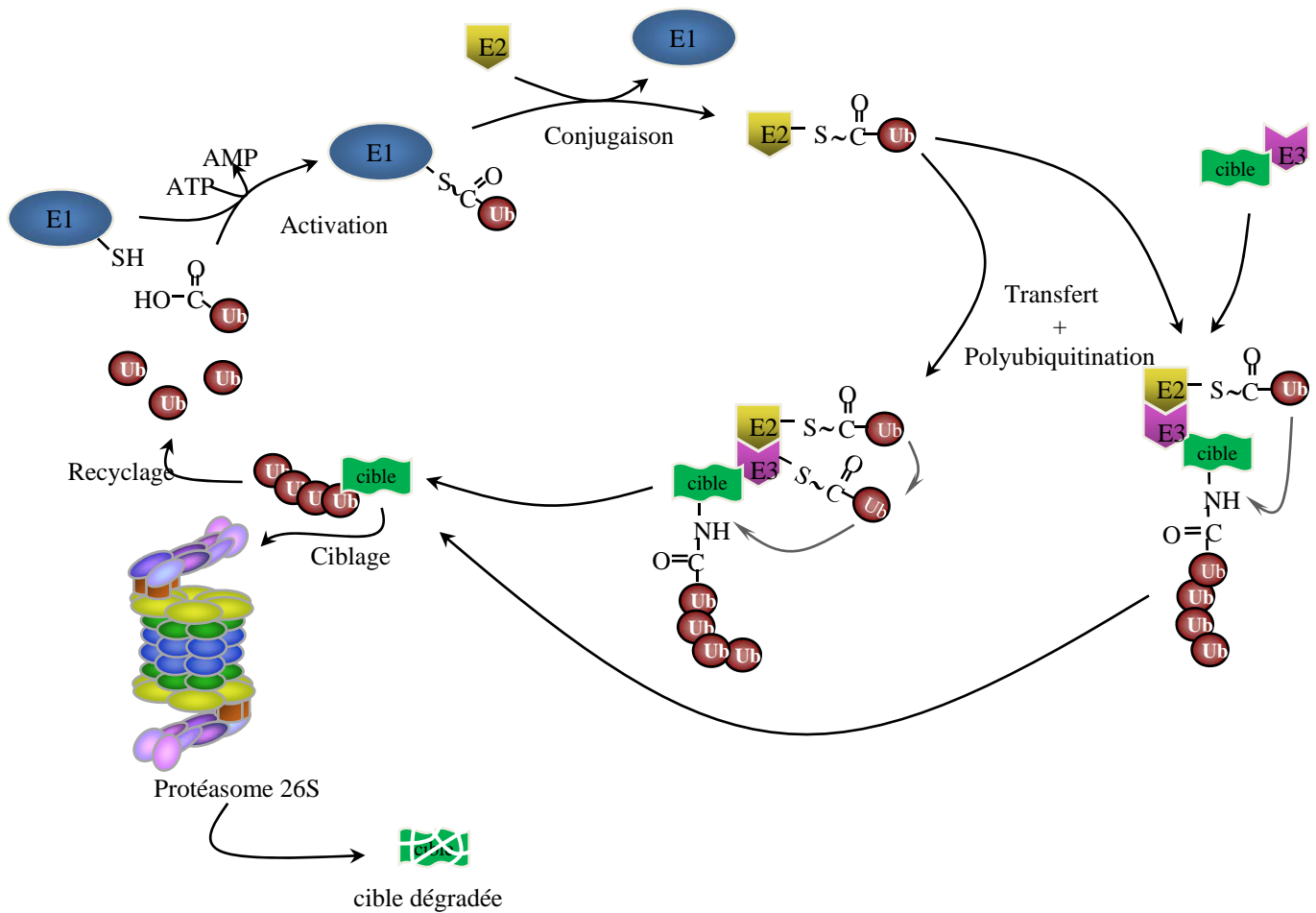


Figure I-6 : la voie ubiquitine-protéasome

E1 est l'enzyme activatrice de l'ubiquitine, E2 est l'enzyme de conjugaison et E3, l'ubiquitine ligase.

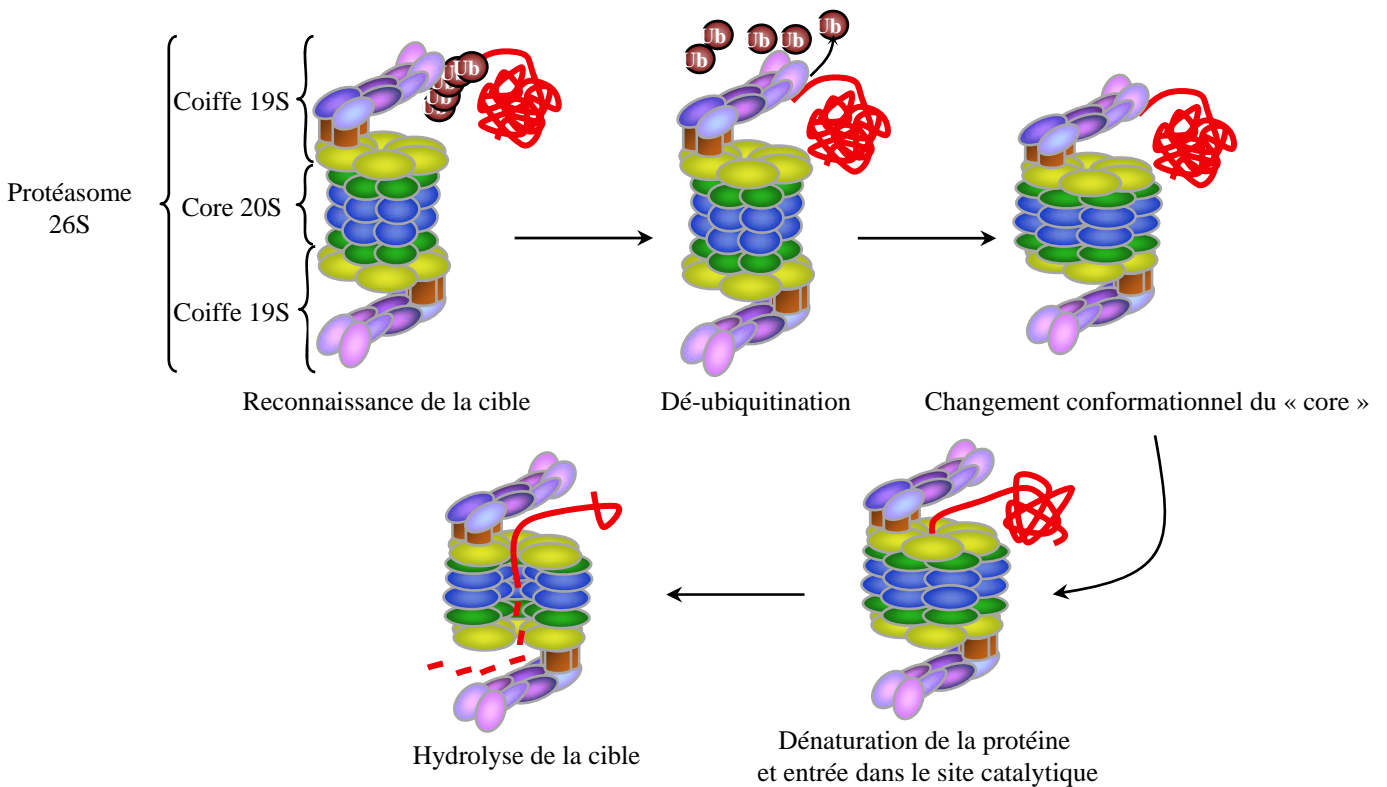


Figure I-7 : la protéolyse par le protéasome 26S

En interagissant avec E3, l'ubiquitine ligase, l'enzyme E2 permet le transfert (direct ou indirect selon la nature de l'enzyme E3) de l'ubiquitine sur une lysine de la protéine cible recrutée par E3, ce qui conduit à la formation d'une liaison covalente entre la chaîne latérale de la lysine et l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine (voir **figure I-6**). Lorsqu'une seule molécule d'ubiquitine est liée à la cible, on parle de mono-ubiquitination. Ce type de modification peut avoir pour conséquence l'adressage de la protéine vers le lysosome ou la vacuole.

Dans la plupart des cas, une répétition du processus d'ubiquitination permet la formation d'une chaîne d'ubiquitine, chaque nouvelle molécule se liant par son extrémité C-terminale sur une des sept lysines de l'ubiquitine en bout de chaîne. La conséquence de cette poly-ubiquitination dépend de la lysine utilisée pour la formation de la chaîne. Une chaîne utilisant la lysine 48 et formée d'au moins quatre molécules d'ubiquitine constitue un marquage pour le ciblage vers le protéasome 26S (voir **figure I-6**). Une chaîne dont les liaisons sont localisées sur la lysine 63 de l'ubiquitine, par exemple, ne constitue pas un signal de protéolyse dépendante du protéasome, mais est impliquée dans d'autres processus comme la réparation du DNA après réplication. Plus généralement, l'adjonction d'une molécule d'ubiquitine ou d'une chaîne d'ubiquitine utilisant une autre lysine que la lysine 48 remanie la fonction de la protéine ubiquitinée, soit en changeant sa localisation, soit en modifiant ses propriétés d'interaction avec d'autres protéines cellulaires.

Le protéasome 26S est un complexe multi-protéique de 1 500 kDa. Il peut être subdivisé en deux parties : une partie cylindrique « core » 20S, prolongé de part et d'autre par une coiffe 19S. La coiffe permettrait la reconnaissance des protéines ubiquitinées et le recyclage des molécules d'ubiquitine. Elle serait également à l'origine de la dénaturation de la protéine ciblée, étape essentielle pour l'entrée dans la cavité formée par le complexe « core ». Un changement conformationnel du core est nécessaire au passage de la chaîne polypeptidique.

L'activité protéolytique est portée par certaines sous-unités du core. Le complexe 20S présente, chez les eucaryotes, trois activités protéolytiques majeures : une activité de type chymotrypsine qui clive la chaîne polypeptidique cible après les acides aminés hydrophobes, une activité de type trypsine qui coupe la chaîne après les acides aminés basiques et enfin, une hydrolyse « peptidylglutamyl » (PGPH), ou activité capsase, intervenant après les acides aminés acides chargés négativement. Il résulte de ces activités des peptides de sept à neuf acides aminés (voir **figure I-7**).

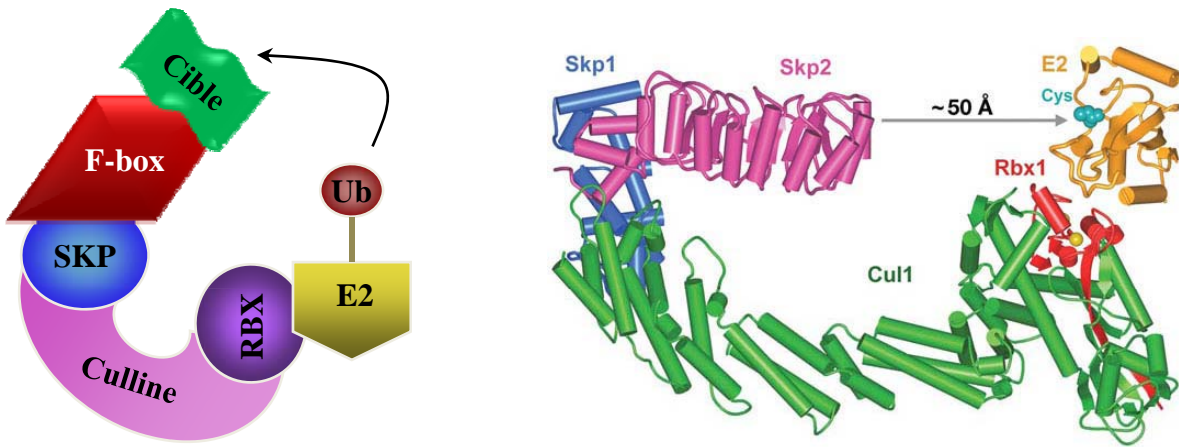


Figure I-8 : le complexe SCF

Le modèle présenté à droite est celui proposé par Zheng *et al.* (2002) pour un complexe SCF humain. Skp2 est la protéine à F-box. Cys représente l'acide aminé de E2 sur lequel se fixe l'ubiquitine. Cul1 : Culline 1. (Voir le texte pour les significations des différents termes)

| | | |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| BWV-P0: | FKIDVFLRSLLYQLPF.HLGSCFHDA P REL..IPATE P EL.CAWFSLQ | VNLHVP G TKTSRRRI I Q R |
| CABV-P0: | INGTNLLRFLAR L L P L.LI S E Q LS.GDYVY..TPGASK R II L ARFHRH | VDLRLPASKDVARF F L A R |
| BMV-P0: | FENENCIR S LLAA L L P L.LL S K Q LDPG S FIY..TPG K R Q S LRLARFYNY | IDLRVPP R KDVKRFY L A R |
| BChV-P0: | HQVEQFLRSIL F Q L PN.LIWSSWDHG T ILYGD R P F T R AEDLL R FSL T T | LRVGLPSSEKAVRL Q L Q R |
| PLRV-P0: | EQIYRIC R S F LHV L L P L.LN C K R G R IST S GL.QL P R H LHYEC L EW G LLC | IKLDDPTTAAAYR S EL L R |
| CYDV-RPV-P0: | NEIDLFCV S L G FL L P I .LL T GESYS W R G HL.NL P LSY T EL L V R W G LAV | IDLST M STR S FY E Q F LL R |
| F-box: | K P F P LL .RLPIELLRKILSR LD | P IDL LR RL LV S KKW RS LV D SL NIW F K |
| | | FIL |

Figure I-9 : la protéine P0 possède un motif à F-box

Alignement de séquences d'une portion de la protéine P0 (acides aminés 50 à 130 environ) de différents poliovirus avec un motif F-box classique. Certains des rares acides aminés conservés parmi les protéines P0 des poliovirus (représentés en rouge) sont retrouvés sur le motif F-box (Gagne *et al.*, 2002).

b) Le complexe SCF

Il existe différents types d'ubiquitine ligase E3. Les protéines HECT sont des enzymes E3 monomériques qui ont la particularité de lier l'ubiquitine avant son transfert vers la protéine cible. Les enzymes RING sont également monomériques, mais comme les ubiquitine ligases multimériques, elles ne lient pas l'ubiquitine mais servent d'adaptateur entre l'enzyme E2, porteuse de l'ubiquitine activée, et la cible qu'elles recrutent de manière spécifique. Parmi les ubiquitine ligases multimériques, on distingue les complexes APC, les complexes VBC et ceux qui nous intéressent plus particulièrement dans cette étude, les complexes SCF.

Le complexe SCF est composé des protéines desquelles il tient son nom : une protéine de type SKP1, une Culline et une protéine à F-box. Il compte également une protéine à Ring-box (RBX) qui permet l'interaction avec E2. La culline a un rôle de charnière et interagit, d'un côté avec RBX et de l'autre, avec une protéine SKP. Cette dernière lie une protéine à F-box.

Le nom de cette protéine provient du motif à F-box, localisé à son extrémité N-terminale, par lequel elle interagit avec SKP et qui a été initialement identifié sur la cycline F humaine (Bai *et al.*, 1996). On dénombre près de 700 gènes codant potentiellement pour des protéines à F-box chez *Arabidopsis thaliana* (Lechner *et al.*, 2006). Cette diversité est nécessaire puisque la protéine à F-box va assurer la reconnaissance de la protéine ciblée en vue de sa dégradation ; c'est donc cette protéine qui donne au complexe SCF sa spécificité d'action (voir **figure I-8**). C'est pourquoi on nomme souvent les complexes SCF par le nom de leur protéine à F-box ; par exemple, le complexe SCF cristallisé par Zheng *et al.* (2002) se nomme SCF^{SKP2}, SKP2 étant la protéine à F-box. Une particularité des protéines ciblées par le complexe SCF est que la plupart nécessitent une phosphorylation qui conditionne leur reconnaissance par le complexe.

4-2) le motif F-box de la protéine P0 est nécessaire à son activité de suppresseur

La démonstration de l'interaction de la protéine P0 avec des membres de la famille des protéines SKP d'*Arabidopsis thaliana* (ASK) suggère que la protéine virale pourrait se substituer à une protéine à F-box au sein d'un complexe SCF. Un alignement plus ciblé des séquences de différentes protéines P0 révèle que parmi les rares acides aminés conservés au sein du genre poliovirus, certains sont caractéristiques d'un motif à F-box (voir **figure I-9**). Afin de prouver que ce motif est bien responsable de l'interaction avec les protéines ASK, Pazouhandeh *et al.* (2006) ont substitué les deux acides aminés LP très conservés au début du

motif par des alanines. Cette mutation LP- abolit l'interaction avec les protéines ASK en système double hybride de levure. De même, l'aggravation des symptômes provoquée par la protéine P0^{BW}, lorsqu'elle est exprimée par le vecteur viral PVX, est perdue après mutation du motif à F-box. Enfin, la protéine mutée P0^{BWLP-} est incapable de supprimer le RNA silencing dans des expériences de patch test (Pazouhandeh *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent que l'interaction de P0 avec une protéine SKP est directement liée à son activité de suppresseur de RNA silencing.

Une hypothèse particulièrement séduisante pour le mode d'action de la protéine P0 serait qu'en se substituant à une protéine à F-box au sein d'un complexe SCF, elle pourrait recruter un facteur majeur du RNA silencing, ce qui conduirait à la poly-ubiquitination de celui-ci, et ainsi, à sa dégradation par le biais du protéasome. L'un des objectifs principaux de ma thèse a été d'identifier ce ou ces facteurs cellulaires menés à la dégradation par la protéine virale.

B) Résultats

1) La protéine P0 agit en aval de l'activité Dicer

Une première approche de type « gène candidat » a été utilisée par Maghsoud Pazhouhandeh au laboratoire. L'interaction entre la protéine P0 et divers acteurs du RNA silencing (AGO1, DCL2, SDE3, RDR6, HEN1 et DRB1) a été testée dans le système double hybride de levure. Malheureusement, aucune de ces interactions ne s'est révélée positive. Cela est dû, soit à la non reconnaissance de ces facteurs par P0, soit à l'utilisation d'un système hétérologue dont les spécificités ne permettent pas de reproduire les conditions dans lesquelles P0 pourrait agir. Notamment, on sait que cette technique n'est pas adaptée à la mise en évidence d'interactions entre deux protéines nécessitant des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, qui est souvent un pré-requis à l'identification d'une cible par le complexe SCF.

Nous avons donc choisi d'utiliser une méthode plus indirecte, afin de déterminer quelle étape de la cascade réactionnelle du RNA silencing est inhibée en présence de P0.

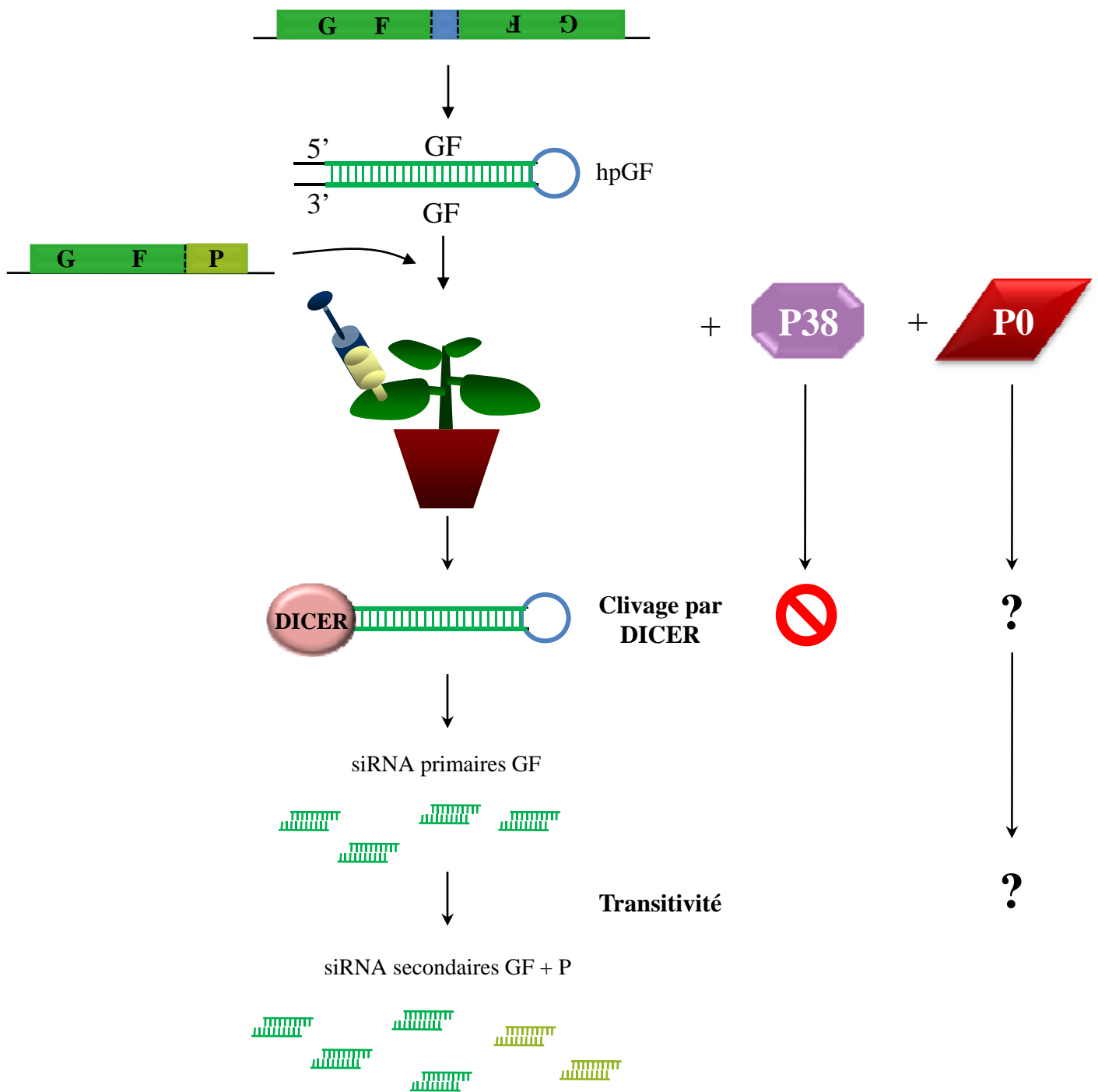


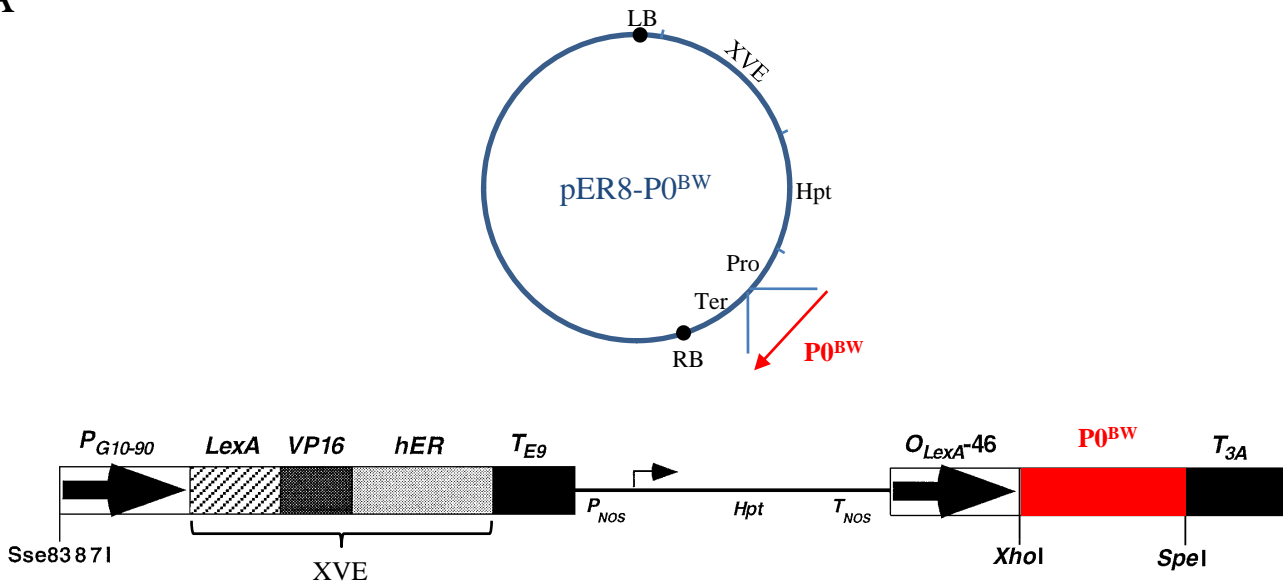
Figure I-10 : principe de l'expérience visant à évaluer l'effet de la protéine P0 sur l'activité Dicer et la transitivity

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de la protéine P0 sur l'activité Dicer. Pour cela, des expériences similaires aux patchs tests et permettant de faire la distinction entre siRNA primaires et siRNA secondaires ont été réalisées. En effet, si l'activité Dicer est spécifiquement touchée, la production totale de siRNA en sera affectée. En revanche, si une étape située en aval de cette activité est inhibée, la production de siRNA primaires reste inchangée, mais des variations dans l'accumulation des siRNA secondaires, qui ne sont produits qu'après clivage du RNA cible par une protéine AGO, dans un complexe RISC, et réplication par une RNA polymérase RNA dépendante, peuvent être observées.

Des plants de *Nicotiana benthamiana* sauvages ont été agro-infiltrés avec des plasmides pBinGFP additionnés des plasmides pBinP0^{BW}, pBinP0^{CA} ou encore pBinP38 (la protéine P38 étant le suppresseur de RNA silencing du TCV inhibant spécifiquement les enzymes DICER (Deleris *et al.*, 2006), il est utilisé ici comme témoin positif). En plus de ces deux constructions (GFP et suppresseur), nous avons ajouté une construction permettant la production d'un RNA en tige boucle correspondant à la partie 5' du gène de la GFP (hpGF pour hairpin 5'GFP). Le clivage par DICER de cette structure en tige boucle permet la production de siRNA primaires capables de cibler le transcrit GFP issu de la construction pBinGFP. Le transcrit GFP étant dégradé, la fluorescence verte due à la protéine n'est pas produite. Par contre, le clivage du transcrit GFP induit la synthèse de siRNA secondaires couvrant la totalité de la séquence GFP grâce au mécanisme de transitivity (voir introduction, paragraphe II-2-3). Parmi les siRNA secondaires, on peut distinguer des siRNA « P » dont la séquence correspond à la partie 3' terminale du transcrit de la GFP et qui résultent obligatoirement de l'amplification du signal induit par la construction hpGF (voir **figure I-10**).

En présence de la protéine P38, on constate que la production de siRNA est très difficilement détectable dans nos expériences, ce qui est en accord avec ses propriétés inhibitrice de DCL4 chez *A. thaliana* (voir publication, figure 1, ligne 9). A l'opposé, en absence de protéine suppresseur, les siRNA GF s'accumulent, et ni le transcrit GFP, ni la protéine GFP ne sont détectables (publication, figure 1, ligne 6). En présence des protéines P0^{BW} ou P0^{CA}, le transcrit GFP est stabilisé, les patchs sont verts, nous pouvons donc conclure que P0 est capable de supprimer l'IR-PTGS induit dans ce système (publication, figure 1, lignes 7 et 8). Néanmoins, on peut noter que la production de siRNA GF est tout à fait comparable à celle observée en absence de suppresseur. Il semble donc que, si P0 est bien capable d'inhiber le RNA silencing, son action se porte sur des facteurs situés en aval de DICER dans ce mécanisme.

A



B



Figure I-11 : mise en évidence du phénotype des plantes pER8-P0^{BW}

A) Représentation schématique du plasmide binaire utilisé pour la transformation des plantes. Adapté de Zuo *et al.* (2000). Le promoteur P_{G10-90} contrôle XVE, un facteur de transcription chimérique comportant le domaine de liaison au DNA du répresseur bactérien LexA, le domaine transactivateur de la protéine virale VP16 et la région régulatrice du récepteur humain de l'œstrogène (hER). Hpt (hygromycin phosphotransferase II) code pour un gène de résistance à l'hygromycine. Le gène codant pour la protéine P0 est placé en aval de huit copies de l'opérateur LexA dont l'activité dépend d'une fixation de l'œstradiol sur le facteur XVE. Sa transcription est stoppée grâce au terminateur T_{3A} . P_{NOS} et T_{NOS} sont le promoteur et terminateur de la nopaline synthase, respectivement. LB et RB sont les frontières gauche et droite du T-DNA. B) Les plantes pER8-P0^{BW} sans induction (à gauche) ou sept jours après induction de l'expression de P0 (à droite). Les plantes exprimant la protéine virale montrent un développement foliaire anormal. Les feuilles sont déformées, enroulées de manière adaxiale et sont beaucoup plus crénelées que des feuilles non traitées à l'œstradiol qui ne peuvent être distinguées de celles d'une plante sauvage.

En revanche, on constate que l'accumulation des siRNA secondaires P est fortement diminuée en présence de P0, par rapport à la situation observée sans suppresseur. Ces résultats indiquent que P0 interfère avec le mécanisme de transitivity et pourrait induire la dégradation d'un des facteurs essentiels à sa mise en place : AGO1, RDR6 ou DCL4. DCL4 étant également impliquée dans la production des siRNA primaires, il semble peu probable que P0 interfère avec son activité. De plus, une étude récente (Zhang *et al.*, 2006) montre que P0 est incapable de fixer des siRNA *in vitro*. La protéine P0 étant issue d'un virus à RNA, celui-ci code pour sa propre RdRP. Il produit donc lui même le RNA double brin initiateur du mécanisme de silencing et nécessaire à sa réplication. Il semblait donc, *a priori*, peu intéressant pour ce virus de développer une protéine ciblant une enzyme dont les produits sont naturellement synthétisés lors de l'infection. Cette expérience nous a donc orientés vers la protéine AGO1 comme candidat pour la dégradation induite par P0.

2) La protéine P0 mime les effets d'une mutation *ago1* chez *Arabidopsis thaliana*

Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons transformé des plants d'*Arabidopsis thaliana* pour qu'ils expriment la protéine P0 du BWYV. Les premières tentatives utilisant une construction 35S-P0^{BW} où le gène de la protéine P0 est sous dépendance d'un promoteur constitutif (promoteur 35S du CaMV) n'ont pas permis d'obtenir de plantes viables (voir publication, figure S1). Ces observations suggèrent un effet toxique de la protéine P0 dans les phases précoces du développement. Nous avons ainsi été amenés à utiliser un système inductible utilisant le plasmide pER8 qui permet l'expression d'un gène sous dépendance d'un promoteur inductible par l'œstradiol (voir **figure I-11-A**).

Les plantes transgéniques pER8-P0^{BW} non traitées ont une croissance tout à fait comparable à des plantes sauvages. Six à sept jours après induction de la synthèse de la protéine virale, nous observons l'apparition de fortes anomalies dans le développement des jeunes feuilles (**voir figure I-11-B** et publication, figure 2), similaires à celles constatées sur des plantes exprimant d'autres suppresseurs fort du RNA silencing (voir introduction, figure 39 : les photos de plantes exprimant la protéine 2b n'étaient pas disponibles au moment où ces expériences ont été réalisées mais d'importantes similitudes peuvent aujourd'hui être constatées). Ces anomalies développementales ont pu être corrélées, dans des études précédentes, à une perturbation de la voie endogène des miRNA (Voinnet, 2005b ; Zhang *et al.*, 2006). Or, un facteur essentiel et commun à cette voie et à celle du RNA silencing antiviral est

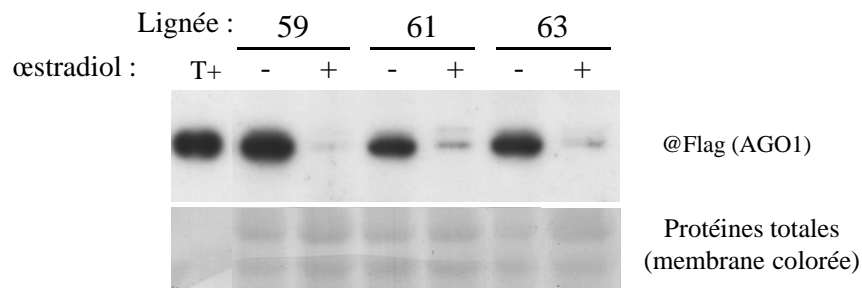


Figure I-12 : mise en évidence de la dégradation d'AGO1 dans les plantes pER8-P0xFlag-AGO1

Les lignées 59, 61 et 63 obtenues par croisement d'une plante pER8-P0^{BW} et d'une plante exprimant une version étiquetée d'AGO1 (Flag-AGO1) sont traitées (+) ou non (-) à l'œstradiol. L'induction de la synthèse de P0 par l'œstradiol conduit à la diminution de l'accumulation de la protéine AGO1. @Flag : anticorps dirigé contre l'épitope Flag; T+ : témoin de migration de la protéine Flag-AGO1 obtenue par immunoprécipitation.

bien la protéine AGO1, dont l'action se situe en aval de l'activité Dicer ce qui est en accord, avec nos résultats précédents.

Afin d'établir un lien entre le phénotype des plantes pER8-P0^{BW} et une éventuelle dégradation d'AGO1, nous avons quantifié le niveau d'accumulation de certains messagers cibles de miRNA, par des expériences de RT-PCR en temps réel, réalisées sur les plantes exprimant la protéine P0. Les transcrits extraits de plantes mutantes *ago1-11* (mutant hypomorphe sévère au développement très perturbé, Kidner et Martienssen, 2005) ont été analysés en parallèle. Les résultats montrent que la majorité des RNA messagers testés ont une nette tendance à la suraccumulation, aussi bien dans les plantes transgéniques pER-P0^{BW} que dans les mutants *ago1-11* (ces expériences ont été réalisées au laboratoire par Maghsoud Pazhouhandeh ; pour plus de détails, voir publication, figures 3 et S4). La stabilisation de ces transcrits classiquement dégradés par des miRNA étaye donc notre hypothèse selon laquelle P0 interfère avec l'activité d'AGO1.

3) La protéine P0 induit la dégradation d'AGO1 *in planta*

Nous avons vu que la protéine P0 pourrait potentiellement, par son domaine F-box, former une complexe SCF susceptible d'ubiquitiner une protéine cellulaire et de promouvoir sa protéolyse (Pazouhandeh *et al.*, 2006). Nous avons donc voulu savoir si l'intégrité de la protéine AGO1 était altérée en présence de P0. En raison de l'absence d'anticorps reconnaissant efficacement la protéine AGO1 au moment où ces expériences ont été entreprises, nous avons croisé nos plantes pER8-P0^{BW} (la lignée 21 présentée dans la publication, voir figure 2-A) avec des plantes exprimant une version étiquetée d'AGO1, Flag-AGO1, sous la dépendance de son promoteur endogène (Baumberger et Baulcombe, 2005).

Une analyse par western blot de trois lignées indépendantes ainsi obtenues (lignées 59, 61 et 63) a permis de mettre en évidence une importante diminution dans l'accumulation de la protéine Flag-AGO1 après induction de l'expression de P0 dans ces plantes, en comparaison avec la même lignée non traitée à l'œstradiol (voir **figure I-12** et publication, figure 4-A). De plus, nous pouvons affirmer que cette différence ne résulte pas de la déstabilisation du RNA messager d'AGO1. En effet, celui-ci étant cible d'un miRNA, il a été testé lors des expériences de PCR quantitative et fait partie des transcrits dont la stabilité est largement augmentée en présence de P0 (voir publication, figure 3-A).

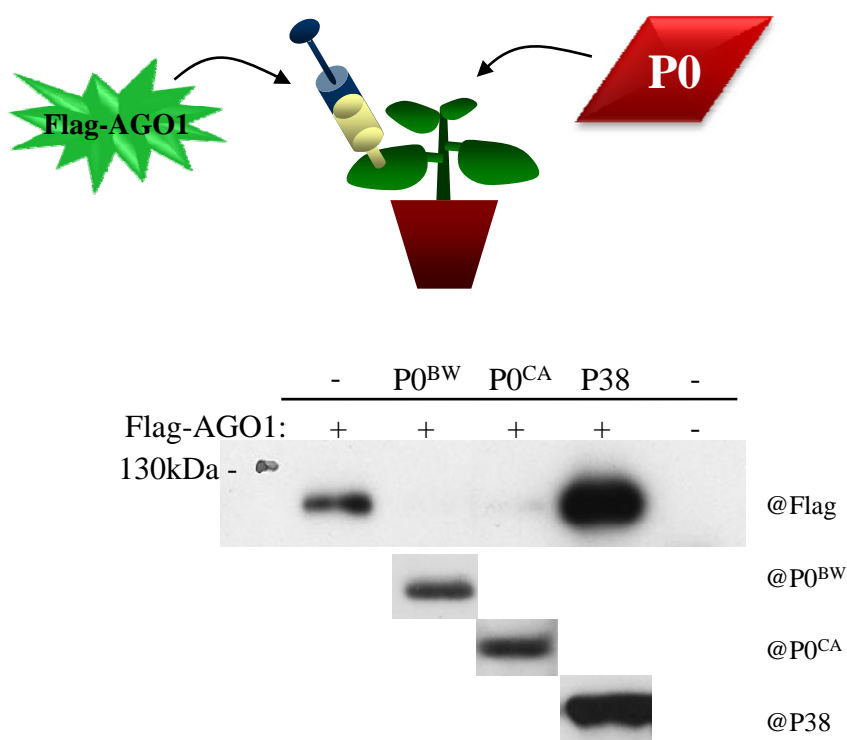


Figure I-13 : mise en évidence de la dégradation d'AGO1 dans un système d'expression transitoire

Un vecteur codant pour une version étiquetée d'AGO1 (pBinFlag-AGO1) est co-infiltré dans des plants de *N. benthamiana* avec différentes protéines virales ou avec le plasmide pBinØ (-). Les protéines sont extraites cinq jours après agro-infiltration. P38, le suppresseur de RNA silencing du TCV qui inhibe l'activité Dicer est utilisé comme témoin négatif. La présence des protéines virales est confirmée dans les extraits totaux grâce à leurs anticorps respectifs (@P0^{BW}, P0^{CA}, P38). Le western blot @Flag mettant en évidence la protéine AGO1 a été réalisé après immunoprécipitation anti Flag et révélé avec le même anticorps.

Enfin, nous avons également évalué cette propriété de P0 dans un système d'expression transitoire dans *N. benthamiana* afin de nous affranchir de toute influence, comme l'utilisation de l'œstradiol ou l'insertion aléatoire du transgène pER8-P0^{BW}. Les plasmides pBinFlag-AGO1 et pBinP0^{BW} ou pBinP0^{CA} ont été agroinfiltrés à des plants de *N. benthamiana*. Cette méthode dérivée de celle des patch tests confirme la dégradation d'AGO1 non seulement par P0^{BW} mais également par P0^{CA} (voir **figure I-13**). Nous avons également testé le mutant P0^{BWLP-} en présence d'un suppresseur de RNA silencing fonctionnel (la protéine P38 du TCV), puisqu'elle est incapable de protéger son transcrite contre le RNA silencing (Pazhouandeh *et al.*, 2006). Dans ces conditions, la protéine AGO1 n'est pas déstabilisée, ce qui suggère que P0^{LP-} est incapable d'induire la dégradation de la protéine cellulaire. Malheureusement, nos techniques d'extraction n'ont pas permis de visualiser la protéine virale mutante par western blot.

Des expériences similaires ont été réalisées en parallèle par Nicolas Baumberger dans le laboratoire de David Baulcombe. En utilisant une version étiquetée de la protéine P0, ils ont réussi à montrer que la présence de la protéine P0^{BW} mutée dans son motif F-box n'a aucun effet sur la stabilité de la protéine AGO1 (Baumberger *et al.*, 2007). Ces résultats font suite à ceux initialement présentés par David Baulcombe en 2006, lors du congrès de l'EPSO « RNA silencing in defence and development » à Visegrad (Hongrie). Il indiquait alors que parmi les différents suppresseurs de RNA silencing testés (P25, P19, 2b ou encore HcPro) dans ce même système d'expression transitoire, seule la protéine P0 du BWYV (celle du CABYV n'avait pas été testée) était en mesure d'affecter la stabilité de la protéine AGO1.

4) Les protéines P0 et AGO1 interagissent entre elles

Afin de valider notre modèle du mode d'action de la protéine P0, nous nous sommes interrogés sur la capacité de P0 à recruter AGO1 au sein du complexe SCF ; en d'autres termes, les deux protéines peuvent-elles interagir ? Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de GST pull-down. Cette méthode a permis de mettre en évidence l'interaction, *in vitro*, de la protéine P0 synthétisée dans un système bactérien et de la protéine AGO1 immunoprécipitée à partir de plants d'*Arabidopsis thaliana* exprimant la protéine sous forme étiquetée (expérience réalisée au laboratoire par Maghsoud Pazhouandeh ; pour plus de détails, voir publication, figure 4-B). L'interaction a ensuite été confirmée *in vivo* par la technique de BiFC, basée sur la restauration de la fluorescence d'une protéine scindée en deux et dont chaque partie est fusionnée à l'une des protéines à tester. Ces protéines de fusions sont exprimées de manière

transitoire après bombardement de plantules de moutarde (expériences réalisées par Katia Marocco, voir publication, figure 4-C).

L'ensemble des résultats présentés jusqu'ici (sous-partie B de ce chapitre) sont détaillés dans la publication :

**The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing.
Current Biology, September 18, 2007, 17(18):1615-1621**

puis résumés dans l'article addendum :

**Viral suppression of RNA silencing by destabilization of ARGONAUTE 1.
Plant Signaling & Behavior, September 2008, 3(9): 657 - 659**

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

The Poliovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing

Diane BORTOLAMIOL, Maghsoud PAZHOUHANDEH, Katia MARROCCO, Pascal GENSHIK
and Véronique ZIEGLER-GRAFF

Current Biology, 2007, vol.17, n° 18, pages 1615-1621

Pages 81-... :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.061>

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

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

Article Addendum

Viral suppression of RNA silencing by destabilisation of ARGONAUTE 1

Diane Bortolamiol,¹ Maghsoud Pazhouhandeh² and Véronique Ziegler-Graff^{1,*}

¹Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS; Strasbourg, France; ²Department of Plant Protection; Science Faculty; Azarbaijan University; Iran

Key words: PTGS, viral silencing suppressor, ARGONAUTE 1, F-box protein, proteolysis, arabidopsis, ubiquitination, viral phloem restriction

RNA silencing is a manifestation of a ubiquitous phenomenon that acts, at least in plants and some insects, as a natural defense mechanism against viruses. As a counter-strategy, viruses have evolved to encode silencing suppressor proteins (SSPs) that can block the defense response and evade the host immunity. Although numerous SSP have been identified, little information is available on the molecular basis of their mode of action. Among SSPs, the polerovirus protein P0 functions as an F-box protein that targets an essential actor of the silencing pathway. Our work demonstrates that one of the main targets is ARGONAUTE 1 (AGO1), a key component of the RISC effector complex. By a physical interaction with AGO1, P0 mediates AGO1 protein degradation *in planta*. This is the first report of a plant virus that exploits components of the host ubiquitination machinery to overcome RNA silencing. This unusual mode of action may provide some clues concerning the mechanism governing phloem tropism of poleroviruses.

RNA silencing also known as RNA interference (RNAi) in animals, is a universal system in multicellular organisms in which RNA expression is specifically downregulated at the post-transcriptional level by a complex process involving small RNAs.¹ Among these, the so-called small interfering RNAs (siRNAs) are 5'-phosphorylated molecules of 21–24 nucleotides (nt) generated by an RNase III-type Dicer enzyme from a double-stranded (ds) RNA. One strand of the siRNA can be incorporated into an RNA-induced silencing complex (RISC) to serve as a guide RNA to direct degradation of RNA species containing a complementary sequence. The core component of the RISC complex is an ARGONAUTE (AGO) protein, which contains the endonucleolytic cleavage activity. An important second class of small RNAs are the microRNAs (miRNAs) produced by Dicer from imperfect hairpin structures in noncoding transcripts of cellular origin. When incorporated into RISC they

either direct cleavage (most commonly in plants) of transcripts bearing sequence homology or interfere with their translation.

In plants and invertebrates, virus infection is typically accompanied by the appearance of double-stranded RNAs and this can trigger a potent RNA silencing response aiming at degrading the foreign RNA. As a counter-strategy viruses encode silencing suppressor proteins (SSPs) that can block this host defense response.² The molecular basis for suppressor activity has only been elucidated for a few of these proteins. For instance, the P19 protein encoded by Tomato Bushy Stunt Virus binds directly to siRNAs^{3,4} so as to impede their loading on RISC, their spread or their amplification by cellular RNA dependant RNA polymerases.⁵ Other SSPs, including the Cloverovirus P21 and HC-Pro of Potyviruses can also bind siRNAs. This has led to the hypothesis that binding of ds siRNA may represent a widespread counter-strategy.⁶ Until recently, the only SSP that was known to function by interacting with a protein component of the silencing pathway was the 2b protein of Cucumber Mosaic Virus. By physically binding to AGO1, 2b provokes inhibition of the cleavage activity of the RISC machinery.⁷ More recent evidence now reveals that another SSP, the polerovirus P0 protein, has an even more dramatic impact on the fate of AGO1, possibly by hijacking components of the cellular ubiquitination pathway to promote degradation of AGO1.^{8,9}

Poleroviruses are a group of plant viruses (*Luteoviridae* family) with a small plus sense-RNA genome. They encode an ~29 kDa protein P0 which is required for strong viral pathogenesis.¹⁰ Pfeffer et al.¹¹ demonstrated its silencing suppressor activity in a transient expression agroinfiltration assay using the GFP reporter gene. To investigate the mechanism of action of P0 a yeast two-hybrid screen of an *Arabidopsis thaliana* cDNA library was undertaken. Two cellular partners, SKP1 and SKP2, were shown to interact with P0 of two poleroviruses, Beet Western Yellows Virus (BWYV) and Cucurbit Aphid Borne Yellows Virus (CABYV).¹² SKP proteins (S-phase Kinase-related protein) are subunits of the SCF (SKP-Cullin-F box) complex in the ubiquitin-dependent protein degradation pathway. The P0-SKP interaction was confirmed *in vitro* by pull-down assay and *in planta* by Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) experiments. Moreover, a yeast bridging assay showed that CUL1 is part of a larger complex containing P0 and SKP, corroborating the existence of a novel SCF^{P0} complex. Recognition between P0 and SKP involves a domain present in different polerovirus P0's (which are otherwise rather dissimilar in sequence) that shows similarities with the consensus motif of F-box proteins. F-box proteins are

*Correspondence to: Véronique Ziegler-Graff; Laboratoire de Virologie Végétale; Institut de Biologie Moléculaire des Plantes; 12 rue du Général Zimmer; STRASBOURG Cedex 67084 France; Tel.: 33.3.88.41.71.63/33.3.88.41.72.35; Fax: 33.3.88.61.44.42; Email: Veronique.Ziegler-Graff@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

Submitted: 02/13/08; Accepted: 02/20/08

Previously published online as a *Plant Signaling & Behavior* E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/5758>

Addendum to: Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V. The polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 2007; 17:1615–21.

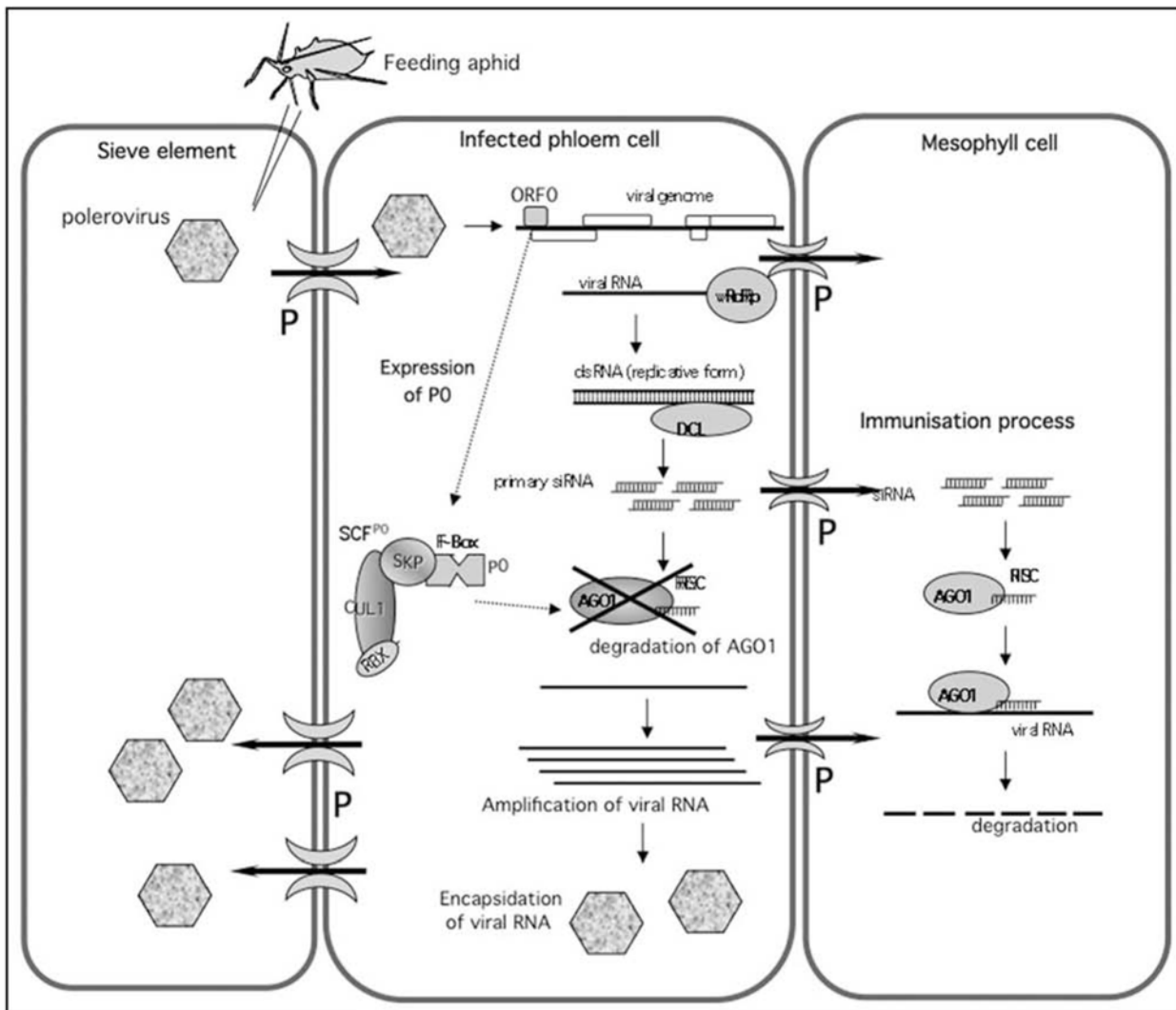


Figure 1. Model of the process of infection by Poloroviruses. Poloroviruses are introduced into the phloem by feeding aphids having acquired virus on infected cells. The virus multiplies in companion and phloem parenchyma cells and circulates within the sieve tubes. In these cell types P0 inhibits RNA silencing by degrading AGO1. As siRNAs are not targeted by the virus, they may spread ahead of the infection front to the neighbouring cells (e.g., mesophyll cells) through the connecting plasmodesmata (P) and thereby immunize them against subsequent invasion by the virus. This immunisation process could be implicated in phloem restriction of poleroviruses. Encapsidation into virions would provide protection to the virus entering new phloem cells via the sieve tubes. vRdRp, virus-encoded RNA dependant polymerase; DCL, dicer-like protein; RISC, RNA Induced Silencing Complex; the SCF^{P0} complex contains an F-box protein (here P0), a SKP protein, a Cullin (CUL1) protein and a ring finger protein (RBX).

responsible for substrate specificity of SCF complexes. Point mutation in the F-box motif of P0 abolished interaction with SKP, both in yeast and *in planta*, and concurrently diminished virus pathogenicity and the ability of P0 to suppress PTGS. Furthermore, plants in which SKP-homolog expression had been reduced by virus-induced gene silencing (VIGS) were resistant to polerovirus infection.¹² These findings supported a model in which P0 functions as an F-box protein that directs the host SCF E3 ligase machinery to target a component of the PTGS pathway. This model thus established a link between the ubiquitination machinery and inhibition of the silencing pathway.

The second step in unraveling the mechanism of action of P0 was to identify its target. By using an inverted-repeat-PTGS agro-infiltration assay, we found that P0 had no effect on the biogenesis

of primary siRNA but interfered with a step downstream of the action of DCL.⁹ Examination of transgenic plants expressing P0 revealed strong developmental abnormalities as well as enhanced accumulation of several miRNA-target transcripts, mimicking the effects observed in a hypomorphic *ago1* mutant. These results were similar to those observed with the CMV 2b protein,⁷ suggesting that P0 may interfere with the RISC effector complex and target AGO1. Strikingly, plants expressing P0 showed a strong reduction of AGO1 protein level which was not correlated to a decrease of *AGO1* transcript accumulation (in fact the levels increased, as expected since *AGO1* transcript accumulation is under feedback control by a miRNA¹³). These findings provided strong circumstantial support for the hypothesis that P0 acts as an F-box protein to recognize AGO1 and promote its degradation (Fig. 1). Finally

co-immunoprecipitation and BiFC experiments provided direct evidence for a physical interaction between P0 and AGO1 in vitro and in vivo.⁹

In a parallel study, Baumberger et al.,⁸ demonstrated AGO1 degradation by P0 in a transient expression assay. They localised the minimal sequence required for P0-mediated destabilisation of AGO1 to the PAZ domain (RNA binding domain) and the adjacent N-terminal domain. Tests performed to investigate the effect of proteasome inhibitors on AGO1 destabilisation were negative, which led Baumberger et al.,⁸ to suggest that the proteasome was not directly involved. A proposed alternative hypothesis could be that P0 behaves like a dominant negative inhibitor of a host F-box protein which may promote a specific pattern of ubiquitination of AGO1 required to fulfil its normal function. Thus, many questions remain to be answered concerning the role, if any, of ubiquitination and the proteasome in P0-induced AGO1 degradation.

In plants, RNA silencing is a non-cell-autonomous process.¹⁴ The silencing signal can spread to neighboring cells through plasmodesmata and for long distances via the vascular system. This obviously has implications for the plant's defense against virus infection in that it allows cells surrounding an infection site and in distant parts of the plant to be "primed" to resist infection before the virus arrives. The main silencing signal for localized movement has been shown to be the 21 nt siRNA produced by DCL4.^{15,16} The signal molecule(s) governing long-distance silencing remain to be identified, although, given the sequence-specific nature of the defense response, it will almost certainly prove to be a small RNA(s). Evidently, viruses that encode SSPs that interfere with siRNA production and/or sequester siRNAs should also interfere with movement of these silencing signals.²

Poleroviruses provide a particularly interesting model for the study of non-cell autonomous silencing signals because they are limited to the vascular tissues: the viruses multiply in companion cells and phloem parenchyma cells and circulate within the sieve elements to infect phloem cells in other leaves but they cannot invade mesophyll cells.¹⁷ Interestingly, using an agroinfiltration assay, Baumberger et al.,⁸ observed that P0 does not prevent the spread of the silencing signal to neighbouring cells. This is consistent with the finding that P0 does not interfere with the accumulation of siRNAs species but instead indirectly blocks their action at a downstream step. One intriguing possibility is that the movement of siRNAs from phloem cells into the surrounding mesophyll (and the presumed inability of the P0 produced in the infected phloem cells to move into these cells) "immunizes" these cells against subsequent invasion by the virus and thus plays a role in restricting poleroviruses to the phloem compartment (Fig. 1). A related question is, assuming that one or more of the small RNAs produced in the infected phloem cells are also involved in long-distance silencing via the sieve elements, how does the virus succeed in invading phloem cells in other parts of the plant? Do companion cells and phloem parenchyma cells respond differently than do mesophyll cells to non-cell-autonomous silencing signals? Does the virus specifically block the long-distance silencing pathway by a P0-independent mechanism? Exploration of these and other possibilities should not only shed light on the infection cycle of these interesting viruses but could also provide new insights into some of the plant-specific aspects of RNA silencing.

Acknowledgements

We would like to thank Véronique Brault for the design of the aphid.

References

1. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; 431:356-63.
2. Li F, Ding SW. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 2006; 60:503-31.
3. Vargason JM, Szittyá G, Burgyan J, Tanaka Hall TM. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 2003; 115:799-811.
4. Ye K, Malinina L, Patel DJ. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 2003; 426:874-8.
5. Ding SW, Voinnet O. Antiviral Immunity directed by Small RNAs. *Cell* 2007; 130:413-26.
6. Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, Lopez Moya JJ, Burgyan J. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 2006; 25:2768-80.
7. Zhang X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 2006; 20:3255-68.
8. Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* 2007; 17:1609-14.
9. Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V. The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 2007; 17:1615-21.
10. Ziegler Graff V, Brault V, Mutterer JD, Simonis MT, Herrbach E, Guilley H, Richards KE, Jonard G. The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant Microb Interact* 1996; 9:501-10.
11. Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, Ziegler Graff V. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 2002; 76:6815-24.
12. Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, Brault V, Hemmer O, Kretsch T, Richards KE, Genschik P, Ziegler Graff V. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:1994-9.
13. Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, Bartel DP. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 2004; 18:1187-97.
14. Voinnet O. Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett* 2005; 579:5858-71.
15. Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 2003; 22:4523-33.
16. Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. 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* 2005; 37:1356-60.
17. Mayo MA, Ziegler Graff V. Molecular biology of luteoviruses. *Adv Virus Res* 1996; 46:413-60.

5) Le protéasome est-il responsable de la dégradation d'AGO1 induite par P0 ?

Les résultats présentés précédemment montrent que la protéine P0 est capable d'induire la dégradation d'AGO1 alors qu'un mutant P0^{BWLP} ayant perdu sa capacité d'interagir avec les protéines SKP n'a pas d'effet. Cependant, jusqu'à présent, aucune preuve liant formellement la dégradation induite par P0 au protéasome 26S n'a pu être apportée.

Dans cette optique, nous avons expérimenté l'utilisation d'un inhibiteur de protéasome afin de voir si l'inactivation du complexe protéolytique pouvait interférer avec les effets de P0 sur AGO1.

Les plantes pER8-P0^{BW} exprimant la protéine Flag-AGO1 (la lignée 59 décrite précédemment) ont été mises en culture *in vitro* sur un milieu sélectif gélosé. Après une semaine, les plantules sont transférées dans un milieu liquide contenant de l'œstradiol afin d'induire l'expression de P0. Entre 3 et 6 jours plus tard, selon les expériences, les plantules sont traitées au MG132, un inhibiteur du protéasome. Plusieurs prélèvements ont été effectués successivement afin d'étudier une éventuelle stabilisation de la protéine AGO1. De nombreuses expériences ont été réalisées avec des modalités différentes (modifications du temps de traitement à l'œstradiol, des conditions de cultures, du mode d'infiltration du MG132).

Des incohérences obtenues pour les témoins négatifs et un manque de reproductibilité ne nous ont pas permis de conclure quant à l'effet de cet inhibiteur du protéasome sur la stabilité d'AGO1, en présence ou en absence de P0. Ces problèmes ont également été rencontrés en testant des plantes témoins : une lignée d'*Arabidopsis thaliana* exprimant une protéine strictement régulée par le protéasome (la cycline B1, stable uniquement pendant la mitose) en fusion avec le gène rapporteur GUS (plantes obtenues par M.-C. Criqui). L'inhibiteur du protéasome semblait effectivement stabiliser la protéine de fusion (plantes bleues après coloration GUS) mais des plantes non traitées montraient le même effet, suggérant un phénomène aspécifique.

Il faut savoir que l'utilisation du MG132, si elle est très courante dans le domaine animal, présente certains désavantages. En particulier, dans les cellules végétales, la molécule pénètre difficilement, notamment en raison de la présence de la paroi. De plus, ce composé est très instable, sa durée de vie à température ambiante n'excédant que difficilement 24 heures, et ses effets sont réversibles puisqu'il ne se fixe pas de manière covalente aux sites catalytiques du protéasome 26S. Enfin, le MG132 est efficace dans l'inhibition de l'activité chymotrypsine du protéasome mais ne bloque que peu ou pas les activités trypsine et caspase ; la neutralisation du protéasome 26S ne peut donc qu'être partielle dans ces expériences (Altun, 2007).

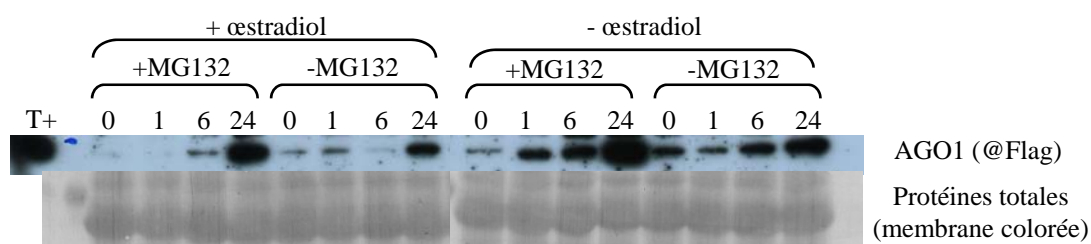


Figure I-14 : utilisation d'un inhibiteur de protéasome sur des plantes exprimant la protéine P0 sous promoteur inductible

Les plantes expriment une version étiquetée d'AGO1 (Flag-AGO1), la protéine est donc détectée grâce à un anticorps anti Flag. Les nombres au dessus de chaque piste représentent la cinétique (en heures) de traitement au MG132 (+ MG132) ou au DMSO, le solvant utilisé pour le MG132 (-MG132). Le temps 0 correspond à un prélèvement avant traitement au MG132, les plantules ayant été préalablement soumises à l'action de l'œstradiol pendant six jours. Les échantillons « + œstradiol » expriment, en théorie, la protéine P0 du BWYV. Les échantillons « - œstradiol » ont été traités par le DMSO, le solvant également utilisé pour diluer l'œstradiol. T+ est un témoin de migration de Flag-AGO1 obtenu par immunoprécipitation.

Dans cette expérience, l'effet de P0 est visualisable en comparant les temps 0, avec ou sans œstradiol : lorsque l'expression de P0 est induite, AGO1 est difficilement détectable. On constate également que l'addition de MG132 permet la stabilisation de la protéine, aussi bien en présence qu'en absence de P0. Malheureusement, les témoins négatifs n'ayant reçu que du DMSO réagissent de la même manière. Nous ne pouvons donc pas conclure suite à cette expérience, quant à l'effet de l'inhibiteur de protéasome sur la stabilité d'AGO1.

Une observation commune à toutes les expériences peut toutefois être notée : quelque soit le traitement effectué (avec ou sans induction par l'œstradiol, traité ou non par le MG132), on constate une augmentation de la quantité et donc de la stabilité des protéines AGO1. Les résultats obtenus suite à l'une de ces expériences sont présentés en **figure I-14**. On peut donc penser que le phénomène observé résulte d'un stress, qu'il soit dû à l'augmentation de la quantité de DMSO dans le milieu de culture (solvant de l'œstradiol lors du premier traitement, puis du MG132), à l'infiltration, ou aux conditions de culture elles-mêmes (en milieu liquide, sous agitation douce). La suraccumulation d'AGO1 observée pourrait donc être une réaction naturelle de la plante permettant d'augmenter les effets de sRNA endogènes comme les nat-siRNA, si AGO1 est aussi la protéine effectrice dans cette voie (voir introduction, paragraphe II-2-1, c), dont la fonction est de répondre au stress.

Des expériences similaires réalisées dans un système d'expression transitoire dans *N. benthamiana* ont été menées parallèlement à nos travaux par Baumberger *et al.* (2007). Leur étude présente des résultats quelque peu contradictoires avec notre hypothèse. En effet, elle montre que l'utilisation de MG132 ne permet pas de stabiliser la protéine AGO1 de manière significative en présence de P0. Ces expériences utilisent la visualisation de la stabilisation de protéines poly-ubiquitinées pour prouver la pénétration effective du MG132 dans les cellules traitées ; néanmoins, l'analyse tardive (16h après traitement) n'exclut pas que les effets de l'inhibiteur soient déjà en phase de réversion.

Baumberger *et al.* (2007) ont également testé d'autres molécules afin d'empêcher la dégradation dépendante du protéasome 26S : le MG115 et l'epoxomycine. Comme pour le MG132, les effets du MG115 sont réversibles. Les résultats d'un traitement par l'epoxomycine sont permanents mais ce peptide ne présente une forte affinité qu'avec les sites portant l'activité chymotrypsine. Enfin, l'absence de témoin de l'activité des inhibiteurs dans ces expériences ne permet pas d'exclure que la dégradation d'AGO1 par P0 soit simplement due à la mauvaise pénétration des molécules dans les cellules.

Dans l'état actuel des résultats, il semble impossible de conclure de manière définitive au sujet du mode de dégradation de la protéine AGO1 par P0. L'hypothèse de la protéolyse ubiquitine dépendante par le protéasome ne peut être écartée. Nous gardons toutefois à l'esprit que l'action de P0 sur la protéine AGO1 pourrait être plus indirecte et induire un type d'ubiquitination qui ne mobilise pas l'activité du protéasome. Par exemple, elle pourrait induire la relocalisation d'un facteur important pour la stabilité de la protéine cellulaire. Si celui-ci

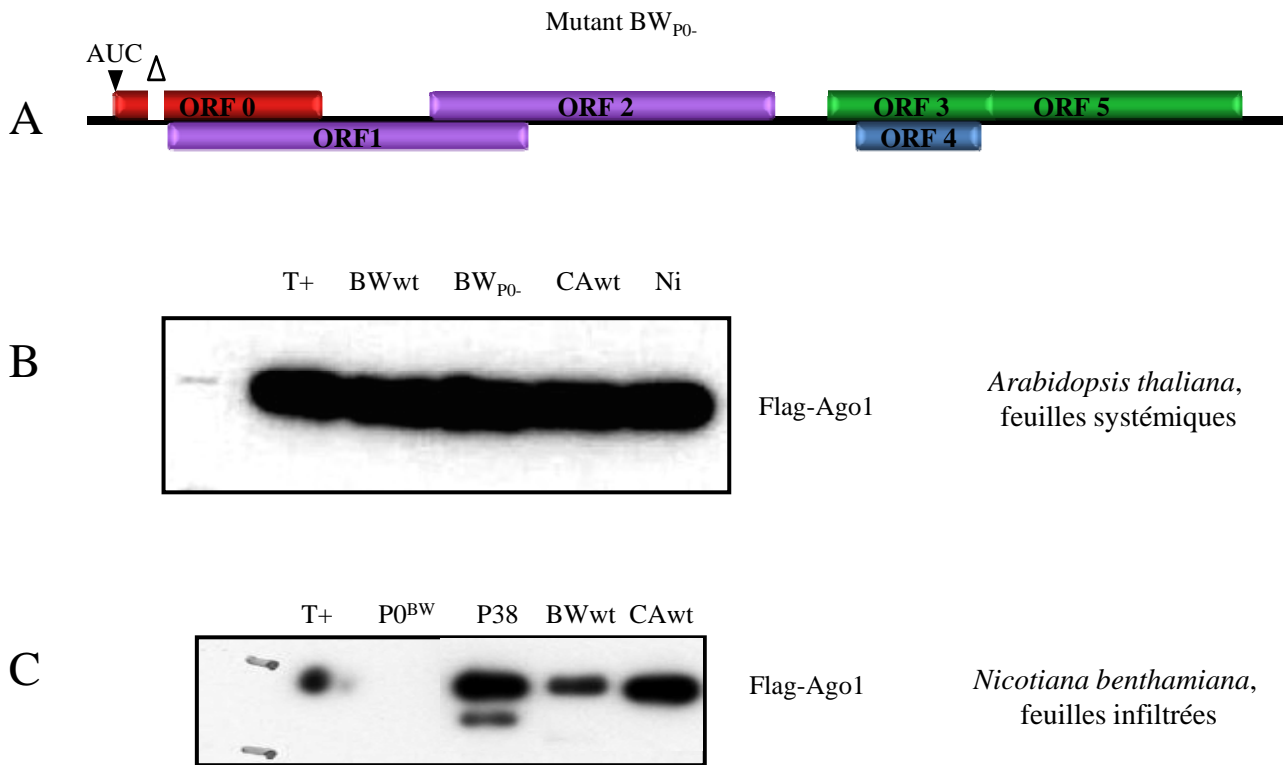


Figure I-15 Effet de l'infection virale sur la protéine AGO1

A) Représentation schématique du mutant BW_{P0}, n'exprimant pas P0. Le triangle noir indique une mutation ponctuelle du codon initiateur de l'ORF 0, le triangle blanc localise la délétion de 29 nucléotides inhibant la synthèse d'une protéine P0 complète en cas de réversion de la première mutation. B) Immunoprécipitation par des anticorps @Flag d'extraits de plants d'*Arabidopsis thaliana* trois semaines après infection par les virus indiqués. Les protéines sont révélées par un anticorps anti Flag. C) Immunoprécipitation par des anticorps @Flag d'extraits de plants de *N. benthamiana* cinq jours après co-agro-infiltration de pBinFlag-AGO1 et de différents suppresseurs de silencing ou de clones complets viraux. T+ : témoin positif de migration de Flag-AGO1 (immunoprécipitation d'*Arabidopsis thaliana* exprimant Flag-AGO1) ; BWwt : BWYV sauvage ; CAwt : CABYV sauvage ; BW_{P0} : BWYV n'exprimant pas P0 ; Ni : plante agroinfiltrée par pBinØ ; P38 : suppresseur de RNA silencing du TCV utilisé comme témoin. Les western blot sont révélés grâce à un anticorps anti Flag.

n'est plus associé au complexe RISC, la demi-vie d'AGO1 en serait affectée. Néanmoins, aucune protéine portant une telle fonction n'est connue à l'heure actuelle et ce modèle ne tient pas compte de l'interaction entre la protéine P0 et AGO1.

Il faut toutefois préciser que la méthode de GST-pull down utilisée pour démontrer cette interaction utilise une protéine AGO1 immunoprécipitée à partir de plantes et donc, potentiellement associée à d'autres facteurs cellulaires ; l'interaction entre les protéines P0 et AGO1 pourrait donc être indirecte. De même, la visualisation de l'interaction par BiFC pourrait masquer la présence d'une protéine intermédiaire recrutée par AGO1, P0 interagirait ainsi avec un co-facteur d'AGO1.

6) Effet de la protéine P0 en contexte viral

Après avoir montré l'effet de déstabilisation de la protéine P0 sur AGO1, il nous a semblé essentiel de tenter de valider notre modèle dans son contexte viral d'origine. Pour ce faire, nous avons infecté des plants d'*Arabidopsis thaliana* exprimant la protéine Flag-AGO1 avec nos deux virus modèles, le CABYV (CAwt pour CABYV wild-type) et le BWYV (BWwt pour BWYV wild-type) ainsi qu'avec un BWYV muté n'exprimant pas la protéine P0 (mutant BW 1.6346, décrit par Ziegler-Graff *et al.*, 1996) que j'appellerai BW_{P0}. Ce virus porte deux mutations, la première modifiant le codon AUG initiateur en un codon AUC, la deuxième étant une délétion de 29 résidus située en amont du codon initiateur de l'ORF1 (voir **figure I-15-A**).

Des immunoprécipitations à l'aide d'anticorps anti Flag ont été réalisées trois semaines après agro-infiltration et testées par western blot. Les résultats présentés **en figure I-15-B** ne montrent aucune différence dans l'accumulation de la protéine Flag-AGO1 en présence des virus sauvages, en comparaison à la situation observée dans des plantes infectées par BW_{P0} ou même dans des plantes non infectées. Ces résultats étaient prévisibles. En effet, les expériences réalisées par Pfeffer *et al.* (2002) ont montré la faible activité de suppresseur de RNA silencing portée par le clone complet du BWYV. De plus, le virus n'est présent que dans une portion infime des cellules extraites (cellules phloémiennes). La production de P0 est probablement insuffisante et trop localisée pour que la dégradation d'AGO1 soit visible sur des extraits protéiques totaux.

Une deuxième expérience réalisée dans *N. benthamiana* en utilisant la méthode dérivée des patch tests a confirmé la faible activité de déstabilisateur de la protéine AGO1 par la protéine P0 exprimée en contexte viral. Comme dans l'expérience présentée en figure I-13, un plasmide binaire pBinFlag-AGO1 est co-agroinfiltré avec pBinBWwt ou pBinCAwt, des

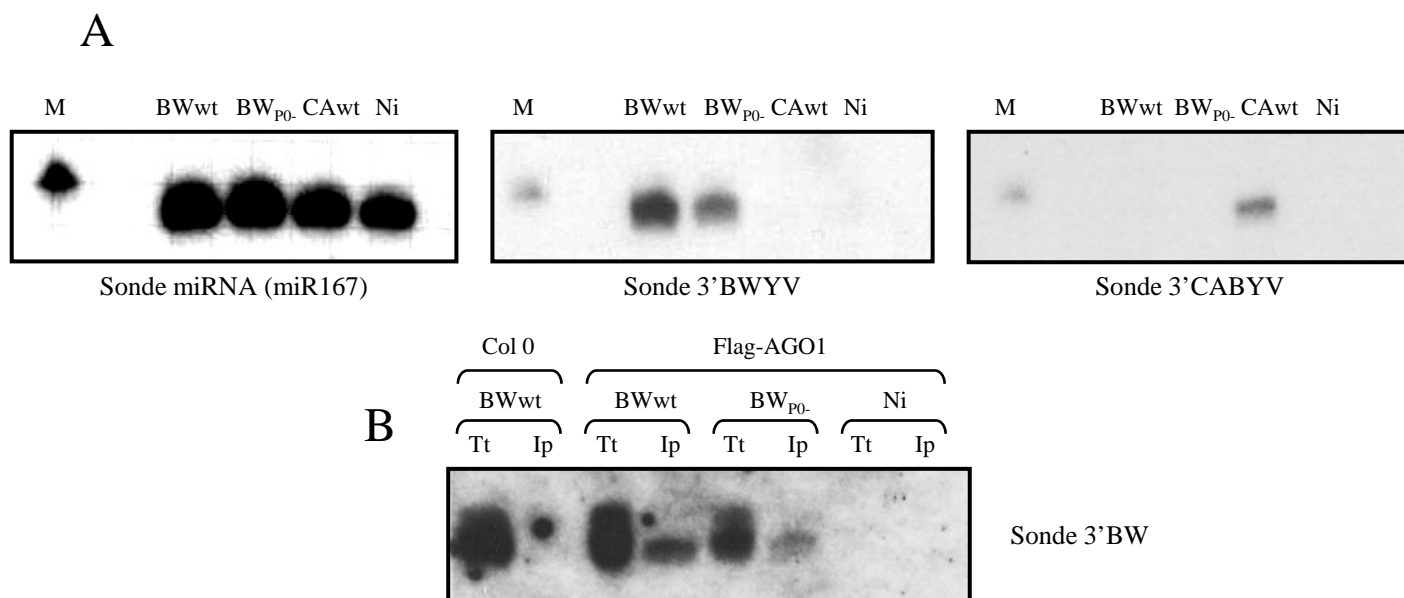


Figure I-16 : AGO1 prend en charge les viRNA dans les plantes Flag-AGO1 infectées

A) Northern blot réalisé sur les RNA extraits des protéines Flag-AGO1 immunoprécipitées (voir figure ci-dessus). Les trois hybridations ont été réalisées successivement sur la même membrane. B) Northern blot comparant les viRNA totaux des viRNA immunoprécipités avec Flag-AGO1. L'absence de viRNA après une immunoprécipitation anti Flag réalisée sur des plantes sauvages (Col 0) prouvent que les viRNA détectés en ligne Ip sont bien extraits d'AGO1. Tt : extraits de RNA totaux ; Ip : RNA obtenus à partir de protéines immunoprécipitées par l'anticorps anti-Flag ; M : marqueur DNA radioactif de 25 nucléotides.

plasmides portant la séquence complète du génome viral du BWYV et du CABYV, respectivement. Cette fois, les extraits sont réalisés à un stade très précoce de l'infection (5 jours après agro-infection), à partir des zones infiltrées dans lesquelles le virus est présent, en théorie, dans toutes les cellules. Les résultats de cette expérience, présentés en **figure I-15-C** montrent que la quantité de protéines P0 produite lors de l'infection est insuffisante pour qu'un effet déstabilisant total d'AGO1 soit visualisable par western blot. On peut toutefois noter une légère réduction de l'accumulation d'AGO1 en présence du BWwt, par rapport au témoin exprimant la protéine P38 qui n'a pas d'effet sur la stabilité d'AGO1.

Dans un deuxième temps, nous avons mis à profit l'infection de plantes Flag-AGO1 pour vérifier si la protéine AGO1 est en mesure de charger les siRNA d'origine virale. En effet, Baumberger et Baulcombe (2005) avaient alors mené le même type d'expérience sur le TCV, le CMV et le CrTMV mais n'était pas parvenu à démontrer le chargement d'AGO1 par des viRNA issus de ces virus, proposant que cette protéine n'est pas l'effecteur dans le complexe RISC antiviral.

Nous avons donc immunoprécipité la protéine Flag-AGO1 à partir des plants *d'Arabidopsis thaliana* infectés par le CABYV, le BWYV ou son mutant BW^{P0}. Les sRNA extraits à partir de ces immunoprécipitats ont été révélés par les northern blots présentés en **figure I-16**. Étonnamment, en plus des miRNA (miR167), nous avons détecté des viRNA spécifiques, aussi bien dans des plantes infectées par le BWYV que par le CABYV, prouvant qu'AGO1 est la protéine ARGONAUTE effectrice portant l'activité antivirale dirigée contre les poliovirus (ce qui n'avait encore été démontré pour aucun virus, au moment où ces expériences ont été réalisées). Ce résultat a été confirmé depuis pour d'autres virus, comme le CymRSV, un tombusvirus (Pantaleo *et al.*, 2007.).

Rappelons que le virus BW_{P0} s'accumule moins efficacement que le BWwt. On constate qu'il en est de même pour les quantités de viRNA immunoprécipités dans AGO1 à partir de plantes infectées par ces virus. Ainsi, il semblerait que la protéine P0 n'inhibe pas le chargement des protéines AGO1 par les siRNA viraux. Mais à ce stade de nos expériences, nous ignorons si les viRNA immunoprécipités et détectés proviennent de cellules infectées ou de cellules environnantes. En effet, les viRNA chargés par AGO1 pourraient être le signal du RNA silencing circulant à courte distance. Ainsi, dans les cellules infectées, P0 préviendrait la dégradation du génome viral induite par AGO1. Par contre, P0 n'affecte pas l'activité Dicer, des viRNA primaires sont donc produits et pourraient circuler de cellule à cellule, dans la limite d'une quinzaine de cellules, à compter de la cellule phloémienne infectée. Dans ces cellules

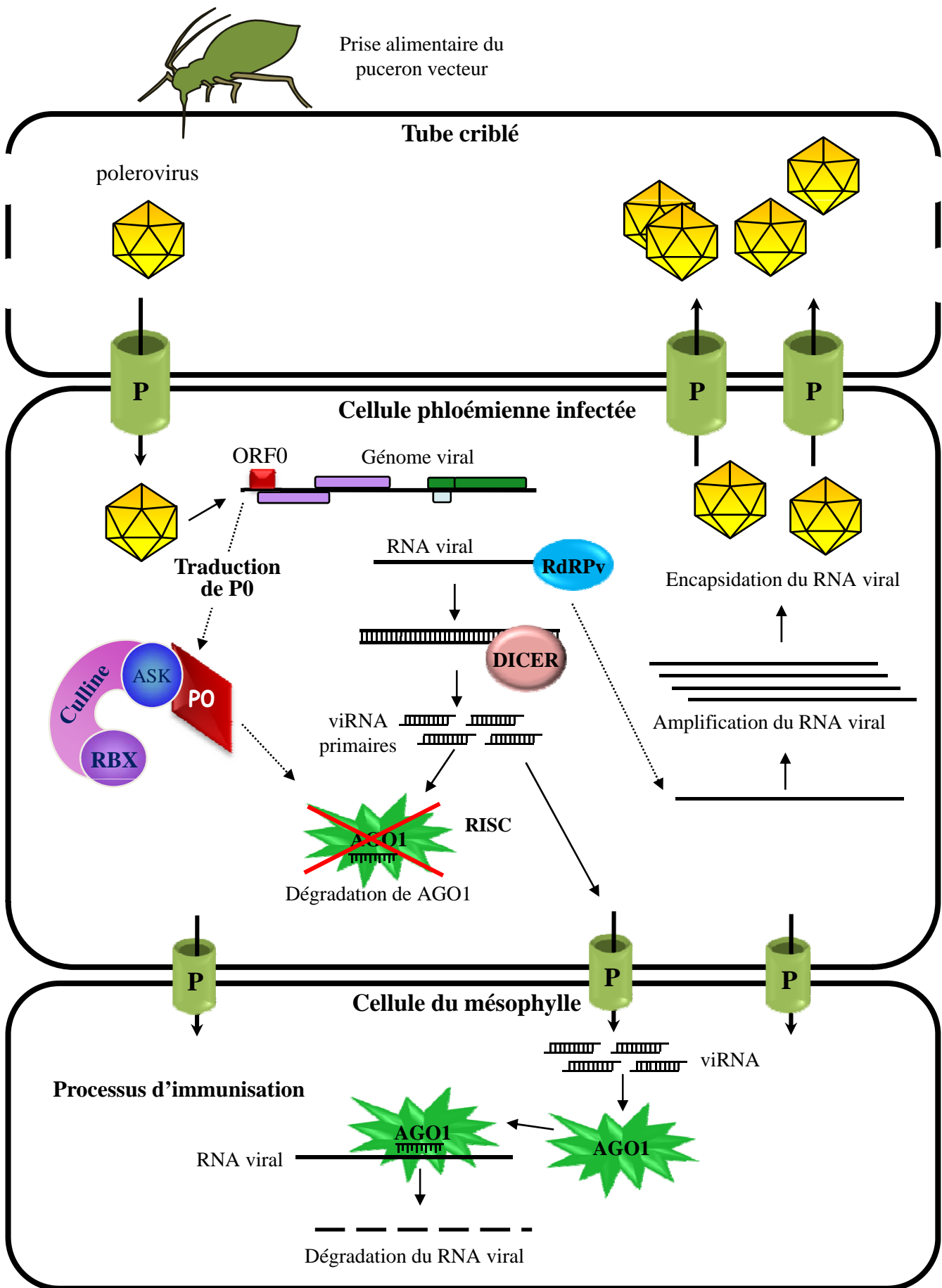


Figure I-17 : Modèle pour le mode d'action de P0 pendant l'infection virale
P : plasmodesme.

adjacentes, la protéine AGO1, dont l'intégrité ne pourrait pas être affectée par P0, prendrait en charge les viRNA, immunisant ainsi ces cellules contre l'entrée ultérieure de virus, ce qui pourrait, au moins partiellement, expliquer le tropisme phloémien des polerovirus. Cette hypothèse ouvre un nouvel axe de recherche concernant les polerovirus qui fait l'objet du deuxième chapitre de ce manuscrit.

7) Conclusions, discussion et perspectives

L'ensemble de ces données nous permettent de proposer un modèle illustrant le mode d'action de P0 pendant l'infection virale (voir **figure I-17**) :

Dans un premier temps, le virus pénètre dans la plante par le biais de son puceron vecteur qui l'introduit directement dans les tubes criblés des vaisseaux conducteurs. Le virion entre alors dans une cellule nucléée du phloème, une cellule compagne, où il est décapsidé. Les gènes précoces codant pour la protéine P0 et la RdRP virale peuvent être exprimés. La réplication du RNA génomique et/ou, la formation de structures secondaires en tige-boucle, forment un RNA double brin reconnu par une enzyme DICER qui le clive en viRNA. La protéine P0 induit la dégradation protéasome-dépendante d'AGO1, ce qui bloque l'étape de clivage et celles situées en aval dans la voie du RNA silencing antiviral. Les viRNA produits ne servent donc plus à la dégradation du RNA viral simple brin mais pourraient transiter dans les cellules voisines où ils sont pris en charge par la protéine AGO1, probablement au sein d'un complexe effecteur RISC. Si un virus apparenté entre dans ces cellules immunisées sous forme de complexe ribonucléoprotéique, à l'image du mouvement de cellule à cellule du TMV, il est rapidement dégradé par l'arsenal des complexes RISC chargés. Dans la cellule infectée, le virus s'encapside et peut ainsi traverser les plasmodesmes branchés pour atteindre les tubes criblés à partir desquels il va pouvoir établir une infection systémique dans les parties plus distales de la plante.

De nombreux points concernant le mode d'action de P0 doivent encore être éclaircis. Par exemple, si l'on sait, grâce aux travaux de Baumberger *et al.* (2007) que le domaine de la protéine AGO1 nécessaire à la dégradation induite par P0 comprend à la fois le domaine PAZ et une partie de la portion N-terminale de la protéine, on ignore quelle partie de la protéine P0 interagit avec AGO1. Des études de mutagenèse dirigée sur P0 sont en cours et devraient permettre d'identifier un motif nécessaire à cette protéine à F-box pour interagir avec sa cible.

Il est également envisageable que P0 soit capable d'induire la dégradation d'autres protéines. En effet, le domaine PAZ d'AGO1 est retrouvé dans l'ensemble des membres de la famille ARGONAUTE et chez les protéines DICER. A la vue de nos résultats, il semble néanmoins peu probable que P0 déstabilise une enzyme DICER puisque la production de sRNA n'est pas perturbée en présence de P0. Par contre, l'impossibilité d'obtenir des plantes exprimant P0 constitutivement, alors que des mutants « knock out » *ago1* sont stériles, mais viables, suggère que P0 a un spectre d'action plus large dans la plante que la seule dégradation d'AGO1. Il est possible que dans le mutant *ago1*, les autres membres de cette famille agissent de manière partiellement redondante, permettant ainsi la survie de la plante. La présence de P0 pourrait, quant à elle, conduire à la dégradation de toutes ou plusieurs des protéines AGO, empêchant cette redondance. Cette hypothèse est appuyée par des expériences de N. Baumberger qui montrent que P0 induit la dégradation de plusieurs autres protéines AGO, à savoir AGO2, AGO5, AGO6 et AGO9 (Baumberger *et al.*, 2007).

Julia De Cillia, au laboratoire, s'intéresse à la localisation subcellulaire des protéines P0 du CABYV et du BWYV. Elle a pu mettre en évidence la localisation nucléaire de ces deux protéines. De manière surprenante, ses résultats montrent des différences quant à leur localisation nucléolaire. Cette observation ouvre une voie intéressante d'étude du fonctionnement des différentes P0. C'est en effet la première expérience mettant en évidence une différence significative dans le comportement de nos deux protéines modèles, malgré leur faible homologie de séquence. Il semble donc intéressant de poursuivre dans cette voie et de comprendre si cette localisation nucléolaire est nécessaire à la fonction de P0, et dans ce cas, pourquoi l'un des deux virus ne l'a pas adoptée ; ou si au contraire, cette localisation est fortuite ou le signe d'une fonction antérieure de P0 perdue par le virus qui n'en possède plus l'utilité.

Un des points soulevés par l'étude du mode de fonctionnement de P0 est, à l'heure actuelle, toujours obscur. En effet, aucune preuve de l'implication, ou non, du protéasome dans la dégradation d'AGO1 induite par P0 n'a pu être apportée. Afin de répondre à cette question, nous allons mettre à profit une nouvelle génération de plantes transgéniques exprimant la protéine P0 sous une forme étiquetée (3xMyc). Ces plantes vont nous permettre d'isoler des protoplastes à partir desquels nous tenterons de nouvelles expériences de stabilisation d'AGO1 en présence de P0. Ces cellules dépourvues de paroi permettront ainsi une meilleure pénétration des inhibiteurs dans le milieu intracellulaire. L'utilisation d'un inhibiteur de protéasome à

l'action irréversible et ciblant les trois activités protéolytique du protéasome, comme les molécules AdaAhx₃L₃VS et AdaY-Ahx₃L₃VS (Altun, 2007), sera privilégiée.

Une approche d'isolement de complexes protéiques associés à P0 par immunoprécipitation est également envisagée en vue d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de la protéine P0, impliqués ou non dans le RNA silencing. Ces complexes pourraient potentiellement être stabilisés en présence d'inhibiteurs de protéasome

Résultats et Discussion

Chapitre II :

Approche génétique du tropisme phloémien des polerovirus

1) Problématique

La restriction au phloème de certains virus est un phénomène marginal parmi les phytovirus, mais l'étude des mécanismes menant à ce tropisme permettra d'aborder un champ d'interaction entre protéines virales et facteurs cellulaires encore très peu exploré. Chez les polerovirus, ce tropisme est loin d'être préjudiciable : il illustre une parfaite adaptation à la plante et à son mode de transmission. En effet, les polerovirus étant transmis par pucerons, la concentration des particules virales dans la sève élaborée augmente la probabilité d'acquisition par leur vecteur. D'autre part, nous avons vu qu'une expression trop forte de la protéine P0 dans l'ensemble des tissus met en danger la survie de la plante hôte, ce qui aurait une incidence négative sur la propagation du virus. Les virus étant des parasites obligatoires, la mort de leur hôte conduit généralement à la fin du cycle viral, leur transmission vers une plante saine par le biais de leur vecteur devenant impossible.

Les mécanismes ainsi que les facteurs, qu'ils soient viraux ou cellulaires, impliqués dans le tropisme phloémien des polerovirus, sont à ce jour inconnus. En effet, si le tropisme des virus animaux est très étudié, et résulte souvent de l'absence ou de la présence de récepteurs spécifique à la surface des cellules, peu d'études ont été menées dans le but de comprendre les mécanismes sélectionnant les tissus infectés par les phytovirus. Les begomovirus sont un genre modèle pour ce type d'analyse car malgré leur proximité génétique, certains d'entre eux comme le BGMV (Bean Golden Mosaic Virus) sont restreints au phloème alors que d'autres, comme le TGMV peuvent infecter l'ensemble des cellules de la plante. Par des expériences de mutagénèses croisées, Morra et Petty (2000) ont pu identifier sur le génome du TGMV (Tomato Golden Mosaic Virus) des régions intergéniques dont la séquence détermine le tropisme de ce virus. En réalité, ces séquences sont impliquées dans la régulation de la synthèse

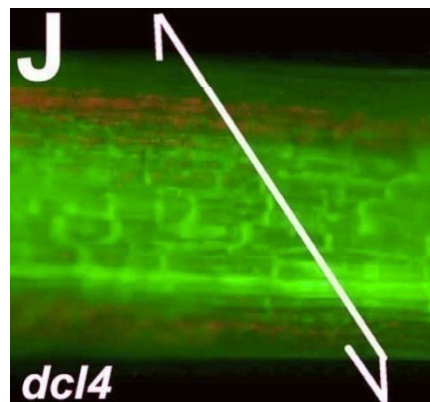
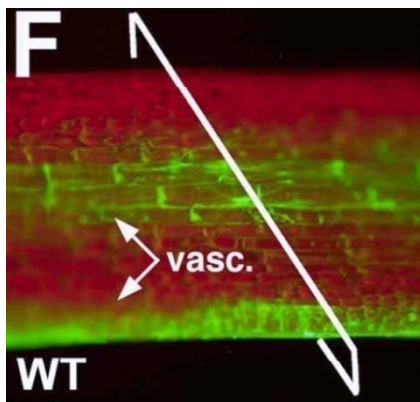
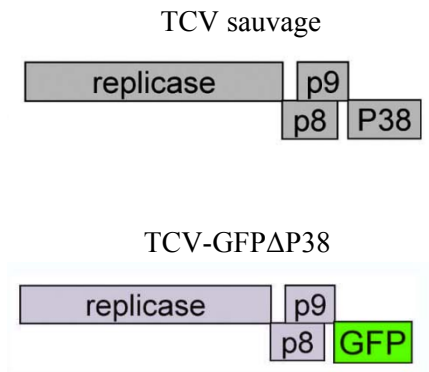


Figure II-1 : Les produits de DCL4 confinent le TCV dépourvu de suppresseur au système vasculaire (Deleris *et al.*, 2006)
 Plante sauvage (WT) ou mutant *dcl4* infectés par le TCV-GFPΔP38. Dans la plante sauvage, le virus, localisé par la fluorescence verte de la GFP, est restreint au système vasculaire (vasc.) de l'hôte. La mutation *dcl4* annule l'effet de l'absence du suppresseur P38 et restaure la capacité du TCV à infecter l'ensemble des cellules de la feuille ce qui suggère que les produits de DCL4 sont responsables du tropisme vasculaire du TCV-GFPΔP38.

des protéines de mouvement virales, le tropisme phloémien de certains begomovirus est donc probablement dû à un défaut d'expression de ces protéines (Qin et Petty, 2001).

Des expériences de co-infection ont montré que certains virus comme le PVY pouvaient compléter une fonction déficiente chez un polerovirus, le PLRV et promouvoir sa sortie des cellules phloémienne (Barker, 1987). Il a donc été proposé que la fonction déficiente soit due à une incapacité de la protéine de mouvement à assurer le transport du génome viral vers les autres cellules. Or, on sait maintenant que la protéine P4 du PLRV (et donc, potentiellement, celles des autres polerovirus) possède les caractéristiques des protéines classiquement impliquées dans le mouvement de cellule à cellule comme la localisation aux plasmodesmes et la fixation d'acides nucléiques.



















Une autre hypothèse a été émise ultérieurement, celle de l'incapacité des polerovirus à supprimer le RNA silencing dans les tissus non vasculaires (Voinnet *et al.*, 1999). Ce chapitre est consacré à l'étude de cette problématique par une approche génétique dans *Arabidopsis thaliana*, permise par les avancées dans la recherche sur le mécanisme de RNA silencing et les outils nouvellement disponibles.

2) Les produits de DICER sont-ils responsables du tropisme des polerovirus ?

2-1) Initiation du projet de recherche

La mise en évidence de viRNA chargés par AGO1, dans les plantes infectées par le BWYV et ce, malgré la présence de P0 (voir premier chapitre, figure I-15), suggère, soit que la dégradation d'AGO1 n'est pas complète dans les cellules infectées, soit que les viRNA sont capables de transiter dans les cellules voisines saines. Dans la deuxième hypothèse, ces viRNA, une fois chargés dans AGO1 pourraient prévenir l'entrée du RNA viral non encapsidé dans les cellules jouxtant le site d'infection. Mutterer *et al.* (1999) ont décrit la présence de particules virales dans les plasmodesmes reliant les tubes criblés aux cellules compagnes, il est donc fort probable que le virus transite entre les cellules phloémiennes sous sa forme encapsidée et serait ainsi protégé d'une action de dégradation de son RNA génomique. Par contre, le passage sous une forme de complexe ribonucléoprotéique exposerait le RNA viral à la destruction par la voie du RNA silencing dès son entrée dans une cellule non phloémienne.

Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Deleris *et al.* (2006). Leurs expériences utilisent le TCV, le virus encodant le suppresseur de RNA silencing P38 (voir **figure II-1**).

| | Ni | BWYV | BW _{P0} - |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Col 0 |  |  |  |
| <i>dcl2</i> |  |  |  |
| <i>dcl3</i> |  |  |  |
| <i>dcl4</i> |  |  |  |
| <i>dcl2/dcl3</i> |  |  |  |
| <i>dcl3/dcl4</i> |  |  |  |

Voir page d'en face pour légende

Cette protéine est capable d'inhiber spécifiquement l'activité de DCL4 lors d'une infection sur *A. thaliana*. Deleris *et al.* ont créé une version mutante du virus où le gène codant pour la protéine P38 a été remplacée par celui de la protéine GFP (TCV-GFPΔP38). Lors de l'infection de plantes sauvages par ce virus recombinant, la fluorescence de la GFP n'est visible que dans le système vasculaire de l'hôte. Ceci montre donc que contrairement au TCV sauvage, le virus TCV-GFPΔP38 est restreint au phloème. Par contre, lorsque ce virus est inoculé à un mutant *dcl4*, le virus est capable d'envahir l'ensemble des cellules du parenchyme du pétiole, puis du mésophylle (voir **figure II-1**). L'absence de P38 est donc compensée par l'inactivation de DCL4. Il semble donc clair, dans ce cas, que les produits de DCL4 empêchent le déchargement du virus dans les cellules du mésophylle lors de l'infection systémique.

2-2) Infection de mutants *dcl*

a) Analyse phénotypique

Afin de tester notre hypothèse, une première étape a été d'infecter, par le BWYV et le mutant n'exprimant pas la protéine P0 (BW_{P0}-), l'ensemble des combinaisons de mutants *dcl* d'*A. thaliana* disponibles au laboratoire, à l'exception des mutants *dcl1*, car leur morphologie fortement affectée rend l'agro-infiltration difficile. De plus, DCL1 n'a jamais été précisément identifiée comme étant impliquée dans le RNA silencing antiviral dirigé contre les virus à RNA, il semblait donc, *a priori*, peu probable que cette enzyme participe activement à la synthèse des viRNA issus des poliovirus.

Arabidopsis thaliana est une plante hôte pour le BWYV, c'est-à-dire que le virus peut s'y multiplier, infecter la plante de manière systémique et être transmis à d'autres plantes par l'intermédiaire de pucerons vecteurs. Par contre, la plante infectée ne montre aucun symptôme caractéristique de virose, mis à part un léger retard de croissance. Cet effet n'est pas observable en **figure II-2** (première ligne) en raison de la précocité des prises de vue. En effet, les analyses réalisées sur des plantes infectées par un poliovirus sont généralement pratiquées après trois

Figure II-2 : infection de mutants *dcl* par le BWYV et le BW_{P0}.

L'infection de plants sauvages d'*Arabidopsis thaliana* (ecotype columbia : Col 0) par un virus exprimant ou non la protéine P0 (BWYV ou BW_{P0}-, respectivement) ne permet pas l'apparition de symptômes, malgré la multiplication virale. De même, aucune différence phénotypique significative n'est observée après infection des différents mutants *dcl* présentés ici. (Ni : non infectée). Les photographies ont été prises 14 jours après agro-infection.

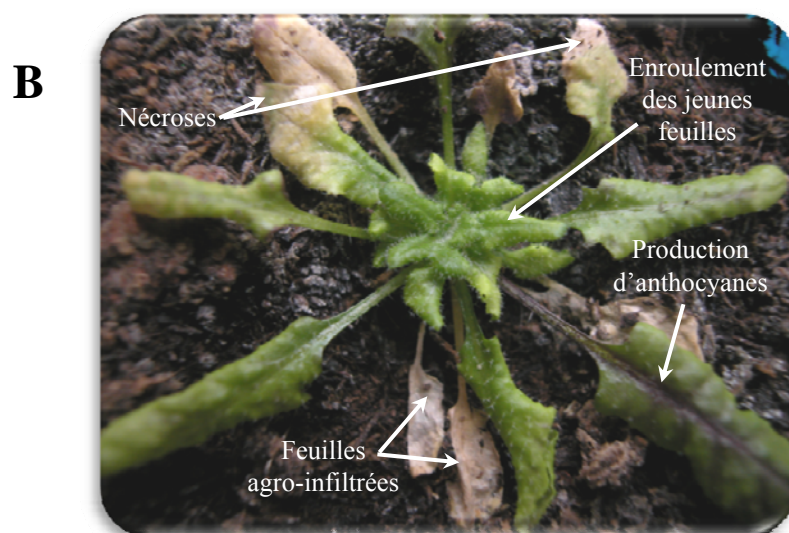


Figure II-3 : infection de mutants *dcl* par le BWYV et le BW_{P0-}.

A) Le double mutant *dcl2/dcl4* et le triple mutant *dcl2/dcl3/dcl4* ne présentent aucune altération développementale. Il sont par contre très sensibles à l'infection par le BWYV. Les feuilles s'étant formées après infection sont fortement déformées, elles s'enroulent et sont très cassantes. Les feuilles âgées s'enroulent et présentent des lésions nécrotiques qui s'étendent jusqu'à couvrir l'intégralité de la feuille. Les symptômes observés sont les mêmes, que le virus utilisé exprime (BWYV) ou non (BW_{P0-}) la protéine P0. Les photos ont été prises 14 jours après agro-infection. (Ni : non infectée ; Col 0 : *Arabidopsis thaliana* écotype columbia 0). B) Mutant *dcl2/dcl4*, 22 jours après infection par le BWYV.

semaines d'infection, au minimum, afin d'obtenir un titre viral important. Dans les expériences décrites ici, les tests sont effectués dès 14 jours après infection pour des raisons exposées par la suite. La **figure II-2** présente les simples mutants *dcl2*, *dcl3* et *dcl4* ainsi que les doubles mutants *dcl2/dcl3* et *dcl3/dcl4* infectés par le BWYV et le mutant BW_{P0}. On constate qu'aucun de ces mutants n'est fortement affecté par l'infection, ils ne semblent donc, *a priori*, pas plus sensibles aux polerovirus qu'une plante sauvage. Le jaunissement et la mort prématurée des feuilles basales sont dus à l'agro-infiltration. On peut tout de même noter un effet modéré de l'infection sur le mutant *dcl4*. Le léger enroulement des feuilles observé ici n'est néanmoins pas présent sur tous les mutants *dcl4* infectés. On peut d'ailleurs l'observer occasionnellement sur des plantes saines. Si DCL4 est l'enzyme DCL majeure dans la voie du RNA silencing antiviral, cette protéine est également impliquée dans la biosynthèse des tasiRNA (voir introduction, paragraphe II-2-1, b). Il est donc possible que la mutation *dcl4* induise ce phénotype indépendamment de l'infection virale.

En **figure II-3** sont présentés les mutants *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4* infectés par le BWYV. Ces mutants n'expriment donc ni DCL4, l'enzyme DICER possédant l'action antivirale principale, ni DCL2, l'enzyme connue pour agir lorsque DCL4 est inactivée (Deleris *et al.*, 2006). Contrairement aux autres mutants testés, ces deux mutants exhibent d'importants symptômes en réponse à l'infection virale. Les feuilles formées après l'agro-infection s'enroulent sur elles-mêmes de manière abaxiale et sont extrêmement cassantes. Les feuilles plus âgées, quant à elles, subissent, en plus de l'enroulement, des nécroses précoces. La coloration violacée des nervures des feuilles de ces mutants infectés, apparaissant à un stade plus tardif de l'infection, indique la synthèse d'anthocyanes⁶. Au final, les plantes ne survivent guère plus d'un mois.

D'un point de vue macroscopique, nous n'observons aucune différence entre un mutant *dcl2/dcl4* et un mutant *dcl2/dcl3/dcl4*. De plus, les simple ou doubles mutants déficients pour l'activité DCL3 ne sont pas affectés par l'infection par le BWYV. Il semblerait donc que DCL3 n'ait pas de fonction antivirale importante contre les polerovirus, contrairement à DCL4 et DCL2. Nous pouvons également noter que l'absence d'expression de P0 (mutant BW_{P0}) ne diminue pas les symptômes provoqués sur les mutants *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4*. La protéine P0 n'est donc pas responsable de ces symptômes, et ce malgré son rôle de facteur de pathogénicité capable de provoquer, lors d'une expression hétérologue (à partir d'un vecteur

⁶ Polyphénols impliqués notamment dans les mécanismes de défense des plantes

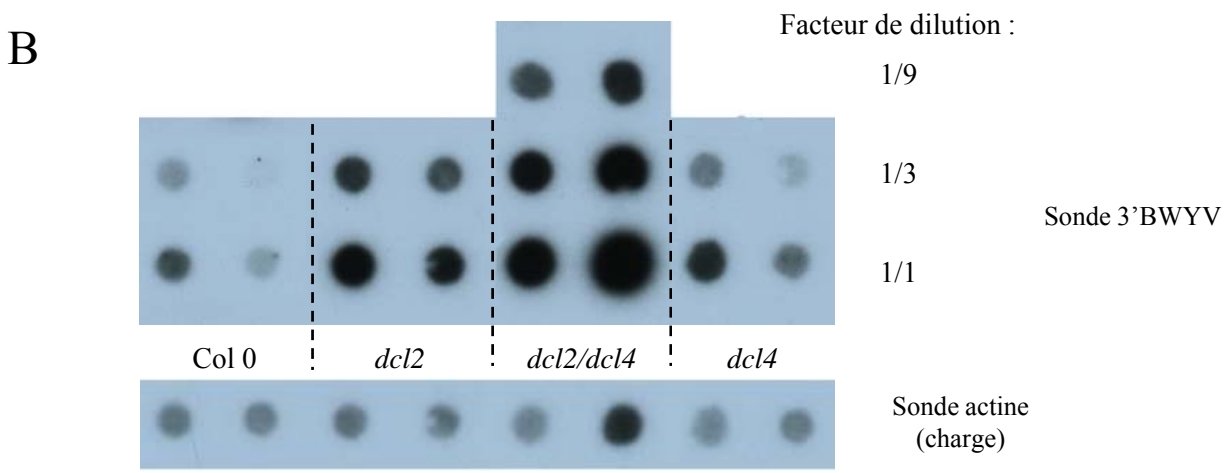
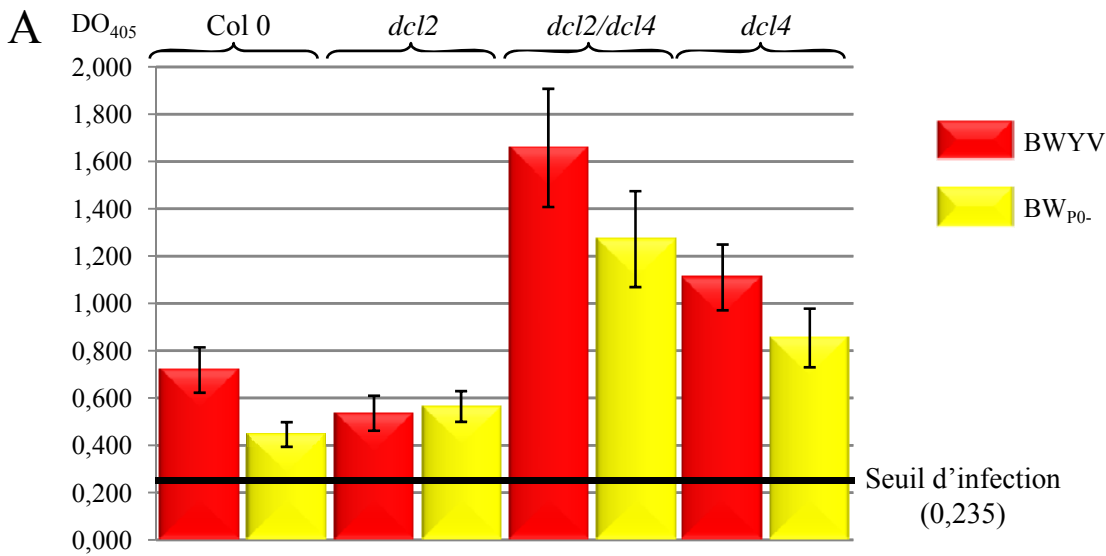


Figure II-4 : quantification de l'accumulation de virus dans les mutants *dcl*

A) Test ELISA réalisé sur des plantes infectées depuis 17 jours. On note une forte accumulation des protéines du BWYV dans le double mutant *dcl2/dcl4*. Le virus BW_{p0} produit moins de protéines mais des différences comparables sont observées dans toutes les plantes testées, P0 ne semble donc pas avoir d'influence sur la suraccumulation de protéines virales dans le mutant *dcl2/dcl4*. Les moyennes et leur écart type sont calculés à partir des données obtenues par l'analyse de 10 plantes (seules les plantes dont le titre viral était supérieur au seuil d'infection ont été considérées).

B) Dot blot réalisé sur RNA extraits de plantes infectées par le BWYV depuis 27 jours. Les extraits ont été déposés concentrés ou dilués trois ou neuf fois. On constate une forte accumulation de RNA viral dans le double mutant *dcl2/dcl4* (environ dix fois supérieure à celle observée dans les plantes Col 0). Deux plantes (une plante par colonne) ont été testées pour chaque mutant.

viral ou dans des plantes transgéniques), des altérations importantes du développement foliaire comparables à ceux observés ici.

b) Analyse du titre en virus

Dans un premier temps, nous avons vérifié si l'apparition des symptômes sévères sur les plantes mutées dans les gènes *DCL* portant une activité antivirale (*DCL4* et *DCL2*) était corrélée à une augmentation du titre en virus.

Nous avons tout d'abord analysé les plantes inoculées par un test ELISA qui permet une quantification relative des protéines structurales du virus grâce à l'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre des particules purifiées (voir **figure II-4-A**). Les résultats montrent une forte accumulation des protéines virales dans les doubles mutants *dcl2/dcl4* (différence d'environ une unité logarithmique, par rapport aux plantes Col 0). En ce qui concerne le mutant *dcl4*, la suraccumulation des protéines virales est nettement visible dans cette expérience (tout en restant inférieure à celle observée pour le double mutant), mais n'est pas systématiquement reproduite. La simple mutation *dcl2* ne semble pas avoir d'influence sur le titre viral. On constate également que le titre de virus diminue en l'absence de P0 (mutant BW_{P0}). Cependant, cette diminution est globalement conservée, quelque soit le fond génétique des plantes infectées (Col 0 ou mutants *dcl*), ce qui confirme que la protéine P0 n'a pas d'influence sur les phénomènes observés dans ces mutants.

La variation du titre en virus a également été analysée par dot blot. Cette technique permet d'évaluer aisément les quantités de RNA viral par rapport à une référence (ici, le RNA viral extrait d'une plante sauvage) grâce à des dilutions en cascade (voir **figure II-4-B**). L'expérience montre que la quantité de RNA viral extrait du mutant *dcl2/dcl4* infectée par le virus sauvage est environ dix fois supérieure à celle extraite d'une plante Col 0 (*A. thaliana* écotype Columbia 0). On peut également noter un effet dans le cas des simples mutants *dcl2* et *dcl4* analysés ici, néanmoins, l'accumulation de RNA viral y est environ trois fois moins forte que dans le double mutant. De plus, la différence entre le mutant *dcl2* et le mutant *dcl4* ne semble pas significative, ce qui suggère, comme dans le cas du TCV, que la redondance de fonction entre les enzymes DCL4 et DCL2 est également efficace dans le contrôle de l'infection par les polerovirus.

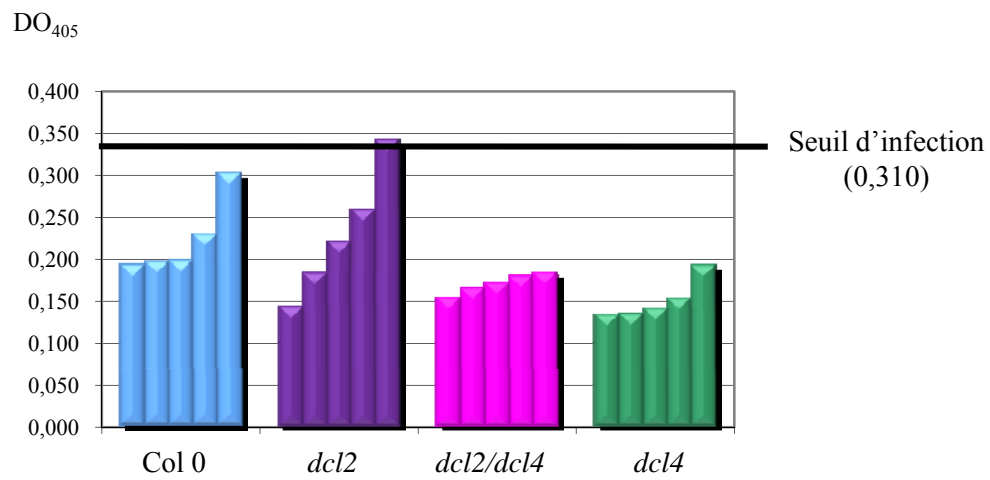


Figure II-5 : test ELISA sur des inoculées mécaniquement par des transcrits *in vitro*

Les extractions sont réalisées sur les feuilles inoculées 25 jours après traitement. Chaque barre correspond au titre viral d'une plante. Les résultats obtenus étant très proches du seuil d'infection, aucune des plantes testées ici ne peut être considérée comme infectée.

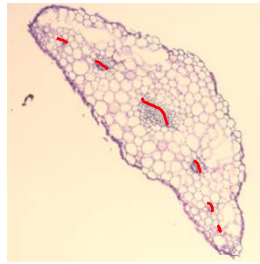
c) Inoculation mécanique

Si notre hypothèse de prémunition par les viRNA se confirmait, le BWYV devrait pouvoir sortir du phloème et étendre sa zone d'infection à l'ensemble de la plante dans les doubles mutants *dcl2/dcl4*. Ainsi, il devrait être possible d'infecter ces mutants par inoculation mécanique de transcrits viraux. En effet, il a été montré que la co-infection du PLRV et de certains umbravirus (le PEMV-2 ou encore, le GRV) permet l'invasion des cellules du mésophylle par le PLRV. Cette co-infection est également responsable, dans certains cas, de la transmission des polerovirus par inoculation mécanique (Ryabov *et al.*, 2001). Nous avons donc tenté d'inoculer le BWYV mécaniquement à l'aide de transcrits synthétisés *in vitro* (infectieux dans les protoplastes). Comme le montre la **figure II-5**, nous n'avons pas réussi à inoculer efficacement le BWYV aux doubles mutants *dcl2/dcl4*, qui sont d'ailleurs restés asymptomatiques. Il est possible que la légère augmentation du titre en virus observé sur quelques plantes soit due à la multiplication du virus dans des cellules isolées.

Dans le cas des expériences citées précédemment, les inoculations ont été réalisées avec des particules virales purifiées à partir de plantes infectées. Notre inaptitude à initier l'infection par le BWYV par inoculation mécanique sur les doubles mutants *dcl2/dcl4* pourrait s'expliquer (outre que par le fait que cette double mutation ne soit pas suffisante pour permettre la circulation du BWYV entre les cellules du mésophylle) par l'utilisation de RNA nus, qui sont vraisemblablement plus sensibles aux systèmes de défense des plantes mis en place à la surface de la feuille que des RNA viraux protégés au sein de leur capsid.

2-3) Localisation tissulaire du BWYV dans les mutants *dcl*

L'augmentation particulièrement remarquable de la quantité de virus dans les plantes mutantes *dcl2/dcl4* peut être due, soit à une multiplication accrue dans les cellules normalement infectées, soit à un élargissement du nombre de cellules contaminées par le virus. Cette deuxième possibilité est particulièrement intéressante à évaluer puisqu'elle est en parfait accord avec notre hypothèse initiale. En effet, dans les plantes mutées dans les gènes *DCL2* et *DCL4*, le virus ne subirait plus le processus d'immunisation mis en place dans les cellules par l'intermédiaire des viRNA, et pourrait s'évader hors du système vasculaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons voulu localiser les sites d'infection dans les plantes mutées dans gènes codant pour les protéines DCL. Différentes techniques ont été mises en œuvre.



Coloration d'une coupe de pétiole au bleu de toluidine

— Cellules du système vasculaire

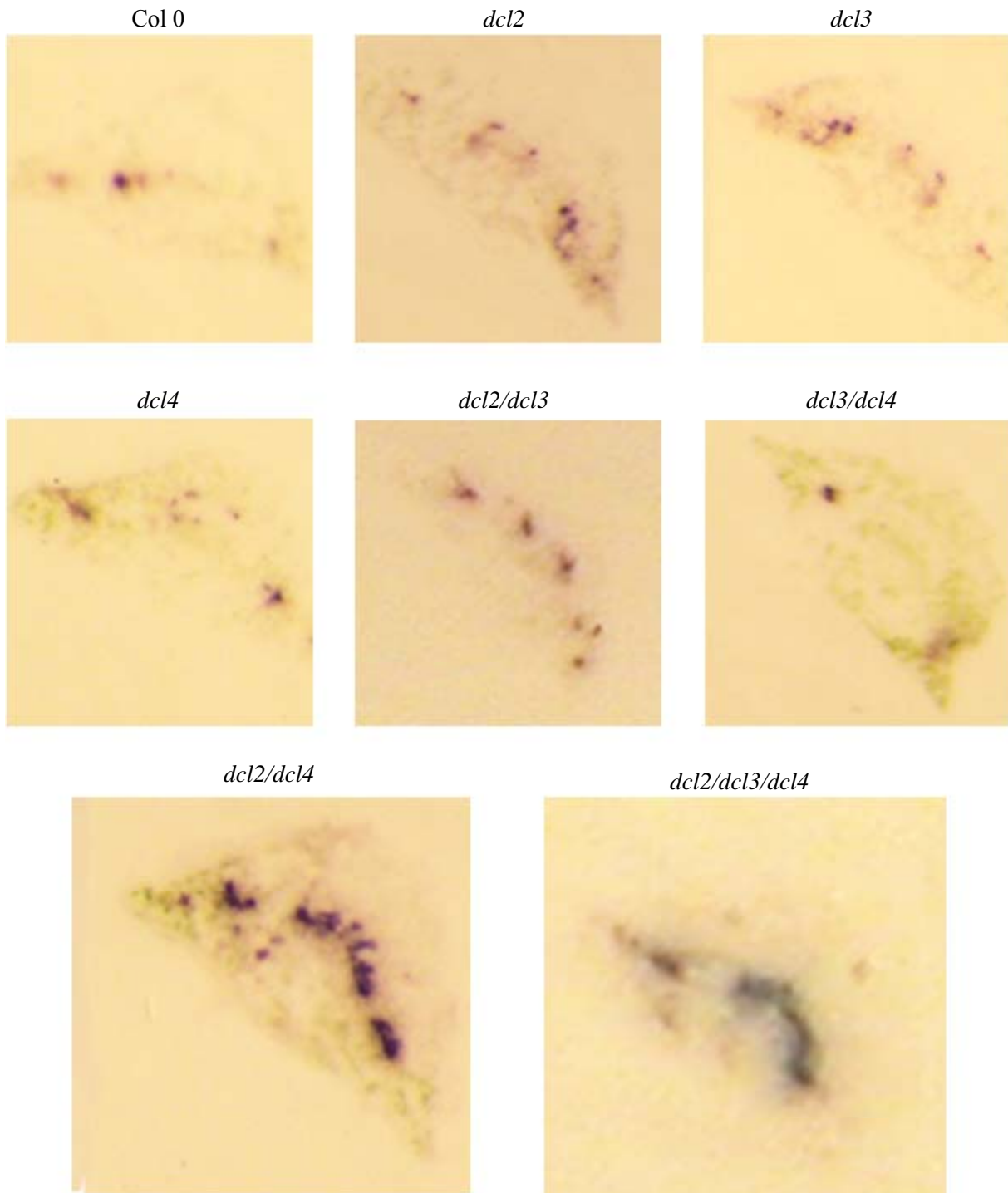


Figure II-6: immunomarquage d'empreintes de pétioles de plantes infectées

Les anticorps utilisés sont dirigés contre la protéine mineure de capsid (RT) du BWYV. Dans la plante sauvage comme dans chacun des mutant, le marquage (coloration violacée) est localisé dans le système vasculaire. On peut noter que le nombre de faisceaux vasculaires contenant des protéines virales est largement augmenté dans les mutants *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4*. En haut, une coupe de pétiole colorée au bleu de toluidine permet de localiser les cellules du système vasculaire.

a) Immunolocalisation sur des empreintes de pétioles

Cette technique extrêmement aisée à mettre en place (elle ne nécessite ni fixation, ni inclusion, ni coupe et est réalisée directement à partir de matériel végétal frais) offre des images peu résolutive, mais cependant interprétables. Nous avons pu ainsi analyser l'ensemble des mutants *dcl* infectés. Les feuilles des plantes infectées sont coupées à leur base, au niveau du pétiole, et la section est directement appliquée sur une membrane de nitrocellulose, permettant le dépôt de sève mais aussi d'éléments intracellulaires issus des cellules coupées. Les protéines restent fixées sur la membrane et sont révélées par coloration enzymatique au NBT-BCIP, après immunomarquage avec un anticorps dirigé contre la protéine mineure de capsid (RT) du BWYV.

La **figure II-6** montre un échantillonnage représentatif des empreintes de pétioles de l'ensemble des mutants testés. Ainsi, on constate que le marquage de la protéine de readthrough est exclusivement localisé dans les veines de la plante sauvage (Col 0). Le nombre de faisceaux vasculaires contenant des particules virales semble légèrement supérieur dans les mutants *dcl2*, *dcl3*, *dcl4* et *dcl2/dcl3*, mais aucune coloration n'est visible en dehors du système vasculaire. Le mutant *dcl3/dcl4* présente, quant à lui, un profil comparable à celui d'une plante Col 0.

Si la coloration due à la production d'anthocyanes dans les mutants *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4* se confond quelque peu avec la couleur du produit utilisé pour révéler la présence des anticorps, il semble clair que la très grande majorité, sinon la totalité du virus reste confiné au système vasculaire dans ces mutants également. On peut par contre aisément remarquer que le nombre de faisceaux infectés dans les mutants *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4* est largement augmenté, ce qui peut expliquer l'accroissement du titre viral constatée d'après le test ELISA. Un résultat étrangement reproductible est l'obtention d'immuno-empreintes « floues » pour le triple mutant *dcl2/dcl3/dcl4*. Cet effet pourrait être la conséquence d'une « lyse » cellulaire plus importante ici que dans un double mutant *dcl2/dcl4*. L'analyse de ces mutants en microscopie électronique pourrait permettre d'expliquer ce phénomène.

b) Immunolocalisation *in situ*

Afin d'obtenir des images plus résolutive et de déterminer si le BWYV est capable de quitter les cellules phloémiennes dans un mutant *dcl2/dcl4*, nous avons expérimenté la localisation du virus par détection immunologique sur coupes. Pour ce faire, nous avons fixé

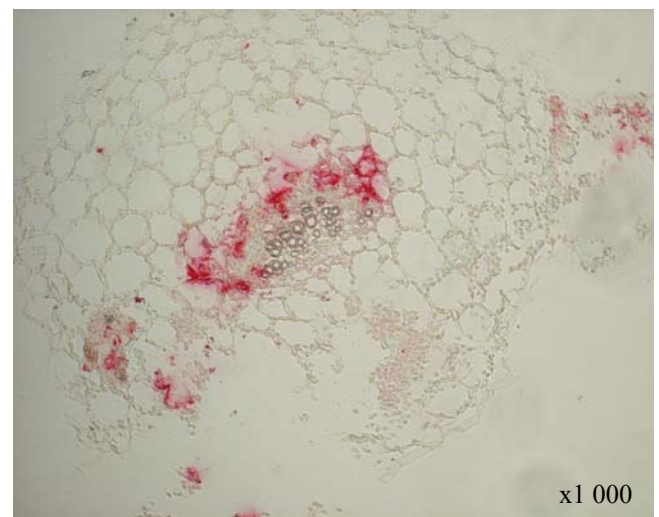
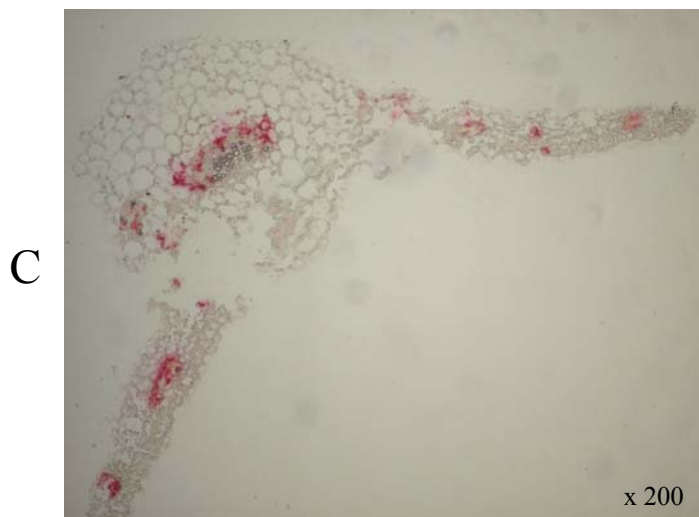
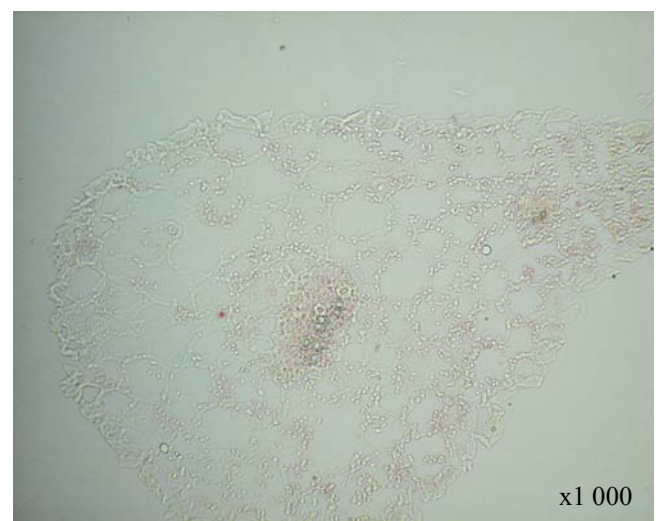
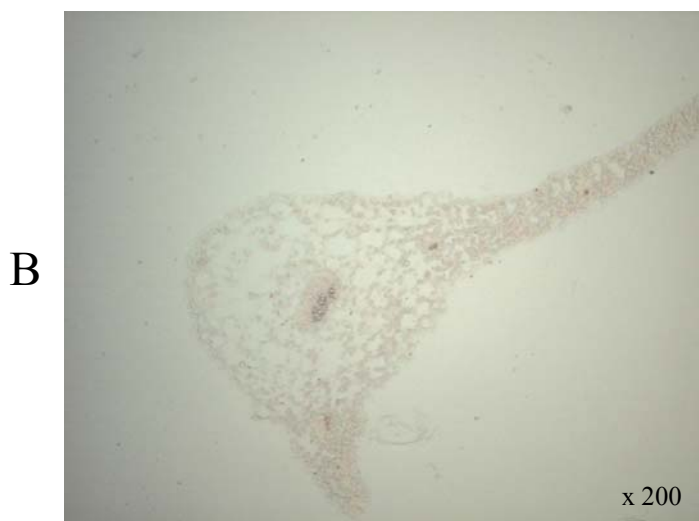
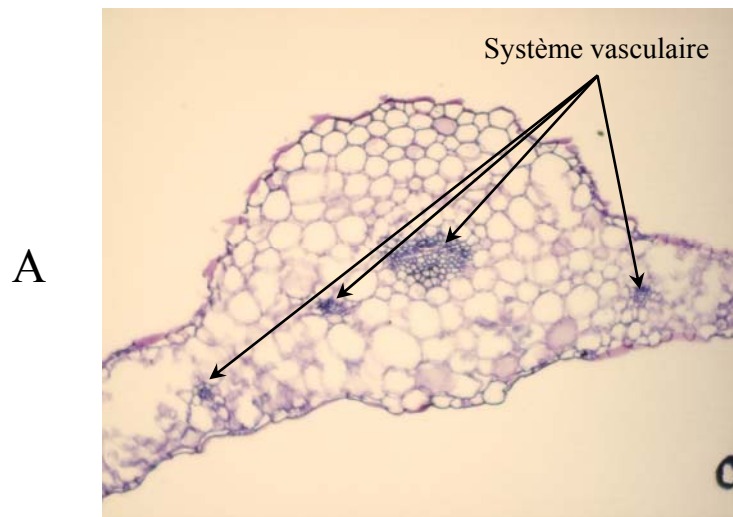


Figure II-7 : immunolocalisation du BWYV sur coupes minces

A) Coloration au bleu de toluidine d'une coupe de feuille issue d'un plant d'*A. thaliana* sain. B) et C) Immunolocalisation de la protéine mineure de capsid (RT) sur des coupes de feuilles infectées issues d'une plante sauvage (B) ou d'un mutant *dcl2/dcl4* (C). La coloration rouge traduit une forte accumulation des protéines virales dans ou à proximité du réseau vasculaire des plantes *dcl2/dcl4*. L'absence de marquage sur les plantes sauvages infectées (détectées positives par test ELISA) indique probablement que le seuil de détection dans ce système n'est pas atteint. Les échantillons de feuilles ont été prélevés 19 jours après agroinoculation.

des échantillons de jeunes feuilles de plantes sauvages et de mutants *dcl2/dcl4* infectées par le BWYV sauvage (BWwt) ou le BW_{P0}-. Les échantillons, inclus dans de la paraffine, sont coupés transversalement puis les coupes sont montées sur des lames afin de localiser les particules virales dans le limbe et le pétiole de la feuille, à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine mineure de capsid. Les résultats de ces expériences, présentés en **figure II-7-C** pour le BWwt, montrent une coloration très intense sur les plantes *dcl2/dcl4* révélant la présence des particules virales majoritairement localisées au niveau de faisceaux vasculaires. Les mêmes observations ont pu être réalisées sur les plantes infectées par BW_{P0}-, avec une intensité de coloration moindre (résultats non présentés).

Malheureusement, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la présence de protéines virales dans les plantes Col 0, pourtant identifiées comme infectées par un test ELISA préalable (voir **figure II-7-B**). L'absence de marquage franc dans ces plantes sauvages pourrait être due à une quantité trop faible ou irrégulière de virus, notamment en raison de la précocité du prélèvement des échantillons nécessaire dans le cas des doubles mutants très affectés. On peut donc également craindre que l'éventuelle présence des virions en faible nombre ne soit pas détectée par cette méthode dans les tissus non vasculaires sur les mutants *dcl2/dcl4*. De plus, il faut remarquer que l'analyse des mutants *dcl2/dcl4* par cette méthode est très délicate en raison de la sévérité des symptômes de virose : les feuilles devenues très cassantes, il est difficile d'obtenir des coupes suffisamment intègres pour qu'elles puissent être utilisées en immunomarquage. Ainsi, le nombre d'échantillons testés est très réduit.

L'absence de témoins positifs satisfaisants et un seuil de détection antigénique potentiellement trop bas nous a donc conduits à utiliser une troisième technique de localisation du virus avant de pouvoir conclure quant à une éventuelle sortie des cellules phloémiennes du BWYV.

c) Localisation des particules virales par microscopie électronique

Ce travail, réalisé en grande partie par Mathieu Erhardt, responsable de la plateforme de microscopie électronique, a eu pour but de localiser les particules virales dans les tissus infectés, d'identifier le type de cellules virosées et de caractériser les sites d'accumulation des virions au sein des cellules. Les observations sont réalisées sur des plantes Col 0 ou des mutants *dcl2/dcl4* infectés par le BWYV depuis 22 jours. Les échantillons analysés sont des coupes de pétioles inclus dans une résine époxy EPON après fixation au glutaraldéhyde,

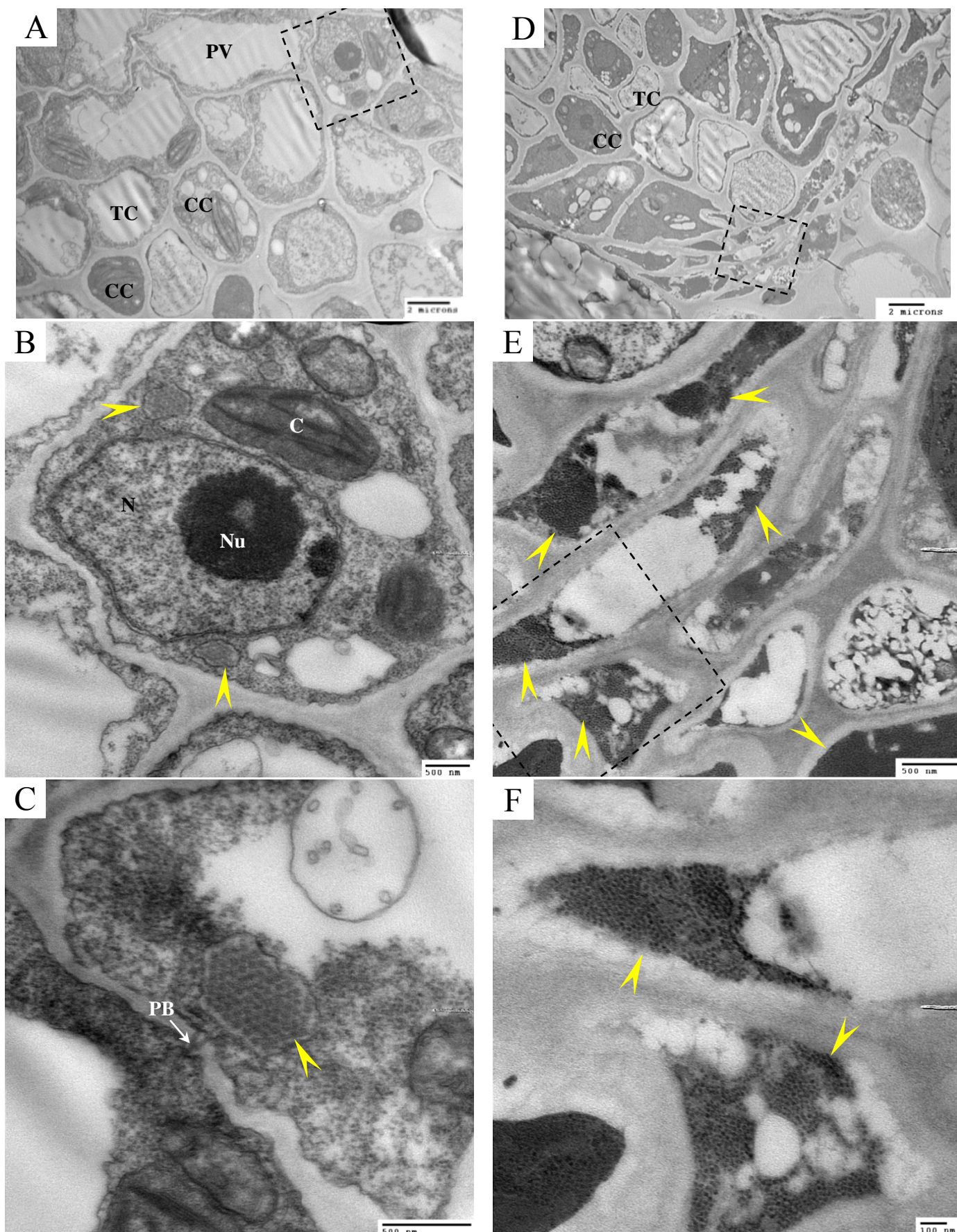


Figure II-8 : observation au microscope électronique de coupes de pétioles issus de plantes Col 0 (A, B, C) ou de mutants *dcl2/dcl4* (D, E, F) infectées par le BWYV

Les flèches jaunes soulignent la présence de particules virales (ponctuations hexagonales sombres). Les lignes pointillées encadrent la zone agrandie dans l'image du dessous. PB : plasmodesme branché ; TC : tube criblé ; CC : cellule compagne ; PV : cellule du parenchyme vasculaire ; N : noyau ; C : chloroplaste ; Nu : nucléole.

coloration au tetroxyde d'osmium et acétate d'uranyl et déshydratation à l'alcool. Les coupes de 80 nm d'épaisseur sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H600. Les images les plus significatives ainsi obtenues sont présentées en **figure II-8**. Les cellules compagnes, site de réplication naturel des polerovirus, sont reconnaissables à la forte densité de leur cytoplasme ; elles sont très riches en organites. Elles font partie des plus petites cellules de la feuille (3 à 5 nm) et se localisent autour des tubes criblés qui sont, eux, très peu dense, les organites subsistants étant repoussés contre la membrane plasmique pour faciliter le flux de la sève élaborée. Les cellules du parenchyme vasculaire sont plus grandes et renferment une imposante vacuole.

Les particules virales visualisées dans les plantes sauvages sont regroupées et organisées sous une forme pseudo-cristalline dans des vésicules constituées, apparemment, d'une seule membrane (**figure II-8-C**). Des études antérieures réalisées sur des plants de pommes de terre infectées par le PLRV (Shepardson *et al.*, 1980) ou sur des betteraves sucrières infectées par le BWYV (Esau et Hoefert, 1972) avaient déjà mis en évidence la présence de multiples vésicules suite à l'infection par ces polerovirus. Une différence majeure avec notre étude est l'absence de virions dans ces vésicules et la double membrane qui les délimite. La membrane externe de ces vésicules est probablement dérivée du reticulum endoplasmique car elle est souvent associée à des ribosomes. La formation de ces structures membranaires précède la dégénérescence des organites puis celle de la cellule.

Dans nos échantillons, aucune particule virale n'a pu être clairement visualisée sous forme libre dans le cytoplasme et l'origine de la membrane internalisant les virions est inconnue, elle pourrait toutefois également dériver du reticulum endoplasmique. Il est possible que ces vésicules soient produites par la cellule afin d'y isoler le virus, ce qui pourrait expliquer, au moins partiellement, l'absence de symptômes suite à l'infection d'*A. thaliana* par le BWYV (contrairement aux plantes utilisées dans les deux études citées précédemment). On constate d'ailleurs que l'absence d'effets macroscopiques est corrélée à l'absence de modifications intracellulaires qui avaient été précédemment observées sur des coupes de feuilles de *N. clevelandii* infectées par le BWYV, comme la dégénérescence des organites, les proliférations membranaires ou la déformation des chloroplastes (Mutterer, 1998). Les vésicules pourraient également être un moyen pour le virus de s'isoler afin de se protéger contre les mécanismes de défense cellulaires et de constituer une niche favorable à la réplication et à l'encapsidation. On peut d'ailleurs noter que ces vésicules sont souvent localisées à proximité des plasmodesmes branchés reliant les cellules compagnes aux tubes criblés, et de manière plus générale, en périphérie de la cellule, près de la membrane plasmique.

Cette situation suggère qu'elles constitueraient également un site de stockage précédant le relargage des virions dans le tube criblé, et donc l'infection systémique de la plante.

Dans les mutants *dcl2/dcl4*, une différence majeure est que les particules virales ne sont pas localisées dans des structures membranaires. Elles sont regroupées en agrégats très importants et désordonnés, occupant la majeure partie de la cellule infectée. Dans ces cellules, ni la membrane plasmique ni aucun organite ne sont identifiables. Il semble qu'elles soient dépourvues de tout élément autre que les virions, mis à part quelques vésicules de nature indéterminée. Ces cellules, dont la forme allongée est très peu conventionnelle, ont probablement dégénéré. Il est frappant de constater que l'ensemble des cellules infectées sont regroupées dans une partie de la coupe du pétiole et que ces cellules présentent une taille particulièrement réduite (comparer les images A et D puis B et E de la **figure II-8**, prises à un grossissement similaire). En particulier, on visualise une seule cellule compagne sur la plante sauvage en **figure II-8-B** contre au moins quatre cellules sur le mutant *dcl2/dcl4* en **figure II-8-E**. Ces observations ne sont comparables à aucune de celles décrites lors d'études précédentes. Dans les cas les plus extrêmes, présentés par Shepardson *et al.* (1980), la dégénérescence des cellules infectées s'accompagne du remplacement du cytoplasme par un réseau fibreux, probablement formé par les membranes des organites brisés, qui n'est pas visible dans nos expériences.

Etonnamment, sur la même coupe on constate la présence de cellules compagnes et de tubes criblés d'apparence normale et exempts de particules virales (voir **figure II-8-D**). On peut malgré tout penser qu'en raison de leur proximité avec les précédentes, les cellules dans lesquelles s'accumulent les particules sont également des cellules phloémiennes. D'autre part, nous n'avons pas observé de telles concentrations de particules virales dans les grandes cellules en périphérie de la zone analysée sur la figure (probablement des cellules du parenchyme vasculaire). Il faut cependant remarquer que si les particules virales n'étaient pas regroupées ainsi, il serait difficile de les distinguer d'un ribosome. Il n'est donc pas impossible que la présence de virions isolés dans certaines cellules ait échappé à nos observations.

Cette étude par microscopie électronique constitue une première dans l'analyse d'un poliovirus infectant la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. L'origine et la formation des vésicules confinant le virus dans les plantes sauvages pourrait composer un sujet de recherche intéressant. Cette étude nous apporte également des éléments inédits concernant l'infection du mutant *dcl2/dcl4* par le BWYV. La déformation importante des cellules de ce mutant est sans

aucun doute à l'origine de certains symptômes sévères liés à l'infection par le BWYV, comme l'enroulement des feuilles. La dégénérescence des cellules entraînerait ensuite les nécroses observées à un stade plus tardif de l'infection.

En conclusion, les observations de microscopie électronique ne soutiennent pas davantage que les résultats des expériences d'immunolocalisation *in situ*, l'hypothèse d'une sortie massive des virions hors des cellules phloémiennes dans les mutants *dcl2/dcl4*. Il semblerait donc que l'absence simultanée des enzymes DCL2 et DCL4 ne produise pas l'environnement nécessaire à la levée du tropisme phloémien du BWYV.

2-4) Analyse moléculaire des extraits de mutants *dcl* infectés

Les différentes plantes mutantes dans les gènes *DCL* infectées par le BW_{wt} et le BW_{PO} ont été analysées 14 jours après agro-inoculation. Après validation de leur infection par un marquage immunologique sur des empreintes de pétioles (voir paragraphe 2-3, a), les plantes de même nature (même virus et même fond génétique) ont été rassemblées, congelées dans l'azote liquide et réduites en poudre. Cette poudre a servi à l'extraction et à l'analyse des protéines, des RNA viraux et des viRNA présentés ci-dessous.

a) Protéines virales

L'analyse par western blot des protéines virales extraites de plantes infectées est réalisée grâce à des anticorps dirigés contre la protéine mineure de capsid (protéine de readthrough ou RT). Les résultats de cette expérience sont présentés en **figure II-9-A**. On ne constate aucune différence dans l'accumulation des protéines RT dans les mutants *dcl3*, *dcl4*, *dcl2/dcl3* et *dcl3/4*. On peut noter que dans cette expérience, la production des protéines virales est légèrement inférieure dans les plantes Col 0, mais cette différence n'est pas systématiquement reproduite. A l'inverse, les mutants *dcl2*, présentent plus de protéines virales que les autres simples mutants, mais dans ce cas aussi, cet effet n'est pas toujours observé, comme on peut le voir lors de la quantification des protéines virales par ELISA présentée en **figure II-4-A**.

Par contre, on note, de manière reproductible, une forte surabondance de ces protéines dans les mutants n'exprimant ni DCL4, ni DCL2. Ces résultats ont été confirmés avec un anticorps dirigé contre la protéine majeure de capsid. Ils sont de plus en accord avec les

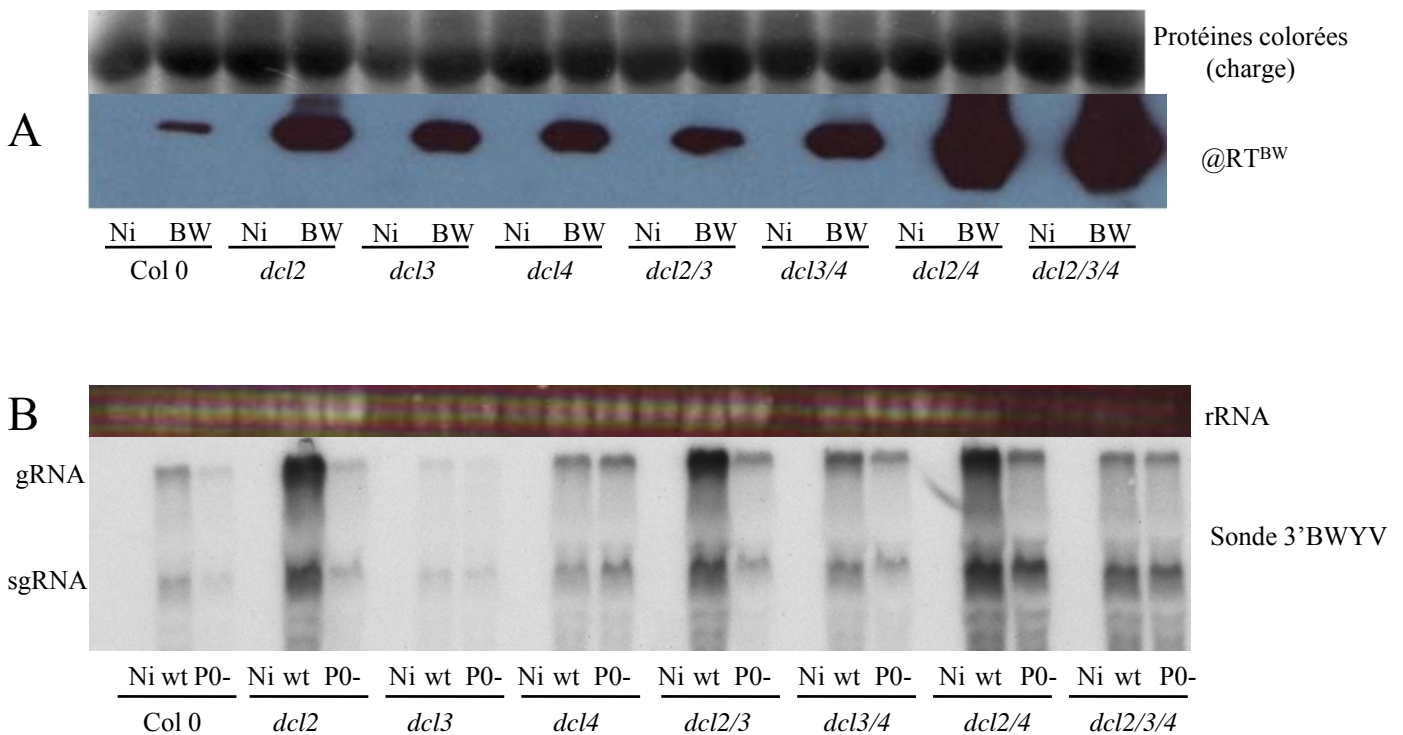


Figure II-9 : analyse moléculaire des mutants *dcl* infectés

A) Analyse par western blot des protéines majeures de capsides (RT). B) Analyse par northern blot des RNA génomiques (gRNA) et subgénomiques (sgRNA) à l'aide d'une sonde dirigée contre l'extrémité 3' du génome viral. Les RNA viraux sont très abondants dans les mutants n'exprimant pas *dcl2*. Une telle conclusion ne peut pas être tirée de l'analyse protéique, il ne semble pas y avoir de corrélation quantitative entre RNA viraux et protéines de structure. rRNA : RNA ribosomiques colorés au BET permettant d'évaluer la charge de RNA totaux. Pour plus de lisibilité, le mutant *dcl2/dcl3* est noté *dcl2/3*, *dcl3/dcl4* est noté *dcl3/4*, etc. Ni : plante non infectée ; wt : BWYV sauvage ; P0- : mutant BWYV n'exprimant pas P0. (NB : la quantité de RNA totaux chargés pour les quatre dernières pistes, visualisé par coloration des RNA ribosomiques au BET, est inférieure à celle chargée pour les autres mutants)

résultats obtenus par ELISA et l'intensité du marquage immunologique observé sur les empreintes de pétioles où l'augmentation franche de la coloration est surtout visible dans les mutants *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4*.

b) RNA viraux

La **figure II-9-B** présente l'analyse par northern blot des RNA viraux extraits de plantes mutantes infectées. Les RNA sont détectés par une sonde dirigée contre l'extrémité 3' du génome viral. La constatation la plus évidente est l'accumulation très forte des RNA viraux extraits des mutants n'exprimant pas l'enzyme DCL2 (*dcl2*, *dcl2/dcl3*, *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4*). Par contre, les plantes mutées dans le gène *DCL4* ne présentent qu'une légère surabondance des RNA viraux, par rapport aux plantes Col 0. Si l'expérience précédente réalisée uniquement sur les mutants *dcl2*, *dcl4* et *dcl2/dcl4* ne montrait pas de différence aussi marquée pour le simple mutant *dcl2*, (dot blot présenté en **figure II-4-B**), la suraccumulation des RNA viraux dans ce mutant est globalement reproductible entre expériences.

Cette observation, nous permet de déduire que contrairement aux études antérieures menées sur d'autres virus (comme celles de Deleris *et al.*, 2006 et de Fusaro *et al.*, 2006) qui désignent la protéine DCL4 comme premier acteur de la voie du RNA silencing antiviral, DCL2 semblerait être la protéine DICER qui agit en priorité dans la défense contre les poliovirus, puisque sa simple mutation favorise fortement la réplication virale.

Un autre fait inattendu qui découle de cette expérience, et qui est reproductible, est la réplication virale significativement réduite en absence de l'enzyme DCL3 : cette protéine ne semble donc pas jouer un rôle dans la défense antivirale (voir **figure II-9-B**, pistes *dcl3*). L'effet est surtout visible dans le simple mutant *dcl3* ; il est possible que dans les doubles mutants, cette baisse de réplication soit contrebalancée par l'effet positif de la mutation dans une autre protéine DCL (DCL2 ou DCL4). L'analyse de ces mutants n'a pour l'instant pas été approfondie. On peut néanmoins imaginer que certains des viRNA de 24 nucléotides, produits par DCL3 à partir du génome viral, pourraient induire le silencing transcriptionnel de gènes endogènes impliqués, par exemple, dans des mécanismes de défense de la plante. Ainsi, en l'absence de cette enzyme, les gènes ciblés par le virus seraient exprimés et la lutte antivirale, plus efficace. Comme précisé dans l'introduction, le détournement, au profit des virus, d'une voie de RNA silencing endogène est une stratégie utilisée par certains virus animaux. Un seul cas de phytovirus usurpant le RNA silencing de l'hôte a été mis en évidence jusqu'à présent : il

s'agit d'un virus à DNA (le CaMV, Moissiard et Voinnet, 2006). Si cette hypothèse est confirmée, le BWYV constituerait le premier exemple de phytovirus à RNA détournant une voie de RNA silencing afin de cibler des gènes endogènes. La construction d'une banque de sRNA produits lors de l'infection par le BWYV est actuellement en cours, elle pourrait nous apporter un début de réponse à cette intéressante question.

Cette expérience nous montre aussi que, curieusement, lorsqu'on compare la quantité de RNA produits à celle des protéines de structure, il ne semble pas y avoir de corrélation directe. Par exemple, la différence d'accumulation du RNA génomique entre le mutant *dcl2/dcl3* et le mutant *dcl3/dcl4* n'est pas retrouvée au niveau de l'analyse des protéines de readthrough alors que les deux extractions ont été réalisées à partir du même lot de plantes infectées.

Un dernier point à souligner dans cette étude est qu'ici encore, on constate que la réplication virale est moins efficace en l'absence de la protéine P0, mais que l'effet est proportionnellement le même dans tous les mutants analysés. Deux exceptions peuvent être notées. L'efficacité de l'infection semble équivalente entre le virus sauvage et le virus muté sur le triple mutant *dcl2/dcl3/dcl4* ce qui est cohérent avec une activité de P0 en aval de l'activité Dicer ; les viRNA n'étant pas produits, la dégradation d'AGO1 par P0 n'a donc pas de conséquence sur l'amplification du RNA viral. La même constatation aurait pu être réalisée sur le double mutant *dcl2/dcl4*. En effet, dans d'autres expériences, nous avons constaté que l'accumulation du RNA viral sauvage est équivalente dans les mutants *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4*. Or, la charge de RNA totaux des quatre dernières pistes du northern blot présenté en **figure II-9-B** est inférieure aux autres ; la piste « BW_{P0} infectant le mutant *dcl2/dcl4* » et les deux pistes correspondant aux mutants *dcl2/dcl3/dcl4* infectés auraient donc du présenter un titre viral plus élevé et proche de celui visualisé pour le mutant *dcl2/dcl4* infecté par le BWwt.

De même, on ne note pas d'accumulation réduite du virus BW_{P0} sur le mutant *dcl4* par rapport au BWwt, mais ce résultat n'a pas été reproduit lors d'expériences ultérieures.

c) siRNA viraux

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier s'il existait, sur le génome du BWYV, des zones particulièrement propices au clivage par DICER afin de sélectionner la sonde permettant la mise en évidence des viRNA la plus efficace. Pour ce faire, nous avons synthétisé six sondes différentes couvrant l'intégralité du génome viral. Ces sondes ont été testées sur des

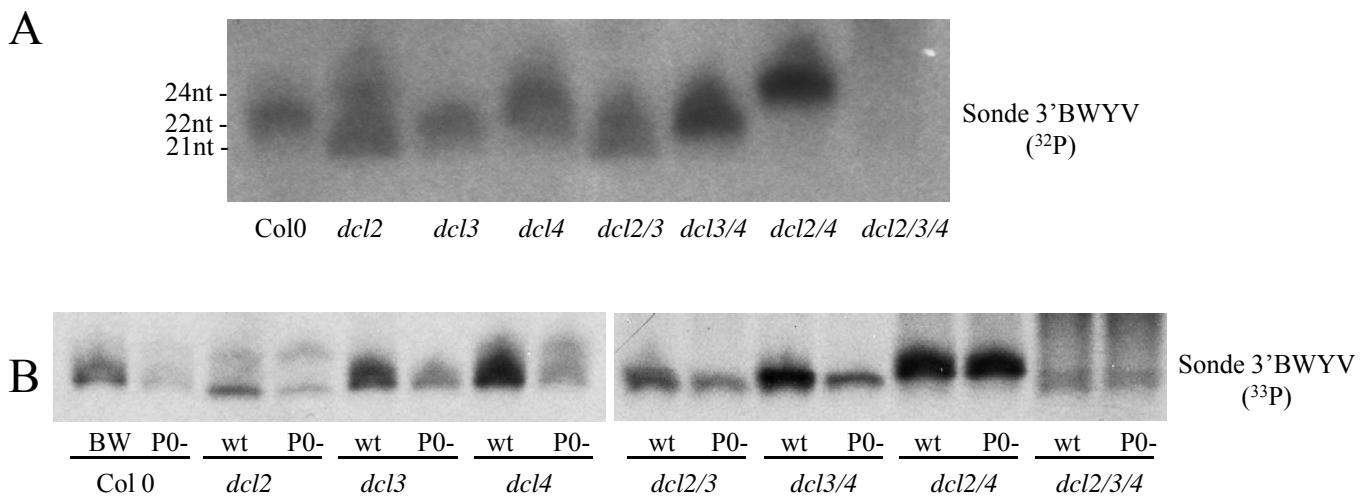


Figure II-10 : analyse par northern blot des viRNA produits lors de l'infection par le BWYV

A) Comparaison des viRNA extraits de différents mutants *dcl* infectés par le BWYV sauvage (sonde marquée au ³²P). Les viRNA majoritaires extraits d'une plante Col 0 sont les produits de DCL2, les viRNA de 22 nucléotides. Aucune bande franche correspondant à des produits potentiels de l'activité DCL1 n'est détectée dans le triple mutant *dcl2/dcl3/dcl4*. A gauche, la taille en nucléotides (nt) des différentes espèces de sRNA. B) Comparaison des viRNA produits dans des plantes infectées par le BWYV sauvage (wt) ou le mutant BW_{P0-} (P0-) (sonde marquée au ³³P). Aucune différence dans la taille des viRNA n'est observée entre les deux virus. La différence de quantité de viRNA produits est généralement proportionnelle à celle constatée pour les RNA génomiques. La bande migrant à 21 nucléotides dans le mutant *dcl2/dcl3/dcl4* n'a pas pu être reproduite mais pourrait correspondre à des produits potentiels de l'activité DCL1.

sRNA extraits de plantes sauvages infectées. Aucune d'entre elles ne s'est significativement démarquée par une intensité de marquage supérieur (données non présentées), ce qui suggère que les viRNA produits lors de l'infection par le BWYV sont principalement issus de l'intermédiaire de réplication double brin du virus, plutôt que d'éventuelles structures secondaires formées par repliement du RNA viral. Nous n'excluons cependant pas que des viRNA puissent être produits à partir de structures en tige boucle, mais leur taille ou leur proximité est probablement trop faible pour qu'elles puissent être identifiées par des sondes d'une taille avoisinant 1 000 nucléotides (si de petites structures secondaires sont réparties tout le long du génome, elles ne peuvent pas être identifiées dans cette expérience ; seule la distinction entre viRNA sens et viRNA antisens pourrait les mettre en évidence). Nous avons donc choisi d'utiliser une sonde correspondant à l'extrémité 3' du virus, cette sonde étant déjà celle utilisée pour la détection du virus puisqu'elle est capable de mettre en évidence à la fois le RNA génomique et le RNA subgénomique.

Le northern blot présenté en **figure II-9** montre une suraccumulation des RNA viraux dans les plantes n'exprimant pas l'enzyme DCL2. Il semblerait donc que celle-ci soit la principale enzyme générant la synthèse de viRNA issus des polerovirus. Pour étudier cette hypothèse, nous avons analysé les viRNA produits lors de l'infection des différents mutants *dcl*.

On remarque, sur la **figure II-10-A**, que l'espèce de viRNA majoritairement détectée suite à l'infection d'une plante sauvage (Col 0) a une taille de 22 nucléotides, des viRNA de 24nt sont également produits, dans des quantités moindres. Or, une approche génétique a démontré que la seule enzyme permettant la synthèse de sRNA de cette taille est DCL2 (Deleris *et al.*, 2006). Cette constatation corrobore notre raisonnement selon lequel DCL2 est l'enzyme majeure responsable du clivage des polerovirus. Dans le mutant *dcl2*, il semble y avoir une stimulation de l'activité DCL4, reflétée par la production de viRNA de 21 nucléotides. On remarque également l'augmentation de la production de viRNA de 24 nucléotides, produits de DCL3, ce qui suggère que l'absence de DCL2 permet aux autres DCL l'accès aux RNA viraux. Dans les mutants *dcl3* et *dcl4*, le profil de viRNA est quasiment identique à celui observé sur la plante Col 0 (avec un léger renforcement de l'activité DCL3 dans le mutant *dcl4*) ce qui peut expliquer l'absence d'effet stabilisateur de ces mutations sur le RNA viral (voir **figure II-9**). Les doubles mutants produisent les viRNA résultant de l'activité de la seule enzyme DCL présente (hormis DCL1) : des viRNA de 21 nucléotides dans le mutant *dcl2/dcl3* où seule DCL4 est active, des viRNA de 22 nucléotides dans le mutant

dcl3/dcl4 dans lequel DCL2 est la seule enzyme fonctionnelle et une forte production de viRNA de 24 nucléotides dans le mutant *dcl2/dcl4* où seule l'enzyme DCL3 est active. Cette surproduction de viRNA de 24 nucléotides ne semble d'ailleurs pas être en mesure d'affecter la suraccumulation du RNA viral dans ce double mutant, ce qui renforce l'idée que DCL3 n'a pas d'activité antivirale sur le BWYV et soutient l'hypothèse d'une action bénéfique de cette protéine sur l'infection par le BWYV.

Dans l'expérience comparant les viRNA produits en absence ou en présence de P0 (**figure II-10-B**), on ne remarque aucun effet majeur du suppresseur de RNA silencing. Cette constatation est cohérente avec la fonction de P0 mise en évidence dans le premier chapitre de ce manuscrit : P0 cible spécifiquement une ou plusieurs protéines ARGONAUTE, son action est donc située en aval de DICER dans la cascade réactionnelle du RNA silencing. On note que la quantité de viRNA produits semble proportionnelle à la quantité de RNA viraux.

Dans le triple mutant *dcl2/dcl3/dcl4*, on constate l'apparition d'une bande inattendue migrant approximativement à 21 nucléotides. Cette bande pourrait être le résultat d'une activité accrue de DCL1 en l'absence des trois autres protéines DCL, nettement visible grâce à l'utilisation d'une sonde synthétisée à partir de dCTP marqué au ³³P qui confère aux bandes un marquage plus fin que dans les expériences classiques utilisant des sondes marquées au ³²P. Un résultat similaire a été observé par Deleris *et al.* (2006) dans les plantes infectées par le TRV et le TCV.

2-5) Conclusions et hypothèses de travail

Ces différentes expériences nous ont montré que même si le BWYV est beaucoup plus virulent lorsqu'il infecte des plantes n'exprimant aucune des enzymes DICER antivirales d'*Arabidopsis thaliana* (DCL2 et DCL4) que lorsqu'il est inoculé à des plantes sauvages, il semble néanmoins incapable de sortir des cellules phloémiennes. En d'autres termes, DCL2 et DCL4 n'auraient pas d'effet sur le tropisme phloémien des polerovirus. Il est possible que la double mutation *dcl2/dcl4* soit insuffisante pour permettre au BWYV d'infecter d'autres tissus que ceux du phloème. Cependant, l'analyse moléculaire ne semble pas être en faveur d'une activité antivirale liée aux deux autres protéines DCL. D'autres facteurs non identifiés pourraient être responsables de la restriction au phloème des polerovirus.

Un fait intrigant nous force toutefois à modérer nos conclusions : l'absence de corrélation entre la quantité de protéines structurales et la quantité de RNA viraux pourrait



Figure II-11 : Système de mise en évidence du mouvement du RNA silencing à courte distance : plantes *Arabidopsis thaliana* « Suc-SUL » (Himber *et al.*, 2003)

Les siRNA, synthétisés suite à l'expression dans les cellules compagnes de la construction présentée à gauche, circulent de cellule à cellule sur une distance maximale d'une quinzaine de cellule autour du site de production. Ils y induisent le silencing post transcriptionnel du gène SULPHUR, provoquant le jaunissement des nervures de la plante, illustré sur la photographie, à droite. La construction introduite dans les plantes et responsable de ce phénotype comprend le promoteur SUC2 (promoteur endogène du « sucrose symporter »), une portion du gène SULPHUR (SUL) placée en répétition inverse de part et d'autre de l'intron de la chalcone synthase et le terminateur OCS (terminateur de l'octopine synthase).

suggérer que dans les mutants *dcl2*, certains RNA génomiques ne seraient pas encapsidés. Ils pourraient donc éventuellement circuler dans la plante sous forme de complexe ribonucléoprotéique non visibles par les techniques employées, basées sur la détection des protéines de capsid ou des virions. C'est pourquoi nous avons mis au point une stratégie d'infection basée sur un virus mutant permettant de rechercher la présence de RNA viraux en dehors des cellules phloémiennes dans les plantes mutantes *dcl*. Ces expériences font l'objet du paragraphe 3 de ce chapitre.

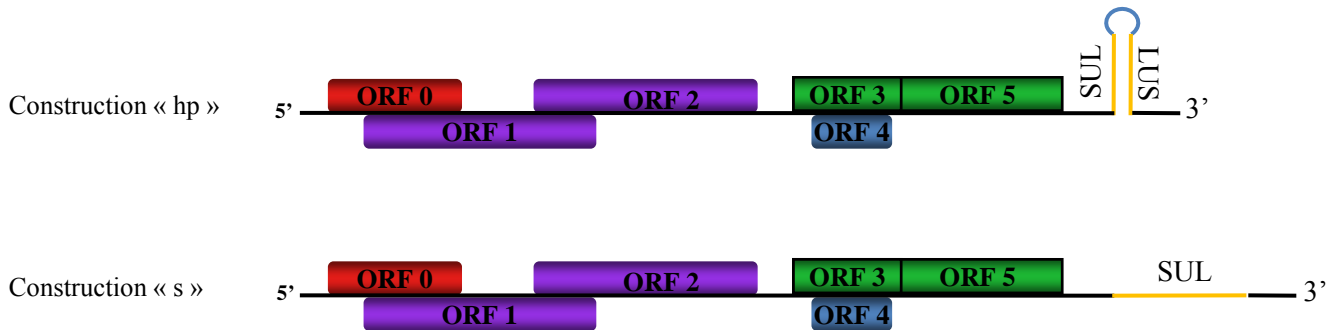
Une autre découverte importante émanant de ces expériences est que la principale espèce de viRNA produits lors de l'infection d'une plante sauvage par le BWYV est celle issue de l'activité DCL2, les sRNA de 22 nucléotides. Si la hiérarchie d'action des enzymes DCL proposée pour le TCV par Deleris *et al.* (2006) se confirmait pour les polerovirus, ces données suggèreraient que l'infection par le BWYV puisse provoquer une inactivation de l'enzyme DCL4. Ainsi, DCL2 agirait, comme dans le modèle de Deleris *et al.* (2006), de manière redondante à DCL4 lorsque cette dernière serait absente ou inactive. Ceci nous amène à avancer l'hypothèse selon laquelle le BWYV pourrait encoder un deuxième suppresseur de RNA silencing (en plus de P0) qui ciblerait l'activité DCL4. Les premières expériences visant à identifier une seconde protéine inhibitrice du RNA silencing sur le génome du BWYV sont décrites dans le paragraphe 4 de ce chapitre.

3) Le RNA viral est-il capable de sortir du phloème sous une forme différente des virions ?

3-1) Construction d'un virus « rapporteur »

Afin de suivre l'infection systémique d'un virus *in planta*, l'insertion, dans le génome viral, du gène codant pour la protéine GFP est une technique très prisée par les virologues (Oparka *et al.*, 1998). Dans le cas des polerovirus, cette technique n'a pour l'instant pas pu être appliquée avec succès, l'encapsidation du génome viral étant tributaire de sa taille. De plus, certains de nos résultats suggèrent que le RNA viral serait capable de circuler dans les plantes *dcl2* sans être encapsidé, nous avons donc créé une version du BWYV qu'il est possible de suivre par détection des RNA et non des protéines. Sa synthèse s'est largement inspirée des plantes Suc-SUL imaginées par Hember *et al.* (2003) (**figure II-11**). Dans ces plantes, un

A



B

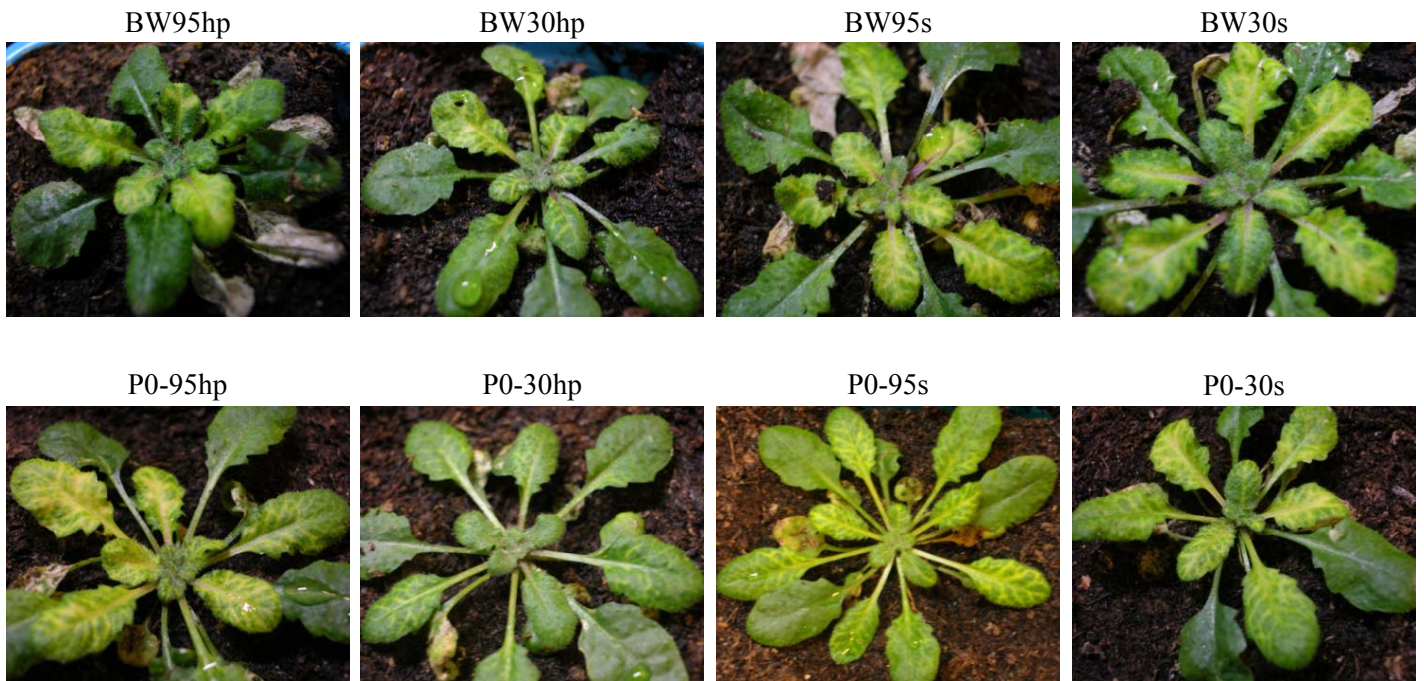


Figure II-12 : test d'inoculation des différentes constructions du « BWYV-SUL » sur Col 0

A) Représentation schématique des constructions « s » et « hp ». B) Plantes Col 0 infectées depuis 14 jours par les différents virus recombinants. Toutes les constructions réalisées permettent l'apparition du phénotype « Suc-SUL ». Les constructions « hp » ou « s » ont été introduites dans le génome du BWYV sauvage (BW) ou du mutant BW_{P0} (P0-), soit au nucléotide 5495 (abrégé 95), soit au nucléotide 5530 (abrégé 30). Ainsi, le nom placé au dessus de chaque image correspond à 1) le virus utilisé, 2) le site d'insertion et 3) le type de construction insérée.

fragment du gène codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse de la chlorophylle (*SULPHUR*) est placé, en répétition inverse, sous dépendance du promoteur *AtSUC2*, dont l'expression est spécifique des cellules compagnes (Imlau *et al.*, 1999). Ainsi, cette construction induit le silencing du gène *SULPHUR* dans le phloème, mais aussi dans les cellules adjacentes, résultat du mouvement de cellule à cellule du signal du RNA silencing. *SULPHUR* étant un gène endogène, il n'est pas soumis au mécanisme de transitivity (Voinnet, 2008), l'extinction de son transcrite reste donc localisée dans et le long des veines de la plante, à proximité des sites où le transgène est exprimé. Il en résulte une coloration jaune des nervures, due à l'absence de chlorophylle (voir **figure II-11**).

Nous avons donc introduit dans le génome du BWYV, un court fragment ciblant ce même gène *SULPHUR* dans l'espoir d'obtenir un virus toujours capable d'être encapsidé afin qu'il demeure infectieux, même sur les plantes Col 0. Différentes constructions ont été expérimentées : nous avons utilisé, d'une part, une séquence de deux fois 40 nucléotides placées en répétition inversée et séparée par une courte séquence hétérologue afin de produire une structure en tige-boucle (hp pour hairpin) ; et d'autre part, un fragment de 80 nucléotides ne permettant pas la formation d'une structure secondaire ciblée par DICER (s pour sens) (**figure II-12-A**). Ces fragments ont été introduits dans la partie 3' non codante du génome viral, soit directement après le codon stop de l'ORF5 (codant pour la protéine de readthrough), en position 5495, soit, en aval, en position 5530. Ces différentes constructions ont été réalisées à la fois dans le contexte du BWYV sauvage et du mutant BW_{P0}.

Chacune de ces constructions a été inoculée à des plantes sauvages (Col 0). La **figure II-12** montre que toutes sont capables de produire des symptômes de jaunissement des nervures similaires au phénotype des plantes Suc-SUL (**figure II-11**). Tous les virus recombinants sont donc capables d'initier une infection systémique et d'induire le silencing du gène *SULPHUR*. Ainsi, les viRNA produits lors de l'infection des cellules phloémiennes sont capables de se déplacer de cellule à cellule et, comme nous le pensions, d'être chargés par AGO1 dans ces cellules adjacentes. Ceci se traduit par la dégradation du transcrite du gène *SULPHUR* puis par l'absence de synthèse de chlorophylle. On constate également que la protéine P0 n'est pas capable d'inhiber le silencing du gène *SULPHUR*, ce qui indique que la protéine virale n'interfère ni avec la synthèse de la molécule signal du RNA silencing à courte distance (les sRNA de 21 nucléotides, produits de DCL4), ni avec son mouvement. Ces données suggèrent également que P0 ne circule probablement pas vers les cellules voisines du site d'infection mais reste localisée dans les cellules phloémiennes infectées, ce qui permet d'expliquer l'existence

de protéines AGO1 chargées en viRNA (cf expérience présentée dans le premier chapitre, en **figure I-15** où AGO1 est co-immunoprécipitée avec des sRNA viraux malgré la présence de P0). L'analyse macroscopique de ce phénotype ne nous permet cependant pas de distinguer les cellules phloémiennes infectées et donc de savoir si P0 y inhibe efficacement le silencing dirigé contre le gène *SULPHUR*.

Par ailleurs, l'observation du phénotype « suc-SUL » sur ces plantes infectées nous permet de préciser que les facteurs identifiés par Dunoyer *et al.* (2007) comme étant important à la mise en place du mouvement à courte distance, ne sont pas nécessaires à la biosynthèse de la molécule signal. En effet, les auteurs ont pu montrer qu'en absence de RDR2 ou NRPD1a, les plantes suc-SUL ne présentent plus leur phénotype caractéristique. Or, ces protéines sont impliquées dans la biosynthèse des hasi-RNA, qui agissent au niveau de la formation de l'hétérochromatine (voir introduction, paragraphe II-2-1-d). Notre système utilisant un virus à RNA, il exclu toute implication d'une molécule de DNA. RDR2 et NRPD1a pourraient donc plutôt agir en aval de la production de la molécule signal, par exemple au niveau de son transport de cellule à cellule ou dans la perception du signal dans les cellules adjacentes au site d'initiation.

3-2) Analyse des virus « rapporteur »

L'analyse des RNA viraux extraits des plantes infectées par les différents virus recombinants a montré que leur accumulation est similaire pour toutes les constructions testées, avec une efficacité moindre pour les mutants P0-, comme attendu (données non présentées). Par contre, nous avons constaté que la réplication de ces virus est moins efficace que celle du virus sauvage. L'introduction d'une séquence hétérologue d'environ 100 nucléotides dans le génome du BWYV est donc préjudiciable à son amplification. Il est probable que des séquences ou une structure importantes pour ce mécanisme soient localisées à l'extrémité 3' ; c'est d'ailleurs la raison pour laquelle deux sites d'insertion différents ont été testés. Malheureusement, quelque soit le type de construction, l'amplification virale est affectée.

S'agissant de virus recombinants, ils sont susceptibles de subir des réarrangements lors de la réplication. C'est pourquoi nous avons initié une analyse de la descendance de ces virus afin d'en évaluer la stabilité et la transmissibilité.

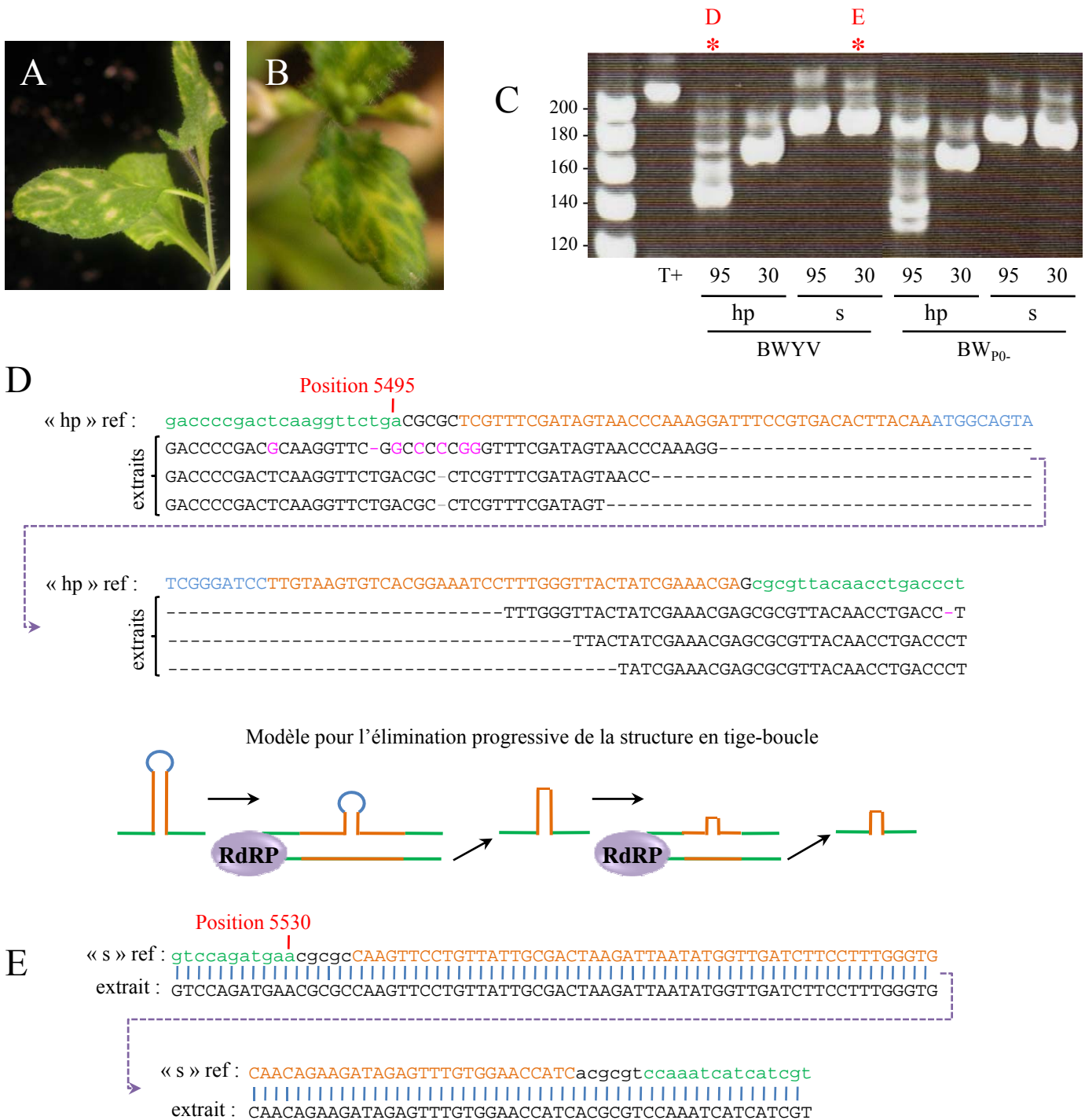


Figure II-13 : analyse de la descendance des virus étiquetés

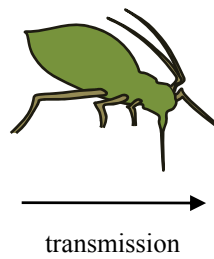
A) et B) Mise en évidence du phénotype de jaunissement des nervures dans les feuilles de la hampe florale. La décoloration est de plus en plus ponctuelle avec une construction « hp » (A) alors qu'elle reste homogène avec une construction « s » (B). C) Analyse par RT-PCR des RNA viraux extraits de plantes montrant le phénotype Suc-SUL. Les fragments PCR ont été fractionnés sur gel de polyacrylamide 10 %. Le témoin positif (T+) correspond à une PCR réalisée sur un plasmide binaire contenant la construction BW95hp. La taille attendue pour les clones « s » est de 190 nucléotides ; pour un virus sauvage : 120 nucléotides. Les RT-PCR réalisées sur les clones portant la construction sens montrent leur stabilité. Les clones « hp » sont de taille beaucoup plus réduite que celle attendue et plusieurs bandes se distinguent. 95 correspond au site de clonage 5495 ; 30 pour 5530. Les clones séquencés en D) et E) sont marqués par un astérisque rouge. D) et E) Analyse des séquences obtenues à partir des PCR présentées en C) pour D) le clone BW95hp et E) le clone BW30s. Si la construction « s » est effectivement parfaitement conservée, la construction hp est progressivement éliminée, probablement lors de la réplication virale comme proposé dans le modèle. Ref : séquence de référence. Sur ces séquences, en vert, la séquence virale, en orange, la séquence correspondant au gène SULPHUR, en bleu, la boucle de la tige-boucle, en noir, des nucléotides introduits pour le clonage. Sur les séquences obtenues par RT-PCR (extraits), les nucléotides non conservés sur la séquence de référence sont figurés en rose. Il est probable que ces quelques erreurs proviennent de la polymérase durant la réaction de PCR.

Le suivi de l'évolution des symptômes induit par le clone BW95hp (virus sauvage portant la construction formant une tige-boucle -hp- en position 5495) montre que le phénotype de jaunissement des nervures devient irrégulier sur les feuilles de la hampe florale (voir **figure II-13-A**), approximativement six semaines après infection. Cette observation suggère une instabilité du virus que nous avons étudié après extraction des RNA totaux de plantes infectées. Ces RNA ont été utilisés comme matrice pour une transcriptase inverse qui, grâce à une amorce correspondant à l'extrémité 3' du génome, a permis la synthèse de cDNA viraux. Ces cDNA ont été amplifiés par une réaction PCR utilisant des amorces localisées de part et d'autre des séquences insérées. L'analyse des produits PCR ainsi obtenus montrent que les constructions portant la structure en tige boucle (hp) ne sont pas stables ; des clones de différentes tailles, mais toujours inférieures à celle du clone initial, sont obtenus à partir d'extraits de la même plante (voir **figure II-13-C**). Le séquençage de ces clones montre une élimination progressive de la structure en tige boucle. Il est probable qu'au cours de la réplication, la RdRP virale ne soit pas capable de dissocier convenablement cette structure secondaire, ainsi, elle répliquerait le RNA génomique en ne déroulant que partiellement la structure, passant directement d'un côté de sa base à l'autre. Ceci serait en accord avec l'élimination de la tige boucle de manière symétrique par rapport à la séquence de la boucle, mise en évidence par les différentes séquences analysées en **figure II-13-D**. Néanmoins, la validation de ce modèle où les virus les plus courts apparaissent en dernier et dérivent de virus déjà largement délétés nécessiterait une analyse cinétique de l'infection. Il est, en effet, également possible que les différents clones observés dérivent tous directement du génome recombinant complet. Dans ce cas, ils devraient être, *a priori*, aussi bien détectables dans les feuilles inoculées, après quelques cycles de réplication virale que tardivement, dans les feuilles systémiques.

La perte progressive du phénotype après infection par le virus BW95hp prouve que la décoloration est bien une conséquence de la présence du virus au sein de la zone jaune de la feuille et non le résultat de l'établissement du silencing systémique contre le gène SULPHUR, dont le profil aurait été plus homogène.

L'étude de la descendance virale des constructions « sens » a montré qu'elles sont, quant à elles, très stables, quel que soit le site d'insertion. L'analyse de plusieurs fragments produits à partir des extraits de plantes infectées montre que la séquence introduite reste intacte après nombreux cycles de réplication (voir **figure II-13-C et II-13-E**). Il semble en être de même pour le phénotype induit par le virus BW30s sur les feuilles apicales (**figure II-13-B**) qui y reste bien plus marqué le long des veines que celui provoqué par le virus BW95hp (**figure II-13-A**).

Plante agro-inoculée avec BW95hp



Plante inoculée par puceron



Figure II-14 : expérience de transmission du virus BW95hp

L'apparition du phénotype de jaunissement des nervures sur la plante infectée via le puceron vecteur indique que le virus est transmissible, et donc, qu'il peut être encapsidé.

Une expérience de transmission par puceron du virus BW95hp a été réalisée par Véronique Brault (INRA, Colmar). Des pucerons vecteurs (*Myzus persicae*) ont été placés sur une plante agro-inoculée par BW95hp. Après la phase d'acquisition, les pucerons ont été transférés sur une plante saine. L'apparition du marquage jaune au niveau des nervures de la plante nouvellement infectée confirme que le virus BW95hp peut être transmis (voir **figure II-14**). Cette donnée importante indique également que malgré l'addition d'une centaine de nucléotides, le génome viral peut toujours être encapsidé. Il reste à analyser la descendance virale après vexion afin de vérifier si le virus transmis est celui inoculé ou s'il y a une transmission préférentielle d'un type de virus partiellement délété mais toujours capable d'induire le silencing du gène *SULPHUR*. Cela nous indiquera également si parmi les différents virus produits dans la descendance, certains présentent une meilleure stabilité des particules virales. Cette expérience devra être reproduite avec un virus portant la construction sens pour vérifier si la stabilité du génome observé sur les plantes agro-inoculées se maintient après transmission.

Ainsi, même si leur réplication est moins efficace que celle du virus sauvage, ces virus recombinants en possèdent toutes les caractéristiques essentielles : infection systémique, encapsidation et transmission. A l'opposé, des expériences visant à créer un polerovirus exprimant la protéine GFP (PLRV-GFP) ont réussi à produire un virus infectieux dans les protoplastes et capable de s'encapsider (Nurkiyanova *et al.*, 2000). Cependant, le virus ayant été délété d'une partie de la protéine de readthrough afin de permettre l'insertion du gène de la GFP, il est incapable d'induire une infection systémique après transmission par puceron. Notre virus recombinant est donc, à ce jour, le plus efficace des polerovirus « marqués » ; on peut suivre aisément son infection *in planta*, sans aucun équipement spécialisé. De plus, comme les polerovirus ne provoquent pas de symptôme sur *Arabidopsis thaliana*, l'utilisation de ces virus recombinants permet de s'affranchir de tests, ELISA ou autres, pour identifier les plantes infectées, la simple visualisation du jaunissement des nervures étant suffisante.

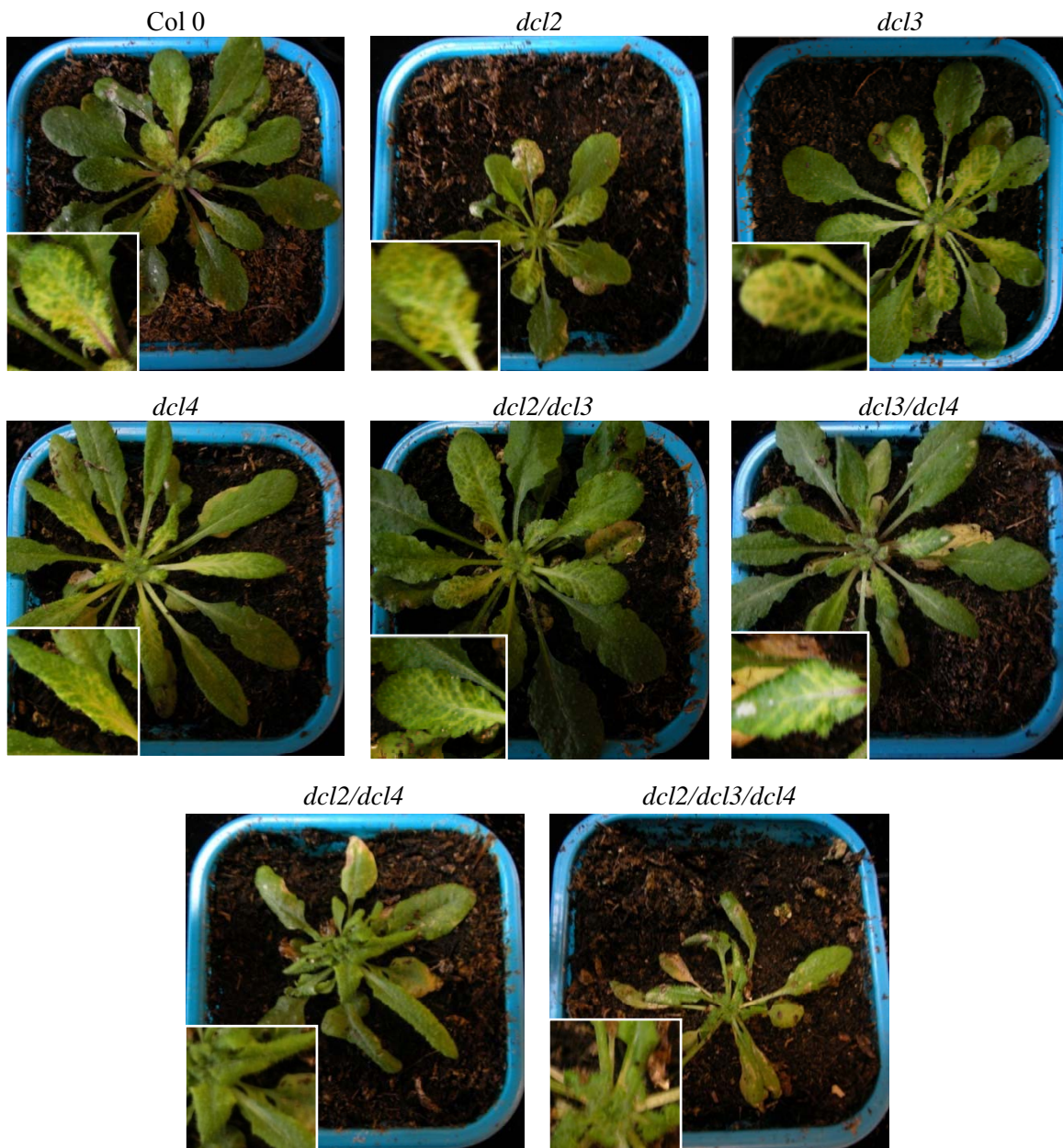


Figure II-15 : infection de mutants *dcl* par BW95hp

Les symptômes de jaunissement des nervures sont visualisables sur tous les mutants testés à l'exception des mutants *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4*.

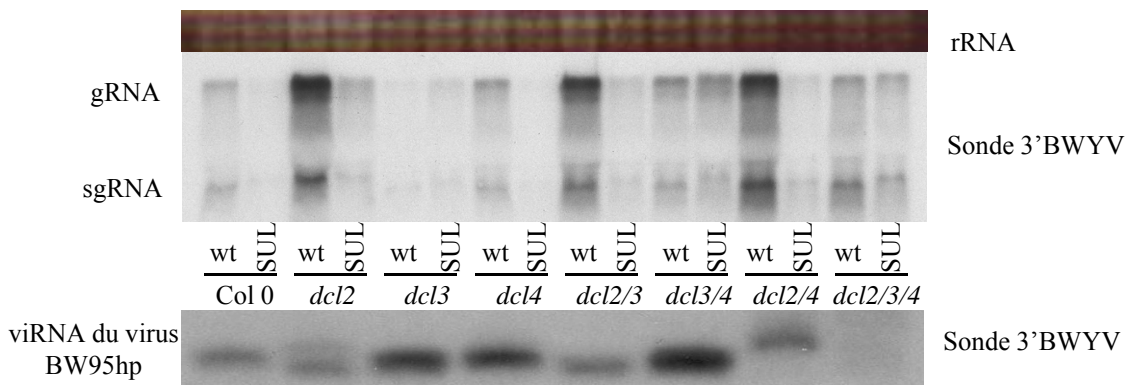


Figure II-16 : northern blots sur les RNA extraits des mutants *dcl* infectés par BW95hp (SUL)

en comparaison avec une infection par le BWYV sauvage (wt). Le profil général de l'accumulation des RNA génomiques (gRNA) et subgénomiques (sgRNA) (haut de la figure) ainsi que des viRNA (bas de la figure) est similaire pour les deux virus, bien que beaucoup plus faible pour le virus recombinant.

3-3) Infection des mutants *dcl* par le virus BW95hp

Afin de savoir si le BWYV est capable de sortir du phloème et d'envahir les cellules du mésophylle dans les mutants d'*Arabidopsis thaliana* n'exprimant pas certaines enzymes DCL, nous avons agro-infiltré un des virus recombinants à la collection de mutants *dcl* utilisée précédemment. Le virus recombinant BW95hp a été choisi pour cette étude avant de connaître les résultats de stabilité génomique. Etant donné qu'il ne s'agit, pour ces expériences, que d'un outil pour initier et établir une infection sur une courte période, l'instabilité de ce virus ne pose donc pas de problème majeur.

En théorie, une simple observation des symptômes de jaunisse sur les plantes infectées devrait permettre de répondre à la question de la sortie du RNA viral du phloème. Si le virus reste confiné au système vasculaire, les symptômes de jaunissement des nervures devraient être conservés sur les mutants *dcl*. Si le virus est capable d'étendre sa zone d'infection à l'ensemble de la feuille, deux situations peuvent se présenter : soit le silencing du gène SULPHUR s'étend également au limbe de la feuille ce qui indique que le virus se multiplie dans d'autres tissus que ceux du phloème mais qu'il est incapable de contrer le RNA silencing résiduel, soit on constate une absence de tout marquage jaune, si P0 est suffisamment efficace pour inhiber la dégradation du RNA messager endogène par les viRNA produits lors de l'infection dans le contexte *dcl* correspondant.

Les résultats de l'infection des mutants *dcl* sont présentés en **figure II-15** et montrent que le phénotype des simples mutants *dcl2*, *dcl3* et *dcl4*, ainsi que celui des doubles mutants *dcl2/dcl3* et *dcl3/dcl4* est tout à fait similaire à celui observé sur les plantes Col 0. Sur ces plantes, le RNA viral resterait donc confiné aux tissus du phloème, invalidant notre hypothèse de sortie du RNA viral dans les plantes portant une mutation *dcl2*.

L'analyse par northern blot des RNA viraux extraits des ces plantes, en comparaison des mêmes mutants infectés par un virus sauvage, montre que le virus BW95hp se réplique moins efficacement mais se comporte de la même manière que le BWYV (voir **figure II-16**). En particulier, on observe le même type de suraccumulation virale dans les mutants *dcl2*. Les viRNA produits à partir de BW95hp sont également de même nature que pour le virus sauvage : les viRNA de 22 nucléotides sont majoritaires dans les plantes sauvages. Cette étude indique un autre résultat important : les viRNA de 22 nucléotides (produits exclusifs dans les plantes *dcl3/dcl4*) sont, dans ce cas, tout aussi efficaces en tant que signal du RNA silencing à courte distance que les sRNA de 21 nucléotides (produits de DCL4 identifiés comme

« molécule signal » dans ce mécanisme par Humber *et al.*, 2003 et confirmés depuis, notamment par Dunoyer *et al.*, 2007).

L'absence de phénotype dans le triple mutant *dcl2/dcl3/dcl4* (**figure II-15**) est très probablement due à l'incapacité de ces plantes à produire des sRNA, hormis par le biais de l'activité DCL1. Comme les viRNA produits par cette enzyme sont vraisemblablement en dessous du seuil de détection par northern blot (voir **figure II-16**), s'ils existent, ils sont soit produits en quantité insuffisante pour induire le phénotype Suc-SUL, soit inactifs dans ce système ciblant un gène endogène.

En ce qui concerne le mutant *dcl2/dcl4* infecté, le défaut de phénotype observé est plus difficile à interpréter (**figure II-15**) (les mêmes résultats ont été obtenus avec le virus P0-95hp, ils ne sont donc pas dus à l'inhibition du silencing par P0). Des viRNA de 24 nucléotides sont produits et détectés facilement. L'absence de marquage suggère leur inefficacité dans le rôle de molécule signal à courte distance. En effet, Dunoyer *et al.* (2007) ont montré que seule une très grande production de sRNA de 24 nucléotides pouvait induire le mouvement du silencing à courte distance ; la quantité de viRNA produits par DCL3 à partir du virus BW95hp serait donc insuffisante, d'autant que ce virus se réplique moins efficacement que le virus sauvage. Cependant, les fortes altérations morphologiques provoquées par l'infection reflètent une grande perturbation du métabolisme cellulaire. Il est donc envisageable qu'un bouleversement plus général au sein de la cellule, que le seul dysfonctionnement du mécanisme de RNA silencing, soit responsable de l'absence de jaunissement. L'interprétation de ces résultats ne nous permet donc pas de savoir si la double mutation *dcl2/dcl4* engendre la sortie du RNA viral du système vasculaire de l'hôte sans que cela soit détectable par le biais du virus rapporteur ou si, dans ce mutant également, l'infection virale (protéines de structures et RNA viral) est restreinte au phloème de l'hôte. D'autres techniques devront donc être mises en œuvre afin de valider ou d'infirmer notre hypothèse, mais il semble déjà clair que la simple mutation *dcl2*, même si elle permet, seule, une forte augmentation du titre viral, n'est pas suffisante pour permettre aux poliovirus d'envahir les tissus du mésophylle, que ce soit sous forme de particules virales ou au sein de complexes ribonucléoprotéiques.

4) Les polerovirus codent-ils pour un deuxième suppresseur de RNA silencing ?

Si l'on considère que DCL4 est responsable de l'activité antivirale principale, la mise en évidence de l'accumulation majoritaire de viRNA de 22 nucléotides, produits de DCL2, lors de l'infection d'une plante sauvage par le BWYV, suggère fortement que le virus est capable d'inhiber l'activité de DCL4. Nous avons déjà pu montrer que P0 n'avait aucun effet sur la synthèse ou la stabilité des sRNA chez *N. benthamiana*. De même, lors de l'infection de plants d'*A. thaliana* par le BWYV, le profil des viRNA produits reste inchangé, que le virus utilisé exprime ou non la protéine P0. Ainsi, il semble fort probable que pour contrer l'activité DCL4 (donc la production de viRNA de 21 nucléotides), les polerovirus aient développé un second suppresseur de RNA silencing.

4-1) Etude de l'effet de l'infection virale sur l'expression des gènes *DCL*

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si l'infection virale pouvait influencer sur l'expression des gènes codant pour les enzymes DCL, en d'autres termes, si la plante était capable de répondre à l'infection par une surproduction des enzymes antivirales. Ce travail, réalisé en collaboration avec Stephanie Ohnesorge (du laboratoire d'Olivier Voinnet) est basé sur l'infection de lignées d'*A. thaliana* (créées par Stephanie Ohnesorge) dans lesquelles un gène rapporteur est sous la dépendance du promoteur d'un gène *DCL*. L'écotype Col 0 d'*Arabidopsis thaliana* a été transformé par différentes constructions exprimant le gène de la eGFP sous la dépendance de séquences d'environ 1 000 nucléotides isolées en amont de chacun des quatre gènes *DCL* et contenant donc la majeure partie de leur promoteur respectif. Ces plantes ont été agro-inoculées avec le BWYV et les plantes infectées ont été soumises à une analyse quantitative par RT-PCR de l'activité de chacun des promoteurs *DCL*. Les quantités relatives, soit du transcrit eGFP, soit du transcrit DCL endogène correspondant au promoteur analysé ont été obtenues puis normalisées par rapport au gène codant pour l'actine. Enfin, les valeurs des plantes infectées ont été rapportées à celle des plantes agro-inoculées avec une souche d'agrobactéries renfermant un plasmide binaire sans insert. Ces dernières ont donc une valeur relative de 1.

Les résultats des premières expériences, montrent que l'infection par le BWYV ne semble pas influencer sur l'activité des promoteurs des gènes *DCL1* et *DCL3*. En effet, tant les

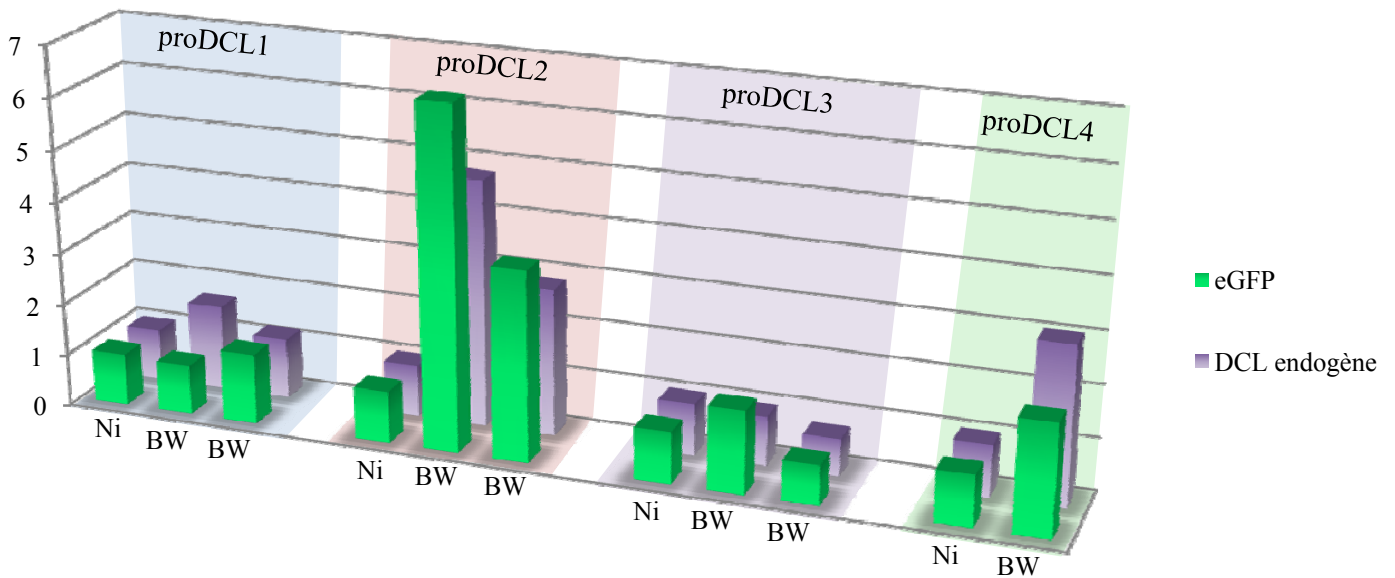


Figure II-17 : analyse par RT-PCR quantitative de l'effet de l'infection virale sur l'expression des gènes *DCL*

Les RNA analysés proviennent de plantes transgéniques exprimant le gène codant pour la eGFP (enhanced GFP) placé sous la dépendance du promoteur du gène *DCL1* (proDCL1) ou *DCL2* (proDCL2), ou *DCL3* (proDCL3), ou encore *DCL4* (proDCL4). Les plantes ont été agroinfiltrées avec des agrobactéries renfermant soit le plasmide binaire sans insert (Ni pour non infectée), soit le pBin portant le clone complet du BWYV (BW). Chaque barre correspond à l'analyse des RNA extraits d'un mélange de trois plantes infectées lors de la même expérience. Les barres vertes représentent le niveau d'expression des transcrits du transgène eGFP, les barres violettes, celui des transcrit DCL endogène correspondant au promoteur d'intérêt. Les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport à celles du transcrit du gène ACTINE. Puis, les valeurs des plantes infectées ont été rapportées à celles des plantes témoin (Ni). Les expériences de RT-PCR quantitatives ont été réalisées par Stephanie Ohnesorge.

quantités de transcrits DCL endogènes (1 et 3) que celles des transcrits eGFP restent à une valeur proche de 1 qu'il y ait infection ou non (**figure II-17**).

A l'inverse, on remarque une augmentation significative de l'activité du promoteur de DCL2 visualisée par l'augmentation d'un facteur 3 à 6 de la quantité de transcrits eGFP. Il est particulièrement intéressant de constater que ces résultats suivent la régulation du transcrit du gène DCL2 endogène, ce qui montre que cette stimulation de la transcription à partir du promoteur proDCL2 n'est pas compensée par une dégradation du transcrit. Il reste à vérifier si l'induction du gène *DCL2* est corrélée à un accroissement de la quantité de protéines DCL2 produites.

En ce qui concerne le promoteur du gène DCL4, il semble également stimulé en présence du virus. Cependant, l'analyse d'un seul lot de plantes infectées ne nous permet pas de conclure quant à l'influence réelle de l'infection virale sur ce promoteur. De nouvelles expériences seront nécessaires. Néanmoins, cette donnée préliminaire indique que si notre hypothèse d'inactivation de DCL4 suite à l'infection par le BWYV se confirmait, elle résulterait d'une inhibition de l'activité de la protéine, plutôt que d'une régulation transcriptionnelle négative.

Un autre point qu'il faudra analyser est le titre en virus des plantes infectées (celles-ci n'ont été testées que par immuno-empreintes). En effet, la variation d'expression des gènes *DCL2* et de *DCL4* observée pourrait être directement liée à la concentration en virus. De plus, l'absence de régulation transcriptionnelle des plantes proDCL1 et proDCL3 pourrait refléter une trop faible accumulation de virus.

L'observation de l'induction du gène *DCL2* (et dans une moindre mesure, *DCL4*) est particulièrement surprenante en raison du tropisme des polérovirus. En effet, étant donné le confinement de ces virus au phloème, nous estimions que même si l'infection virale pouvait influencer sur la synthèse des enzymes DCL, cet effet serait restreint aux tissus infectés ou voisins des sites d'infection et risquait donc d'être « dilué » par l'analyse des RNA totaux. Or il apparaît que l'augmentation de l'activité du (des) promoteur(s) DCL2 (et DCL4) est visible dans une analyse globale. Ceci suggère, soit que l'influence du virus est remarquablement forte dans les tissus phloémiens, soit qu'un signal produit lors de l'infection est transmis de manière systémique dans la plante et que celle-ci répond par une stimulation généralisée de la transcription de *DCL2* (et de *DCL4*).

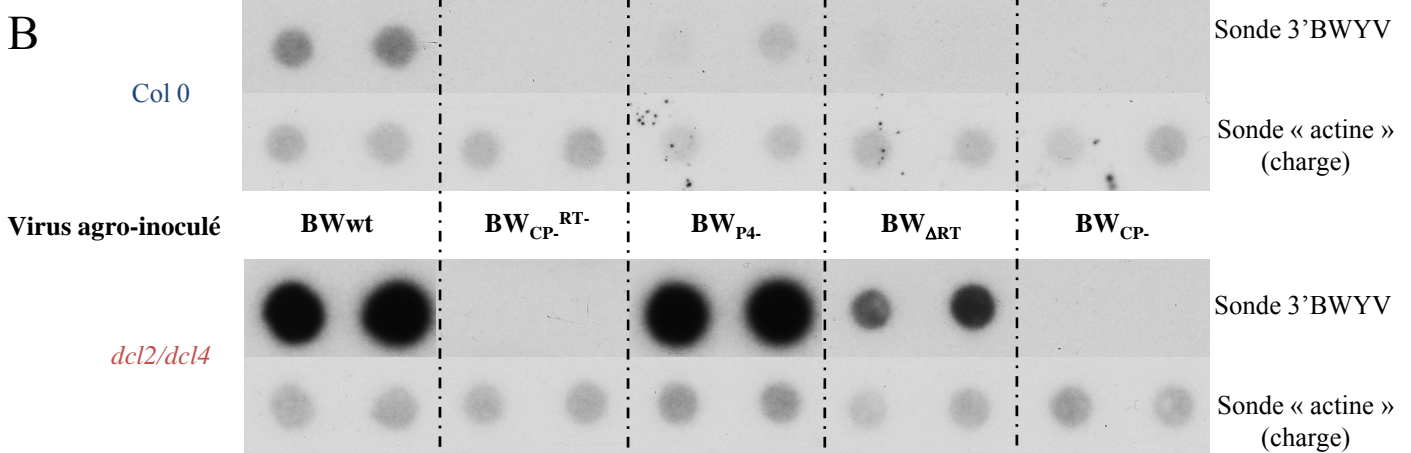
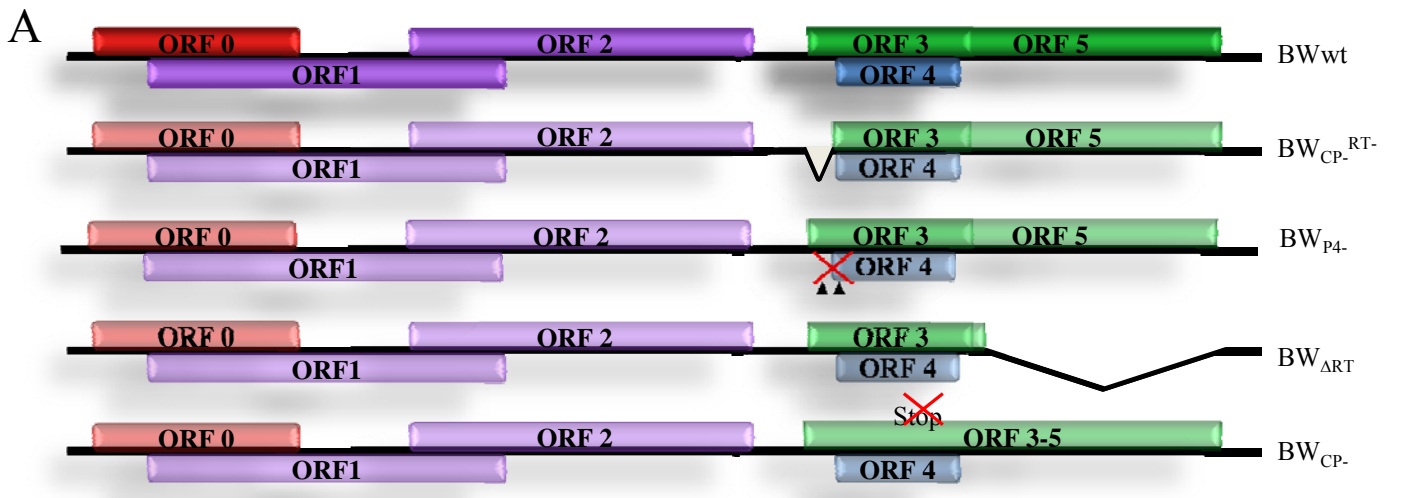
Pour répondre à cette question, nous analysons actuellement des plantes similaires à celles utilisées pour les expériences de RT-PCR quantitatives mais transformées avec le gène de la β -glucuronidase (GUS) à la place du gène de la eGFP comme gène rapporteur. Dans ces

plantes proDCL-GUS, l'analyse est réalisée par coloration GUS, ce qui permet, non pas une analyse quantitative globale comme pour les lignées testées par RT-PCR, mais la localisation tissulaire des sites dans lesquels les promoteurs DCL sont induits. Des résultats préliminaires obtenus avec ces plantes infectées par le BWYV semblent montrer un renforcement de la coloration bleue dans le système vasculaire des plantes proDCL2-GUS infectées, révélant une surexpression du transcrit GUS sous la dépendance du promoteur DCL2. Par contre, une plante non infectée n'exprime que peu ou pas de protéine GUS dans ces tissus lorsque son gène est exprimé sous la dépendance de ce même promoteur DCL. Il semblerait donc que l'effet révélé par RT-PCR soit dû à une importante surexpression locale du gène DCL2, plutôt qu'à un signal global, mais ces résultats demandent confirmation.

Ces expériences ne permettent pas de savoir si l'effet important observé sur l'expression du gène DCL2 est directement dû à une réponse de la plante à l'infection virale ou s'il résulte, d'une manière directe ou indirecte, de l'inactivation de la protéine DCL4, un des rôles de DCL2 étant de prendre le relais de l'activité de DCL4 lorsque celle-ci est inhibée. L'utilisation, dans des expériences similaires à celles-ci, de plantes mutées dans le gène *DCL4* pourraient nous apporter cette réponse. Ainsi, si l'inactivation de DCL4 mimait les effets observés sur le promoteur du gène *DCL2* suite à l'infection virale, on pourrait conclure à l'existence, sur le génome du BWYV, d'un gène codant pour un deuxième suppresseur de RNA silencing dont l'action serait d'inhiber l'activité DCL4. Cette hypothèse nous a conduits à expérimenter l'identification d'une protéine virale pouvant porter cette fonction.

4-2) Recherche du deuxième suppresseur potentiel

Afin d'identifier un éventuel deuxième suppresseur encodé par les polérovirus, nous avons utilisé une approche de génétique inverse en infectant des plantes Col 0 et des mutants *dcl2/dcl4* par différents mutants du BWYV, chacun étant déficient dans l'expression d'une ou plusieurs protéines virales (**figure II-18-A**). Cette expérience avait pour objectif de mettre en évidence la protéine virale dont l'absence peut être compensée par la mutation *dcl4*, en d'autres termes, la protéine dont une fonction essentielle est de minimiser l'activité de DCL4 lors de l'infection d'une plante sauvage. Le choix de l'utilisation des mutants *dcl2/dcl4* plutôt que de simples mutants *dcl4*, a été dicté par la forte activité antivirale de DCL2 contre le BWYV (qui aurait masqué la différence d'accumulation du RNA viral dans des plantes sauvage et des mutants *dcl4*).



C

| | BW _{wt} | BW _{CP^{-RT-}} | BW _{P4-} | BW _{ΔRT} | BW _{CP-} |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Col 0 | 0,95 | 0 | 0,2 | 0,12 | 0 |
| <i>dcl2/dcl4</i> | 6,28 | 0 | 6,53 | 1,91 | 0 |
| Rapport $\frac{dcl2/dcl4}{Col\ 0}$ | 6,61 | 1 | 32,65 | 15,91 | 1 |

Figure II-18 : infection de Col 0 et du mutant *dcl2/dcl4* par différents mutants du BWYV

A) Représentation schématique des différents mutants du BWYV utilisés. La délétion du codon initiateur du gène de la CP inhibe à la fois la synthèse de la CP et celle de la RT (mutant BW_{CP^{-RT-}}). Une croix rouge représente une mutation ponctuelle (mutants BW_{P4-} et BW_{CP-}). Les triangles noirs indiquent l'insertion des deux codons stop dans la phase de lecture du gène de la protéine P4 (mutant BW_{P4-}). ΔRT indique la délétion de la majorité de l'ORF 5, la mutation abolit la synthèse de RT mais ne contrecarre pas celle de la protéine CP (mutant BW_{ΔRT}). La mutation du codon stop du gène de la CP empêche la synthèse de la CP tout en conservant celle de la RT (mutant BW_{CP-}). L'ensemble de ces mutants ont été construits et décrits par Brault *et al.* (1995) et Ziegler-Graff *et al.* (1996). B) Analyse par dot blot des RNA extraits de plantes Col 0 ou *dcl2/dcl4* infectées depuis 21 jours par les différents virus. Chaque « dot » correspond à l'analyse d'une plante. Les RNA viraux sont révélés par une sonde 3' BWYV ; la sonde actine a été hybridée sur la même membrane et permet de normaliser la charge de RNA totaux. C) Quantité relative des RNA viraux. Chaque valeur correspond à la moyenne des valeurs calculées pour les deux échantillons présentés sur le dot blot, grâce au logiciel Image Gauge. Le rapport est révélateur de l'augmentation du titre viral sur les mutants *dcl2/dcl4*.

Le niveau d'amplification des RNA des différents virus a été testé par dot blot et leur quantité relative (normalisée par rapport au signal obtenu avec la sonde actine), mesurée grâce au logiciel Image Gauge (FUJIFILM). Les résultats obtenus (présentés en **figure II-18**) montrent que la mutation *dcl2/dcl4* permet une augmentation du titre viral d'un facteur supérieur à 6 pour le virus sauvage, par rapport à une plante Col 0.

L'infection systémique de plantes Col 0 par un virus n'exprimant pas la protéine majeure de capsid (CP) est impossible (mutants BW_{CP-} et BW_{CP-RT-}), cette protéine étant essentielle au mouvement à longue distance. On constate que la double mutation *dcl2/dcl4* ne permet pas de restaurer l'infection en compensant le défaut d'expression de la protéine CP, comme le confirme l'absence de RNA viraux extraits de ces mutants.

Le virus mutant $BW_{\Delta RT}$ est délété du domaine RT dont l'importance dans l'accumulation du virus dans la plante a été démontrée (Brault *et al.*, 1995). L'expérience présentée ici confirme les résultats précédents : on note environ huit fois moins de virus $BW_{\Delta RT}$ que de virus sauvage dans les plantes Col 0. Inoculé à des plantes *dcl2/dcl4*, son titre augmente d'un facteur 16 par rapport à une plante Col 0, mais reste encore trois fois plus faible que celui du virus sauvage dans ces mutants. Ainsi, même si son infection semble facilitée sur les mutants *dcl2/dcl4*, probablement en raison d'une inhibition importante du système défensif de la plante, le virus $BW_{\Delta RT}$ ne surmonte pas totalement l'absence de la protéine RT.

Par contre, l'analyse de l'infection par le virus mutant n'exprimant pas la protéine de mouvement, P4 (BW_{P4-}), montre que le virus se multiplie 33 fois plus efficacement dans le double mutant *dcl2/dcl4* que dans une plante sauvage. De plus, la quantité de RNA BW_{P4-} extrait de ces plantes est comparable à celle du RNA viral sauvage (alors qu'elle était cinq fois plus faible dans les plantes Col 0). On peut en conclure l'absence des enzymes DCL2 et DCL4 permet de restaurer le pouvoir infectieux du mutant BW_{P4-} à un niveau similaire à celui de BW_{wt} .

Cette expérience soutient donc fortement un rôle de la protéine P4 dans la suppression du RNA silencing en inhibant l'activité DCL4.

Forts de ces résultats, nous avons mené une nouvelle série d'infection afin d'analyser en détail le comportement du mutant BW_{P4-} sur les plantes Col 0, *dcl4* et *dcl/dcl4*. Les RNA ont été extraits des plantes infectées et analysés par northern blot. Les résultats préliminaires de cette expérience sont présentés en **figure II-19**. Dans un premier temps, on constate que le virus BW_{P4-} s'accumule plus efficacement dans les plantes Col 0 que le virus BW_{wt} ,

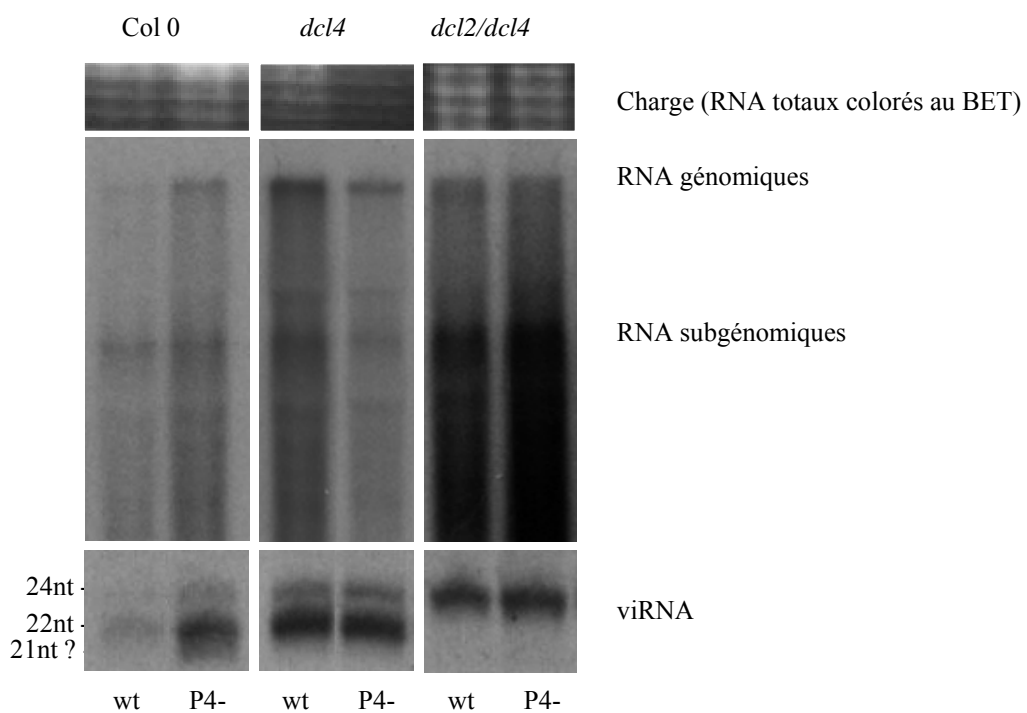


Figure II-19 : northern blot réalisé sur des RNA extraits de plantes infectées par le BWwt ou le BW_{P4}.

Les RNA ont été extraits 28 jours après agro-inoculation, les deux northern blots sont révélés grâce à une sonde 3' BWYV. Cette expérience préliminaire montre une suraccumulation de viRNA après infection par un mutant BW_{P4} (P4-) sur une plante col 0, par rapport à la situation observée avec le virus sauvage (wt). Une bande supplémentaire migrant plus rapidement (21 nucléotides ?) semble se distinguer dans cet échantillon, reflétant peut-être la restauration d'une activité DCL4.

contrairement aux résultats présentés sur le dot blot en **figure II-18**. Une explication pourrait reposer sur le choix de la plante analysée. En effet, il faut savoir que la proportion de plantes clairement infectées par rapport aux plantes inoculées est très faible (voir paragraphe 5 de ce chapitre, **table II-1**). Dans cette expérience, les plantes inoculées ont été analysées par immuno-empreintes et nous avons sélectionné la seule plante Col 0 présentant un marquage important suite à l'infection par le virus BW_{P4} pour l'analyse par northern blot. Ceci contraste avec l'expérience précédente où toutes les plantes infectées par BW_{P4} avaient été testées par dot blot et présentaient le même niveau faible d'infection. Il est donc possible que l'analyse par immuno-empreinte ne permette pas d'identifier des plantes faiblement infectées. De plus, les RNA sont ici extraits à 28 jours après inoculation (contre 21 jours pour le dot blot). La semaine d'infection additionnelle a donc offert au virus des occasions supplémentaires de contre-sélectionner les mutations introduites dans son génome. Les RNA analysés dans cet échantillon pourraient donc refléter un mélange de virus « pseudo » sauvage et de virus n'exprimant pas la protéine P4. L'analyse de la descendance de ce virus est en cours et nous permettra de répondre à la question de la stabilité du mutant BW_{P4}.

Sur les mutants *dcl2/dcl4*, par contre, on constate que le virus se réplique aussi bien qu'il exprime ou non la protéine P4. Dans le mutant *dcl4*, l'accumulation virale semble meilleure pour le virus sauvage mais la différence pourrait être due à un problème de charge. L'analyse des viRNA révèle une modification importante : on constate, sur Col 0, que la quantité de viRNA produits est nettement plus forte en absence de la protéine P4 et ne reflète pas uniquement une multiplication virale accrue (voir **figure II-19**, viRNA). Il semble également qu'une bande supplémentaire, migrant plus rapidement que les viRNA issus du virus sauvage, se dessine suite à l'infection par BW_{P4} (cette bande pourrait correspondre à des viRNA de 21 nucléotides produits par DCL4). Ce résultat suggère que la protéine P4 serait capable d'inhiber la production de viRNA de 21 nucléotides, ce qui serait en parfait accord avec notre hypothèse d'un rôle de P4 dans l'inactivation de DCL4. On peut toutefois s'interroger sur la nature des viRNA suraccumulés et qui co-migrent avec ceux de 22 nucléotides : s'agit-il d'une augmentation de l'activité DCL2 ou d'un retard de migration des viRNA de 21 nucléotides ? Par contre, dans les plantes mutantes *dcl4* ou *dcl2/dcl4* aucune différence, ni dans la quantité, ni dans la taille des viRNA produits, n'est visible entre celles infectées par le BW_{wt} ou le BW_{P4}. Sur les plantes *dcl4*, on observe une forte augmentation des viRNA de 22 nucléotides générés par DCL2. Les plantes *dcl2/dcl4* infectées ne présentent que des viRNA de 24 nucléotides qui reflètent la seule activité DCL3 fonctionnelle (mis à part DCL1). Les profils semblables

obtenus pour les infections par BWwt et BW_{P4}. soutiennent que la protéine P4 n'aurait donc d'effet, ni sur l'activité DCL3, ni sur l'activité DCL2.

L'ensemble de cette expérience devra être réitérée sur un nombre plus important de plantes. Il faudra analyser des plantes Col 0 infectées par le mutant BW_{P4} présentant les deux types de situation (très faible ou forte infection) afin d'évaluer la capacité du mutant BW_{P4} à (pseudo)réverter et de corrélérer, le cas échéant, la production des viRNA.

4-3) Analyse de l'activité de suppresseur de RNA silencing de P4 sur *N. benthamiana*

Les expériences de patches tests sont classiquement utilisées afin de démontrer ou d'infirmer le caractère de suppresseur de RNA silencing d'une protéine (voir introduction, **figure 37**). Nous avons donc voulu tester la protéine P4 dans ce système. Les résultats préliminaires d'une première expérience suggèrent que contrairement à P0, les protéines P4 des polerovirus (CABYV et BWYV) sont incapables d'inhiber le silencing local dans *N. benthamiana*. En effet, les zones infiltrées sont rouges, résultat du silencing du transcrit GFP. Ces protéines n'interfèrent pas non plus avec le mouvement du RNA silencing, qu'il soit local (visualisés par un liseré rouge autour du patch) ou systémique (coloration rouge des nervures des feuilles systémiques) (données non présentées).

L'analyse moléculaire de cette expérience est en cours, ses résultats nous permettront de savoir si la présence de la protéine P4 des polerovirus modifie le profil des siRNA produits dans ce système à partir du transcrit de la GFP.

5) Conclusions, discussion et perspectives

L'hypothèse initiale selon laquelle les enzymes DCL seraient responsables du tropisme phloémien des polerovirus n'a pas pu être validée par nos différentes expériences. Il semblerait donc que la restriction des polerovirus au système vasculaire de l'hôte est le résultat d'un autre phénomène, lié ou non au mécanisme de RNA silencing.

L'approche génétique que nous avons menée a cependant montré qu'en l'absence des DCL dites « antivirales », DCL2 et DCL4, les plantes sont hypersensibles à l'infection et développent de graves symptômes dont l'issue est rapidement fatale. Nous avons également découvert que ces protéines ont une forte influence sur la multiplication virale, puisqu'on

constate une augmentation du titre de virus d'un facteur 10 environ lorsque ces protéines DCL sont absentes. Néanmoins, un effet aussi marquant n'a pas été observé sur la quantité de protéines de structure produites durant l'infection.

Nos expériences basées sur l'infection par un virus recombinant dont le trajet peut être suivi lors de l'infection *in planta* par l'induction du silencing d'un gène endogène, montrent que cette augmentation en RNA viraux n'est pas accompagnée d'une sortie des cellules phloémiennes : le RNA reste confiné dans le système vasculaire de l'hôte dans la plupart des mutants testés. Pour les mutants fortement affectés, *dcl2/dcl4* et *dcl2/dcl3/dcl4*, nous n'avons toutefois pas pu obtenir de réponse claire car le suivi de ce virus nécessite que le mécanisme de RNA silencing soit opérationnel. Nous avons donc pour objectif, afin de pouvoir conclure cet aspect de l'étude, de mener des expériences d'hybridation *in situ* pour rechercher, dans ces plantes mutantes, la présence du RNA viral.

Ces expériences ont également ouvert un nouvel axe de recherche au laboratoire. En effet, nous avons mis en évidence l'implication prioritaire de DCL2 dans la synthèse de sRNA viraux lors de l'infection par le BWYV. Ce résultat était inattendu puisque la hiérarchie d'action des protéines DCL dans le RNA silencing antiviral (proposé par Deleris *et al.*, et confirmée, notamment par les travaux de Fusaro *et al.*, 2006 et Diaz-Pendon *et al.*, 2007) indique que DCL4 est l'enzyme majoritairement impliquée dans ce mécanisme et que DCL2 n'agit que de manière redondante, lorsque cette première est inactivée génétiquement ou par un suppresseur viral. Cette observation nous amène donc à envisager la présence, sur le génome du BWYV, d'un deuxième suppresseur de RNA silencing capable d'inhiber la production de sRNA de 21 nucléotides par DCL4.

Nos premières expériences montrent que la protéine de mouvement, P4, est un bon candidat pour porter cette fonction. En effet, la faible accumulation du RNA viral d'un mutant BW_{P4} infectant une plante sauvage est compensée par la double mutation *dcl2/dcl4* (**figure II-18-B**). De plus, il semble que ce virus soit d'avantage la cible des enzymes DCL, comme le suggère la synthèse de viRNA nettement accentuée par rapport à celle constatée avec le virus sauvage, sur des plantes Col 0. Ainsi, la présence de la protéine P4 pourrait réguler de manière négative la synthèse des viRNA lors de l'infection.

Nous n'avons toutefois pas pu prouver l'activité de la protéine P4 des polerovirus dans les tests classiques de suppression (patchs tests sur *N. benthamiana*), ce qui confirme les résultats obtenus par S. Pfeffer (thèse, 2002). Par ailleurs, les expériences de patch test réalisées avec le virus complet avaient mis en évidence une activité de suppresseur de RNA silencing

| | <i>Arabidopsis thaliana</i> | | | <i>Nicotiana benthamiana</i> | | |
|------------------|-----------------------------|-------------|-----------|------------------------------|------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| BWwt | 7/8 (1.54) | 7/10 (2.11) | 4/5 (+++) | 5/5 (2.14) | 6/6 (0.91) | 6/7 (1.21) |
| BW _{p0} | 2/8 (1.04) | 5/10 (2.12) | 3/5 (+) | 2/5 (0.42) | 2/6 (0.90) | 1/7 (0.43) |
| BW _{p4} | 0/9 | 1/10 (2.11) | 1/5 (++) | 1/5 (0.45) | 2/6 (0.46) | 2/8 (0,54) |

Table II-1 : efficacité de l'infection d'*A. thaliana* et de *N. benthamiana* par le BWwt et les mutants BW_{p0} et BW_{p4}.

Trois expériences d'infection sont présentées pour chaque plante hôte. La première valeur correspond au nombre de plantes infectées par rapport au nombre de plantes inoculées. Entre parenthèses, les résultats chiffrés indiquent la densité optique moyenne (DO_{405nm}) obtenue par test ELISA. Les symboles + sont le résultat de l'estimation de l'intensité du marquage immunologique après un test par immuno-empreintes (le marquage le plus intense étant celui représenté par +++ ; + indiquant un marquage faible).

très réduite, perdue avec le mutant BW_{P0-}, ce qui suggère que P0 est la seule protéine virale capable d'inhiber le RNA silencing dans ce système (Pfeffer *et al.*, 2002).

Ces résultats négatifs ne nous découragent toutefois pas dans l'idée que P4 pourrait inhiber l'activité DCL4. Il a été montré que cette protéine de mouvement a une activité hôte-spécifique. En effet, si elle n'est pas nécessaire à l'infection de *N.clevelandii* (Ziegler-Graff *et al.*, 1996), elle semble essentielle à l'infection d'*Arabidopsis thaliana* comme nous l'avons vu dans l'expérience présentée en **figure II-17**. La **table II-1** rassemble les résultats de plusieurs expériences d'inoculation d'*A. thaliana* et de *N. benthamiana* par le BW_{wt} et les mutants BW_{P0-} et BW_{P4-}. Le virus P0- infecte un nombre raisonnable de plantes et présente un titre viral plus faible que celui du virus sauvage. Le virus P4-, par contre, est beaucoup plus difficilement inoculable (voir nombre faible ou nul de plantes infectées). Sur *N. benthamiana*, la DO moyenne mesurée par ELISA est faible dans les trois expériences alors que sur *Arabidopsis thaliana*, lorsque les plantes sont infectées, le titre viral est plus fort.

En particulier, on constate que le titre viral obtenu suite à l'infection d'une seule plante par le mutant BW_{P4-} est comparable à celui obtenu grâce au virus sauvage (expérience numéro 2, **table II-1**). Comme la descendance de ces virus mutants n'a pas été analysée suite à cette expérience, il est possible que ce comportement similaire à celui du virus sauvage reflète, dans cette plante, des réversions des mutations introduites dans le but de restaurer l'expression de P4. Il est d'ailleurs nécessaire, pour nos expériences d'infection des mutants *dcl*, que cette analyse soit effectuée. En effet, nous ne pouvons pour l'instant pas exclure que la restauration de la multiplication du virus BW_{P4-} dans les mutants *dcl2/dcl4* soit également le résultat de réversions de ces mêmes mutations. Il semble cependant peu probable que ces réversions soient l'unique explication au phénomène observé sur les mutants *dcl2/dcl4* car, en plus de restaurer le titre en virus, ces plantes présentent aussi un très fort accroissement de la sensibilité au virus mutant (augmentation du rapport nombre de plantes infectées sur nombre de plantes inoculées) (données non présentées). En résumé, ces résultats suggèrent que la protéine P4 aurait une fonction fondamentale sur *A. thaliana* et moins cruciale sur *N. benthamiana*.

Nous pouvons également imaginer que si l'activité de P4 est spécifique à DCL4 et n'affecte que peu ou pas DCL2 chez *A. thaliana*, les motifs protéiques putativement ciblés dans cette plante ne sont pas retrouvés chez les orthologues de DCL4 chez *N. benthamiana*, dont la séquence est, à ma connaissance, encore inconnue. Ceci expliquerait aisément l'absence d'effet observable de P4 dans cette plante.

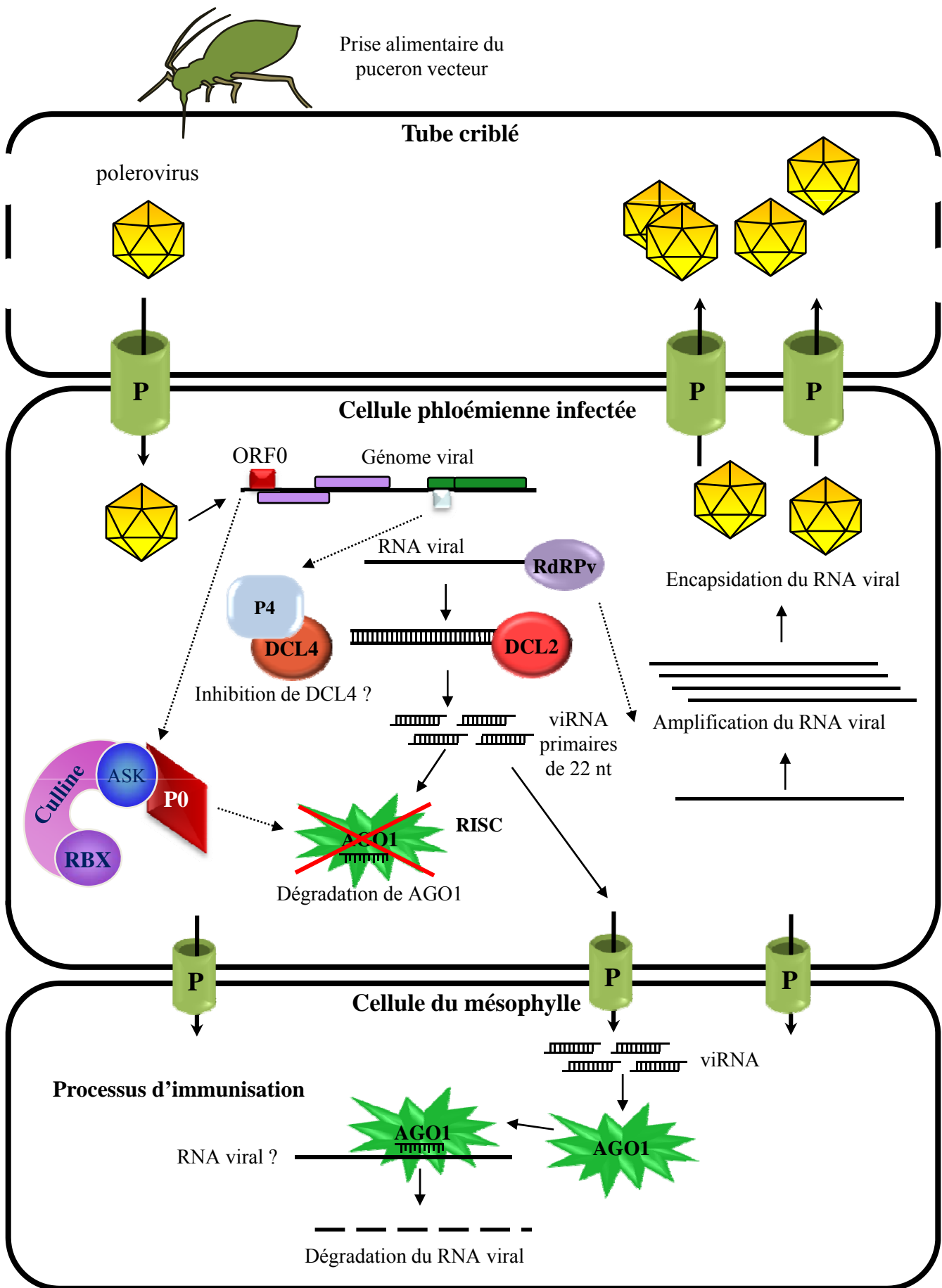


Figure II-20 : Modèle pour l'activité des protéines DCL lors de l'infection virale
P : plasmodesme.

Afin d'identifier chez P4 une activité de suppresseur de RNA silencing, nous prévoyons de tester ses propriétés dans des plantes transgéniques. L'obtention de plantes exprimant la protéine P4 du BWYV est en cours au laboratoire. Le croisement de ces plantes avec des lignées transgéniques dans lesquelles le silencing d'un transgène GFP ou du gène *SULPHUR* (plantes Suc-SUL) est établi pourrait nous permettre d'analyser l'impact de la protéine P4 sur le RNA silencing chez *A. thaliana*. Nous envisageons aussi de réaliser des expériences qui nous permettraient de mettre en évidence une éventuelle interaction entre P4 et DCL4 en système double hybride de levure, par des techniques de co-immunoprécipitations, ou encore, *in vivo* par la méthode de BiFC. Toutes ces expériences seront réalisées dans un futur proche. Nous allons bien évidemment répéter les expériences d'infection par le mutant BW_{P4} sur l'ensemble des mutants *dcl* d'*A. thaliana*.

L'ensemble des données répertoriées dans ce chapitre nous permettent de préciser le modèle de l'infection par le BWYV établi à la fin du premier chapitre (voir **figure II-20**). Nous savons désormais que la synthèse des viRNA résulte principalement de l'activité de DCL2. Nous précisons également que l'activité de DCL2 est probablement la conséquence de l'inactivation de la protéine DCL4, potentiellement grâce à un effet inhibiteur porté par la protéine P4. Nous pouvons confirmer la fonctionnalité d'AGO1 dans les cellules jouxtant les cellules phloémiennes puisque nous avons vu, grâce au virus marqué, que les viRNA peuvent y être transportés et que leur incorporation dans AGO1 permet l'établissement du silencing du gène *SULPHUR*. Néanmoins, nous n'avons pas encore de preuve directe quant à l'entrée effective et la dégradation du RNA viral dans ces cellules.

Conclusion générale

Le RNA silencing est un mécanisme largement utilisé par les eucaryotes dans diverses voies de régulation endogènes. Chez les plantes, il constitue également un moyen efficace de lutter contre les infections virales. En réponse à cet arsenal, la plupart des phytovirus ont développé des protéines capables d'inhiber ce mécanisme de défense.

Mode d'action de la protéine P0

L'objectif premier de ma thèse a été de contribuer à l'élucidation du mode d'action du suppresseur de RNA silencing codé par nos virus modèles au laboratoire, les polerovirus. Des études antérieures (Pfeffer *et al.*, 2002) avaient montré que la protéine P0 des polerovirus possède une forte activité de suppresseur de RNA silencing. Les travaux de Pazhouhandeh *et al.* (2006) ont permis de grandes avancées dans la compréhension du mode d'action de cette protéine, par la découverte d'un domaine F-box nécessaire à son interaction avec une protéine (ASK) impliquée dans la voie de la protéolyse dépendante de l'ubiquitine. Cette donnée importante nous a permis de proposer un modèle pour le mode d'action de la protéine P0. Celle-ci serait capable de prendre part à un complexe enzymatique portant une activité ubiquitine ligase. Ainsi, la protéine P0 pourrait recruter de manière spécifique, un ou plusieurs facteurs impliqués dans le mécanisme de RNA silencing, afin d'induire leur poly-ubiquitination par le biais du complexe ubiquitine ligase. Cette modification constitue un marquage pour le ciblage vers le protéasome 26S dont le rôle est de dénaturer et de cliver les protéines poly-ubiquitinées. Ainsi, la reconnaissance d'une protéine cellulaire par P0 conduirait à sa dégradation et au blocage de la voie du RNA silencing.

Afin d'identifier la « cible » potentielle de P0, nous avons, dans un premier temps, voulu localiser l'action de la protéine virale dans la cascade réactionnelle du RNA silencing. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence l'inhibition du silencing à une étape située en aval de l'activité DICER, ce qui nous a conduits à proposer que la protéine AGO1 pourrait être

un candidat à la dégradation par P0. La mise en évidence de la stabilisation de transcrits cibles de miRNA dans des plantes transgéniques exprimant la protéine P0 corrobore cette hypothèse, la protéine AGO1 étant l'effecteur responsable du clivage de ces transcrits. Nous avons par la suite pu montrer qu'AGO1 était effectivement dégradée *in vivo* en présence de P0, et que les deux protéines peuvent interagir. Il semble donc que l'effet inhibiteur de P0 se positionne bien contre la protéine AGO1.

Ce mode d'action original constitue une première chez les supresseurs de RNA silencing. En effet, la plupart des supresseurs viraux inhibent le RNA silencing par séquestration des sRNA. De rares exemples d'action directe de supresseurs viraux contre des protéines cellulaires ont été récemment mis en évidence, avec un effet inhibiteur sur l'activité de la protéine cellulaire. Par exemple, la protéine P38 du TCV bloque l'activité de DCL4, inhibant la production de sRNA de 21 nucléotides (Deleris *et al.*, 2006), mais une interaction directe entre les deux protéines n'a pas encore été démontrée. La protéine 2b du CMV, quant à elle, enraye l'activité d'AGO1 en se fixant au niveau de son site catalytique (Zhang *et al.*, 2006). La protéine V2 du TYLCV peut, elle, interagir avec SGS3, une protéine dont la fonction est liée à l'amplification du signal de silencing (Glick *et al.*, 2008). Enfin, la protéine P6 du CaMV interagit avec DRB4, un co-facteur de DCL4 (Haas *et al.*, 2008). Actuellement, la protéine P0 est donc la seule capable d'interférer avec l'intégrité même d'une protéine cellulaire, en l'occurrence, AGO1.

Cependant, nous n'avons pour l'instant aucune preuve substantielle que l'interaction entre les protéines P0 et ASK ait un lien direct avec la dégradation d'AGO1. En particulier, nous ignorons si la déstabilisation constatée de la protéine cellulaire fait réellement suite à une poly-ubiquitination induite par un complexe ubiquitine ligase contenant P0 et résulte de sa dégradation par le protéasome 26S. Ainsi, l'étude de cette protéine virale n'est pas encore arrivée à son terme, des expériences confirmant ou infirmant notre modèle devant encore être menées. Nous avons notamment pour objectif d'expérimenter les effets d'inhibiteurs de protéasome différents du MG132 afin de palier aux nombreuses limites de cette molécule. De plus, combinées à des essais dans des protoplastes, ces drogues devraient bénéficier d'une meilleure pénétration intracellulaire. Nous mettrons à profit, pour ces expériences, les plantes nouvellement produites au laboratoire, exprimant une version étiquetée de la protéine P0 sous la dépendance du promoteur inductible à l'oestradiol ; leur utilisation devrait nous permettre de détecter plus facilement la protéine virale après induction.

L'immunoprécipitation de complexes renfermant la protéine P0 à partir de ces plantes pourrait également nous permettre d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de la protéine virale et ainsi, de déterminer d'éventuelles autres cibles ou encore, de lui imputer de nouvelles fonctions. D'autres plantes plus appropriées à l'élucidation de ces nouvelles questions sont également en cours d'obtention au laboratoire. Une version étiquetée de P0 a été introduite dans des plantes sous la dépendance du promoteur SUC2, dont l'activité est spécifique des cellules compagnes. Nous recréons ainsi des conditions plus proches de la localisation naturelle de P0 pendant l'infection virale. L'utilisation de ces plantes devrait nous éviter l'identification d'éventuels interactants dont la localisation tissulaire ne leur permettrait pas d'interagir avec P0 en contexte viral.

D'autre part, nous n'avons aucune démonstration, pour le moment, de la localisation de la protéine AGO1 dans les cellules phloémiennes et notre tentative visant à montrer une diminution de l'accumulation d'AGO1 dans les plantes infectées s'est révélée infructueuse. Cet échec s'explique aisément par la dilution de l'effet de P0 sur AGO1 dans un extrait protéique total. Un moyen de montrer l'effet de P0 exprimée en contexte viral sur la stabilité de la protéine AGO1 serait l'infection de plantes exprimant, sous la dépendance du promoteur SUC2, une version étiquetée d'AGO1. Ainsi, l'effet de la protéine virale serait plus ciblé, même si l'on peut s'attendre à ce qu'il ne soit pas total, en raison, notamment, de la faible expression de P0 pendant l'infection, mais aussi, du nombre limité de faisceaux conducteurs contaminé par le virus.

Afin de mieux comprendre le fonctionnement de P0 en contexte viral, il serait donc fort intéressant d'étudier la localisation tissulaire des différents acteurs du RNA silencing. Certaines plantes en cours de caractérisation dans l'institut pourraient nous apporter des réponses. En effet, Nicolas Baumberger (laboratoire de Pascal Genschik) analyse actuellement une lignée d'*Arabidopsis thaliana* dans laquelle il a introduit le gène codant pour une protéine de fusion AGO1-GFP exprimée sous la dépendance du promoteur endogène d'AGO1. De même, Stephanie Ohnesorge (laboratoire d'Olivier Voinnet) a produit des lignées exprimant un gène rapporteur (GFP ou GUS) sous dépendance des promoteurs des gènes *DCL*, permettant de localiser les sites où ces protéines sont préférentiellement synthétisées.

Parmi les polerovirus, la protéine P0 est la moins conservée, du point de vue de sa séquence. Si dans nos expériences, les mêmes résultats ont toujours été obtenus avec des protéines P0 issues de nos deux virus modèles, le CABYV et le BWYV, ces importantes

disparités de séquence dissimulent certainement des fonctions supplémentaires spécifiques à chaque virus, fonctions qu'il serait intéressant d'identifier et d'étudier. En particulier, des expériences récentes montrent que si les deux protéines P0 présentent une localisation nucléaire, la protéine P0 du CABYV est la seule capable de se localiser dans le nucléole (Julia De Cillia, communication personnelle). L'identification du signal de localisation nucléolaire et sa mutagénèse devrait nous indiquer si cette localisation subcellulaire est nécessaire à l'activité de suppression du RNA silencing ou si elle est impliquée dans d'autres fonctions de la protéine qui nous sont, pour le moment, inconnues.

Tropisme phloémien des polerovirus

En marge de cette étude adressant le mode d'action de la protéine P0, nous avons montré que, malgré la présence de la protéine P0 dans les plantes infectées nous avons pu isoler des protéines AGO1 intactes et capables de charger des sRNA viraux. Cette observation surprenante nous a amenés à imaginer que ces viRNA produits dans les cellules infectées pourraient passer dans les cellules voisines non infectées, et ainsi prévenir l'entrée du virus dans les cellules non phloémiennes, cet effet pouvant être la cause du tropisme phloémien des polerovirus.

Nous avons initié une étude génétique pour tenter de répondre à cette question. La conclusion de nos expériences est que le RNA silencing, et plus particulièrement, les protéines DCL impliquées, notamment, dans la synthèse des molécules signal permettant le mouvement à courte distance du RNA silencing ne semblent pas responsables de la restriction des polerovirus dans le système vasculaire de leur hôte. Plus précisément, ces protéines ne sont pas les uniques garants de ce tropisme ; leur inactivation ne permet pas aux polerovirus d'infecter l'ensemble des tissus de la plante.

L'explication la plus vraisemblable pour la restriction au phloème des polerovirus est, en l'état actuel de nos connaissances, le résultat d'une combinaison de facteurs impliquant à la fois le RNA silencing mais aussi la déficience d'une protéine de mouvement efficace. En effet, Savenkov et Valkonen (2001) ont montré que même si la co-infection du PLRV et du PVA (Potato Virus A) permet la sortie du phloème du polerovirus, l'expression constitutive du suppresseur de silencing du PVA, la protéine HcPro, dans une plante transgénique, n'induit qu'une augmentation du titre viral du PLRV dans les vaisseaux phloémiens lors de l'infection.

Dans ce cas, comme dans nos expériences, la suppression du silencing est donc également insuffisante pour lever la restriction au phloème des polerovirus.

Ryabov *et al.* (2001) sont, quant à eux, parvenus à induire la sortie du phloème du PLRV grâce à une co-infection avec un umbravirus. Ces expériences montrent qu'une protéine essentielle mais non suffisante à ce phénomène est le produit de l'ORF 4 des umbravirus, impliqué dans le mouvement de cellule à cellule. Or, lorsque cette protéine est exprimée dans un contexte hétérologue, à partir du CMV, le PLRV co-inoculé est toujours capable d'envahir les cellules du mésophylle. Par contre, la même expérience réalisée avec un CMV mutant n'exprimant pas son suppresseur de RNA silencing, la protéine 2b, mais portant toujours l'ORF4 des umbravirus, ne promeut plus la sortie du PLRV, ce qui semble indiquer que le RNA silencing est également impliqué dans le tropisme de ce virus. La protéine 2b du CMV, par son activité inhibitrice d'AGO1, pourrait neutraliser l'activité de ces protéines chargées en viRNA dans les cellules voisines des sites d'infection du PLRV (mais infectés par le CMV). Cette fonction ne peut pas être portée par la protéine P0, puisqu'elle est, *a priori*, incapable de circuler de cellule à cellule, mais pourrait être mimée par les mutations *dcl2/dcl4*, les viRNA chargeant AGO1 étant les produits de ces enzymes. Quant au produit de l'ORF4, il participerait au transport du RNA viral des cellules phloémiennes vers les cellules de la gaine périvasculaire et au-delà. Puisque les polerovirus codent pour une protéine de mouvement, ces expériences suggèrent que cette protéine n'est pas adaptée à la sortie vers les cellules du mésophylle.

Ainsi, il devrait être possible d'induire l'invasion des cellules du mésophylle par les polerovirus grâce à l'infection de mutants *dcl2/dcl4* exprimant une protéine de mouvement virale hétérologue.

Un nouveau suppresseur pour les polerovirus ?

L'approche génétique de notre étude nous a conduits à montrer que l'enzyme DCL principalement active dans la défense antivirale contre les polerovirus chez *Arabidopsis thaliana* est DCL2. Or, d'autres études (Deleris *et al.*, 2006, Fusaro *et al.*, 2006 et plus récemment, Donaire *et al.*, 2008) indiquent que pour des virus à RNA appartenant à différentes familles ou genres (*Tombusviridae*, *Bromoviridae*, *Potyviridae*, Tobravirus), l'activité antivirale est assurée de manière hiérarchique, en premier par DCL4, puis par DCL2 dans le cas d'une défection de DCL4.

Nos études préliminaires analysant le niveau d'expression des gènes de ces enzymes montrent que l'infection par le BWYV dans une plante sauvage stimule nettement la transcription du gène *DCL2*, et dans une moindre mesure, celle du gène *DCL4*. Ces expériences devront être répétées, éventuellement avec d'autres polerovirus, et élargies à certains mutants *dcl* afin de simplifier les interprétations. A ce stade, il n'est pas encore possible de distinguer une induction globale de l'expression des gènes des DCL antivirales suite à l'infection, d'une induction spécifique du promoteur *DCL2* en réponse à la présence du BWYV. Cependant, l'hypothèse suivante peut être proposée : l'inactivation de *DCL4* induit la mobilisation de *DCL2*, fonctionnellement redondante à *DCL4*, sa production doit donc être augmentée, ce que la plante régule de manière transcriptionnelle.

Une cause des plus évidentes à l'inactivation d'une enzyme DCL lors d'une infection virale est une action inhibitrice sur la protéine cellulaire par un suppresseur de RNA silencing codé par le virus. Or nous avons montré que le suppresseur des polerovirus identifié par Pfeffer *et al.* (2002), la protéine P0, est incapable d'interférer avec la production de sRNA (Bortolamiol *et al.*, 2007 et résultats dans ce mémoire). Ces données suggèrent l'existence d'un second suppresseur de RNA silencing sur le génome des polerovirus.

Afin d'identifier une telle protéine virale, nous avons initié une étude d'infection de mutants *dcl* d'*A. thaliana* par différents mutants du BWYV touchés dans l'expression d'une ou plusieurs protéines virales. Les premiers résultats désignent la protéine P4 (P4^{BW}) comme suppresseur potentiel. En effet, la déficience d'un virus n'exprimant pas la protéine P4 peut être restaurée par l'absence des protéines *DCL2* et *DCL4*.

Le caractère obligatoire de la présence de la protéine P4 pour permettre un développement normal de l'infection virale dépend fortement de l'espèce végétale dans laquelle se déroule l'infection. Son expression peut être totalement abolie, l'infection du BWYV n'en sera pas moins efficace sur *Nicotiana clevelandii*. Par contre, une telle mutation du virus perturbe fortement l'infection sur *A. thaliana* et dans une moindre mesure, sur *N. benthamiana*.

Si la protéine P4 s'avérait être le second suppresseur de RNA silencing codé par les polerovirus, sa caractéristique hôte-dépendante pourrait s'expliquer par la présence d'un système de défense plus ou moins efficace, selon les espèces végétales. Ainsi, sur *N. clevelandii*, par exemple, l'absence d'homologue de *DCL4* dans les cellules infectées par le BWYV rendrait la présence de P4 superflue. On peut également penser que dans cette plante, la protéine portant l'activité *DCL4* serait suffisamment éloignée génétiquement de son orthologue

chez *A. thaliana* pour ne pas être reconnue par P4. La présence de la protéine virale serait dans ce cas inefficace, et l'inhibition de son expression ne modifierait pas la réplication virale. A l'opposé, dans *A. thaliana*, l'activité du suppresseur P4 serait requise pour inactiver un système de défense puissant dans les cellules phloémiennes.

Nous pouvons également imaginer que l'activité de P4 pourrait compléter l'activité de P0, voire s'y substituer dans des espèces où les protéines ARGONAUTE ne possèdent pas de domaine reconnu par P0, ces espèces échappant donc à l'action de P0. Il est important de noter qu'*Arabidopsis thaliana* n'est pas un hôte naturel du BWYV, mais que cette plante appartient à la famille des brassicacées dont différents représentants sont, eux, hôtes de ce virus. Il est donc probable que les effets de l'infection virale constatés et analysés dans la plante modèle soient reproduits dans les hôtes naturels, la proximité génétique des membres d'une même famille pouvant permettre au virus d'appliquer ses stratégies défensives sur différentes espèces.

L'hypothèse selon laquelle la protéine P4 des polerovirus pourrait être un suppresseur de RNA silencing est appuyée par le fait que cette même protéine, chez les luteovirus, possède une activité de suppresseur de RNA silencing (S. Pfeffer, thèse, 2002). Des expériences similaires à celles réalisées par S. Pfeffer (patch tests dans *N. benthamiana*) ont été reproduites récemment au laboratoire et montrent qu'en plus de son action locale, la protéine P4 du BYDV semble capable d'inhiber le mouvement du RNA silencing de cellule à cellule (données préliminaires non présentées). Or le signal de RNA silencing responsable de l'extinction ciblée de gènes à courte distance est le produit de l'activité de DCL4 chez *A. thaliana*, les siRNA de 21 nucléotides (Himber *et al.*, 2003). La protéine P4 du BYDV (P4^{BY}) serait donc capable d'interférer, soit avec le mouvement de la molécule signal, soit avec sa production. Cette deuxième hypothèse suggère un effet inhibiteur de P4^{BY} sur l'activité des enzymes DICER. Si tel est le cas, et comme le silencing local est également inhibé par cette protéine, il est fort probable que l'activité de l'ensemble des protéines DICER chez *N. benthamiana* soit neutralisée en présence de P4^{BY}, empêchant toute redondance fonctionnelle. L'analyse moléculaire des patchs tests utilisant la protéine P4^{BY} devrait nous permettre de mesurer son effet sur la production de siRNA dans *N. benthamiana*.

Le modèle actuel pour l'évolution des *Luteoviridae* indique qu'un ancêtre commun aurait subi des événements de recombinaison interspèces dans sa partie 5' (région de la RdRP virale, notamment) donnant ainsi naissance aux deux genres polerovirus et luteovirus. La partie 3' des *Luteoviridae* (portant l'ORF 4) est donc beaucoup plus stable parmi les espèces, même si elle a


```

1
P4_BYDV MAMVRADADR ESLGE---GL LSERSQWLWS LPTAQPGAE- DAEDQLVLGE EELQDSEEQA VGRHLFSQRT
P4_PLRV MSMVVYNNQE GEEGNPFAGA LTEFSQWLWS RPLGNPGAE- DAEAAIAAQ EELEFPEDA QARHSLQRT
P4_SbDV MSQYNDDAIV EPHE-----A LHEFSSWLFQ RPPAQHSAEE DNDDEGEIIE EEAVFPEDQA RLTHSSFRRT
P4_CABYV      MQGGGG EEIS-----A LYGATAWLWS TPLGDHHAED DNEETADALI EEAEEL-EEGA QAKHSYFQRT
P4_BWYV-FL MEEDDHA GKHD-----A LSALSQWLWS KPLGQHNADL DDDEEVTGQ EELFLPEEQV RARHLFSQKT
P4_ScYLV      MSSEDALTV VDRLGQWSWS GLPQD--LDE YDDVEHVLEE TLCEDRREEA TGMFSLSRLT
Consensus .....e..... l..lsqWLWS .p..#..a#. dd#.#.vl.# ee.ed.E#a .g.hs.sq.T

71
P4_BYDV HSLATPLEVS PSGRLYQTIR HSRMEYSRPT MNIRSQIVSY SSSARPLPQQ PVPSLMSWTP IAKHLHLGQQ
P4_PLRV TSWATPKQVS PSGRVYQTVR HSRMEYSRPT MSIRSQASYF SSSARPLPPP PVPSLMSWTP IAKYHPSSPT
P4_SbDV ASMAVPRELS LSGRLYQASAS HSLMEYSRPT MNIRSRVSY SSSPRPLPPR QAPSLMSLTH TASTPKFNRY
P4_CABYV ISRAVPQEVPS PSGRLYQRAQ HSALEYSRPT MNIRSSWSSW SSSPRPLPPP RAPSLMSWTP TASPNSNR
P4_BWYV-FL ISREVPQEQS RSGRVYQTAR HSLMECSRPT MSIKSQVSWF SSSPKPLPKI PVPSLTSWTH TVNSTPFPQL
P4_ScYLV ISKPTQPGSS NSDRTYLSTQ RSTMAYSKPT MSIKSQVSLF SITHAPPTQL QVQSHLKIWIH PAPKQQQAPR
Consensus iS..tp.e.S .SgR.Yq... hS.MeySrPT MsIkSq.s.f Sss..Plpq. .vpSl.sWth .a.....p.

111
P4_BYDV STSSRS PKLV RAASQRR
P4_PLRV STNSKL RRAA PKLIKRG
P4_SbDV SINSQLQRAV RNDSPRLSM ASNGMIPVKT SSRSTTRGME TPRSQA PSRS RSL S
P4_CABYV LISLES PRMD CDVGQLSRST GWNGMTQLRT NSRSSTKGTD LPRLQAAGS PSSARSKTRN R
P4_BWYV-FL STSSGSQSPG KGRLQRLTST ERNGTTLPR T NSGSSTKAMV LHR
P4_ScYLV LLASPSRGTP RKSSRPSSG GKIS
Consensus s..S.sr... rk.s.....s. ....

201

```

Figure Cg-1 : alignement des séquences de la protéine P4 de différents *Luteoviridae*

Alignement réalisé sur <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>. Les acides aminés représentés en rouge sont conservés à plus de 90 %, les acides aminés bleus, à plus de 50 %. On constate que contrairement à la protéine P0, P4 est très conservée, autant chez les poliovirus (PLRV, CABYV, BWYV-FL1, ScYLV) que chez les luteovirus (BYDV et SbDV).

également subi des mutations évolutives et connaît des événements de recombinaison intra et inter-espèces, permettant notamment la génération de nouveaux virus au sein de la famille (Moonan *et al.*, 2000). Ainsi, et comme nous le montre une importante homologie de séquence parmi les protéines P4 de la famille des *Luteoviridae* (voir **figure Cg-1**), ces protéines ont probablement une origine commune ; il est donc fort à parier que la protéine P4 des polerovirus possède ou a possédé une activité de suppresseur de RNA silencing similaire à celle portée par la protéine P4 des luteovirus. En effet, on peut supposer que le développement ou l'acquisition de la protéine P0 par le genre polerovirus a conduit à une perte progressive de l'activité suppresseur de P4, alors que les luteovirus ne codant pas de protéine P0 ont maintenu la pression de sélection sur cette fonction afin de lutter efficacement contre le RNA silencing antiviral.

L'action présumée de la protéine P4^{BY} contre les activités DICER est en parfait accord avec nos premières observations de l'effet d'une mutation P4- sur le génome du BWYV lors de l'infection de plantes *A. thaliana* sauvages. En effet, nous pouvons penser que l'éventuelle « perte d'efficacité » de la protéine P4 du BWYV au cours du temps résulterait de la spécificité d'action de cette protéine à l'encontre d'une enzyme DCL particulière, afin de cibler un aspect bien spécifique du RNA silencing. L'infection par le BWYV sauvage provoque la synthèse de viRNA de 22 nucléotides. Nous avons constaté que l'absence de P4 lors de l'infection induisait une augmentation de la production de viRNA et qu'il est fort probable que ce renforcement soit dû à une restauration de l'activité DCL4, symbolisée par la présence de viRNA de 21 nucléotides. Ces données indiquent que P4^{BW} ciblerait spécifiquement l'activité DCL4. Elles pourraient également expliquer l'absence de suppression du RNA silencing dans les expériences de patch test : si la protéine P4^{BW} est également capable d'interférer spécifiquement avec l'orthologue de DCL4 chez *N. benthamiana*, la redondance de fonction entre les différentes protéines DCL nous empêcherait de voir un effet stabilisateur sur le transcrit GFP et donc une fluorescence verte en patch tests. Seule l'analyse moléculaire d'une telle expérience (qui est en cours) pourrait nous indiquer si P4^{BW} interfère avec le RNA silencing, de la même manière chez *N. benthamiana* qu'elle semble le faire chez *A. thaliana*.

Les raisons pour lesquelles le virus aurait sélectionné l'inhibition spécifique de DCL4 par rapport à une inhibition globale des protéines DCL pourrait notamment s'expliquer par le fait que la redondance fonctionnelle de l'activité DCL4 par DCL2 n'est pas complète, une simple mutation *dcl4* étant souvent suffisante pour obtenir une forte augmentation du titre viral

(Deleris *et al.*, 2006 ; Donaire *et al.*, 2008). Nous avons d'ailleurs constaté que l'absence de P4 semble fortement renforcer la synthèse de viRNA et donc le clivage du virus, reflété par une diminution de l'accumulation du RNA viral d'un mutant BW_{P4} infectant une plante Col 0, par rapport au virus sauvage. Ainsi, le virus serait moins affecté par un clivage par DCL2 que par DCL4. De plus, l'inhibition de l'activité des deux enzymes DCL antivirales (DCL4 et DCL2) serait très préjudiciable pour la survie du virus. Nous avons constaté que l'infection de double mutants *dcl2/dcl4* provoque de graves symptômes sur *A. thaliana* et que la plante ne survit guère plus d'un mois. Or, la survie du virus dépend étroitement de celle de son hôte.

Le virus pourrait également tirer profit de son clivage par une enzyme DCL. En effet, nous avons montré que la mutation *dcl3*, contrairement aux mutations *dcl2* ou *dcl4*, a un effet négatif sur l'amplification virale. Cette donnée suggère que les viRNA produits par DCL3 pourraient être profitables au cycle viral, par exemple, en ciblant spécifiquement des gènes endogènes dont l'activité est délétère au virus. Si tel était le cas, la spécificité d'inhibition visant une seule enzyme DCL est aisée à concevoir.

Jusqu'ici, peu de virus à RNA ont été identifiés comme codant pour plusieurs protéines suppresseurs de RNA silencing : un dianthovirus et un closterovirus et un crinivirus.

Le RCNMV (Red Clover Necrotic Mosaic Virus) est un dianthovirus dont le génome compte deux RNA de polarité positive pour lequel la suppression du silencing résulte de l'action conjointe de deux protéines, p27 et p88, toutes deux impliquées dans la réplication virale (Takeda *et al.*, 2005) La seule présence de ces deux protéines est insuffisante pour supprimer le silencing, mais leur activité dans la réplication est nécessaire..

Le CTV (Citrus Tristeza Virus), un closterovirus (famille *Closteroviridae*) dont le génome est un RNA simple brin de polarité positive d'environ 20 kb, code pour trois protéines capables d'inhiber le RNA silencing selon des modes distincts (Lu *et al.*, 2004). Les protéines p20 et p23 sont capables d'inhiber le RNA silencing local et ont été identifiées grâce à la technique des patch tests. L'action de p23 sur l'activité des enzymes DICER est strictement locale. p20, quant à elle, est également capable d'inhiber le RNA silencing systémique. Dans cette même étude (Lu *et al.*, 2004) une troisième protéine capable d'interférer avec le RNA silencing a été identifiée. Celle-ci, la protéine CP, n'a aucun effet stabilisateur sur le transcrit GFP dans les patch tests mais bloque le signal de silencing systémique. Elle a donc nécessité des analyses différentes des patch tests (expériences de greffes) avant d'être indiscutablement identifiée comme suppresseur de RNA silencing. Ces résultats nous confortent dans l'idée que

même si cette méthode est très puissante, elle n'est pas universelle dans l'identification des supresseurs. Le CTV a donc développé trois protéines aux fonctions complémentaires et partiellement redondantes, afin de lutter contre un mécanisme de défense de la plante. Ce phénomène pourrait expliquer la raison pour laquelle le CTV est le virus le plus destructeur des agrumes.

Une étude récente montre que le CTV n'est pas un cas isolé chez les *Closteroviridae*. Le ToCV (Tomato Chlorosis Virus), un crinivirus au génome à RNA bipartite code également pour trois supresseurs de RNA silencing (Cañizares *et al.*, 2008).

Nos travaux ouvrent donc un nouvel axe de recherche au laboratoire. Beaucoup de points restent à éclaircir mais si l'hypothèse selon laquelle la protéine P4 du BWYV est un supresseur de RNA silencing se confirmait, notre virus modèle constituerait donc un nouvel exemple de phytovirus à RNA codant pour plusieurs supresseurs de RNA silencing. La forte régulation négative de l'expression de la protéine P0 par le virus et le ciblage très spécifique d'une activité DCL par la protéine P4 permettrait un équilibre entre la multiplication virale et la dégradation du virus par le mécanisme de RNA silencing, préservant ainsi la relation hôte-parasite. L'existence de ces deux supresseurs pourrait ainsi expliquer partiellement le succès écologique des polerovirus, qui infectent de nombreuses espèces végétales aux quatre coins du monde.

| | Plantes | <i>E. coli</i> | <i>A. tumefaciens</i> |
|------------------------------|-----------|----------------|-----------------------|
| Kanamycine | 50 µg/ml | 35 µg/ml | 100 µg/ml |
| Hygromycine | 15 µg/ml | | |
| Carbenicilline | 0,5 µg/ml | | |
| Phosphinothricine ou BASTA ® | 10 µg/ml | | |
| Rifampicine (DMSO) | | | 100 µg/ml |
| Tetracycline (éthanol) | | 10 µg/ml | |
| Ampicilline | | 100 µg/ml | |
| Œstradiol (DMSO) | 5 µM | | |
| MG132 (DMSO) | 5 µM | | |

Table M&M-1 : concentrations finales des antibiotiques ou des produits chimiques ajoutés aux milieux de culture
Entre parenthèse, le solvant dans lequel le produit chimique est préparé.

Matériel et méthodes

I) Matériel

I-1) Milieux de culture

- Milieu complet Luria Bertani (LB)

Milieu utilisé pour *E. coli*. Il contient 1 % de bactotryptone, 0,5 % d'extrait de levure et 0,5 % de NaCl. Le pH est ajusté à 7,4.

- Milieu YEB

Milieu utilisé pour la culture des agrobactéries. Il contient 0,5 % de Bacto-Beef Extract, 0,1% de Bacto-Yeast Extract, 0,5 % de Bacto-peptone, 0,5 % de saccharose. On l'ajuste à un pH de 7,2 et après autoclavage, on ajoute 2 mM de MgSO₄.

- Milieu MS (Murashige and Skoog)

Milieu utilisé pour la culture de plantes in vitro. Le milieu est préparé à partir d'une poudre commerciale (contenant vitamine et MES ; Duchefa) additionnée de 3% de saccharose et de 7g/L d'agar pour les milieux solides. Le pH est ajusté à 5,7.

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C durant 30 minutes puis additionnés des antibiotiques appropriés. Les bactéries sont cultivées en milieu liquide sous agitation, ou sur milieu solide contenant 1,5% d'agar, à une température de 37°C pour les souches dérivant d'*E. coli* et de 28°C pour les agrobactéries. Les plantes sont mises en cultures à 21°C, dans des conditions lumineuses de jours longs (16h de lumière par jour). Les concentrations des antibiotiques et produits chimiques utilisés sont récapitulées en **table M&M-1**.

| Mutant | Locus | Ecotype | Mutation | Position | Référence |
|----------------|-----------|-----------|--------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <i>ago1-11</i> | At1g48410 | Landsberg | EMS | Conversion A à T au site accepteur d'épissage de l'intron 14 | Kidner et Martienssen, 2005 |
| <i>dcl1-9</i> | At1g01040 | Columbia | Insertion de T-DNA | Exon 19 | Xie <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>dcl2-9</i> | At3g03300 | Columbia | Insertion de T-DNA | Exon 9 | Xie <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>dcl3-9</i> | At3g43920 | Columbia | Insertion de T-DNA | Exon 7 | Xie <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>dcl4-9</i> | At5g20320 | Columbia | Insertion de T-DNA | Exon 23 | Xie <i>et al.</i> , 2004 |

Table M&M-2 : mutants d'*Arabidopsis thaliana* mutantes utilisés lors de nos expériences

Les doubles et triple mutants utilisés ont été obtenus par croisement des simples mutants

I-2) Bactéries

- *Escherichia coli*, souche XL1-blue (STRATAGENE)

Cette souche est utilisée pour l'amplification de vecteurs de petite taille. Elle est *recA*- ce qui limite les risques de recombinaison. Elle est mutée dans l'opéron lactose et code pour une enzyme β -galactosidase délétée de son extrémité N-terminale. Cette délétion peut être complétée par un peptide α de la β -galactosidase exprimé à partir d'un vecteur de clonage de type pBluescript.

- *Escherichia coli*, souche MC1022

On utilise cette souche pour le clonage de vecteurs de grande taille comme les plasmides binaires. Elle dérive de la souche K12 et autorise l'alpha-complémentation avec le fragment N-terminal de la β -galactosidase exprimé à partir d'un vecteur de clonage de type pBluescript.

- *Agrobacterium tumefaciens*, souche GV3101

Cette souche est utilisée pour l'agro-infiltration de *N. benthamiana* et l'agro-infection d'*Arabidopsis thaliana*. Son chromosome porte un gène de résistance à la rifampicine. Elle contient un plasmide Ti désarmé permettant le transfert *en trans* du T-DNA porté par un plasmide binaire (pBin). Les souches d'agrobactéries contenant le plasmide binaire d'intérêt peuvent être conservées à -80°C dans 15% de glycérol.

I-3) Plasmides

- Plasmide Bluescript KS

Ce phagemide dérive du plasmide pUC19 et compte 2961 paires de bases. Il porte un gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de répllication du plasmide ColE1, la région intergénique du phage f1 et le gène lacZ codant pour le peptide α de la β -galactosidase. De part

et d'autre de sa cassette de clonage se trouvent les séquences promotrices des RNA polymérasés des phages T3 et T7. Ce plasmide de petite taille est utilisé pour faciliter les étapes de clonage avant transfert dans un plasmide binaire.

- pBin61

Ce plasmide de 12,9 Kb dérive du pBin19 et est utilisé pour les expériences d'agro-infiltration et d'agro-infection (Voinnet *et al.*, 2000). Il porte, à l'intérieur de son T-DNA, une cassette d'expression sous la dépendance du promoteur 35S et du terminateur 35S du CaMV. Le plasmide possède deux gènes de résistance à la kanamycine. Le premier, localisé en dehors du T-DNA et exprimé grâce à un promoteur procaryotique, permet la sélection des bactéries ; le second, transféré avec le T-DNA, confère sa résistance aux plantes transformées avec ce plasmide par la méthode de « floral dip » (Bechtold et Pelletier, 1993).

I-4) Virus

- BWYV

Le clone utilisé dans les travaux présentés dans ce manuscrit est la souche FL1 du BWYV, nouvellement nommée TuYV. Il a été isolé de plants de laitue à l'INRA de Montfavet (Veidt *et al.*, 1988).

- CABYV

Le clone utilisé a été isolé à Nérac en 1989 par Lecoq *et al.* (1992) à partir d'un plant de melon infecté. Il s'agit du virus séquencé par Guilley *et al.* (1994)

I-5) Plantes

Les différents mutants d'*Arabidopsis thaliana* utilisés sont récapitulés en **table M&M-2**. Les plants de *N. benthamiana* 16C utilisés sont ceux décrits par Ruiz *et al.* (1998).

Sens S

ATGCGCGCCAAGTTCCTGTTATTGCGACTAAGATTAATATGGTTGATCTTCTTTGGGTGCAACAGAAGATAGAGTTTGTGGAACCATCACGCGTTA

Sens AS

TAACGCGTGATGGTTCACAAACTCTATCTTCTGTTGCACCCAAAGGAAGATCAACCATATTAATCTTAGTCGCAATAACAGGAACTTGGCGCGCAT

Hairpin1 S

CGCGCTCGTTTCGATAGTAACCCAAAGGATTTCCGTGACACTTACAAATGGCAGTATCGGGATCCTGA

Hairpin1 AS

CGCGTCAGGATCCCGATACTGCCATTTGTAAGTGTACGGAAATCCTTTGGGTTACTATCGAAACGAG

Hairpin2 S

GATCCTTGTAAGTGTACGGAAATCCTTTGGGTTACTATCGAAACGAG

Hairpin2 AS

CGCGCTCGTTTCGATAGTAACCCAAAGGATTTCCGTGACACTTACAAG

Figure M&M-1 : séquences des oligonucléotides utilisés et stratégie pour le clonage des virus BW-SUL

Les oligonucléotides « sens » sont hybridés puis digérés par BssHII et MluI. Le fragment est ensuite introduit dans un site MluI en 3' du génome viral. La construction de la tige boucle est réalisée en deux temps. Les oligonucléotides Hairpin1 sont hybridés puis introduit dans un site MluI en 3' du génome viral. La ligation conserve le site MluI en 3' de fragment inséré mais détruit celui en 5'. Le clone ainsi obtenu est digéré par BamHI et MluI (le site BamHI se trouve quelques nucléotides en amont du site MluI) pour permettre l'insertion du fragment Hairpin2 (après hybridation des oligonucléotides).

II) Méthodes

II-1) Clonage

- Hybridation et phosphorylation d'oligonucléotides

Pour le clonage de courts fragments de DNA, des oligonucléotides commerciaux portant la séquence d'intérêt (sens et antisens) sont hybridés afin d'obtenir un fragment double brin dont les extrémités sortantes correspondent aux sites de restriction choisis pour le clonage. Leurs extrémités 5' sont phosphorylées car, pour éviter une recircularisation sans insert, les extrémités clivées du vecteur ont été déphosphorylées. La réaction est réalisée dans un volume final de 20 µl contenant 2 µl de tampon T4-PNK x10, 0,5 µl de BSA (stock : 1 mg/ml), 1 µl d'ATP (stock : 1 mM), 0,5 µl de chaque oligonucléotide (stock : 100 µM) et 1 µl de T4 polynucléotide kinase. Le milieu réactionnel est mis à incuber 30 minutes à 37°C, puis l'enzyme est inactivée pendant 10 minutes à 70°C. Le mélange est refroidi très progressivement pour favoriser l'hybridation des deux brins complémentaires. 1 µl de ce milieu est utilisé pour la ligation. En **figure M&M-1**, la séquence des oligonucléotides utilisés pour le clonage des différents virus recombinants « BW-SUL ».

- Amplification d'un fragment de DNA par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les fragments de DNA d'intérêt sont amplifiés *in vitro* de manière exponentielle grâce à l'utilisation de la DNA polymérase thermostable isolée de *Thermus aquaticus* (Taq). La réaction se déroule en 25 à 30 cycles. Chaque cycle comporte trois étapes successives ; une étape de dénaturation du DNA matrice (15 secondes à 94°C), une étape d'hybridation des amorces avec les brins matrices (30 secondes à une température inférieure de 2 à 3°C à la plus faible des températures de fusion (T_m) des amorces utilisées), suivie d'une étape d'élongation des amorces à 72°C dont la durée dépend de la taille du fragment à amplifier (le temps d'élongation est déterminé sur la base de 30 secondes pour obtenir un fragment de 500 pb). Les conditions générales de l'amplification se font selon le protocole du kit Fidelity™ PCR Master Mix (USB) : DNA : 10 ng, oligonucléotides : 300 nM, qsp H₂O stérile 25 µl, puis ajout

de 25 µl du Master Mix (dNTP 4 mM, MgCl₂ 3 mM, Taq polymérase). Le produit final est généralement digéré par deux enzymes de restriction pour être ensuite introduit dans le vecteur de clonage digéré par les mêmes enzymes.

- Digestion par les enzymes de restriction et analyse des fragments de DNA par électrophorèse en gel d'agarose

Les digestions des molécules de DNA bicaténares sont généralement réalisées à 37°C pendant 2 heures dans un tampon spécifique à l'enzyme, en présence de BSA (100 µg/ml), à raison de 2 à 5 unités d'enzymes pour 1µg de DNA, dans un volume final de 20 à 100 µl selon la quantité de DNA à digérer. Les fragments de DNA ainsi obtenus sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose dont le pourcentage (0,8 à 2,5 %) varie selon la taille des fragments à analyser. Le DNA en suspension dans le tampon de charge (Tris-HCl 2 mM pH 8, EDTA 10 mM, saccharose 5 %, bleu de bromophenol 0,01 %) est déposé sur le gel préparé dans du tampon TBE x 0,5 (Tris 50 mM ; acide borique 50 mM pH 8,3 ; EDTA 2 mM). Après électrophorèse à 100 volts dans le tampon TBE x 0,5, le gel est coloré au bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) et les fragments de DNA sont visualisés sous lumière UV.

- Déphosphorylation d'un vecteur

La déphosphorylation a pour but d'éviter la recircularisation d'un vecteur linéarisé pendant la ligation. Elle est réalisée par une phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP pour calf intestinal phosphatase) qui élimine les phosphates aux extrémités 5'. Cette enzyme ne nécessite pas l'utilisation d'un tampon très spécifique, la réaction est donc souvent réalisée dans le milieu de digestion. 0,1 unité d'enzyme est ajouté au milieu réactionnel, la réaction est réalisé pendant 30 minutes à 55°C. L'enzyme est ensuite inactivée à 70°C ou éliminée par extraction phénolique.

- Purification de fragments de DNA à partir d'un gel d'agarose LMP

Les fragments de DNA sont purifiés à partir d'un gel d'agarose LMP ("Low Melting Point"), qui a la propriété de fondre à 65 °C. Après électrophorèse, les bandes de gel contenant les fragments de DNA désirés sont localisées sous lumière UV, découpées et puis chauffées pendant 10 minutes à 65°C dans trois volumes de tampon (Tris-HCl 200 mM, pH 8, EDTA 1 mM). Le DNA est purifié par une extraction au phénol, puis au phénol/chloroforme. Il est ensuite précipité par addition de deux volumes d'éthanol 100% en présence de NaCl 200 mM et de 5 µg de tRNA d'*E. coli*. Après centrifugation pendant 20 minutes à 15000 rpm, le culot de DNA est lavé à l'éthanol 70%, séché et remis en suspension dans 20 µl d'eau.

- Ligation

Les fragments purifiés à partir du gel LMP sont ligués, pendant une nuit à 15°C, dans les conditions suivantes : vecteur (50 à 500 ng), insert (50 à 500 ng, rapport stoechiométrique 1:3), tampon de ligation (Tris-HCl 30 mM pH 7,8 ; MgCl₂ 10 mM ; DTT 10 mM ; ATP 1 mM) et une unité de T4 DNA ligase. Après réaction, le milieu de ligation est extrait au phénol/chloroforme et précipité à l'éthanol. La ligation peut également être réalisée sur les fragments de DNA non extraits du gel LMP (dont les bandes contenant les fragments de DNA seront chauffées à 65°C avant d'être incorporées au milieu de ligation), la purification du DNA à partir du gel est alors réalisée après action de la ligase.

- Transformation des bactéries par électroporation

Cette méthode de transformation très efficace est réalisée à l'aide d'un électroporateur (BioRad) dans une cuve dont les électrodes sont distantes de 2 mm. Le contrôleur d'impulsion est réglé sur 25 µF (capacité) et 2,5 kV/cm (champ électrique), la résistance étant ajustée à 200 Ω. 40 µl de bactéries « compétentes » sont décongelées dans la glace puis ajoutés à 1 µl de produits de ligation. Après le choc électrique, les bactéries sont additionnées d'1 ml de LB, incubées 30 minutes à 37°C puis étalées sur milieu gélosé sélectif. Après croissance pendant une nuit à 37°C, les colonies obtenues sont analysées. Cette technique de transformation s'applique également aux agrobactéries, qui seront alors incubées et mises en culture à 28°C.

- Analyse des clones bactériens

Les colonies obtenues sont analysées par préparation de petites quantités de DNA plasmidique (miniprep.). 3 ml de milieu liquide sélectif (LB + antibiotique approprié) sont ensemencés avec une colonie recombinante et sont placés sous agitation une nuit à 37°C. Le DNA plasmidique est extrait selon la technique de lyse alcaline (décrite par Sambrook *et al.*, 1989). Le DNA extrait est suffisamment pur pour être analysé par digestion enzymatique et séquençage automatique (selon la méthode dite de Sanger).

II-2) Expériences avec les plantes

- Croisements de plants d'*Arabidopsis thaliana*

Des bourgeons floraux sont émasculés (retrait de toutes les étamines) avant leur éclosion pour éviter une auto-fertilisation. Le lendemain, les pistils de ces fleurs sont ensemencés par le pollen d'une plante d'un autre génotype.

- Culture de plants d'*Arabidopsis thaliana in vitro*

Les graines sont stérilisées, dans un premier temps, pendant deux minutes dans de l'éthanol 75 %. Elles sont ensuite placées 20 minutes sous agitation sur une roue dans de l'eau de javel additionnée de Tween-20® (une goutte par tube). Les graines sont rincées trois à quatre fois à l'eau stérile sous une hotte puis étalées sur un milieu de culture gélosé. Les boîtes de culture sont stockées 48h à 4°C pour permettre la vernalisation des graines, puis placées dans des chambres de culture.

- Agro-infiltration / agro-infection

Les agrobactéries portant le plasmide binaire d'intérêt sont mises en préculture dans 2 ml de YEB en présence des antibiotiques adéquats pendant environ 48 heures à 28°C. La préculture est utilisée pour ensemencer le milieu de culture (YEB), additionné de MES 10mM

(pH 5,6), d'acétosyringone 20 μ M (préparé dans du DMSO) et d'antibiotiques. La culture est incubée sous agitation pendant 18 heures environ à 28°C. Les agrobactéries sont ensuite sédimentées (10 minutes à 5000rpm), resuspendues dans 10 ml de solution MMA (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, acétosyringone 150 μ M) et la DO_{600nm} est ajustée à 0,5 dans le tampon MMA. La suspension bactérienne est incubée à température ambiante 2 à 3 heures avant l'infiltration. Les plants de *N. benthamiana* sont infiltrés au stade 4 à 6 feuilles à l'aide d'une seringue sans aiguille. Les plants d'*Arabidopsis thaliana* utilisés pour l'agro-infection sont classiquement âgés d'un mois, toutes les feuilles sont infiltrées grâce à une seringue sans aiguille ; ils sont ensuite mis en culture en jour court (8h de lumière par jour).

- Inoculation mécanique de transcrits *in vitro*

La transcription est réalisée à partir d'un plasmide portant le cDNA du virus, linéarisé au niveau de l'extrémité 3' de la séquence virale, grâce à un kit commercial (Promega). Le milieu réactionnel est composé comme suit :

Tampon de transcription x5 : 4 μ l

rATP 100 mM : 1,5 μ l

rCTP 100 mM : 1,5 μ l

rUTP 100 mM : 1,5 μ l

rGTP 100 mM : 0,15 μ l

7mG(5')ppp(5')G 15 mM (coiffe) (New England BioLabs) : 4 μ l

Inhibiteur de RNase 40 U/ μ l : 0,5 μ l

DTT 0,1 M : 1 μ l

BSA 10 mg/ml : 1 μ l

DNA 1-2 μ g/ μ l : 1 μ l

T3 ou T7 RNA Polymerase (Promega) 1,5 μ l

H₂O qsp 20 μ l

La réaction est initiée durant 30 minutes à 37°C puis 1,5 μ l de rGTP et 0,5 μ l d'enzyme sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 1h30 à 37°C, les RNA produits sont analysés sur gel d'agarose 1%. Les plantes sont inoculées par un mélange amené à 100 μ l et contenant 10 μ l de KH₂PO₄ 0,5 M, pH 7,4, 8 μ l de Macaloid 0.5 %, 2 μ l de RNA total de levure et 1 à 10 μ g de transcrits.

II-3) Détection *in situ* de protéines virales

- Immunolocalisation *in situ*

Les portions de feuilles à analyser sont fixées dans le FAA (formaldéhyde 3,7 %, éthanol 50 %, acide acétique 5 %) grâce à deux infiltrations sous vide successives de 30 minutes. Après changement du FAA, les feuilles sont incubées dans le fixateur une nuit à 4°C. Les échantillons sont traités par des bains d'éthanol de concentration croissante (2 fois 30 minutes dans l'éthanol 50 %, 2 fois 30 minutes dans l'éthanol 70 %, une heure dans l'éthanol 96 %) puis incubés une nuit à 4h dans l'éthanol 96 % additionné d'éosine 0,1 %. Les feuilles sont alors placées une heure dans de l'éthanol 100 % puis incubées dans des bains d'Histo-clear® de concentration croissante (Histo-clear 25 % / éthanol 75 %, puis Histo-clear 50 % / éthanol 50 %, puis Histo-clear 75 % / éthanol 25 % et enfin Histo-clear 100 %, chaque bain durant une heure). Les échantillons sont ensuite placés dans une solution contenant 50 % d'Histo-clear et 50% de Paraplast® pendant 2 à 3 heures à 60°C. Le mélange Histo-clear/Paraplast est progressivement remplacé par du paraplast pur (les fioles contenant les échantillons sont partiellement vidées puis remplies par du Paraplast, cette manipulation est réalisée deux à trois fois par jour pendant deux jours). Les échantillons sont positionnés dans des réceptacles permettant la formation de blocs aptes à être coupés. Une fois le bloc refroidi et durci, il est coupé au microtome en des coupes de 10 µM d'épaisseur.

Les coupes sont placées sur des lames et déparaffinées par l'Histo-clear par deux bains de 20 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite réhydratées grâce à des bains d'éthanol de concentration décroissante (éthanol 100 %, éthanol 96 %, éthanol 70 %, éthanol 50 %, H₂O puis PBS x1). Les lames sont lavées dans une solution PBS x1, BSA 1%, Triton 0,05 % (tampon de lavage).

Les coupes sont isolées à l'aide d'un crayon siliconé. Les sites de reconnaissance aspécifiques sont bloqués pendant une heure à température ambiante dans la solution de lavage additionnée de sérum de mouton à 5 % (tampon de blocage). L'anticorps primaire dilué adéquatement (50 à 100 fois plus concentré que pour un western blot) dans le tampon de blocage est mis en contact des coupes pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages (tampon de lavage), l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline est placé sur les coupes après dilution dans le tampon de blocage. Après une heure d'incubation à température ambiante, les lames sont lavées quatre fois au PBS puis deux fois dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,2.

Le substrat FastRed® (Boehringer, Mannheim) utilisé pour la révélation est préparé selon les instructions du fabricant puis placé sur les coupes et incubé à l'obscurité jusqu'à apparition d'un signal (visible au microscope optique). La réaction est arrêtée par une incubation dans du tampon Tris-EDTA froid suivi d'un bain d'eau. Les échantillons sont recouverts d'une lamelle et prêts à être observés.

- Immuno-empreintes sur pétioles

Les feuilles des plantes d'intérêt sont coupées au niveau de leur pétiole. La tranche de pétiole ainsi obtenue est appliquée trois à quatre fois, successivement, sur une membrane de nitrocellulose afin de pouvoir sélectionner la meilleure empreinte. Une fois les empreintes sèches, la membrane est incubée 2 heures à une nuit dans une solution de PBSx1, Tween-20® 0,5 % et lait 2,5 %. Les anticorps primaire et secondaire sont fixés sur les protéines dans les mêmes conditions que pour un western blot (voir méthodes, western blot). L'anticorps secondaire utilisé dans cette expérience est couplé à la phosphatase alcaline. Après le dernier lavage au PBS-Tween, un lavage au diéthanolamine (0,1 M, pH 9,6) est réalisé. La révélation est effectuée par addition du substrat NBT-BCIP (NBT 100 µg/ml, BCIP 50 µg/ml, MgCl₂ 1 mM, diéthanolamine 0,1 M pH 9,6). La membrane est incubée à l'obscurité sans agitation jusqu'à obtention d'une intensité de coloration satisfaisante (une révélation d'une nuit est parfois nécessaire). La réaction est arrêtée par rinçage à l'eau.

II-4) Extraction et analyse de protéines

- Immunoprécipitation

- a) Extraction des protéines

Le matériel végétal est broyé en fine poudre dans l'azote liquide puis additionné d'un volume de tampon « DB » (Tris 20 mM pH 7,5 ; NaCl 300 mM ; MgCl₂ 5 mM ; DTT 1,5 mM ; NP40 0,5% ; antiprotéases Roche).

Le broyat est centrifugé 15 minutes à 15 000 rpm et le surnageant est filtré sur filtre Millipore™ 0,22 µm. Le filtrat est additionné de 5 µl de billes couplées à l'anticorps monoclonal anti Flag (EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, SIGMA) pour 250 mg

de matière fraîche de départ. Le tout est mis à incuber 2 heures à 4°C (agitation rotative) (si le broyat paraît trop concentré ou le volume trop petit, le volume de tampon peut être ajusté à 3 fois le volume du matériel de départ.

Les billes sont récupérées par passage au travers d'une colonne filtrante Bio-Spin de Biorad qui permet l'élimination de la phase liquide. Les billes restées sur le filtre sont lavées 4 à 5 fois avec 2 ml de tampon DB puis reprises dans du tampon DB sans NP40 et transférées dans un tube collecteur.

b) Analyse des protéines immunoprécipitées

Pour analyser les protéines immunoprécipitées sur gel SDS-PAGE, l'extraction est réalisée à partir de 250 mg de matière fraîche.

Une fois les billes lavées, elles sont rapidement sédimentées afin d'éliminer un maximum de tampon. Elles sont ensuite additionnées d'un volume de PAGEx2, chauffées à 95°C et chargées sur gel de polyacrylamide.

c) Analyse des petits RNA co-immunoprécipités

L'extraction est réalisée à partir d'un gramme de matière fraîche. Les billes après lavages sont reprises dans 200 µl de tampon DB sans NP40 et le tout est additionné d'1 ml de trizol puis laissé à température ambiante durant 10 minutes après agitation manuelle. 200µl de chloroforme sont alors ajoutés à la solution. Après agitation manuelle et repos de quelques minutes, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 12 000 g. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube. 1 µl de glycogène pourra aider à la précipitation en présence de faibles quantités de matériel. Les RNA sont précipités par un volume d'isopropanol durant 10 minutes à température ambiante. Après 10 minutes de centrifugation à 12 000 g, le culot est lavé à l'éthanol 70 % puis centrifugé 5 minutes à 7500 g. Le culot séché est repris dans 20 µl de formamide 50 % et les RNA sont dénaturés à 65°C pendant 5 minutes et transférés directement dans la glace. Après ajout de 7 µl de bleu de charge (glycérol 50 %, bleu de bromophénol, bleu de xylene cyanol) les RNA sont chargés sur gel d'acryl/urée 17,5% (voir méthode II-4, analyse des RNA de faible poids moléculaire).

| | Gel de résolution 8 % | Gel de résolution 10 % | Gel de résolution 12 % | Gel de concentration |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| 40% Acryl-bisacryl (38.9:1.1) | 3 ml | 3,75 ml | 4,5 ml | 0,5 ml |
| Tampon de résolution x3 | 5 ml | 5 ml | 5 ml | - |
| Tampon stacking x5 | - | - | - | 1 ml |
| H ₂ O | 7 ml | 6,25 ml | 5,5 ml | 3,5 ml |
| Persulfate d'ammonium (APS) 25% | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 40 µl |
| TEMED | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 8 µl |

| | Tampon de résolution x3 | Tampon stacking x5 |
|------------------|-------------------------|--------------------|
| Tris-HCl | 6,8 g | 37 g |
| SDS 20% | 7,5 ml | 12,5 ml |
| H ₂ O | qsp 500 ml | qsp 500 ml |

Table M&M-3 : composition des gels de poly-acrylamide pour protéines

La composition du gel de concentration est la même, quelque soit celle du gel de résolution.

| Anticorps anti- | Facteur de dilution utilisé |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Flag M2 (couplé à la peroxydase – SIGMA) | 1/1 000 |
| P0 ^{BW} | 1/40 000 |
| P0 ^{CA} | 1/40 000 |
| P38 | 1/20 000 |
| RT ^{BW} | 1/20 000 |
| Lapin (anticorps secondaire couplé à la peroxydase) | 1/30 000 |
| Lapin (anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline) | 1/5 000 |
| Souris (anticorps secondaire) | 1/5 000 |

Table M&M-4 : dilution des anticorps utilisés en western blot

- Western Blot

Les protéines sont extraites, soit par la technique utilisée pour les immunoprécipitations (les extraits protéiques totaux sont alors obtenus après l'étape de filtration et additionnés d'un volume de tampon PAGE x4 pour trois volumes d'extraits), soit par broyage du matériel végétal dans deux volumes de tampon PAGE x2 suivi d'une centrifugation douce (5 minutes à 3 000 rpm). Les extraits sont chargés sur un gel de polyacrylamide dont la composition en bis-acrylamide varie selon la concentration désirée (voir table **M&M-3**). La partie supérieure du gel est un gel de concentration (« stacking »), la partie inférieure, le gel de résolution, permet la séparation des protéines selon leur taille. La migration est réalisée à 120 volts dans du tampon Tris-HCl 25 mM, glycine 0,2 M et SDS 0,1%.

Les protéines sont transférées du gel vers une membrane Hybond-P® (Amersham) (préalablement hydratée dans le tampon de transfert après un bref passage dans l'éthanol) dans du tampon Tris-HCl 25 mM, glycine 0,2 M, à 60 volt, 400 mA pendant 2 heures à 4°C.

La membrane est saturée dans une solution PBSx1, Tween-20® 0,5 %, lait 2,5 % pendant une nuit. Elle est ensuite mise en présence des anticorps primaires adéquats, dilués dans la solution de blocage (voir **table M&M-4** pour les facteurs de dilution des différents anticorps utilisés), pendant 3 heures. Après 4 à 5 lavages dans du PBSx1, Tween-20 0,5%, la membrane est mise à incuber en présence de l'anticorps secondaire (toujours dilué dans la solution de blocage) couplé à l'enzyme peroxydase (ou phosphatase alcaline pour la révélation des empreintes de pétioles, voir méthodes II-2, immuno-empreintes sur pétioles) pendant 2 heures.

Après 4 à 5 nouveaux lavages au PBSx1, Tween-20 0,5%, les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence grâce au kit Lumi-LightPLUS Western Blotting® (Roche) et autoradiographie.

Tampon PAGE x2 : Tris-HCl pH 6,8 125 mM ; SDS 5 % ; β -mercaptoethanol 10 % ; glycérol 20 % ; bleu de bromophénol 0,1%.

Tampon PBSx10 (pH 7,4) : KH_2PO_4 (2,04 g/l), Na_2HPO_4 (14,24 g/l), KCl (2,01 g/l) et NaCl (87,66 g/l).

- Quantification des protéines virales par ELISA

Sur une plaque ELISA 96 puits (Nunc®) sont fixés les anticorps polyclonaux dirigés contre le BMYV (Loewe Biochemica GmbH) à une dilution 1/400 (ces anticorps reconnaissent parfaitement le BWYV). Cette étape est réalisée dans le tampon « coating » (Na_2CO_3 1,6 g/l et NaHCO_3 2,92 g/l, pH 9,6). La plaque est incubée 3 à 4 heures à 37°C puis lavée trois fois au PBS-Tween20 (0,5 %), pH7,4.

Parallèlement, les protéines sont extraites par broyage dans 2,5 ml de tampon d'extraction (PVP360-500G 2% dans du PBS-Tween) par gramme de plante (on utilise généralement 200 mg de plante par expérience). Les débris sont éliminés par centrifugation (3 minutes à 3 000 rpm), le surnageant est incubé dans les plaques ELISA rincées pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages au PBS-Tween, l'anticorps anti-BMYV conjugué à la phosphatase alcaline est ajouté à la plaque, après dilution (1/400) dans le tampon de conjugaison (PVP 2 % et BSA 0,2 % dans du PBS-Tween). Après 3 à 4h à 37°C, les plaques sont lavées trois fois. Le substrat de la phosphatase alcaline est finalement déposé dans les puits (une tablette SIGMA® est solubilisée dans le tampon substrat : diéthanolamine à 97 ml/l, pH 9,8). La plaque est incubée à l'obscurité à 37°C pendant 3h à une nuit, selon la concentration en antigènes, puis, la densité optique est lue à 405nm. Le seuil d'infection correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour des plantes non infectées additionnée de trois fois son écart type.

II-5) Extraction et analyse de RNA

- Extraction de RNA par le tampon « polysome » (d'après Jackson et Larkins, 1976)

Le matériel végétal est réduit en poudre dans de l'azote liquide puis broyé dans un mortier en présence d'un ml de tampon polysome (Tris HCl 50 mM, pH 9 ; EDTA 10 mM ; SDS 2% ; NaCl 0,1 M ; Protéinase K 100 µg/ml) pour 500 mg de poudre. Le broyat est soumis à deux extractions phénoliques successives (phénol puis phénol/chlorophorme) et les acides nucléiques totaux sont précipités par trois volumes d'éthanol 100 %. Après centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70 % puis repris dans 400 µl d'eau. La solution est additionnée de 50 µl de PEG 8 000 à 50% et de 50 µl de NaCl 5 M puis incubée une heure dans la glace. Après centrifugation, la phase liquide contenant les RNA de faible poids moléculaire est précipitée

par 3 volumes d'éthanol 100%. Le culot contenant les acides nucléiques de haut poids moléculaire est repris dans 400 µl d'une solution d'acétate de sodium 3 M afin de solubiliser le DNA. Après centrifugation, le culot de RNA est lavé à l'éthanol 70 %.

- Northern blot

- a) Analyse des RNA de haut poids moléculaire

Le culot de RNA est repris dans 50 µl d'eau. Environ 2 µl (quantité estimée après électrophorèse sur un gel d'agarose) de RNA sont additionnés de 18 µl de tampon de charge. Le mélange est chauffé 10 minutes à 65°C puis refroidi brusquement dans la glace. Les RNA dénaturés sont chargés sur un gel d'agarose dénaturant 1 % (agarose 1% ; HEPES x1 ; formaldéhyde 6%). La migration est réalisée à 100 volt dans du tampon HEPES x1. Les RNA sont ensuite transférés par capillarité, pendant une nuit, dans du tampon SSC x20, sur une membrane Hybond-NX (GE Healthcare). La membrane est rincée dans du SSC x4 puis fixée aux ultraviolets (Stratalinker).

Tampon HEPES x10 : 200 mM HEPES, 10 mM EDTA et KOH 9.5 g/l, pH 7.8

Tampon de charge : HEPES x10 : 500 µl ; formaldéhyde : 800 µl ; formamide désionisée : 2,5 ml ; glycérol 50 % : 250 µl ; bromure d'éthidium : 1µg/ml ; bleu de bromophénol.

- b) Analyse des RNA de faible poids moléculaire

Le culot de RNA est repris dans 20 µl de formamide désionisée 50 %. Les RNA sont dénaturés à 65°C pendant 10 minutes puis rapidement refroidis dans la glace. Ils sont ensuite additionnés de tampon de charge (glycérol 50 %, bleu de bromophénol, bleu de xylène-cyanol) puis chargés sur un gel acryl-urée 17,5 % qui aura subi une pré-électrophorèse (30 minutes à 400 volts). La migration (comme la pré-électrophorèse) est réalisée dans du tampon TBE x0,5 à 200 volts. Les RNA sont alors transférés sur une membrane Hybond-NX (GE Healthcare) dans du TBE 0,5 % pendant 1h30 à 80 volts, 400 mA à 4°C. Les RNA sont fixés sur la membrane par des ultraviolets (Stratalinker) après rinçage dans du SSC x4.

Gel acryl-urée 17,5 % : urée : 12.6 g (8 M final) ; acrylamide/bisacrylamide 19:1 40% : 13,1 ml ; TBE x10 : 1,5 ml.

| | Température de pré-hybridation | Température d'hybridation | Tampon de lavage 1 | Tampon de lavage 2 | Température des lavages |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| RNA de haut poids moléculaire | 60°C | 55°C | SSC x2, SDS 0,1 % | SSC x0.2, SDS 0,1% | 65°C |
| RNA de faible poids moléculaire | 42°C | 42°C | SSC x2, SDS 2% | SSC x1, SDS 1% | 50°C |

Table M&M-5 : conditions d'hybridation et de lavage pour northern blot

c) Synthèse de sondes radioactives

➤ Marquage en 5'

3 µl d'oligonucléotides 10 µM antisens (DNA) sont dénaturés pendant deux minutes à 95°C après addition de 9 µl d'eau. La solution est brusquement refroidie dans la glace. On ajoute 2 µl de tampon PNK B x10 (Fermentas), 5 µl d'ATP marqué radioactivement au ³²P en position γ (c'est le phosphate transféré en 5' de l'oligonucléotide qui confère le marquage radioactif) et 1 µl d'enzyme PNK (T4 polynucléotide kinase) (Fermentas). Le mélange réactionnel est incubé une heure à 37°C. Les nucléotides sont éliminés par passage sur une colonne de sephadex G25 après augmentation du volume final à 60 µl. La sonde est finalement dénaturée à 95°C pendant deux minutes puis brusquement refroidie dans la glace. Ce type de sonde, chargée sur un gel, a servi de marqueur approximatif de poids moléculaire sur certains gels d'acrylamide de sRNA.

➤ Marquage aléatoire

La sonde est réalisée à partir d'un fragment PCR correspondant au RNA d'intérêt. La synthèse est exécutée selon les indications du kit « Prime-a-Gene » de Promega. 2 µl de DNA additionnés de 31 µl d'eau sont chauffés à 95°C pendant 2 minutes. On ajoute 10 µl de tampon x5, 0,66 µl de dATP 100 mM, 0,66 µl de dTTP 100 mM, 0,66 µl de dGTP 100 mM, 2 µl de BSA à 2 mg/ml, 2,5 µl de dCTP marqué au ³²P et 1 µl de DNA polymérase (fragment de Klenow). Le mélange est incubé une heure à 37°C. Les dNTP non incorporés sont éliminés par passage sur une colonne de Sephadex G50. La sonde est dénaturée à 95°C pendant deux minutes.

d) Hybridation des sondes

Les membranes sont mises à pré-hybrider pendant une heure dans le tampon d'hybridation (Perfect Hyb Plus buffer, SIGMA). La sonde est ajoutée et l'hybridation est réalisée pendant une nuit. Les membranes sont ensuite lavées, deux fois dans le tampon de lavage 1 puis une fois dans du tampon de lavage 2 (voir **table M&M-5** pour les compositions des tampons ainsi que les températures d'hybridation et de lavage). Chaque lavage dure 30 minutes. Les membranes séchées sont révélées par autoradiographie.

11-6) RT-PCR et purification de DNA séparé sur gel de polyacrylamide

Cette technique est utilisée pour l'analyse de la descendance des virus. Les RNA viraux sont extraits de plantes infectées selon la méthode décrite précédemment.

- Transcription inverse

La transcription inverse (RT pour reverse transcriptase) est réalisée sur 10 pg à 5 µg de RNA auxquels sont additionnés 2 pmoles d'amorces spécifiques et 10mM de chaque dNTP pour un volume final de 13 µl. Le mélange est dénaturé 5 minutes à 65°C puis refroidi brusquement dans la glace. On ajoute alors 4 µl de tampon Superscript III (Invitrogen), 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl d'inhibiteur de ribonucléases (RNase Out Invitrogen) et 1 µl (=200 unités) d'enzyme Superscript III (Invitrogen). Le tout est incubé une heure à 55°C puis l'enzyme est inactivée pendant 15 minutes à 65°C. 0,5 µl de cette solution est utilisé pour une réaction de PCR classique.

- Migration sur gel de polyacrylamide

Les fragments PCR produits pour l'analyse de la descendance du virus BW95hp ont été voulus très courts, afin de permettre la séparation de fragments de taille proche. Pour obtenir une bonne résolution de ces fragments, ils ont été séparés sur gel de polyacrylamide 10 % (TBE x10 : 1,5 ml ; acrylamide 40 % : 3,75 ml, H₂O : 9,75 ml ; TEMED : 15 µl et persulfate d'ammonium 25 % : 30 µl). La migration est réalisée à 150 volts dans du tampon TBE x0,5 %. Le gel est coloré au bromure d'éthidium et visualisé sous rayons ultra violet.

- Purification du DNA

Les bandes de DNA séparées sur le gel de polyacrylamide sont découpées et broyées dans un tube 1,5 ml à l'aide d'un piston. Le broyat est incubé pendant une nuit à 37°C dans le tampon « crush and soak » (acétate d'ammonium 500mM, SDS 0,1 %, EDTA 0,1mM) afin de

permettre la diffusion du DNA du gel vers le tampon. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et le culot d'acrylamide, une nouvelle fois lavée par du tampon crush and soak. Les phases liquides rassemblées sont précipitées par un volume d'isopropanol additionné de glycogène. Les dernières traces d'acrylamide sont éliminées par une purification au phénol-chloroforme. Une nouvelle précipitation à l'éthanol 100 % permet l'obtention d'un DNA suffisamment pur pour être séquencé.

Références bibliographiques

- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C. and Harberd, N.P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, *131*, 3357–65.
- 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.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M. and Carrington, J.C. (2006). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, *121* (2), 207–221.
- Altun, M. (2007). Old-Age Muscle Atrophy. Thèse disponible sur diss.kib.ki.se/2007/978-91-7357-305-4/thesis.pdf.
- Ashoub, A., Rohde, W. and Prüfer, D. (1998). *In planta* transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucleic Acids Research*, Vol. 26, No. 2, 420–426.
- Atabekov, J.G., Malysenko, S.I., Morozov, S.Y., Taliansky, M.E., Solovyev, A.G., Agranovsky, A.A. and Shapka, N.A. (1999). Identification and study of tobacco mosaic virus movement function by complementation tests. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *354* (1383), 629–35.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, *86* (2), 263–74.
- Barker, H. and Harrison, B.D. (1982). Infection of potato mesophyll protoplasts with five plant viruses. *Plant Cell Reports*, *1*, 247–249.
- Barker, H. (1987). Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by potato leafroll luteovirus is enhanced in plants also infected with potato Y potyvirus. *Journal of General Virology*, *68*, 1223–1227.
- Bateman, A. (2002). The SGS3 protein involved in PTGS finds a family. *BMC Bioinformatics*, *3* (21).
- Baulcombe, D. (1996). Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *The Plant Cell*, *8*, 1833–1844.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D.C. (2005). *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *102*, 11928–11933.
- Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E. and Baulcombe, D.C. (2007). The Ploverovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol*, *17* (18), 1609–14.
- Bayne, E. H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y. and Baulcombe, D.C. (2005). Cell-to-cell movement of Potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal*, *44*, 471–482.
- Bechtold, N. and Pelletier, G. (1993). *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol.*, *82*, 259–266.
- Béclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P. and Vaucheret H. (2002). A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr Biol.*, *12* (8), 684–688.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, *409* (6818), 363–366.

- Bertens, P., Wellink, J., Goldbach, R. and van Kammen, A. (2000). Mutational analysis of the cowpea mosaic virus movement protein. *Virology*, 267, 199–208.
- Bian, X.Y., Rasheed, M.S., Seemanpillai, M.J. and Ali Rezaian, M. (2006). Analysis of silencing escape of tomato leaf curl virus: an evaluation of the role of DNA methylation. *Mol Plant Microbe Interact.*, 19 (6), 614-24.
- Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.Y., Hunter, C., Berardini, T.Z. and Poethig, R.S. (2003). HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development*, 130, 1493–1504.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R. and Zhu, J.K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 123 (7), 1279-1291.
- Bouché, 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.
- Boyko, V., van der Laak, J., Ferralli, J., Suslova, E., Kwon, M.O. and Heinlein, M. (2000). Cellular targets of functional and dysfunctional mutants of tobacco mosaic virus movement protein fused to green fluorescent protein. *J Virol.*, 74 (23), 11339-46.
- Brault, V. and Herrbach, E. (2008). Luteoviruses. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-8.
- Brault, V. and Miller W.A. (1992). Translational frameshifting mediated by a viral sequence in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol.89, 2262-2266.
- Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Richards, K.E. and Ziegler-Graff, V. (2003). Effects of point mutations in the major capsid protein of Beet Western Yellows Virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *Journal of Virology*, Vol. 77, No. 5, 3247-3256.
- Brault, V., Herrbach, E. and Reinbold, C. (2007). Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron*, 38, 302-312.
- Brault, V., Herrbach, E., Hauser, S. et Lemaire, O. (2001). Les Luteoviridae : propriétés biologiques et évolution. *Virologie*, 5, 9-21.
- Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M.T., Herrbach, E., Richards, K. and Ziegler-Graff, V. (2000). Effects of point mutations in the readthrough domain of the Beet Western Yellows Virus minor capsid protein on virus accumulation *in planta* and on transmission by aphids. *Journal of Virology*, Vol. 74, No. 3, 1140-1148.
- Brault, V., Pérignon, S., Reinbold, C., Erdinger, M., Scheidecker, D., Herrbach, E., Richards, K.E., and Ziegler-Graff, V. (2005). The Polerovirus Minor Capsid Protein Determines Vector Specificity and Intestinal Tropism in the Aphid. *Journal of Virology*, 9685-9693.
- Brault, V., van den Heuvel, J.F.J.M., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Garaud, J.C., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. (1995). Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO J.*, 14, 650-659.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L., Ding, S. and Baulcombe, D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.*, 17, 6739–6746.
- Brodersen, P. and Voinnet O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, 22 (5), 268-280.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L. and Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320 (5880), 1185-1190.
- Brosnan, C.A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N.A., Waterhouse, P.M., Carroll, B.J. (2007). Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 104 (37), 14741-6.
- Brown, C.M., Dinesh-Kumar, S.P. and Miller, W.A. (1996). Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon. *J Virol.*, 70 (9), 5884-92.

- Bruyere, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M.T., van den Heuvel, J.F.J.M., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G. and Herrbach, E. (1997). Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging, and on virus accumulation, symptoms and aphid transmission. *Virology*, 230, 323-334.
- Cañizares, M.C., Navas-Castillo, J. and Moriones, E. (2008). Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, Tomato chlorosis virus. *Virology*, 379 (1), 168-174.
- Carvalho, C.M., Pouwels, J., van Lent, J.W.M., Bisseling, T., Goldbach, R.W. and Wellink, J. (2004). The Movement Protein of Cowpea Mosaic Virus Binds GTP and Single-Stranded Nucleic Acid *In Vitro*. *J Virol.*, 78 (3), 1591–1594.
- Cavener, D.R. and Ray, S.C. (1991). Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids Research*, 19 (12), 3185-3192.
- Chalhoub, B.A., Kelly, L., Robaglia, C. and Lapierre, H.D. (1994). Sequence variability in the genome-3'-terminal region of BYDV for 10 geographically distinct PAV-like isolates of barley yellow dwarf virus: analysis of the ORF6 variation. *Archives of Virology*, 139 (3-4), 403–416.
- Chan, S.W.L. (2008). Inputs and outputs for chromatin-targeted RNAi. *Trends Plant Sci.*, 13 (7), 383-389.
- Chapman, E.J. and Carrington, J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet*, 8 (11), 884-896.
- Chay, C.A., Gunasinge, U.B., Dinesh-Kumar, S.P., Miller, W.A. and Gray, S. M. (1996). Aphid Transmission and Systemic Plant Infection Determinants of Barley Yellow Dwarf Luteovirus-PAV are Contained in the Coat Protein Readthrough Domain and 17-kDa Protein, Respectively. *Virology*, 219, 57-65.
- Chen, M.H. and Citovsky, V. (2003). Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *Plant J.*, 35 (3), 386-92.
- Chen, X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.*, 579 (26), 5923-5931.
- Citovsky, V., Wong, M. L., Shaw, A. L., Prasad, B.V.V., and Zambryski P. (1992). Visualization and Characterization of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Binding to Single-Stranded Nucleic Acids. *Plant Cell*, 4, 397-411.
- Colmenares, S.U, Buker, S.M., Buhler, M., Dlakić, M. and Moazed, D. (2007). Coupling of double-stranded RNA synthesis and siRNA generation in fission yeast RNAi. *Mol Cell*, 27 (3), 449-61.
- Cramer, P., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2001). Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Ångstrom Resolution. *Science*, 292 (5523), 1876-1882.
- Cruz, S.S. (1999). Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules - what goes in must come out. *Trends in Microbiology*, 7 (6), 237-241.
- Culver, J.N., Dawson, W.O., Plonk, K. and Stubbs, G. (1995). Site-directed mutagenesis confirms the involvement of carboxylate groups in the disassembly of tobacco mosaic virus. *Virology*, 206 (1), 724-30.
- Curaba, J. and Chen, X. (2008). Biochemical activities of *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase 6. *J Biol Chem.*, 283 (6), 3059-66.
- Curtin, S.J., Watson, J.M., Smith, N.A., Eamens, A.L., Blanchard, C.L. and Waterhouse, P.M. (2008). The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNAi-like pathways. *FEBS Letters*, Article in press.
- Dalmay, T., Hamilton, A.J., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (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, 543-553.
- Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. and Baulcombe, D.C. (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 20, 2069-2078.
- Dawson, W.O., Bubrick, P. and Grantham, G.L. (1988). Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement and symptomatology. *Phytopathology*, 78, 783-789.
- 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.

- Delrot, S. (2000). Les sèves et leur circulation. *Pour la Science* (26), 28-33.
- 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.
- Díaz-Pendón, J.A. and Ding, S.W. (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol.*, 46, 303-26.
- Ding, B., Haudenschild, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N. and Lucas, W.J. (1992). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, 4 (8), 915-28.
- Ding, S. and Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130 (3), 413-26.
- Ding, X.S., Shintaku, M.H., Carter, S.A. and Nelson, R.S. (1996). Invasion of minor veins of tobacco leaves inoculated with tobacco mosaic virus mutants defective in phloem-dependant movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11155-11160.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G. and Carrington, J.C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.*, 13 (6), 1482–1491.
- Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I. and Llave C. (2008). Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J Virol.*, 82 (11), 5167-77.
- Du, Q.S., Duan, C.G., Zhang, Z.H., Fang, Y.Y., Fang, R.X., Xie, Q. and Guo, H.S. (2007). DCL4 targets Cucumber mosaic virus satellite RNA at novel secondary structures. *J Virol.*, 81 (17), 9142-51.
- Dunoyer, P. and Voinnet, O. (2008). Mixing and matching: the essence of plant systemic silencing? *Trends Genet.*, 24 (4), 151-4.
- Dunoyer, P., Himber, C. and Voinnet, O. (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, 1356–1360.
- 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.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C. and Voinnet, O. (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, 16 (5), 1235-50.
- Eamens, A., Vaistij, F.E. and Jones, L. (2008). NRPD1a and NRPD1b are required to maintain post-transcriptional RNA silencing and RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 55 (4), 596-606.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO Journal*, 20, 6877-6888.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M.A., Jacobsen, S.E., Cooke, R. and Lagrange, T. (2007). Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev*, 20 (21), 2539-2544.
- Esau, K. and Hoefert, L.L. (1972). Development of infection with beet western yellows virus in sugarbeet. *Virology*, 48, 724-738.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, 132 (1), 9-14.
- Fenner, F. (1976). The classification and nomenclature of viruses: Second Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 7, 1-115.
- Filichkin, S.A., Brumfield, S., Filichkin, T.P. and Young, M. J. (1997). *In vitro* interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *J. Virol.*, 71, 569–577.
- Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. and Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses : fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Springer-Verlag*, Vienna and New York, 309-311.

- Franco-Lara, L.F., McGeachy, K.D., Commandeur, U., Martin, R.R., Mayo, M.A. and Barker, H (1999). Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of Potato leafroll virus : evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. *Journal of General Virology*, *80*, 2813–2822.
- Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G.A., Watson, J.M., Wang, M.B., Brosnan, C., Carroll, B.J. and Waterhouse, P.M. (2006). RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO rep.*, *7*, 1168-1175.
- Gagne J.M., Downes B.P., Shiu S-H., Durski A.M. and Vierstra, R.D. (2002). The F-Box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *99*, 11519-11524.
- Gan, J., Shaw, G., Tropea, J.E., Waugh, D.S., Court, D.L. and Ji, X. (2008). A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Mol Microbiol*, *67* (1), 143-154.
- Garcia, D., Collier, S.A., Byrne, M.E. and Martienssen, R.A. Specification of leaf polarity in *Arabidopsis* via the trans-acting siRNA pathway. *Curr Biol.*, *16* (9), 933-8.
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P. and Vaucheret, H. (2005). Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Mol Cell*, *16* (1), 69-79.
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V. and Gafni, Y. (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, *105* (1), 157-61.
- Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T. and Masuta, C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol.*, *48*, 1050–1060.
- Gottwein, E., Mukherjee, N., Sachse, C., Frenzel, C., Majoros, W.H., Chi, J.T., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Ohler, U., Cullen, B.R. (2007). A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature*, *450* (7172), 1096-9.
- Gray, S. and Gildow, F.E. (2003). Luteovirus-aphid interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *41*, 539-566.
- Guilley, H., Wipf, S. C., Richards, K., Lecoq, H., and Jonard, G. (1994). Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology*, *202*, 1012-1017.
- Haas, G. A. (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.*, *27* (15), 2102-12.
- Hacker, D. L., Petty, I. T. D., Wei, N. and Morris, T. J. (1992). Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. *Virology*, *186*, 1–8.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, *286*, 950–952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.*, *21* (17), 4671-9.
- Hammond, S.M. (2005). Dicing and slicing, the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters*, *579*, 5822-5829.
- Harrison, B.D (1999). Steps in the development of Luteovirology. *The Luteoviridae*, 1-14.
- Haupt, S., Duncan, G.H., Holzberg, S. and Oparka, K.J. (2001). Evidence for symplastic phloem unloading in sink leaves of barley. *Plant Physiol.*, *125* (1), 209-18.
- Haupt, S., Stroganova, T., Ryabov, E., Kim, S.H., Fraser, G., Duncan, G., Mayo, M.A., Barker, H. and Taliansky, M. (2005). Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *Journal of General Virology*, *86*, 2891-2896.
- Hébrard, E., Froissard, R., Louis, C. et Blanc, S. (1999). Les modes de transmission des virus phytopathogènes par vecteurs. *Virologie*, *3* (1), 35-48.

- Herbers, K., Tacke, E., Hazirezaei, M., Krause, K.P., Melzer, M., Rohde, W., and Sonnewald, U. (1997). Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *The Plant Journal*, 12(5), 1045-1056.
- 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.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K. and Fukuhara, T. (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 57, 173–188.
- Ho, T., Pallett, D., Rusholme, R., Dalmay, T. and Wang, H. (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, 217-23.
- Ho, T., Wang, H., Pallett, D. and Dalmay, T. (2007). Evidence for targeting common siRNA hotspots and GC preference by plant Dicer-like proteins. *FEBS Lett.*, 581 (17), 3267-3272.
- Hoffmann, K., Verbeek, M., Romano, A., Dullemans, A.M., van den Heuvel, J.F.J.M. and van der Wilk, F. (2001). Mechanical transmission of poleroviruses. *Journal of Virological Methods*, 91, 197–201.
- Hofius, D., Herbers, K., Melzer, M., Omid, A., Tacke, E., Wolf, S., Sonnewald, U. (2001). Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal*, 28(5), 529-543.
- Huang, Z., Han, Y. and Howell, S.H. (2001). Effects of movement protein mutations on the formation of tubules in plant protoplasts expressing a fusion between the green fluorescent protein and Cauliflower mosaic virus movement protein. *Mol Plant Microbe Interact.*, 14 (8), 1026-31.
- Hutvagner, G. and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9 (1), 22-32.
- Imlau, A., Truernit, E. and Sauer, N. (1999). Cell-to-cell and long distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell*, 11, 309-322.
- Jaag, H.M., Kawchuk, L., Rohde, W., Fischer, R., Emans, N. and Prüfer, D. (2003). An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *PNAS*, 100, 8939-8944.
- Jackson, A.O. and Larkins, B.A. (1976). Influence of ionic strength, pH, and chelation of divalent metals on isolation of polyribosomes from tobacco leaves. *Plant Physiol.*, 57, 5–10.
- Jeffrey, J.L., Pooma, W. and Petty, I.T. (1996). Genetic requirements for local and systemic movement of tomato golden mosaic virus in infected plants. *Virology*, 223 (1), 208-18.
- Jolly, C. A., and Mayo, M. A. (1994). Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology*, 201, 182-185.
- Jones-Rhoades, M.W. and Bartel, D.P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 14 (6), 787-799.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 19-53.
- Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H.K. and Klessig, D.F. (2000). Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes, is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene and jasmonate independent. *Plant Cell*, 12, 677–690.
- Kalantidis, K., Schumacher, H.T., Alexiadis, T. and Helm, J.M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol Cell.*, 100 (1), 13-26.
- Kalantidis, K., Tsagris, M. and Tabler, M. (2006). Spontaneous short-range silencing of a GFP transgene in *Nicotiana benthamiana* is possibly mediated by small quantities of siRNA that do not trigger systemic silencing. *Plant J.*, 45, 1006–1016.

- Kaplan, I.B., Gal-On, A. and Palukaitis P. (1997). Characterization of Cucumber Mosaic Virus. *Virology*, 230, 343-349.
- Kaplan, I.B., Lee, L., Ripoll, D.R., Palukaitis, P., Gildow, F. and Gray, S.M. (2007). Point mutations in the potato leafroll virus major capsid protein alter virion stability and aphid transmission. *Journal of General Virology*, 88, 1821-1830.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A.Jr, Zhu, J.K., Staskawicz, B.J. and Jin, H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 103 (49), 18816-21.
- Kawchuk, L.M., Martin, R.R. and McPherson, J. (1990). Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3, 301-307.
- Kidner, C.A. and Martienssen, R.A. (2005). The role of ARGONAUTE1 (AGO1) in meristem formation and identity. *Dev. Biol.*, 280, 504-517.
- Klattenhoff, C. and Theurkauf, W. (2008). Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*, 135 (1), 3-9.
- Koev, G and Miller, W.A. (2000). A Positive-Strand RNA Virus with Three Very Different Subgenomic RNA Promoters. *Journal of Virology*, Vol. 74, No. 13, 5988-5996.
- Kornitzer, D. and Ciechanover, A. (2000). Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol.*, 182 (1), 1-11.
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y. (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 12753-12758.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J. and Burgyan, J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.*, 25, 2768-2780.
- Lartey, R.T., Ghoshroy, S. and Citovsky, V. (1998). Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutation (vsm1) that restricts systemic movement of tobamoviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 706-709.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T. and Genschik, P. (2006). F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol.*, 9 (6), 631-8.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O. and Herrbach, E. (1992). A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology*, 41, 749-761.
- Lee L., Kaplan I.B., Ripoll D.R., Liang D., Palukaitis P., and Gray, S.M. (2005). A surface loop of the Potato Leafroll Virus coat protein is involved in virion assembly, systemic movement, and aphid transmission. *Journal of Virology*, Vol. 79, No. 2, 1207-1214.
- Lee, L., Palukaitis, P. and Gray S. M. (2002). Host-Dependent Requirement for the Potato leafroll virus 17-kDa Protein in Virus Movement. *MPMI*, Vol 15, No 10, 1086-1094.
- Leiser, R.M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guillely, H., Richards, K.E. and Jonard, G. (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9136-9140.
- Levy, A., Dafny-Yelin, M. and Tzfira, T. (2008). Attacking the defenders: plant viruses fight back. *Trends Microbiol.*, 16 (5), 194-7.
- Li, C., Cox-Foster, D., Gray, S.M. and Gildow, F. (2001). Vector Specificity of Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) Transmission: Identification of Potential Cellular Receptors Binding BYDV-MAV in the Aphid, *Sitobion avenae*. *Virology*, 286, 125-133.
- Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y.V., Chan, S.W., Lagrange, T., Pikaard, C.S. and Jacobsen, S.E. (2006). An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 126 (1), 93-106.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. and Chen, X. (2005). Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 15 (16), 1501-1507.

- Li, X., Ryan, M. D. and Lamb, J. W. (2000). Potato leafroll virus protein P1 contains a serine proteinase domain. *Journal of General Virology*, *81*, 1857-1864.
- Liu, K., Xia, Z., Zhang, Y., Wen, Y., Wang, D., Brandenburg, K., Harris, F., Phoenix, D.A. (2005). Interaction Between the Movement Protein of Barley Yellow Dwarf Virus and the Cell Nuclear Envelope: Role of a Putative Amphiphilic α -Helix at the N-Terminus of the Movement Protein. *Biopolymers*, *72*(2), 86-96.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A. and Carrington J.C. (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, *14* (7), 1605-1619.
- Lu, C. and Fedoroff, N. (2000). A Mutation in the *Arabidopsis* HYL1 Gene Encoding a dsRNA Binding Protein Affects Responses to Abscisic Acid, Auxin, and Cytokinin. *The Plant Cell*, *12*, 2351-2365.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O. and Ding, S.W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, *101* (44), 15742-7.
- MacRae, I.J., Zhou, K. and Doudna J.A. (2007). Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol*, *14* (10), 934-940.
- Maia, G.I., Séron, K., Haenni, A.L., and Bernardi, F. (1996). Gene expression from viral RNA genomes. *Plant Molecular Biology*, *32*, 367-391.
- Mallory, A.C. and Bouché, N. (2008). MicroRNA-directed regulation: to cleave or not to cleave. *Trends Plant Sci.*, *13* (7), 359-367.
- Martinez, J. and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, *18*, 975-980.
- Matzke, M.A. and Birchler, J.A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.*, *6*, 24-35.
- Mayo, M.A. and D'Arcy, C.J. (1999). Family Luteoviridae: a reclassification of Luteoviruses. *The Luteoviridae*, 15-22.
- Mayo, M.A. and Miller, W.A. (1999). The Structure and Expression of Luteovirus Genomes. *The Luteoviridae*, 23-42.
- Mayo, M. A. and Ziegler-Graff V. (1996). Molecular biology of luteoviruses. *Advances in virus research*, *46*, 413-460.
- Mayo, M.A., Robinson, D.J., Jolly, C.A. and Hyman L. (1989). Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. *J Gen Virol.*, *70*, 1037-51.
- Mayo, M.A., Barker, H., Robinson, D.J., Tamada, T., and Harrison, B.D. (1982). Evidence that potato leafroll virus is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate. *J. Gen. Virol.*, *59*, 163-167.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, *15* (2), 185-197.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, 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* (12), 5747-56.
- Mi, S. Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C. Chen, S., Hannon, G.J. and Qi, Y. (2008). Sorting of Small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*, *133* (1), 116-127.
- Miller, W.A., Dinesh-Kumar, S.P. and Paul, C.P. (1995). Luteovirus Gene Expression. *Critical Review in Plant Sciences*, *14* (3), 179-211.
- Miller, W.A., Hercus, T., Waterhouse, P.M. and Gerlach W.L. (1991). A satellite RNA of barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in the self-cleavage domain. *Virology*, *183*, 711-720.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J. and Vance, V. (2008). Small RNAs in viral infection and host defence. *Trends Plant Sci.*, *13* (7), 375-382.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H. and Vance, V. (2008b). DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, *3* (3), e1755.

- 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 (51), 19593-8.
- Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, E., Lacomme, C. and Burgyán, J. (2005). Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNA. *J Virol.*, 79 (12), 7812-8.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E. and Carrington, J.C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, 133 (1), 128-141.
- Moonan, F. M. (2000). Sugarcane yellow leaf virus: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology*, 269 (1), 156-71.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F. and Vaucheret, H. (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, 14 (3), 629-39.
- Morra, M.R. and Petty, I.T. (2000). Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell*, 12 (11), 2259-70.
- Mosher, R.A., Schwach, F., Studholme, D. and Baulcombe, D.C. (2008). PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 105 (8), 3145-3150.
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Rémoüé, K., Sanial, M., Vo, T.A. and Vaucheret, H. (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101 (5), 533-542.
- Murphy, J.F., D'Arcy, C.J., and Clark, J.M.J. (1989). Barley yellow dwarf virus RNA has a 5'-terminal genome-linked protein. *J. Gen. Virol.*, 70, 2253-2256.
- Mutterer, J. (1998). Etude des déterminants viraux impliqués dans le mouvement et la transmission du virus des jaunisses occidentales de la betterave ou BWYV. Thèse.
- Mutterer, J.D., Stussi-Garaud, C., Michler, P., Richards, K.E., Jonard, G. and Ziegler-Graff, V. (1999). Role of the beet western yellows virus readthrough protein in viral movement in *Nicotiana glauca*. *Journal of General Virology*, 80, 2771-2778.
- Mutterer, J.D., Ziegler-Graff, V. and Richards K.E. (1999b). Agro-infection as a means of transmitting Luteoviruses to host plants for study of gene function. *The Luteoviridae*, 43-67.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2, 279-289.
- Nowotny, M., Gaidamakov, S.A., Crouch, R.J. and Yang, W. (2005). Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis. *Cell*, 121 (7), 1005-1016.
- Nurkiyanova K.M., Ryabov, E.V., Commandeur, U., Duncan, G.H., Canto, T., Gray, S.M., Mayo, M.A. and Taliansky, M.E. (2000). Tagging potato leafroll virus with the jellyfish green fluorescent protein gene. *J Gen Virol.*, 81 (3), 617-26.
- Okada, Y. (1999). Historical overview of research on the tobacco mosaic virus genome: genome organization, infectivity and gene manipulation. *Philosophical transactions of the royal society*, 354, 569-582.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Nunes, P.C., Pontes, O. and Pikaard, C.S. (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell*, 120 (5), 613-622.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G. and Santa Cruz, S. (1998). Use of GFP-tagged viruses in plasmodesmal research. In *Plasmodesmata. Structure, Function, Role in Cell Communication*. A. J. E. van Bel and W.J.P. van Kesteren, (Eds.), 85-99. Springer, Berlin.

- Osman, T.A.M., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W. (2006). *In Vitro* Synthesis of Minus-Strand RNA by an Isolated Cereal Yellow Dwarf Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Requires VPg and a Stem-Loop Structure at the 3' End of the Virus RNA. *Journal of Virology*, Vol. 80, No. 21, 10743-10751.
- Pak, J. and Fire, A. (2007). Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*, 315 (5809), 241-244.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M. and Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.*, 16, 4738-4745.
- Pantaleo, V., Szittyá, G. and Burgyán, J. (2007). Molecular Bases of Viral RNA Targeting by Viral Small Interfering RNA-Programmed RISC. *J Virol.*, 81 (8), 3797-806.
- Parizotto, E.A., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C. and Voinnet, O. (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, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. and Poethig, R.S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102 (10), 3691-3696.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K.E., Genschik, P. and Ziegler-Graff, V. (2006). F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 103 (6), 1994-9.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L. and Poethig, R.S. (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.
- Peter, K.A., Liang, D., Palukaitis, P. and Gray S.M. (2008). Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. *J Gen Virol.*, 89, 2037-45.
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K.E., Jonard, G. and Ziegler-Graff, V. (2002). P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol.*, 76 (13), 6815-24.
- Pfeffer, S. (2002). Identification et étude fonctionnelle de protéines virales impliquées dans la suppression de l'extinction post-transcriptionnelle de gènes ou PTGS. *Thèse*.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C. and Tuschl, T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304 (5671), 734-736.
- Pikaard, C.S., Haag, J.R., Ream, T. and Wierzbicki, A.T. (2008). Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci.*, 13 (7), 390-397.
- Pontes, O., Li, C.F., Nunes, P.C., Haag, J., Ream, T., Vitins, A. and Jacobsen, S.E., Pikaard C.S. (2006). The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell*, 126 (1), 79-92.
- Pouwels, J., Kornet, N. van Bers, N. Guighelaar, T. van Lent, J. Bisseling, T. and Wellink J. (2003). Identification of distinct steps during tubule formation by the movement protein of Cowpea mosaic virus. *J. Gen. Virol.*, 84, 3485-3494.
- Pouwels, J., Van Der Krogt, G. N., Van Lent, J., Bisseling, T. and Wellink, J. (2002). The cytoskeleton and the secretory pathway are not involved in targeting the cowpea mosaic virus movement protein to the cell periphery. *Virology*, 297, 48-56.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J. and Hannon, G.J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 443 (7114), 1008-1012.
- Qin, Y. and Petty, I.T. (2001). Genetic analysis of bipartite geminivirus tissue tropism. *Virology*, 291 (2), 311-23.
- Qu, F., Ren, T. and Morris, T.J. (2003). The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.*, 77, 511-522.

- Qu, F., Ye, X. and Morris, T.J. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 105 (38), 14732-7.
- Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V., Salazar, L.F. (1997). Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *J Gen Virol.*, 78, 1207-11.
- Rasmussin, D.C. and Schaller, C.W. (1959). The inheritance of resistance in barley to the yellow-dwarf virus. *Agronomy journal*, 51, 661-664.
- Reinbold, C., Gildow, F. E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Gonçalves, M. C., van den Heuvel, J. F. J. M. and Brault, V. (2001). Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*. *Journal of General Virology*, 82, 1995-2007.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.*, 16 (13), 1616-1626.
- Reutenauer, A., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K.E. and Jonard, G. (1993). Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology*, 195, 692-699.
- 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 (4), 340-349.
- Robert, Y. and Lemaire, O. (1999). Epidemiology and control strategies. *The Luteoviridae*, 211-220.
- Roberts, A.G., Cruz, S.S., Roberts, I.M., Prior, D., Turgeon, R. and Oparka, K.J. (1997). Phloem Unloading in Sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. *Plant Cell*, 9 (8), 1381-1396.
- Rochow, W.F. and Muller, I. (1975). Use of aphids injected with virus-specific antiserum for study of plant viruses that circulate in vectors. *Virology*, 63, 282-286.
- Rossmann, M.G., and Johnson, J.E. (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 533-573.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 10 (6), 937-46.
- Ryabov, E.V., Fraser, G., Mayo, M.A., Barker, H. and Taliansky, M. (2001). Umbravirus Gene Expression Helps Potato leafroll virus to Invade Mesophyll Tissues and to be Transmitted Mechanically between Plants. *Virology*, 286, 363-372.
- Ryabov, E.V., Robinson, D.J. and Taliansky, M.E. (1999). A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1212-1217.
- Sadowy, E., Maasen, A., Juszczuk, M., David, C., Zagorski-Ostojka, W., Gronenborn, B. and Hulanicka, M.D. (2001). The ORF0 product of Potato leafroll virus is indispensable for virus accumulation. *Journal of General Virology*, 82, 1529-1532.
- Salem, N., Golino, D.A., Falk, B.W. and Rowhani, A. (2008). Identification and Partial Characterization of a New Luteovirus Associated with Rose Spring Dwarf Disease. *Plant Disease*, 92 (4), 508-512.
- Samols, M.A., Skalsky, R.L., Maldonado, A.M., Riva, A., Lopez, M.C., Baker, H.V. and Renne, R. (2007). Identification of cellular genes targeted by KSHV-encoded microRNAs. *PLoS Pathog.*, 3 (5), e65.
- Sanford, J.C. and Johnston, S.A. (1985). The concept of parasite-derived resistance deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, 113, 395-405.
- Sanger, M., Passmore, B., Falk, B.W., Bruening, G., Ding, B. and Lucas, W.J. (1994). Symptom severity of beet western yellows virus strain ST9 is conferred by the ST9-associated RNA and is not associated with virus release from the phloem. *Virology*, 200 (1), 48-55.
- Ramachandran V and Chen X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science*, 321 (5895), 1490-2.

- Requena, A., Simón-Buela, L., Salcedo, G. and García-Arenal, F. (2006). Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of Cucumber mosaic virus particles. *Mol Plant Microbe Interact.*, 19 (7), 734-46.
- Reutenauer, A., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K.E. and Jonard, G. (1993). Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology*, 195, 692-699.
- 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 (4), 340-349.
- Robert, Y. and Lemaire, O. (1999). Epidemiology and control strategies. *The Luteoviridae*, 211-220.
- Roberts, A.G., Cruz, S.S., Roberts, I.M., Prior, D., Turgeon, R. and Oparka, K.J. (1997). Phloem Unloading in Sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. *Plant Cell*, 9 (8), 1381-1396.
- Rochow, W.F. and Muller, I. (1975). Use of aphids injected with virus-specific antiserum for study of plant viruses that circulate in vectors. *Virology*, 63, 282-286.
- Rossmann, M.G., and Johnson, J.E. (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 533-573.
- Ryabov, E.V., Fraser, G., Mayo, M.A., Barker, H. and Taliansky, M. (2001). Umbravirus Gene Expression Helps Potato leafroll virus to Invade Mesophyll Tissues and to be Transmitted Mechanically between Plants. *Virology*, 286, 363-372.
- Ryabov, E.V., Robinson, D.J. and Taliansky, M.E. (1999). A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1212-1217.
- Sadowy, E., Maasen, A., Juszczuk, M., David, C., Zagorski-Ostojka, W., Gronenborn, B. and Hulanicka, M.D. (2001). The ORF0 product of Potato leafroll virus is indispensable for virus accumulation. *Journal of General Virology*, 82, 1529-1532.
- Salem, N., Golino, D.A., Falk, B.W. and Rowhani, A. (2008). Identification and Partial Characterization of a New Luteovirus Associated with Rose Spring Dwarf Disease. *Plant Disease*, 92 (4), 508-512.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Samols, M.A., Skalsky, R.L., Maldonado, A.M., Riva, A., Lopez, M.C., Baker, H.V. and Renne, R. (2007). Identification of cellular genes targeted by KSHV-encoded microRNAs. *PLoS Pathog.*, 3 (5), e65.
- Sanford, J.C. and Johnston, S.A. (1985). The concept of parasite-derived resistance deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, 113, 395-405.
- Sanger, M., Passmore, B., Falk, B.W., Bruening, G., Ding, B. and Lucas, W.J. (1994). Symptom severity of beet western yellows virus strain ST9 is conferred by the ST9-associated RNA and is not associated with virus release from the phloem. *Virology*, 200 (1), 48-55.
- Sasaki, T., Chino, M., Hayashi, H. and Fujiwara, T. (1998). Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant and Cell Physiology*, 39, 895-897.
- Savenkov, E.I. and Valkonen, J.P. (2001). Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato leaf roll virus but does not alleviate its phloem limitation. *Virology*, 283 (2), 285-93.
- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, D., Rohde, W., and Rohfritsch, O. (1997). In Situ Localization of the Putative Movement Protein (pr17) from Potato Leafroll Luteovirus (PLRV) in Infected and Transgenic Potato Plants. *Virology*, 235, 311-322.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B., Kikkert, M. and Jackson, A.O. (1995). Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology*, 213 (2), 425-38.

- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C. (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., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115 (2), 199-208.
- Schwarz, D.S., Tomari, Y. and Zamore, P.D. (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr. Biol.*, 14, 787-791.
- Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J.M. and Van Dorselaer, A. (2004). Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid. *Virology*, 325, 399-412.
- Shen, R., Rakotondrafara, A.M. and Miller, W.A. (2006). trans Regulation of Cap-Independent Translation by a Viral Subgenomic RNA. *J Virol.*, 80 (20), 10045–10054.
- Shepardson, S., Esau, K. and McCrum, R. (1980). Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology*, 105, 379-392.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107 (4), 465-76.
- Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L. and Plasterk, R.H. (2007). Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science*, 315 (5809), 244-7.
- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. and Burgyán, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.*, 21 (12), 3070-80.
- Smalle, J. and Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol.*, 55, 555-90.
- Smith, H.G. and Barker, H. (1999). *The Luteoviridae*. Oxon, UK: CABI publishing.
- Smith, L.M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F.K., Herr, A.J., Pikaard, C.S. and Baulcombe, D.C. (2007). An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, 1507–1521.
- Smith, L.M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F.K., Herr, A.J., Pikaard, C.S. and Baulcombe, D.C. (2007). An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (5), 1507-1521.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science*, 305 (5689), 1434-7.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P. and Green, P.J. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell.*, 15 (2), 173-183.
- Stadler, R., Wright, K.M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K.J. and Sauer, N. (2005). Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J.*, 41 (2), 319-31.
- Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D.G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., Goldman-Wohl, D., Greenfield, C., Yagel, S., Hengel, H., Altuvia, Y., Margalit, H. and Mandelboim, O. (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science*, 317 (5836), 376-381.
- Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J. and Rohde, W. (1991). The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *Journal of General Virology*, 72, 2035-2038.
- Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, D., and Rohde, W. (1993). Mutational analysis of the Nucleic Acid-binding 17kDa phosphoprotein of Potato Leafroll Luteovirus identifies an α -helix as the domain for protein-protein interactions. *Virology*, 197, 274-282.
- Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2005). A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J.*, 24 (17), 3147-57.

- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. and Watanabe, Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol*, 49 (4), 493-500.
- Taliansky, M., Roberts, I.M., Kalinina, N., Ryabov, E.V., Raj, S.K., Robinson, D.J. and Oparka, K.J. (2003). An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. *J Virol.*, 77 (5), 3031-40.
- Terradot, L., Souchet, M., Tran, V. and Giblot Ducray-Bourdin, D. (2001). Analysis of a three-dimensional structure of Potato leafroll virus coat protein obtained by homology modeling. *Virology*, 286, 72-82.
- Tomassoli, L. and Meneghini, M. (2007). First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Italy. *Plant Pathology*, 56 (4), 720-720.
- Ueki, S. and Citovsky, V. (2001). Inhibition of systemic onset of post-transcriptional gene silencing by non-toxic concentrations of cadmium. *Plant J.*, 28, 283-291.
- Vaistij, F.E., Jones, L., and Baulcombe, D.C. (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell*, 14 (4), 857-67.
- Van Den Heuvel, J.F.J.M., Bruyere, A., Hogenhout, S.A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., Van Der Wilk, F. and Richards, K. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal of Virology*, Vol. 71, No.10, 7258-7265.
- van der Wilk, F., Houterman, P., Molthoff, J., Hans, F., Dekker, B., van den Heuvel, J., Huttinga, H. and Goldbach, R. (1997). Expression of the Potato Leafroll Virus ORF0 Induces Viral-Disease-like Symptoms in Transgenic Potato Plants. *MPMI*, Vol. 10, 153-159.
- van Lent, J.W., Wellink, J. & Goldbach, R.W. (1990). Evidence for the involvement of the 58K and 48K proteins in the intracellular movement of cowpea mosaic virus. *J Gen Virol*, 71, 219-223.
- Van Wezel, R. D. (2002). Mutation of three cysteine residues in Tomato yellow leaf curl virus-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15, 203-208.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J. and Hall, T.M. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*, 115 (7), 799-811.
- Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318 (5858), 1931-1934.
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci*, 13 (7), 350-358.
- Vazquez Rovere, C., Asurmendi, S. and Hopp, H.E. (2001). Transgenic resistance in potato plants expressing potato leaf roll virus (PLRV) replicase gene sequences is RNA-mediated and suggests the involvement of post-transcriptional gene silencing. *Archives of Virology*, 146, 1337-1353.
- Vazquez, F. (2006). *Arabidopsis* endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends Plant Sci.*, 11 (9), 460-468.
- Veidt, I., Bouzoubaa, S.E., Leiser, R.M., Ziegler-Graff, V., Guilley, H., Richards, K.E. and Jonard, G. (1992). Synthesis of full-length transcripts of beet western yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology*, 186, 192-200.
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. (1988). Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Res*, 16, 9917-32.
- Verchot, J., Angell, S.M., and Baulcombe, D.C. (1998). In vivo translation of the entire triple gene block of potato virus X requires two separate mRNAs. *J. Virol.*, 72, 8316-8320.
- Vogel, F., Hofius, D. and Sonnenberg, U. (2007). Intracellular Trafficking of Potato Leafroll Virus Movement Protein in Transgenic *Arabidopsis*. *Traffic*, 8, 1205-1214.
- Voinnet, O. (2005b). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet.*, 6 (3), 206-20.

- Voinnet, O. (2005). Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett.*, 579, 5858–5871.
- Voinnet, O. (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.*, 13 (7), 317-28.
- Voinnet, O., Lederer, C. and Baulcombe D.C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 103, 157–167.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M. and Baulcombe, D.C. (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, 14147–14152.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 95, 177–187.
- Waigmann, E., Lucas, W.J., Citovsky, V. and Zambryski, P. (1994). Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 91 (4), 1433-7.
- Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K. and Cytovsky, V. (2004). The Ins and Outs of Nondestructive Cell-to-Cell and Systemic Movement of Plant Viruses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23 (3), 195-250.
- Wang, H.L., Wang, Y., Giesman-Cookmeyer, D., Lommel, S.A. and Lucas, W.J. (1998). Mutations in Viral Movement Protein Alter Systemic Infection and Identify an Intercellular Barrier to Entry into the Phloem Long-Distance Transport System. *Virology*, 245, 75-89.
- Wang, S., Guo, L., Allen, E. and Miller, W.A. (1999). A potential mechanism for selective control of cap-independent translation by a viral RNA sequence in cis and in trans. *RNA*, 5, 728-738.
- Wang, X.J., Gaasterland, T. and Chua, N.H. (2005). Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.*, 6 (4), R30.
- Wassenegger, M. and Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.*, 11 (3), 142-51.
- Waterhouse P.M., Wang M-B. and Lough T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 411, 834-842.
- Waterhouse, P. G. (1988). Luteovirus group. Dans *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* (Vol. 339).
- Wille, A. and Lucas, W.J. (1984). Ultrastructural and histochemical changes on guard cells. *Planta*, 160, 129-142.
- Xie, Z. and Qi, X. (2008). Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta*, Article in press.
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S.A. and Carrington J.C. (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol.*, 138, 2145–2154.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2, E104.
- Yang, X., Thannhauser, T.W., Burrows, M., Cox-Foster, D., Gildow, F.E. and Gray, S.M. (2008). Coupling Genetics and Proteomics To Identify Aphid Proteins Associated with Vector-Specific Transmission of Polerovirus (Luteoviridae). *Journal of Virology*, 291-299.
- Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B. and Chen, X. (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), 667-675.
- Ye, K., Malinina, L. and Patel, D.J. (2003). Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, 426 (6968), 874-8.
- Ye, K. and Patel, D.J. (2005). RNA silencing suppressor p21 of Beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure*, 13 (9), 1375-84.

- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., Lucas, W.J. (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, 16 (8), 1979-2000.
- 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.*, 19 (18), 2164-2175.
- Young, M.J., Kelly, L., Larkin, P.J., Waterhouse, P.M. and Gerlach, W.L. (1991). Infectious *in vitro* transcripts from cloned cDNA of barley yellow dwarf virus². *Virology*, 180, 372-379.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R. and Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307 (5711), 932-935.
- Yu, D., Fan, B., MacFarlane, S.A. and Chen, Z. (2003). Analysis of the involvement of an inducible *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16, 206-216.
- Zhang, D. T. (2008). The XS domain of a plant specific SGS3 protein adopts a unique RNA recognition motif (RRM) fold. *Cell Cycle*, 7 (14), 2268-2270.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy E. and Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO*, 21 (21), 5875-5885.
- Zhang, X., Henderson, I.R., Lu, C., Green, P.J. and Jacobsen, S.E. (2007). Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (11), 4536-4541.
- 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 (23), 3255-68.
- Zhao, D., Ni, W., Feng, B., Han, T., Petrasek, M.G. and Ma, H. (2003). Members of the *Arabidopsis*-SKP1-like gene family exhibit a variety of expression patterns and may play diverse roles in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 133 (1), 203-17.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Harper, J.W. and Pavletich N.P. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416 (6882), 703-9.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A. and Zhu, J.K. (2007). Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO Journal*, 26, 1691-1701.
- Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J.D., Simonis, M.T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K.E. and Jonard, G. (1996). The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene product P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 9, 501-510.
- Zrachya, A., Glick, E., Levy, Y., Arazi, T., Citovsky, V. and Gafni, Y. (2007). Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology*, 358 (1), 159-65.
- Zuo, J., Niu, Q.W. and Chua, N.H. (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.*, 24 (2), 265-73.