

THÈSE

Présentée à la

FACULTE DES SCIENCES DE LA VIE

En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Domaine : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
« Biotechnologies appliquées dans la protection des végétaux »

Par

Kamal HLEIBIEH

Étude des propriétés biologiques de la protéine p25, de l'ARN3 et de la protéine p14 du *Beet necrotic yellow vein virus* : vers de nouvelles stratégies de luttes antivirales

Soutenue publiquement le 10 décembre 2010 devant la Commission d'Examen :

Dr. Pascal GENSHIK
Dr. Isabelle JUPIN
Dr. Stéphane BLANC
Pr. Claude BRAGARD
Pr. David GILMER

Examineur Interne
Rapporteur Externe
Rapporteur Externe
Examineur Externe
Directeur de Thèse

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (CNRS, UPR 2357) – Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements à mon directeur de thèse, le Professeur David GILMER qui m'a accepté comme un membre de son laboratoire dès mon entrée en Master 2, pour sa supervision, pour ses conseils sur la science et sur la vie quotidienne en France durant ces cinq ans. Je le remercie également pour ses discussions enrichissantes, sa disponibilité et l'aide qu'il m'a apportée en travaillant tard (criblage) et bien sûr pour la Girafe également, pour la correction de mes rapports, résumés et enfin mon mémoire de thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury, les Docteurs Pascal GENSCHIK, Isabelle JUPIN, Stéphane BLANC et Claude BRAGARD pour avoir accepté de juger mon travail de doctorat.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, le Professeur Anne-Catherine SCHMIT et le Docteur Catherine SCHUSTER pour leur participation à l'évaluation de ce travail en fin de deuxième année de thèse et pour leurs remarques intéressantes.

Je suis également très reconnaissant au Docteur Salah Eddine BOUZOUBAA pour ses précieux conseils et pour ses discussions scientifiques très utiles, ainsi que pour sa participation à la relecture de cette thèse. Je remercie Elodie qui m'a aidé, dès mon arrivée au laboratoire et continue à le faire, pour trouver les clones, les matériels, lorsque j'en avais besoin. Je la remercie tout simplement pour sa grande disponibilité.

Je tiens à remercier Mark et Heike pour leur participation à une partie de ce travail.

Je remercie le Docteur Frank MARTIN pour ses discussions et pour m'avoir fourni des souches de levures pour les tests de triple hybride.

Merci à Dimitri, Esther, Claudio, Véronique, Corinne, Christophe, Maghsoud, Odon, Audrey, Jérôme, Mathieu, Malek et Danièle pour leurs conseils et leur intervention dans ce travail, mais également toute l'équipe des jardiniers.

Merci à Philippe et Kamel pour m'avoir permis de contribuer modestement à leur recherche.

Sûrement, je n'oublierai pas les autres membres du labo 409-412, merci à toi Claire, notre journaliste scientifique et ma copine de paillasse pour ta bonne humeur. Je n'oublierai pas mon cher ami Manu pour ses cadeaux sur ma paillasse, sur mon bureau et sur ma voiture. Khalid et Fanny, merci pour votre gentillesse et pour votre bonne humeur. Dalya, Annette et Edouardo, je vous remercie pour vos superbes soirées aux quelles j'ai participées ou que j'ai ratées. Merci à tous ceux qui ont partagé de près ou de loin des moments joyeux: Macs, François, Pascale, Laura, Khaldoun, Rose, Wessam, Nawara, Sophie, Julia, Diane, Jessica, Mathieu, Tristan, Marina, Kamal et Rana.

Je remercie aussi les stagiaires qui ont mis généreusement la main à la pâte et qui ont contribué à rendre plus agréable ce travail: Guillaume, Cindy, Claire, Anna et Mamia.

J'exprime mes plus vifs remerciements à toutes les personnes côtoyées à l'IBMP pour leur gentillesse. Je n'oublierai jamais mes cinq ans à Strasbourg.

Je remercie également mon gouvernement syrien qui m'a donné cette opportunité de poursuivre mes études supérieures en France.

Merci à ma famille, qui m'a toujours soutenu dans mes décisions et qui a facilité l'aboutissement de ces longues années d'études, mon père qui m'a appris le respect et l'amour du travail, ma mère qui m'a enseigné le sens de la réussite, mes sœurs et mes frères: Kinda et sa famille, Talal, Kinana, Jamal et sa Nermeen, Karmen et Ahmad.

Enfin, un énorme merci à ma Kinda pour m'avoir accompagné en France, pour ton encouragement et pour ton aide, et surtout pour ta patience, sans toi cette expérience n'aurait pas eu la même saveur. Je te souhaite également pleine réussite pour ta thèse.

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	1
TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	5
I. <i>Figures</i>	5
II. <i>Tableaux</i>	8
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	9
❖ LA RHIZOMANIE	11
I. <i>Article de revue « Etiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière ».....</i>	<i>13</i>
II. <i>Enjeux de mon travail de thèse.....</i>	<i>31</i>
❖ LES MODIFICATIONS POST TRADUCTIONNELLES DES PROTÉINES.....	33
I. <i>Clivage protéolytique</i>	<i>36</i>
II. <i>Addition de molécules complexes.....</i>	<i>37</i>
1. Acylation	37
i. Myristoylation	37
ii. Palmitoylation	39
iii. Prénylation : farnésylation et géranylgeranylation	41
2. Glycosylation.....	43
3. Nucléotidylation et ADP-ribosylation	46
III. <i>Modifications d'acide aminé individuel et de chaîne latérale</i>	<i>48</i>
1. Déamidation.....	48
2. Amidation (C-terminale).....	49
3. Carboxylation	49
4. Oxydation et Hydroxylation	50
5. Sulfatation (Sulfanation).....	51
6. Acylation (acétyle-, formyle-, pyroglutamyle-)	52
7. Méthylation.....	56
8. Phosphorylation	58
i. Les protéines Kinases (PK)	60
a. Les protéines Sérine/Thréonine Kinases (PS/TK).....	61
▪ Les protéines Sérine/Thréonine Kinases dépendantes de la cycline (CDK).....	62
▪ Les "Mitogen-Activated Protein Kinases" (MAPK)	62
b. Les protéines Tyrosine Kinases (PTK).....	63
▪ Les protéines Tyrosine Kinases cytosoliques.....	63
▪ Les protéines Tyrosine kinases réceptrices transmembranaires "transmembrane receptor-linked kinases"	63
c. Les protéines Histidine Kinases	64
ii. Les protéines Phosphatases	65
a. Les protéines Sérines/Thréonine Phosphatases (PPP).....	66
b. Les Protéines Phosphatases Magnésium-dépendant (PPM)	66
c. Les Protéines Tyrosine Phosphatases (PTP)	67
d. Aspartate Based Phosphatases (Asp-based PTP).....	68
iii. Importance de la phosphorylation	68
a. Importance	68
b. Phosphorylation des protéines virales	70
▪ Virus à ARN de polarité négative	70
▪ Virus à ADN double brin	70
▪ Virus à ADN simple brin	71
▪ Virus à ARN de polarité positive	72
IV. <i>Addition de polypeptides</i>	<i>74</i>
1. Polypeptide RUB.....	75
2. Polypeptide SUMO.....	75
3. Polypeptide UBIQUITINE	78
i. Ubiquitination.....	80
ii. Le système ubiquitine-protéasome (UPS)	82
a. Cascade de conjugaison de l'ubiquitine	85
▪ E1 (Ub-activating enzyme).....	85
▪ E2 (Ubiquitin conjugating enzymes).....	85
▪ E3 (Ubiquitin ligating enzymes)	86
b. Implication de l'ubiquitine/protéasome 26S dans la défense des plantes	95
V. <i>Autres PTM</i>	<i>98</i>

Table des matières

VI. Relations entre les PTM	100
CHAPITRE I : ÉTUDE DES MODIFICATIONS POST TRADUCTIONNELLES DE LA PROTÉINE P25 DANS LE BUT D'IDENTIFIER UN MUTANT DOMINANT NÉGATIF UTILISABLE DANS LA LUTTE CONTRE LE BNYVV	103
I. Introduction.....	105
II. Étude des modifications post traductionnelles (PTM) de la protéine p25	109
1. Approche protéomique	111
i. N-acétylation et déamidation de la protéine p25	112
ii. Phosphorylation de la protéine p25	115
2. Approche de mutagenèse « Alanine et Aspartate scanning ».....	121
i. Effet des résidus phosphorylables sur la localisation subcellulaire de la protéine p25 du BNYVV ..	123
a. Expression transitoire en cellules BY2.....	124
b. Observation de la localisation subcellulaire des protéines p25 mutées	125
c. Effet de doubles et triples substitutions sur la localisation subcellulaire de la protéine p25	131
ii. Influence de mutants de phosphorylation de la protéine p25 sur l'interaction avec l'importine α <i>in vitro</i>	132
iii. Rôle des résidus phosphorylables sur la capacité d'activation de la transcription de la protéine p25 : utilisation de l'approche de "simple hybride"	134
iv. Rôle des résidus phosphorylables sur les capacités d'interaction entre protéine p25 : utilisation de l'approche de "double hybride".....	136
v. Rôle des résidus phosphorylables sur les propriétés de la protéine p25 : Effet des remplacements sur le développement des symptômes foliaires	141
CHAPITRE II : RECHERCHE DES PARTENAIRES CELLULAIRES ET VIRAUX CAPABLES D'INTERAGIR AVEC LA PROTÉINE P25 DU BNYVV	151
I. Introduction.....	153
II. Recherche des partenaires de la protéine p25	155
III. Résultats	157
1. Interaction entre la protéine p25 et une protéine F-box à deux motifs Kelch.....	157
i. Article: Identification of a sugar beet F-box protein involved in the induction of a hypersensitive resistance response physically interacting with the beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor.....	157
ii. Expériences complémentaires	184
a. Étude du complexe Ask•F-box•p25	186
b. Estimation des forces d'interactions par quantification de l'activité ONPG (O-NitroPhényl- β -D-Galactopyrnoside) dans la levure	190
c. Analyse de l'expression de la protéine F-box dans des plantes de betterave.....	191
d. Effet des mutations de phosphorylation de la protéine p25 sur l'interaction avec la protéine F-box	192
2. Recherche des partenaires cellulaires et viraux de la protéine p25 par des approches <i>in vitro</i>	195
i. Approche de co-immunoprécipitation	195
ii. La protéine p25 interagit indirectement avec les particules virales du BNYVV	199
IV. Conclusion.....	200
CHAPITRE III : MISE EN ÉVIDENCE DE L'INTERACTION ENTRE LA PROTÉINE P14 ET LA SÉQUENCE COREMIN DE L'ARN3 DU BNYVV : IMPLICATION DANS LE MOUVEMENT À LONGUE DISTANCE	205
I. Introduction.....	207
1. Mécanisme de RNA silencing	207
2. Suppression du RNA silencing	209
3. Des suppresseurs de RNA silencing impliqués dans le mouvement à longue distance.....	211
II. Caractérisation de la protéine p14 du BNYVV, un suppresseur du RNA silencing.....	212
1. Localisation subcellulaire de la protéine p14 dans les protoplastes de cellules BY-2.....	212
2. Immunomarquage en microscopie électronique	216
3. Identification d'un signal de localisation nucléolaire (NoLS).....	216
i. Mutagenèse de la séquence NoLS de la protéine p14.....	219
ii. Rôle des acides aminés basiques de la séquence NoLS dans l'adressage nucléolaire de la protéine p14	219
4. La protéine p14 interagit avec elle même	220

Table des matières

i.	Analyse de la multimérisation de la protéine p14 <i>in vivo</i> par système double hybride.....	222
ii.	Effet de mutations de la protéine p14 sur sa capacité de dimérisation.....	224
III.	<i>Particularités de l'ARN3 du BNYVV</i>	225
1.	Particularités.....	225
2.	La séquence coremin.....	226
3.	Importance de la séquence coremin chez le BNYVV.....	229
IV.	<i>Recherche des partenaires de la séquence coremin</i>	230
1.	Approche <i>in vivo</i> par la technique triple hybride de levure.....	230
i.	Recherche des partenaires viraux de la séquence coremin.....	230
ii.	Recherche des partenaires cellulaires de la séquence coremin.....	234
2.	Etude de l'interaction entre la séquence coremin et la protéine p14 <i>in vitro</i>	239
i.	Approche par gel retard.....	239
ii.	Approche par Cross-linking.....	242
3.	Effet de mutations du NoLS de la p14 sur l'interaction avec la séquence coremin.....	244
V.	<i>Est-ce que l'interaction p14-coremin est impliquée dans l'infection systémique ?</i>	246
1.	Effet des protéines p14 mutées sur l'infection virale locale.....	246
i.	Symptômes locaux sur <i>C. quinoa</i>	246
ii.	Symptômes locaux sur <i>C. quinoa</i> en présence de la séquence coremin.....	250
2.	Effet des protéines p14 mutées sur l'infection systémique.....	256
i.	Expériences chez <i>B. macrocarpa</i>	256
ii.	Expériences chez <i>N. benthamiana</i>	258
VI.	<i>Conclusion</i>	261
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		265
MATÉRIEL ET MÉTHODES		275
❖	MATERIEL	277
I.	<i>Organismes</i>	277
1.	Plantes hôtes.....	277
2.	Cellules de tabac BY-2.....	277
3.	Souche virale.....	278
4.	Bactéries.....	278
5.	Levures (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (tableau MM.2).....	280
II.	<i>Milieux de culture</i>	282
III.	<i>Vecteurs de clonage et d'expression</i>	283
❖	METHODES	289
I.	<i>Infections virales, agroinfiltration et transfection de cellules</i>	289
1.	Infections virales.....	289
2.	Expression transitoire par agroinfiltration de feuilles.....	291
3.	Transfection de cellules BY-2 de tabac par biolistique.....	291
4.	Transfection de protoplastes de tabac BY-2 par électroporation.....	293
II.	<i>Manipulation des ADN</i>	294
1.	Clonage classique.....	294
2.	Clonage GATEWAY®.....	298
III.	<i>Manipulation des ARN</i>	299
1.	Extraction et purification des ARN.....	299
2.	Analyse des ARN par hybridation moléculaire.....	301
IV.	<i>Manipulation des PROTEINES</i>	303
1.	Analyse des protéines par western-blot.....	303
2.	Localisation <i>in situ</i> de protéines virale par microscopie confocale.....	305
3.	Localisation <i>in situ</i> de protéines virale par microscopie électronique.....	305
4.	Etude de l'activation de la transcription et tests d'interaction protéine-protéine.....	307
i.	Etude de l'activation de la transcription.....	307
ii.	Tests d'interaction protéine-protéine.....	308
a.	Interaction protéine-protéine <i>in vivo</i>	308
b.	Interaction protéine-protéine <i>in vitro</i>	312
iii.	Tests d'interaction protéine-acide nucléique.....	314
a.	Interaction protéine-acide nucléique <i>in vivo</i>	314
b.	Interaction protéine-acide nucléique <i>in vitro</i>	316
APPENDICE		319
I.	<i>Abréviations</i>	321
II.	<i>Unités de mesure</i>	323

Table des matières

III.	Liste des virus cités.....	324
BIBLIOGRAPHIE	325
ANNEXES	349
I.	Article de revue « <i>Molecular Biology of the Beet necrotic yellow vein virus</i> ».....	351
II.	Article « <i>Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in Beta macrocarpa</i> ».....	363

Table des figures et des tableaux

Table des figures et des tableaux

I. Figures

Figure 1	<i>Arabidopsis thaliana</i> sauvage ou exprimant la protéine p25 du BNYVV	29
Figure 2	Visualisation des capacités de dimérisation et d'activation de la transcription de la protéine p25.	30
Figure 3	Diversité des modifications post-traductionnelles.	34
Figure 4	Schéma général d'une réaction de modification covalente	35
Figure 5	Clivage protéolytique d'une protéine.....	37
Figure 6	La myristoylation d'une protéine	38
Figure 7	Les différentes formes de palmitoylation de protéines	40
Figure 8	Représentation schématique de prénylation.....	42
Figure 9	Représentation des réactions de <i>N</i> -glycosylation et d' <i>O</i> -GlcNAcylation de protéines	44
Figure 10	Réactions réversibles d'adenylation et d'ADP-ribosylation	47
Figure 11	La déamidation de glutamine.....	48
Figure 12	Acétylation N-terminale et de chaîne latérale ϵ -amine de lysine	53
Figure 13	Méthylation, formylation et acétylation de la chaîne latérale ϵ -amine de la lysine.....	55
Figure 14	Représentation schématique des réactions de la phosphorylation et de la déphosphorylation.....	60
Figure 15	Représentation de la SUMOylation d'une protéine	76
Figure 16	Représentation schématique de protéines monoubiquitinée, multiubiquitinée et polyubiquitinée ...	79
Figure 17	Structure tridimensionnelle de l'ubiquitine	80
Figure 18	Le protéasome 26S.....	81
Figure 19	Représentation simplifiée des trois étapes de réaction de conjugaison, d'activation et de ligation de l'ubiquitine (Ub) à une protéine cible	84
Figure 20	Représentation schématique de l'ubiquitination suivie de la dégradation de la protéine par le protéasome 26S.....	86
Figure 21	Représentation simplifiée des quatre types de ligase E3 retrouvées chez les plantes	87
Figure 22	Représentation des différentes protéines à domaine F-box.....	90
Figure I.1	Mise en évidence de l'aggravation des symptômes induits par l'expression de la protéine p25...	108
Figure I.2	La protéine p25 est présente sous la forme d'un doublet après migration sur gel de polyacrylamide dénaturant.....	109
Figure I.3	La protéine p25 est phosphorylée <i>in vivo</i>	110
Figure I.4	Identification d'une N-acétylation de la protéine p25.....	113
Figure I.5	Identification d'une déamidation de la protéine p25 après séparation bidimensionnelle	114
Figure I.6	Différentes isoformes de la protéine p25 identifiées en western blot	115
Figure I.7	Confirmation de l'existence de phosphorylations par traitement à la phosphatase alcaline	116
Figure I.8	Immunodétection de la protéine HAp25 après séparation par électrophorèse bidimensionnelle..	117
Figure I.9	Immunoprécipitation de la protéine HAp25.....	118
Figure I.10	Immunoprécipitation de la protéine p25 après marquage <i>in vivo</i>	120
Figure I.11	Identification des résidus potentiellement phosphorylés sur la protéine p25.....	122

Table des figures et des tableaux

Figure I.12	Représentation schématique de la protéine p25 du BNYVV	124
Figure I.13	Analyse par western blot des extraits protéiques de cellules BY-2.....	125
Figure I.14	Analyse comparative par microscopie confocale de la localisation subcellulaire des protéines eGFP et de protéines p25 sauvage ou mutées	126
Figure I.15	Recherche par microscopie confocale de la localisation subcellulaire de protéines fusionnées à l'EGFP après agroinfiltration de feuilles de <i>N. benthamiana</i>	127
Figure I.16	Immunodétection des protéines EGFP, EGFP-p25 et de la protéine EGFP-p25 Δ SB dans <i>N. benthamiana</i>	128
Figure I.17	Immunodétection des protéines p25 produites <i>in vitro</i> , capables d'interagir avec l'importine α de riz... ..	134
Figure I.18	Analyse en système simple hybride de levure	136
Figure I.19	Caractérisation des capacités de dimérisation de protéines p25 sauvage et mutées	138
Figure I.20	Effet de l'expression de la protéine p25 mutée sur le développement des symptômes foliaires	142
Figure I.21	Analyse de l'accumulation des protéines virales et des ARN viraux.....	143
Figure I.22	Étude de l'influence des protéines virales p25 mutées sur l'expression protéique et sur la réplication des ARN viraux.....	144
Figure I.23	Analyse prédictive des résidus potentiellement <i>O</i> -GlcNAcylés de la protéine p25	149
Figure II.1	Les hypothèses de reconnaissance entre les produits de gène d'avirulence d'un agent pathogène et celui de gène de résistance de l'hôte	154
Figure II.2	Test de double hybride de levure en présence d'une protéine adaptatrice exprimée par l'intermédiaire d'un vecteur bridge.....	185
Figure II.3	Recherche de la formation des complexes protéiques par test triple hybride de levure.....	188
Figure II.4	Quantification de l'activité β -galactosidase.....	191
Figure II.5	Analyse par northern blot de l'accumulation de l'ARN messager de F-box dans les betteraves sucrières résistantes <i>Rz1</i> et <i>Rz2</i> et susceptibles, infectées et non-infectées.....	192
Figure II.6	Interaction <i>in vitro</i> entre des protéines p25 sauvage ou mutées avec la protéine de fusion GST-F-box	194
Figure II.7	Analyse comparative par électrophorèse des protéines issues de l'immunoprécipitation.....	196
Figure II.8	Électrophorèse (une dimension), après co-immunoprécipitation de protéines totales extraites de <i>C. quinoa</i> infectées.....	197
Figure II.9	Recherche des interactions entre la protéine p25, la protéine RT et la protéine p14	198
Figure II.10	Visualisation de l'existence d'interaction entre la protéine p25 et les particules virales	200
Figure II.11	Modèle proposé pour le rôle de la protéine p25 dans le complexe SCF	202
Figure III.1	Mécanisme de l'ARN silencing	209
Figure III.2	La protéine p14 est un suppresseur de PTGS.....	212
Figure III.3	Localisation cytoplasmique et nucléolaire de la protéine p14.....	214
Figure III.4	Localisation subcellulaire des protéines de fusion EGFP14 ou RFp14 et de la protéine RFP libre	215
Figure III.5	Immunodétection de la protéine p14 et observation par microscopie électronique de cellules de <i>C. quinoa</i> infectées par le BNYVV	216
Figure III.6	Localisation du signal de localisation nucléolaire de la protéine p14.....	217
Figure III.7	Représentation schématique de la séquence en acides aminés de la protéine p14	218
Figure III.8	Effet des mutations du NoLS de la protéine p14 sur sa localisation subcellulaire.....	220
Figure III.9	Immunodétection de la protéine p14 purifiée à partir de bactéries recombinantes ou extraite de protoplastes infectés par le BNYVV	221

Table des figures et des tableaux

Figure III.10	Interaction de la protéine p14 avec elle-même dans un système de double hybride de levures	223
Figure III.11	Effet des mutations du NoLS de la protéine p14 sur ses capacités d'interaction en système double hybride	225
Figure III.12	Complémentation du mouvement à longue distance du BNYVV par l'ARN3 du BSBMV sur <i>B. macrocarpa</i>	227
Figure III.13	Schéma représentant la présence et la conservation de la séquence coremin sur le génome de plusieurs virus	228
Figure III.14	Recherche des protéines du BNYVV interagissant avec la séquence coremin	232
Figure III.15	Analyse par système de triple hybride de levure de l'interaction entre la protéine p14 et la séquence coremin du BNYVV	234
Figure III.16	Recherche des protéines cellulaire interagissant avec la séquence coremin	236
Figure III.17	Analyse de l'interaction entre la séquence coremin et les protéines virales en système de triple hybride utilisant une approche de mating entre les souches de levures YBZ-1 et R40 coat	238
Figure III.18	Analyse de l'interaction entre la protéine p14His et la séquence coremin, par la technique du "gel retard", sur gel de polyacrylamide natif 10 %	240
Figure III.19	Analyse de l'interaction entre la protéine p14 et l'ARN par la méthode de "gel retard" sur gel d'agrose	241
Figure III.20	Analyse de l'interaction entre la protéine p14His et les séquences oligoribonucléotidiques coremin et nimeroc, par la méthode de "cross-linking"	243
Figure III.21	Effet des mutations de NoLS de la protéine p14 sur son interaction avec la séquence coremin <i>in vivo</i>	245
Figure III.22	Comparaison des effets des protéines p14 mutées sur l'infection locale de feuilles de <i>C. quinoa</i>	247
Figure III.23	Analyse par northern blot de l'accumulation des ARN viraux portant ou non des mutations dans la séquence de la protéine p14 et un test de l'encapsidation des ARN	249
Figure III.24	Effet de la séquence coremin ou nimeroc sur la modulation des symptômes induits par des ARN viraux portant les mutants de p14	251
Figure III.25	Effet de la séquence coremin sur l'accumulation et l'encapsidation des ARN viraux en présence de l'ARN2 muté	252
Figure III.26	Analyse par western blot de la présence de la protéine CP lors d'une infection par des ARN viraux sauvage ou muté	253
Figure III.27	Effet de la séquence coremin ou nimeroc sur les symptômes induits par des ARN viraux en présence de l'ARN2 Δ p14	255
Figure III.28	Rôle de la protéine p14 dans l'infection systémique de <i>B. macrocarpa</i>	257
Figure III.29	Effet des mutations de la protéine p14 et de la séquence coremin sur l'infection systémique	259
Figure III.30	Analyse de l'accumulation des ARN viraux extraits des feuilles systémiques <i>N. benthamiana</i>	260
Figure CG.1	Exemples d'interaction entre le système ubiquitine-protéasome et les phytovirus	270
Figure MM.1	Représentation schématique du protocole d'amplification utilisé pour réaliser la mutagenèse par PCR	296
Figure MM.2	Schéma représentant le principe de technique de double hybride de levure	309
Figure MM.3	Représentation schématique du principe de système double hybride de levure en présence d'une protéine adaptatrice exprimée par un vecteur bridge	311
Figure MM.4	Représentation schématique du principe de la méthode de triple hybride de levure utilisé pour rechercher l'interaction entre protéine et un acide ribonucléotidique	315

Table des figures et des tableaux

II. Tableaux

Tableau 1	Résumé du nombre et des types de protéines phosphatases	65
Tableau 2	Vue d'ensemble des protéines F-box de plantes et de leurs fonctions biologiques	94
Tableau 3	Vue d'ensemble de modifications co- et post traductionnelles citées dans ce mémoire de thèse et leurs fonctions biologiques connues	99
Tableau I.1	Les modifications en masse peptidique produites après des modifications des protéines	111
Tableau I.2	Récapitulatif des localisations subcellulaires de protéines p25 sauvage et mutées	130
Tableau I.3	Résumé de l'effet des mutations de phosphorylation de la protéine p25 sur l'activation de transcription en système simple hybride et sur la capacité de dimérisation en système double hybride dans la levure.....	140
Tableau I.4	Résumé de l'ensemble des résultats de l'incidence des mutations introduites au niveau des sites potentiels de phosphorylation de la protéine p25 sur ses caractéristiques connues	147
Tableau II.1	Liste des partenaires potentiels de la protéine p25 identifiés par criblage double hybride.....	156
Tableau II.2	Test de double hybride de levure en présence d'une protéine adaptatrice, un composant du SCF.....	186
Tableau II.3	Résultats des tests double hybride en présence de protéine bridge.....	188
Tableau II.4	Partenaires viraux et cellulaires de la protéine p25 co-immunoprécipités et identifiés par analyse MS-MS	197
Tableau III.1	Synthèse des remplacements d'acides aminés basiques par alanine effectués sur la séquence NoLS de la protéine p14	219
Tableau MM.1	Génotype des souches de bactéries d' <i>E. coli</i> utilisées	279
Tableau MM.2	Génotype des souches de levures utilisées lors des tests de simple, double et triple hybride.....	281
Tableau MM.3	Protocole de transcription <i>in vitro</i>	290
Tableau MM.4	Composition du milieu réactionnel nécessaire à la ligation.....	297
Tableau MM.5	Protocole de transformation de levures.....	308

Introduction générale

❖ LA RHIZOMANIE

Les plantes, par leur capacité à fixer le dioxyde de carbone *via* la photosynthèse, sont à la base de l'alimentation humaine. Cependant, il existe des organismes pathogènes des plantes (champignons, nématodes, bactéries et virus) qui causent des dommages phytosanitaires considérables, affectant la vie de millions de personnes.

Les virus sont des parasites obligatoires. Ils utilisent la machinerie cellulaire de leur hôte pour se multiplier. Ces agents infectieux possèdent une information génétique portée soit par de l'ADN, soit par de l'ARN, simple brin (de polarité positive ou négative) ou double brin. Plus de 900 virus de plantes sont connus et sont regroupés dans une quarantaine de familles. Une vaste majorité des phytovirus renferme un génome constitué d'ARN simple brin de polarité positive. Parmi ceux-ci, on retrouve le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave ou *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) qui est l'agent responsable de la rhizomanie de la betterave sucrière. Le BNYVV avait été considéré initialement comme membre possible du genre *Tobamovirus* en raison de la forme hélicoïdale des particules virales [pour revue voir (Koenig, 2008)]. L'existence de plusieurs ARN génomiques et sa transmission par champignon ont ensuite placé le BNYVV parmi les *Furovirus*. Ces *Furovirus* ont ensuite été reclassés dans les genres *Furovirus*, *Pomovirus*, *Pecluvirus* et *Benyvirus* (Torrance and Mayo, 1997; Shirako *et al.*, 2000; Fauquet *et al.*, 2005). Le genre *Benyvirus* renferme des virus à génome segmenté : le BNYVV, le membre type du genre, le *Beet soil borne mosaic virus* ou BSBMV (Fauquet *et al.*, 2005) et le *Rice stripe necrosis virus*, RSNV, qui est classé comme une espèce provisoire dans ce genre suite aux études moléculaires effectuées par Lozano and Morales (Lozano and Morales, 2009). En effet, ces études phylogénétiques révèlent l'existence de fortes conservations de séquences entre les réplicases virales et protéines de mouvement de BNYVV, BSBMV et RSNV. L'organisation des ARN génomiques les plus grands est identique pour ces trois espèces. Cependant, si le BNYVV renferme quatre à cinq ARN [voir Figure 2 de la revue (Hleibieh *et al.*, 2007), annexée à cette introduction], le BSBMV possède quatre ARN génomiques et le RSNV n'en possède que deux.

L'une des particularités unique du BNYVV est de pouvoir se comporter comme un virus bipartite où seuls les ARN1 et 2 sont suffisants pour développer une infection sur feuilles inoculées mécaniquement et comme un virus tétra- ou pentapartite lors de l'infection naturelle de la betterave. Ceci permet d'utiliser les petits ARN génomiques comme outils

Introduction générale

moléculaires (Gilmer *et al.*, 1993), comme des vecteurs d'expression (Schmidlin *et al.*, 2005) ou de complémentation fonctionnelle (Lauber *et al.*, 1998b). Les principales caractéristiques de la rhizomanie de la betterave sucrière et du BNYVV ont été synthétisées dans la revue ci-dessous et celle de 2008 annexée dans cette thèse (Peltier *et al.*, 2008). Depuis 2008, de nouvelles données sont disponibles et seront présentées à la suite de la revue « Etiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière », *Virologie*, 2007, 11 (6), 209-421 (page suivante).

I. Article de revue «Etiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière »

K. Hleibieh, C. Peltier, E. Klein, A. Schirmer, L. Schmidlin, L. Covelli, C. Ratti, A. Legrève, C. Bragard, D. Gilmer

Virologie, 2007, **11** (6), 209-421.

Étiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière

K. Hleibieh¹C. Peltier¹E. Klein¹A. Schirmer¹L. Schmidlin^{1,2}L. Covelli¹C. Ratti³A. Legrève⁴C. Bragard⁴D. Gilmer¹

¹ Institut de biologie moléculaire des plantes,
Laboratoire propre du CNRS (UPR 2357)
conventionné avec l'Université Louis-
Pasteur (Strasbourg 1),
12, rue du Général-Zimmer,
67084 Strasbourg
<david.gilmer@ibmp-ulp.u-strasbg.fr>

² INRA, 28, rue de Herrlisheim,
680021 Colmar

³ Università di Bologna,
Dipartimento di Scienze e Tecnologia
Agroambientali, area Patologia Vegetale,
Viale G. Fanin, 40 - Il piano,
40127 Bologna, Italie

⁴ Unité de phytopathologie, UCL,
Croix du Sud 2 bte 3,
1348 Louvain-la-Neuve, Belgique

Résumé. Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave est l'agent responsable de la rhizomanie de la betterave sucrière. La prolifération anarchique du chevelu racinaire est caractéristique de l'infection qui entraîne de lourdes pertes de rendement en sucre. L'utilisation de plantes tolérantes à la maladie maintient des rendements en sucre élevés mais conduit à la persistance de la charge virale dans le vecteur tellurique, *Polymyxa betae*, permettant ainsi l'apparition d'isolats contournant les résistances utilisées. La pathogenèse virale est entre autres liée à l'expression de la protéine non structurale p25, exprimée par l'un des ARN génomiques « accessoires » du virus. Le contournement des résistances utilisées au champ semble lié à des variations de séquence de la protéine p25. Dans cette revue, la biologie moléculaire du BNYVV, de son vecteur et les moyens de lutte contre la rhizomanie seront abordés.

Mots clés : benyvirus, rhizomanie, *Polymyxa betae*, pathogénicité virale

Abstract. Beet necrotic yellow vein virus is responsible for sugar beet rhizomania. Root proliferation is characteristic of the viral infection and lead to sugar losses. Pathogenicity is particularly linked to the expression of RNA-3-encoded p25. The extensive use of viral tolerant crops allows maintenance of sugar yields but also permits viruliferous vector to be maintained and therefore the appearance of resistance breaking isolates. The resistance breaking isolates present some amino acid variations within the p25 protein sequence, a key determinant in BNYVV pathogenicity. Here, we will review the molecular biology of BNYVV, of its vector and the antiviral strategies that may be used against rhizomania.

Key words: benyvirus, rhizomania, *Polymyxa betae*, viral pathogenicity

La rhizomanie est l'une des maladies les plus dommageables de la betterave sucrière. Elle provoque une baisse de la teneur en sucre de l'ordre de 10 à 20 %, mais surtout de lourdes pertes de rendement lors de la purification du saccharose, pertes pouvant atteindre 50 %, voire 70 % dans les cas de pathologies sévères [1]. La maladie, qui a été décrite pour la première fois en Italie [2], est maintenant présente dans toutes les régions de culture betteravière, c'est-à-dire dans le monde entier. En 1973, Tamada et Baba [3] ont démontré que cette pathologie était provoquée par un phytovirus, le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (*Beet necrotic yellow vein virus* [BNYVV]), actuellement classé dans le genre *Benyvirus*. Ce virus est

transmis par le protozoaire du sol *Polymyxa betae* Keskin, un vecteur longtemps considéré comme un champignon tellurique. Parasite obligatoire des radicules, *P. betae* virulifère est capable de sporuler et de résister ainsi pendant de nombreuses années dans les sols infestés [4]. L'extrême résistance des spores explique la persistance de la rhizomanie dans les sols. La sélection variétale de betteraves tolérantes permet de maintenir des rendements en sucre acceptables. Cependant, l'utilisation de telles variétés assure le maintien du vecteur virulifère dans les sols infestés et applique une forte pression de sélection lors de l'infection virale, conduisant à l'émergence d'isolats contournant la ou les résistances utilisées. Les isolats émergents présentent des variations de séquence dans l'ARN3, en particulier au niveau de la phase codante pour la protéine p25, un facteur de pathogénicité du BNYVV directement responsable de la

Tirés à part : D. Gilmer

prolifération racinaire [5]. Les études moléculaires actuellement menées sur la rhizomanie visent à comprendre les mécanismes moléculaires de la mise en place d'une telle prolifération racinaire en étudiant en détail la protéine p25. De telles études devraient permettre, à terme, la mise en œuvre de moyens de lutte efficaces.

La rhizomanie

Symptômes

La rhizomanie (*rhizo* : racine ; *mania* : démente) réfère à des symptômes principalement racinaires. Les betteraves infectées présentent un nanisme général plus ou moins prononcé, qui se traduit par une réduction significative de la taille du pivot qui se nécrose fortement (*figure 1A*). L'infection à la base du pivot induit une prolifération anarchique des racines latérales (*figure 1A*) qui deviennent friables, nécrosées, et de couleur caractéristique poivre et sel. Cette différenciation racinaire anormale conduit à un étranglement du pivot, qui donne à la betterave une forme de verre à pied. Les dommages causés aux racines provoquent un déficit hydrique des parties aériennes de la plante, ce qui conduit à un flétrissement important des feuilles aux heures chaudes de la journée (*figure 1B*). Parfois, des symptômes foliaires apparaissent et sont caractérisés par un jaunissement, puis l'apparition de nécroses le long des nervures des feuilles (*figure 1C*). Ce sont ces symptômes foliaires qui sont à l'origine de l'appellation du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave.

Caractéristiques histologiques et biochimiques des betteraves rhizomaniées

Des coupes histologiques effectuées sur des pivots de plantes infectées laissent penser que la nécrose des racines latérales au niveau de leur point d'origine induit la « reprogrammation » des cellules du péricycle en cellules méristématiques, donnant naissance à de nouvelles racines [6]. Le virus pourrait être responsable d'une modulation de l'expression d'un certain nombre de gènes cellulaires conduisant à cette reprogrammation. Ainsi, la prolifération racinaire anormale devient favorable d'une part à l'amplification du virus, et d'autre part à sa transmission par *P. betae*. En effet, c'est au niveau de ces radicelles que le vecteur parasite la plante, qu'il peut acquérir et relarguer le virus.

L'auxine joue un rôle prépondérant dans le développement des plantes, et particulièrement dans la formation et la croissance racinaire. Les dosages effectués sur des betteraves sensibles et tolérantes, saines et infectées ont révélé des taux trois fois plus élevés d'auxine dans les plantes infectées que dans les plantes saines [7]. De plus, les plantes tolérantes contiennent moins d'auxine que les plantes sen-

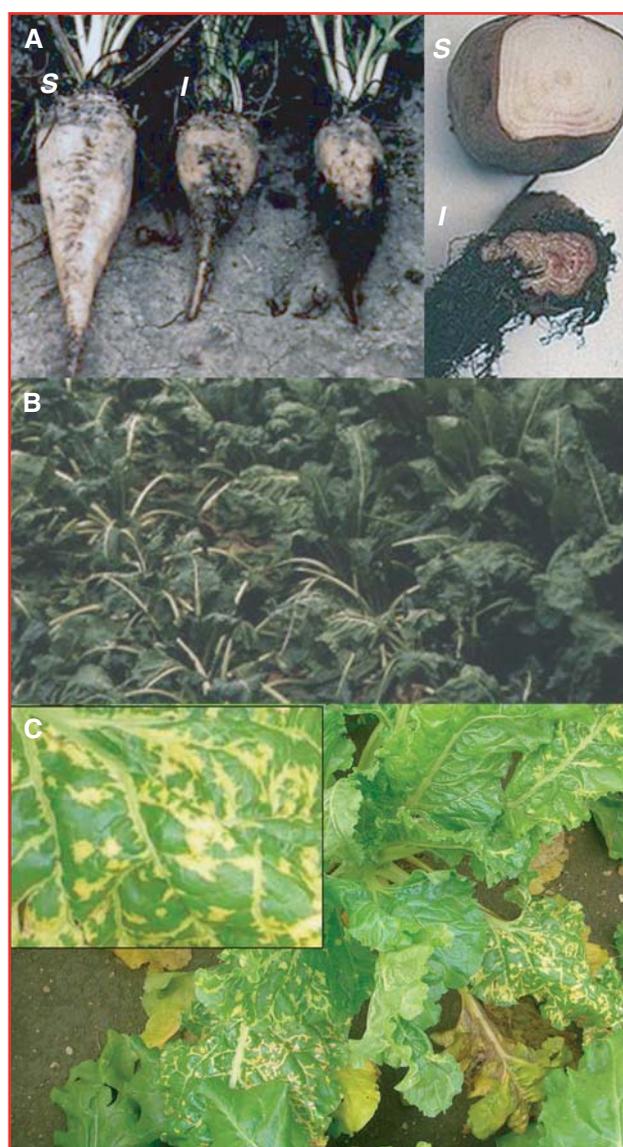


Figure 1. Caractéristiques symptomatologiques de la rhizomanie de la betterave sucrière : **A**) Symptômes racinaires caractéristiques de la rhizomanie : les pivots de plantes infectées (I) sont plus courts, en forme de verre à pied ; ils possèdent un chevelu racinaire anormalement développé comparé au pivot de plante saine (S). Les pivots de plantes infectées sont nécrosés. **B**) Aux heures chaudes de la journée, le déficit hydrique provoqué par la maladie provoque le flétrissement des plantes. **C**) Les symptômes foliaires sont assez rares et correspondent à l'infection généralisée de la plante. Le jaunissement des nervures et l'apparition de lésions chlorotiques jaunes sont le résultat de l'expression de la protéine p25 codée par l'ARN3. Photos A et B : Inra Colmar ; photo C : Institut technique de la betterave, Paris.

sibles. Il reste à déterminer si ces variations hormonales sont la cause ou la conséquence du désordre cellulaire induit par la virose.

Résistances génétiques utilisées pour lutter contre la rhizomanie

L'un des enjeux majeurs des professionnels est de maintenir les rendements de production en sucre suffisamment élevés. Pour cela, la culture de variétés qui ne développent pas ou peu de symptômes de rhizomanie remplace celle de variétés sensibles. Les premières lignées présentant des résistances partielles à la rhizomanie sont issues de l'hybride diploïde Rizor [1]. Depuis, plusieurs sources de résistance provenant de betteraves sauvages ont été découvertes (*Rz1* à *Rz4*) (tableau 1). La première source de résistance décrite en 1983 et appelée Holly [8] possède un gène de résistance dominant appelé *Rz* puis renommé *Rz1* [9]. Cette variété Holly, qui présente l'avantage de ne pas développer les symptômes de rhizomanie et qui renferme des concentrations élevées en virus [10], est actuellement très utilisée pour développer de nouvelles lignées tolérantes et plus performantes au champ.

D'autres sources de résistance ont été décrites, comme WB42 et WB41 issues de *Beta vulgaris ssp. maritima* (L.) Arcang [8]. Les gènes majeurs de résistance présents chez WB42 et WB41 ont été nommés respectivement *Rz2* et *Rz3*. Des tests de résistance au BNYVV effectués en serre et en conditions sévères d'infection ont révélé que le gène *Rz2* confère une meilleure résistance que le gène *Rz1* et que leurs origines seraient génétiquement distinctes [9]. Ces gènes sont présents sur le chromosome III à une distance comprise entre 20 [9] et 35 cM [11]. Le gène *Rz3* a également été localisé sur le chromosome III à environ 5 centimorgans (cM) de *Rz1* [12]. Dans cette étude, Gidner *et al.* (2005) [12] émettent l'hypothèse que *Rz2* et *Rz3* sont identiques. Récemment, l'utilisation de la lignée hybride R36 résistante au BNYVV a permis de trouver un QTL (*quantitative trait locus*) baptisé *Rz4* conférant une résistance partielle au BNYVV [13]. Cette étude a permis également

de développer des marqueurs liés au phénotype permettant d'identifier plus rapidement de nouvelles sources de résistance à la rhizomanie.

L'utilisation de variétés possédant les gènes *Rz1* ou *Rz2* permet la réduction du titre en virus jusqu'à 6.10^4 fois, par comparaison au titre viral présent dans des variétés sensibles. Toutefois, leur utilisation systématique dans des sols infestés favorise une dérive génétique du virus plus rapide que celle qui est observée sur des variétés sensibles [14]. Cette dérive permettrait ainsi l'apparition de nouveaux variants pathogènes (*resistance breaking isolates* ou RB) [10].

Une alternative consisterait à utiliser des betteraves transgéniques dont certaines ont été caractérisées (tableau 1). Ces plantes expriment la protéine de capsid du BNYVV [10], ou la protéine de mouvement TGB-p3 mutée [15], ou encore une structure tige-boucle issue de l'ARN1 [16]. Elles présentent des niveaux de protection supérieurs à ceux conférés par les gènes *Rz*. L'utilisation combinée de la transgénèse et des résistances naturelles permettra peut-être d'accéder à des résistances difficilement contournables tout en gardant des rendements en sucre élevés.

Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave

Classification

Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave ou BNYVV (aféodé aux alphavirus-like) est un virus multipartite à ARN simple brin de polarité positive classé dans le genre *Benyvirus* qui comporte également le *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV), tous deux transmis par *P. betae*. Ces deux virus possèdent une gamme d'hôtes similaire, leurs particules sont en nombre et en morpholo-

Tableau 1. Plantes utilisées ou utilisables au champ pour lutter contre la rhizomanie. Origines et caractéristiques des gènes de résistance *Rz* isolés de betteraves sauvages et des séquences dérivées du pathogène (transgène). Les gènes *Rz* sont localisés sur le chromosome III. RDP : résistance dérivée du pathogène ; PTGS : *post transcriptional gene silencing*

Variété hybride	Origine	Gène de résistance Transgène	Nature	Niveau de résistance
Holly	<i>B. vulgaris ssp. vulgaris</i> (Californie)	<i>Rz1</i>	Dominant	Bonne à faible selon l'inoculum
WB42	<i>B. vulgaris ssp. maritima</i> (Danemark)	<i>Rz2</i>	Dominant	Rz2 > Rz1
WB41	<i>B. vulgaris ssp. maritima</i> (Danemark)	<i>Rz3</i>	Partiellement dominant Allélique à <i>Rz2</i> ?	Variable
R36	<i>B. vulgaris ssp. maritima</i>	<i>Rz4</i>	Allélique à <i>Rz 1, 2</i> ou <i>3</i> ?	Résistance partielle
4D6834	<i>B. vulgaris</i>	Protéine de mouvement	RDP Dominant négatif PTGS ?	Excellente
G018	<i>B. vulgaris</i> (sensible)	Réplicase	RDP PTGS	Excellente
-	<i>B. vulgaris</i> (sensible)	CP	RDP	Bonne

gie identiques, et leurs ARN sont tous polyadénylés à leur extrémité 3' [17]. Les deux virus présentent la même organisation génétique [18], mais le BSBMV n'a été trouvé que sur le continent Nord-Américain. Ces deux virus sont pourtant bien distincts, même s'ils présentent des identités de séquences parfois fortes. En conditions d'infections mixtes, le BNYVV s'accumule préférentiellement au détriment du BSBMV [17]. Les gènes de résistance utilisés pour lutter contre la rhizomanie sont sans effet sur une infection par le BSBMV [19].

Gamme d'hôte

Le BNYVV infecte les plantes de la famille des chénopodiacées. Sur *Beta vulgaris* (betterave sucrière), l'infection est systémique, tout comme sur *Beta macrocarpa* (betterave sauvage), ou sur *Spinacea oleracea* (épinard). Au laboratoire, le virus est également étudié sur d'autres plantes, comme *Chenopodium quinoa*, ou encore *Tetragonia expansa*, qui répondent à l'infection virale par la formation de lésions locales chlorotiques ou nécrotiques selon le contenu de l'inoculum. L'utilisation de *Nicotiana benthamiana* est également possible. Sur cette plante, l'infection par le BNYVV est systémique.

Structure

Les particules purifiées de BNYVV apparaissent sous forme de bâtonnets (*figure 2*). Ces nucléocapsides possèdent une symétrie hélicoïdale de diamètre constant de 20 nm et de longueur variable de 390, 265, 105, 89 et 80 nm selon le type d'ARN encapsidé [20, 21]. Les hélices, qui ont un pas à droite de 2,6 nm, sont formées de 49 sous-unités de protéines de capsidite par répétition axiale de 4 tours, chaque sous-unité protéique interagissant avec 4 bases de l'ARN [22]. La protéine mineure de capsidite obtenue par translecture du codon ambre du gène CP, est retrouvée à l'une des extrémités des particules virales et participe à la morpho-

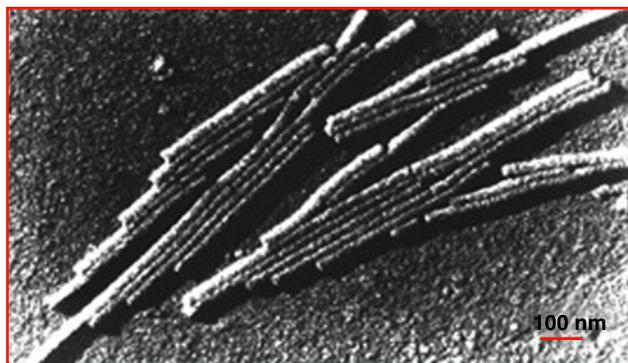


Figure 2. Particules virales de BNYVV purifiées visualisées en microscopie électronique après ombrage. Barre d'échelle : 100 nm. Photo : Inra Colmar.

genèse virale [23, 24], mais également à la transmission du virus par *P. betae* [25].

Organisation génétique

Le BNYVV possède un génome segmenté composé, selon les isolats, de 4 ou 5 ARN de polarité positive [26], coiffés en 5' (Cap, m⁷GpppG) et polyadénylés en 3'. La détermination des séquences nucléotidiques des ARN viraux, puis l'obtention des clones ADNc infectieux des cinq ARN viraux [27, 28] ont permis d'étudier la fonction des gènes viraux et d'établir l'organisation génomique représentée sur la *figure 3*.

Les ARN génomiques les plus grands (ARN1 et 2) suffisent pour produire une infection locale après inoculation mécanique de feuilles. Ces ARN expriment les protéines essentielles pour la réplication (ARN1), l'encapsidation, le mouvement de cellule à cellule et la suppression du *RNA silencing* (ARN2). De ce fait, dans les feuilles, les petits ARN sont accessoires, ils peuvent subir des troncutures ou disparaître [29]. Au champ, l'expression de ces petits ARN est cependant essentielle. L'ARN3 permet la multiplication virale dans les pivots des plantes infectées et son expression influence les symptômes [21, 30]. L'expression de l'ARN4 favorise la transmission du virus par le vecteur [31]. Ainsi, le BNYVV présente la caractéristique unique de pouvoir se comporter comme un virus bipartite sur feuilles inoculées mécaniquement et comme un virus tétra- ou pentapartite lors de l'infection naturelle. Une telle propriété a été mise à profit pour produire des vecteurs d'expression dérivés des ARN3 et 5 [32]. Ces vecteurs d'expression sont usuellement appelés réplicons.

Fonctions des ARN et des protéines virales

L'ARN1, long de 6 746 nucléotides, comporte une seule ORF (*open reading frame* ou cadre ouvert de lecture). Il dirige la synthèse d'une polyprotéine de 237 kDa [33]. Cette protéine renferme les séquences consensus caractéristiques des domaines fonctionnels MTR (méthyltransférase), HEL (hélicase), PRO (protéase de type papaine) et POL (polymérase). Après clivage autocatalytique entre les domaines PRO et POL, deux polypeptides sont libérés. Le premier de 150 kDa renferme les domaines MTR, HEL et PRO. Le second, de 66 kDa, possède le domaine POL [34]. Si l'ensemble de ces fonctions est essentiel à la réplication virale, la stoechiométrie de ces protéines virales au sein du complexe de réplication n'est pas connue (*figure 3*).

L'ARN2 (4 612 nts) est multicistronique et code pour six protéines.

L'ORF I code pour la protéine majeure de capsidite de 21 kDa appelée CP, séparée de la seconde ORF par un codon stop (ambre). Cette seconde ORF est présente dans la même phase de lecture. Ainsi, environ 10 % des évé-

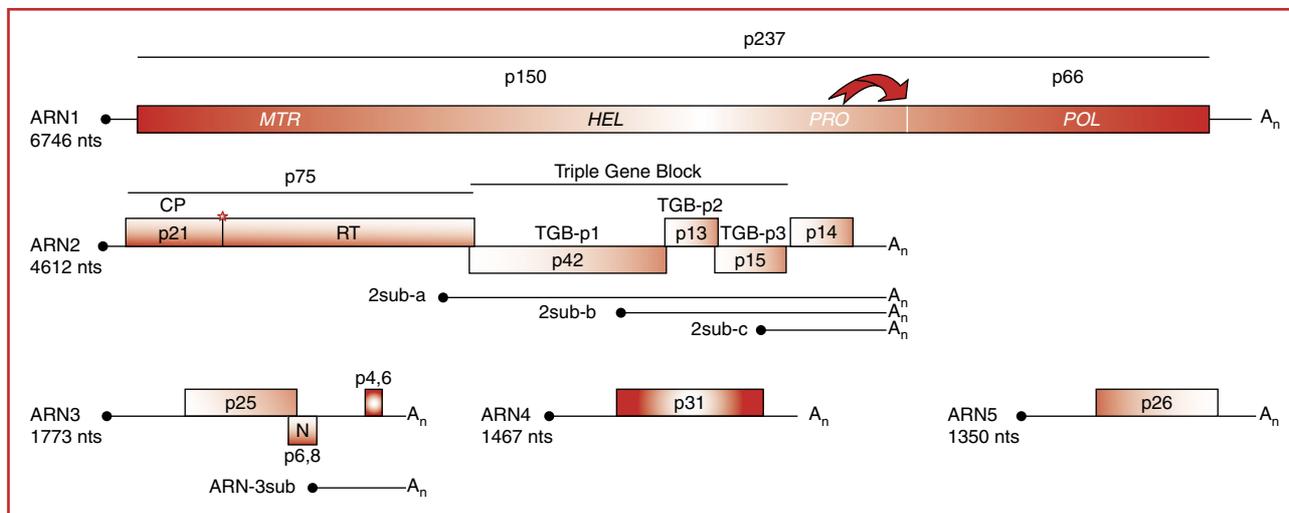


Figure 3. Représentation schématique de l'organisation génomique du BNYVV. La taille des différents ARN est précisée sous leur nom. La sphère noire représente la coiffe et A_n correspond à la séquence polyadénylée. Les rectangles représentent les cadres ouverts de lecture. La flèche représente l'événement de clivage en *cis* de la polyprotéine p237 libérant les protéines p150 et p66. L'étoile correspond à la suppression du codon ambré de la protéine CP conduisant au mécanisme de translecture et à la synthèse de la protéine mineure de capsid p75. MTR : domaine méthyltransférase ; HEL : hélicase ; PRO : protéase ; POL : polymérase.

ments de traduction de la protéine CP subissent un mécanisme de suppression du codon stop, qui conduit à la synthèse d'une protéine de fusion de 75 kDa appelée CP-RT (*coat protein readthrough*) ou plus simplement p75 [35]. Cette protéine CP-RT constitue la protéine mineure de capsid retrouvée au niveau des particules virales [24]. Elle intervient dans la transmission du virus par *P. betae* grâce à un motif KTER situé dans le domaine de translecture [25]. Récemment, l'analyse de la localisation subcellulaire des particules virales, puis de constructions fusionnelles entre la protéine mineure de capsid et la protéine autofluorescente GFP [36] a révélé la présence transitoire des particules virales à la périphérie de la membrane externe des mitochondries. Ces études permettent de supposer que l'assemblage des virions pourrait avoir lieu autour des mitochondries en faisant intervenir la protéine mineure de capsid. Les gènes III, IV et V sont partiellement chevauchants. Les trois ORF constituent le TGB (*triple gene block*) également retrouvé chez les *Pomo-*, *Peclu-*, *Potex-*, *Carla-* et les *Hordeivirus* [37]. Ces trois ORF codent respectivement pour les protéines TGB-p1 de 42kDa (p42), TGB-p2 de 13 kDa (p13) et TGB-p3 de 15 kDa (p15). Ces trois protéines sont nécessaires au mouvement des ARN viraux de cellule à cellule [38]. La protéine TGB-p1 est exprimée à partir de l'ARN subgénomique 2sub-a, et les protéines TGB-p2 et TGB-p3 à partir de l'ARN subgénomique 2sub-b [38]. L'utilisation de vecteurs viraux exprimant la protéine TGB-p1 fusionnée à la GFP a permis de localiser la protéine GFP:TGB-p1 au niveau des plasmodesmes uniquement si les protéines TGB-p2 et -p3 étaient

présentes [39]. Récemment, l'immunolocalisation par microscopie électronique de protéines étiquetées a démontré la localisation aux plasmodesmes des trois protéines de mouvement. Cet adressage particulier nécessite l'expression des trois protéines puisque aucune protéine exprimée individuellement n'y est adressée [40]. L'ORF VI code pour une protéine de 14 kDa, appelée p14, exprimée à partir de l'ARN subgénomique 2sub-c. La protéine p14 intervient dans la régulation de la réplication virale [38] par la stimulation de l'accumulation de la protéine de capsid [41] et la suppression du *RNA silencing* [42].

L'ARN3 (1 773 nts) est impliqué dans l'apparition des symptômes foliaires observés sur plantes hôtes [21, 30]. Il est nécessaire au mouvement à longue distance du virus [43] et est essentiel à l'apparition des symptômes de rhizomanie sur *B. vulgaris* [21, 44]. L'ARN3 code potentiellement pour trois protéines. La première ORF code pour une protéine de 25 kDa, appelée p25, responsable de la sévérité des symptômes foliaires [30] et racinaires [5].

p25

Cette protéine de 220 acides aminés ne possède aucune homologie de séquence avec des protéines connues, mis à part la séquence Fx₃FRGPGNx₂L retrouvée sur la protéine p26 codée par l'ARN5 du BNYVV (*figure 4*). La protéine p25 a été localisée dans le noyau et le cytoplasme de cellules infectées [45]. Son adressage nucléaire a pu être élucidé grâce à la caractérisation d'une séquence d'import nucléaire (NLS) classique (5₇KRIRFR₆₂), localisée dans le domaine N-terminal basique de la protéine [46]. Une

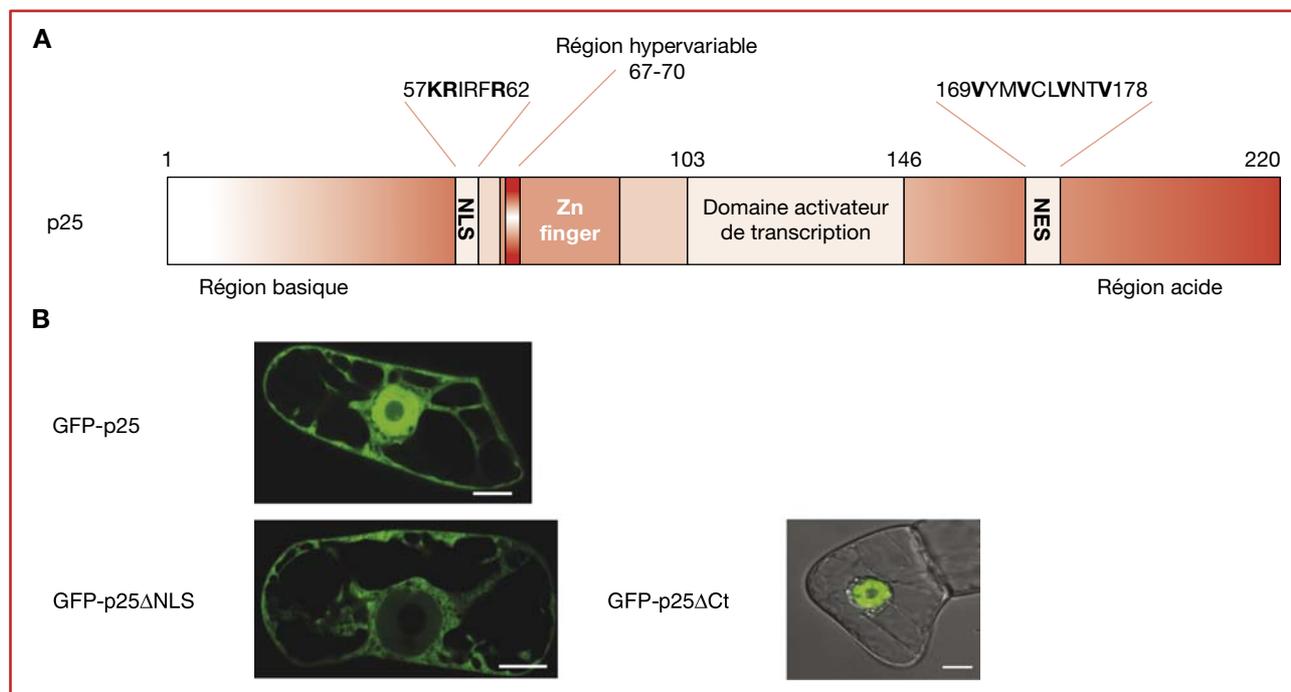


Figure 4. Caractéristiques de la protéine p25 codée par l'ARN3 de BNYVV : **A)** Représentation schématique de la protéine p25 et de ses domaines fonctionnels connus. La protéine est constituée d'un domaine N-terminal basique renfermant une séquence NLS, (séquence de localisation nucléaire), la région hypervariable (tetrad) et un domaine en doigt à zinc (Zn finger) ; le domaine C-terminal acide renferme le domaine d'activation de la transcription et la séquence d'export nucléaire (NES). **B)** Expression transitoire et localisations subcellulaires de protéines p25 sauvage ou tronquées en cellules de tabac BY-2. La protéine p25 fusionnée à la protéine autofluorescente GFP (GFP-p25) se localise dans le noyau et le cytoplasme des cellules transfectées. La délétion de la séquence NLS (GFP-p25ΔNLS) empêche l'accumulation nucléaire de la protéine de fusion alors que la délétion du domaine C-terminal contenant la séquence d'export permet l'accumulation de la protéine de fusion dans le nucléoplasme des cellules (GFP-p25ΔCt). Barre : 10 μm.

séquence d'export nucléaire (NES) non conventionnelle (₁₆₉VYMVCLVNTV₁₇₈) a pu être également identifiée dans le domaine C-terminal de la protéine. Ces deux séquences permettraient à la protéine p25 d'effectuer une navette nucléo-cytoplasmique dépendante de l'importine alpha et de l'exportine 1 [46]. Ce transport nucléo-cytoplasmique est indépendant de l'expression d'autres protéines virales [46]. Enfin, les symptômes foliaires observés sur *C. quinoa* ont pu être partiellement corrélés avec la localisation subcellulaire de p25, suggérant que l'activité de la protéine pourrait être régulée par sa localisation subcellulaire [46]. Si la fonction exacte de la protéine p25 n'est pas encore connue, elle possède néanmoins de nombreuses caractéristiques communes aux facteurs de transcription (localisation nucléaire, domaine en doigt à zinc, domaine acide). Dans la levure, son expression fusionnelle au domaine de fixation à l'ADN de Gal4 ou à la protéine LexA entraîne une auto-activation de la transcription de gènes rapporteurs [47]. Le domaine de la protéine p25 qui est responsable de cette activation de la transcription a pu être localisé entre les résidus 103 et 146 de la protéine [47]. La protéine p25 est capable de multimériser. L'interaction entre protéines p25 requiert l'intégrité de la protéine et a pu

être corrélée à l'apparition de lésions chlorotiques jaunes sur plante hôte [47]. L'immunodétection de la protéine p25 sous forme d'un doublet [35] suggère la présence de modifications post-traductionnelles [47].

L'expression ectopique de la protéine p25 dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a été réalisée. La transgénèse de plantes par une protéine virale constitue un outil performant pour identifier, entre autres par microarray, les gènes dérégulés lors de l'expression de la protéine et corréler les données obtenues à celles qui sont décrites pour d'autres modèles viraux [48]. Plusieurs lignées homozygotes exprimant la protéine p25 ont été obtenues (plantes p25⁺). Dans ces plantes, la protéine p25 est retrouvée dans le noyau et le cytoplasme des cellules foliaires et racinaires. Les plantules obtenues se distinguent des plantes sauvages par un système racinaire plus développé. Plusieurs résultats suggèrent que l'auxine interviendrait en partie dans ce phénotype racinaire : 1) les plantules sont plus sensibles à l'apport exogène d'un analogue stable de cette hormone ; 2) le gène rapporteur GFP placé sous le contrôle d'un promoteur auxine-dépendant est fortement exprimé dans les plantes transgéniques p25⁺ [49].

Autres protéines potentiellement exprimées par l'ARN3

L'ARN3 de BNYVV possède deux ORF supplémentaires. Une telle organisation est retrouvée sur l'ARN3 du BS-BMV. La seconde ORF (ou gène N) code pour une protéine de 6,8 kDa nommée p6,8. Cette protéine n'est exprimée que par des formes tronquées de l'ARN3 [30]. Sur ces ARN plus courts, l'ORF se trouve rapprochée de l'extrémité 5' proximale ou alors fusionnée à l'ORF de p25. Dans de telles situations, des nécroses apparaissent sur *T. expansa* et *C. quinoa*, et sont liées à l'expression de cette protéine [30]. Toutefois, son expression n'a jamais été mise en évidence lors d'infections naturelles, ce qui laisse penser que la séquence du gène N pourrait constituer une ORF cryptique. La troisième ORF code potentiellement pour une protéine de 4,6 kDa (p4,6) qui pourrait être produite par l'ARN sub-génomique (ARN3sub) colinéaire aux 550 derniers nucléotides de l'ARN3 [50]. Sa fonction demeure inconnue.

Un ARN particulier

Si l'ARN3 a servi à la caractérisation des éléments *cis* impliqués dans sa réplication, son encapsidation et la détermination des structures 5' et 3' UTR en solution [51-55], il possède une fonction qui est indépendante de ses propriétés messagères. En effet, chez *B. macrocarpa*, la présence d'ARN3 est nécessaire pour que le virus puisse envahir la plante entière, ou en d'autres termes pour qu'il effectue un mouvement systémique. La séquence de l'ARN3 responsable de ce mouvement systémique a pu être localisée entre les nucléotides 1033 et 1257 [43]. Si le mécanisme d'action moléculaire de cette séquence d'ARN sur le mouvement du virus dans la plante n'est pas encore connu, l'interférence par l'ARN pourrait constituer une piste prometteuse.

L'ARN4 (1 467 nts) code pour une protéine de 31 kDa (p31), essentielle pour la transmission du virus par le vecteur *P. betae* [31, 56]. Cette protéine, encore peu caractérisée sur le plan biologique, pourrait constituer un facteur assistant de la transmission. Celui-ci agirait en synergie avec la protéine mineure de capsid p75. L'expression de la protéine p31 influence également les symptômes foliaires sur plantes hôtes et la protéine p31 vient d'être décrite comme un suppresseur de RNA silencing spécifique des tissus racinaires [56].

L'ARN5 (1 350 nts) contient une seule ORF qui code pour une protéine de 26 kDa appelée p26. Cet ARN est présent chez certains isolats viraux qui provoquent des symptômes très sévères de rhizomanie et ont une forte incidence sur les rendements en sucre [57]. L'obtention du clone complet d'ADNc infectieux a permis d'étudier l'influence de l'ARN5 sur le pouvoir pathogène du virus [28, 32]. L'expression de la protéine p26 induit l'apparition de symptômes nécrotiques sur feuilles de *C. quinoa*. Cette protéine, comme la protéine p25, se localise dans le noyau et le

cytoplasme des cellules et elle active fortement la transcription en système simple hybride chez la levure [28].

Variabilité moléculaire virale

Les virus, en particulier les virus à ARN, sont sujets à un très fort taux de variation génétique et présentent un fort potentiel pour s'adapter aux modifications environnementales [58]. Ils préservent leur robustesse génétique et conservent leur potentiel infectieux malgré la présence de mutations dans leur génome [59]. Trois, voire quatre, isolats de BNYVV, sérologiquement identiques, dénommés A, B et P ou J ont été identifiés [60, 61]. Ces différents isolats de BNYVV sont retrouvés dans des régions géographiques bien spécifiques. L'isolat A est retrouvé dans l'ensemble des pays européens, en Iran, aux Etats-Unis, en Chine et au Japon, et l'isolat B est détecté plus particulièrement en France et en Allemagne, mais aussi en Suisse, en Suède, en Chine et au Japon [62-65]. Les isolats viraux qui possèdent un cinquième ARN ont été initialement identifiés au Japon [21, 66], puis en France [67], en Chine [68], au Kazakhstan [69] et en Angleterre [70].

La distinction des isolats de type A ou B est possible grâce aux changements des amino-acides en position 62, 103 et 172 (tableau 2). L'étude de la variabilité de séquence de la protéine p25 permet aussi de préciser la phylogénie des isolats viraux [71]. La caractérisation de séquences de protéines p25 d'isolats mondiaux a révélé l'existence d'une très forte variabilité de séquence des codons 67 à 70 (tableau 2) [71]. Cette région hypervariable a été nommée tetrad. Récemment, de nouvelles séquences tetrad ont été décrites [72] [A. Schirmer, non publié]. L'analyse des contraintes de sélection de p25 a révélé que la séquence tetrad et l'acide-amino 198 subissaient une forte sélection positive [71] comparable à celle décrite pour des virus animaux contournant le système immunitaire [73]. Une telle sélection positive pourrait s'expliquer par l'adaptation du BNYVV aux gènes de résistance utilisés aux champs [71]. La présence ou pas de l'ARN5 est également intéressante d'un point de vue évolution et adaptation. Les ARN5 d'isolats européens (isolats de type P) possèdent une courte délétion dans leur séquence 5'UTR et leur région codante est quatre codons plus longue que les ARN5 asiatiques (isolats de type J). De plus, huit résidus variables permettent de discriminer les protéines p26 de type P et J (tableau 2) [62, 69, 71]. Ces différences de composition et de taille ne semblent pas interférer sur les propriétés biologiques connues de p26 [28] : ces protéines p26P et p26J induisent les mêmes symptômes foliaires, se localisent dans le noyau et le cytoplasme et sont capables d'activer la transcription [28] [D. Gilmer, non publié].

Pathogénicité

Les dégâts provoqués aux racines sont retrouvés de façon quasi identique lors de l'infection par les isolats A, B et P ou

Tableau 2. Caractéristiques des variations de séquence en amino-acides observées au sein des protéines de capsid (CP) et de pathogénicité (p25 et p26) respectivement codées par les ARN2, 3 et 5. Δ : délétion ; * et ** indiquent la présence d'ARN5 de type P ou J respectivement

CP										
Position	62	103	172							
Type B	S	N	F							
Type A	T	S	L							
p25 tetrad										
Position	67	68	69	70						
Type A	A	C	H	G						
Type A	A	F	H	G/R						
Type A	A	H	H	G						
Type A	A	L	H	G	*					
Type A	A	Y	F	G						
Type B	A	Y/H	H	R						
Type A/B	A	Y	H	G	**				C. Bragard, non publié	
Type A	A	Y	P	R					A. Schirmer, non publié	
Type A	A	Y	R	V	**					
Type A	S/T	Y	H	G	*				[72]	
Type A	V	C/L	H	G						
p26										
Position	30	69	77	103	142	146	149	174	200	227-229
Type P	N	L	D	G	R	F	G	S	A	NNN
Type J	H	F	Δ	D	C	H	R	N	S	Δ

J ; les isolats contenant l'ARN5 montrent la plus grande agressivité, en provoquant des symptômes très sévères de rhizomanie. Les premières analyses comparatives qui ont été effectuées ont permis de montrer que les virus à cinq composants (P et J) s'accumulent dans les racines à des taux plus élevés et produisent des dommages plus grands que des isolats à quatre ARN [57]. Cette différence de pouvoir pathogène est retrouvée sur les plantes hôtes à l'aide d'isolats artificiels [28]. Ces isolats à cinq ARN sont entre autres retrouvés dans les pivots de betteraves dites résistantes à la maladie, mais la présence de l'ARN5 n'est pas toujours suffisante pour expliquer l'augmentation de la virulence. En effet, sur le continent américain où l'ARN5 n'a jamais été retrouvé, des isolats de BNYVV contournent les résistances naturelles des betteraves utilisées [74]. L'analyse moléculaire de tels isolats a une fois encore révélé la présence systématique de variations au niveau de la séquence tetrad de la protéine p25 [75, 76] et du résidu 135 [75]. Le remplacement de la séquence tetrad d'un isolat B par des tetrad d'autres variants (tableau 2) a permis de démontrer l'influence de cette région hypervariable sur les symptômes foliaires, la multimérisation et la capacité de la protéine p25 à activer la transcription en système levure [47]. L'utilisation d'un isolat modifié uniquement dans la région hypervariable permettra d'établir si certaines des séquences tetrad sont effectivement responsables du contournement des gènes de résistance *Rz* en conditions naturelles.

Le vecteur *Polymyxa betae*

En plus du BNYVV, trois autres virus sont également associés au syndrome de la rhizomanie, le *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV), le *Beet soil-borne virus* (BSBV) et le *Beet virus Q* (BVQ) [77]. Ces virus sont tous transmis à la betterave par l'intermédiaire du vecteur *Polymyxa betae* Keskin, un parasite obligatoire qui se développe dans les cellules épidermiques et corticales des racines. Son aire de distribution s'étend sur l'ensemble des zones de culture de la betterave [78]. *P. betae* appartient aux *Plasmodiophoridae*, un groupe monophylétique incluant dix genres. Il fut longtemps associé aux champignons inférieurs, mais il est aujourd'hui classé au sein des protistes [79]. Le spectre d'hôte de *P. betae*, longtemps considéré comme restreint, apparaît cependant plus large. Récemment, *P. betae* a été détecté par RT-PCR dans les racines de certaines espèces de *Brassicaceae*, *Papaveraceae*, *Poaceae* et *Urticaceae*. L'infection de ces espèces n'est que faiblement détectée, mais elle pourrait jouer un rôle facilitateur de recombinaison entre virus ou de maintien de la charge virale dans le vecteur.

Cycle de *P. betae*

Les virus transmis par *Polymyxa spp.* sont intériorisés dans leur vecteur [80-83]. Le cycle biologique des viroses dépend donc du cycle de vie du vecteur (figure 5). La haute capacité de survie de *P. betae* explique l'apparition récur-

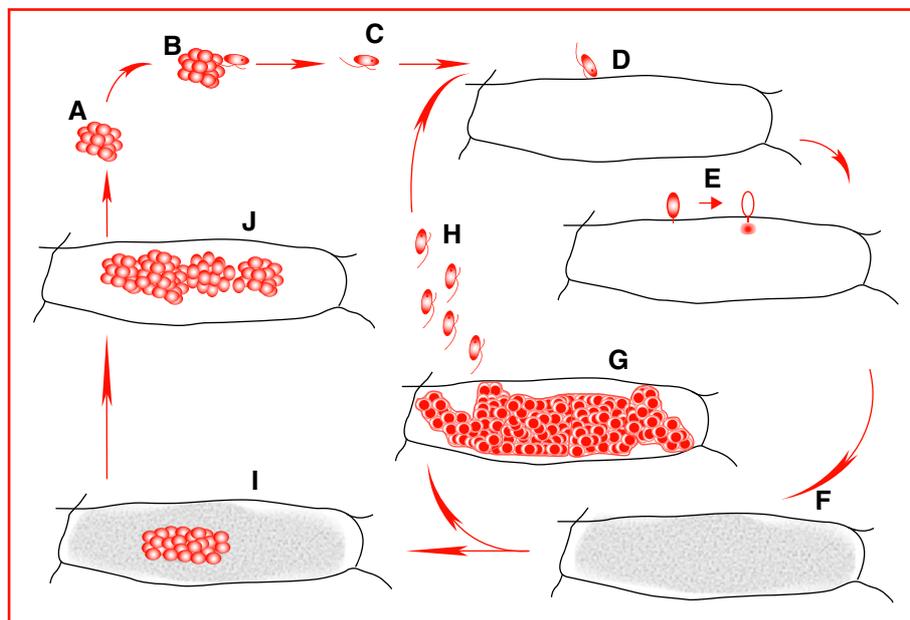


Figure 5. Illustrations du cycle de vie et des différents stades de développement de *Polymyxa betae* ; **A**) sporosoire = amas de spores de survie ; **B**) germination d'une zoospore primaire ; **C**) zoospore nageant vers une cellule **(D)** épidermique ou corticale d'une racine ; **E**) enkystement de la zoospore sur cette cellule et injection du cytoplasme et du noyau de la zoospore à travers la paroi et la membrane *via* le stachel ; **F**) développement d'un plasmode qui au cours de la phase sporangiale évolue en un zoosporange **(G)** libérant des zoospores secondaires **(H)** capables de réinfecter une nouvelle cellule, ou qui, au cours de la phase sporogène, évolue en plasmode sporogène **(I)** conduisant à la formation de sporosores **(J)**. Ces sporosores sont libérés dans le sol lors de la décomposition des tissus racinaires.

rente des viroses et leur dissémination soit avec le sol adhérent aux engins et aux produits agricoles, soit *via* les eaux de drainage et d'irrigation. Les sporosores (amas de spores de 5 à 7 µm de diamètre de paroi très épaisse et résistante) peuvent persister dans le sol pendant de nombreuses années [84, 85]. En présence de plantes hôtes, leur germination libère des zoospores biflagellées de 4-5 µm mobiles capables de s'enkyster sur un poil absorbant ou une cellule épidermique de la racine d'une plante hôte. Trois conditions sont essentielles à l'infection des racines par ce parasite : 1) la présence d'une plante hôte, 2) la présence d'eau libre dans le sol pour préparer la germination des sporosores et pour permettre aux zoospores d'accéder aux racines, et 3) une température suffisamment élevée comprise entre 10 et 30 °C avec un optima situé entre 20 et 25 °C selon l'origine des souches [86, 87]. Ainsi, les printemps chauds et humides sont favorables aux infections précoces, tout comme les sols légers sablonneux et bien drainés car ceux-ci se réchauffent plus rapidement que des sols lourds et organiques à haute capacité de rétention [87]. Le pH et la teneur en calcium du sol influencent aussi l'activité du vecteur. La germination des spores et l'infection des racines par les zoospores sont affectées par des pH acides [88]. Elles sont favorisées dans des sols à pH neutre ou basique, particulièrement lorsque les teneurs en calcium et magnésium sont respectivement supérieures à 350 et

20 mg/100 g de sol [89]. Un raisonnement du chaulage et des pratiques régulant le pH et la teneur en calcium du sol permettraient probablement de mieux gérer la rhizomanie.

Détection du vecteur

L'infection des plantes par *P. betae* n'est associée à aucun symptôme particulier. La détection de ce parasite dans les racines a été effectuée jusqu'au début des années 1990 par l'observation des racines au microscope, après coloration au lactophénol bleu coton. C'est selon cette méthode assez laborieuse que les exigences écologiques du vecteur et les niveaux de potentiel infectieux dans les sols ont été initialement étudiés en utilisant la technique du nombre le plus probable (MPN) en cultivant des plantes pièges sur des dilutions de sols [90]. Des techniques moléculaires (sondes ADN, PCR, nested PCR, Elisa) ont grandement facilité la détection rapide de *P. betae* dans les racines ou même dans le sol [91-93]. L'utilisation de RT-PCR multiplex permet de révéler en un seul test la présence de *P. betae*, de BNYVV, de BSBV et de BVQ à partir d'un extrait d'ARN de racines [77].

Interaction virus-vecteur

Les modes d'acquisition et de transmission des virus par les plasmodiophorides ont été décrits [94]. Ces virus survivent

à l'intérieur des spores sous une forme encore non élucidée. Cependant, l'accumulation d'ARN et des protéines de mouvement de *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) témoigne probablement de la présence de complexes ribonucléoprotéiques [95]. Dans le cas du BNYVV, aussi bien les sporosores que les plasmodes de *P. betae* sont marqués à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine de capsid virale [D. Doucet, UCL, communication personnelle]. Les protéines structurales et non structurales ont été détectées dans les spores et les zoospores de *P. betae*. Ces résultats suggèrent que ce vecteur pourrait également être un hôte du BNYVV [83]. Lors de leur transmission par l'intermédiaire des zoospores virulifères, le virus est présent sous forme de particules. Pendant de nombreuses années, la transmission des virus par les plasmodiophorides a été considérée comme un mécanisme passif qui se produisait lors du mélange des cytoplasmes de la cellule végétale et du protozoaire, avant la formation des membranes [82]. Des travaux récents ont cependant démontré le rôle particulier de certaines protéines virales dans le processus de transmission par le vecteur. Le domaine de translecture de la protéine capsidiale (RT) du BNYVV joue un rôle important dans le processus de transmission puisque des délétions réalisées au sein de la portion C-terminale de ce domaine sont corrélées à la perte de transmission du virus. La substitution des quatre acides aminés KTER localisés en position 553 à 556 du domaine RT par le motif ATAR empêche complètement la transmission [25]. Une analyse comparative des génomes viraux transmis par les plasmodiophorides, qui n'ont pas la même organisation génomique, a permis d'identifier la présence de deux domaines transmembranaires complémentaires dans les domaines RT de la protéine capsidiale des *Beny*-, *Furo*- et *Pomovirus* et dans les protéines P2 des *Bymovirus* [96]. La délétion ou la substitution du second domaine empêche également la transmission par le vecteur. Le modèle moléculaire n'est pas encore détaillé, mais il est possible que les séquences des hélices transmembranaires déterminent une structure particulière facilitant une invagination de la membrane et le mouvement des virus à travers la membrane du vecteur [96]. Si le mécanisme moléculaire de l'interaction est loin d'être totalement élucidé, l'implication de la protéine p31, codée par l'ARN4 est fortement subodorée. En effet, deux études indépendantes de la transmission comparative de virus sauvages ou mutés dans la séquence codant pour la protéine p31 ont montré une forte diminution de la transmission des mutants de la protéine p31 [56] (Anne Legrève, communication personnelle). En plus de son rôle dans la transmission, la protéine p31 agirait également à la fois sur l'induction de symptômes chez *N. benthamiana* et sur la suppression de *RNA silencing* dans les racines, ceci sans affecter l'accumulation des ARN viraux [56].

Conclusion et perspectives

L'ARN3, et en particulier la protéine p25, semblent constituer la clé de voûte de la mise en place de la rhizomanie. L'émergence de variants viraux dans lesquels la protéine p25 est modifiée semble expliquer les contournements des résistances utilisées aux champs. L'identification des processus cellulaires perturbés par l'infection virale, et en particulier par l'expression de la protéine p25, devrait permettre d'isoler des marqueurs moléculaires pouvant servir à la sélection de nouvelles variétés de betteraves résistantes. L'émergence de nouvelles populations virales qui contournent les résistances des variétés actuellement cultivées en champ, pousse les organismes de recherche et les sociétés betteravières à développer des résistances dérivées du pathogène pour lutter contre la rhizomanie.

Dans l'attente de ces nouvelles variétés, des moyens prophylactiques sont mis en œuvre pour limiter l'infection. En effet, la présence de *P. betae* dans tous les types de sols, les transports culturels (betteraves, pommes de terre, navets, etc.) et la dispersion de terre par le matériel agricole, sont autant d'éléments qui favorisent le maintien et la dissémination du virus. La persistance des spores virulifères du vecteur dans le sol ne permet en aucun cas de minimiser l'infection, même en allongeant le cycle de rotation des cultures des betteraves avec d'autres plantes. La sévérité de la maladie dépend directement des conditions extérieures favorisant ou non la multiplication du vecteur et modulant les quantités de virus dans le sol. Seul le traitement des sols infestés par fumigation au bromure de méthyle permettait de réduire fortement la densité de l'inoculum. Son usage est progressivement abandonné (protocole de Montréal), en raison de son rôle dans la destruction de la couche d'ozone stratosphérique. Les seules méthodes de lutte reposent désormais sur la sélection et la culture de nouvelles variétés tolérantes comportant plusieurs gènes de résistance (résistances au virus et au vecteur), mais surtout sur le développement de la transgénèse. Les betteraves OGM sont potentiellement utilisables au champ. En effet, leur récolte précède la floraison, ce qui limite grandement la dispersion du transgène. D'un point de vue production sucrière, il faut préciser que le sucre ne contient aucune trace d'ADN ni de protéines [97].

Enfin, si le BNYVV est l'agent responsable de la rhizomanie de la betterave sucrière, il est souvent associé à plusieurs autres phytovirus à ARN, transmis aussi par *P. betae* [98]. Parmi ceux-ci, on trouve un autre *Benyvirus*, le *Beet soil-borne mosaic virus* [78], ainsi que deux *Pomovirus*, le *Beet soil-borne virus* et le *Beet virus Q* [77]. Récemment, un autre virus à ARN de la famille des *Tombusviridae*, transmis par le vecteur tellurique *Olpidium brassicae* a été décrit en Chine et aux États-Unis : le *Beet black scorch virus* [99].

La contribution éventuelle de tels virus dans le syndrome rhizomanie reste encore à préciser.

Remerciements. Les auteurs remercient chaleureusement Monsieur le Professeur Mario Keller de leur avoir suggéré l'écriture de cette revue ainsi que les deux relecteurs pour leurs suggestions. KH et CP ont contribué de manière égale à l'écriture de cette revue.

Références

- Richard-Molard M. Rhizomania : a world-wide danger to sugar beet. *Span* 1985 ; 28 : 92-4.
- Canova A. On the pathology of sugarbeet. *Informatore Fitopatologico* 1959 ; 9 : 390-6.
- Tamada T, Baba T. Beet necrotic yellow vein virus from rhizomania-affected sugar beet in Japan. *Ann Phytopathol Soc Japan* 1973 ; 39 : 325-32.
- Keskin B. *Polymyxa betae* n.sp., a parasite in the roots of *Beta vulgaris* tournefort, particularly during the early growth of the sugar beet. *Arch Mikrobiol* 1964 ; 19 : 348-74.
- Tamada T, Uchino H, Kusume T, Saito M. RNA-3 Deletion mutants of beet necrotic yellow vein virus do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* 1999 ; 89 : 1000-6.
- Pollini CP, Giunchedi L. Comparative histopathology of sugar beets that are susceptible and partially resistant to rhizomania. *Phytopath Medit* 1989 ; 28 : 16-21.
- Pollini CP, Masia A, Giunchedi L. Free indole-3-acetic acid in sugarbeet root of rhizomania-susceptible and moderately resistant cultivars. *Phytopath Medit* 1990 ; 29 : 191-5.
- Biancardi E, Lewellen RT, Biaggi MD, Erichsen AW, Stevanato P. The origin of rhizomania resistance in sugarbeet. *Euphytica* 2002 ; 127 : 383-97.
- Scholten OE, Bock TSMD, Klein-Lankhorst RM, Lange W. Inheritance of resistance to Beet necrotic yellow vein virus in *Beta vulgaris* conferred by a second gene for resistance. *Theor Appl Genet* 1999 ; 99 : 740-6.
- Scholten OE, Lange W. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet : a review. *Euphytica* 2000 ; 112 : 219-31.
- Amiri R, Moghaddam M, Mesbah M, Sadeghian SY, Ghannadha MR, Izadpanah K. The inheritance of resistance to Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*, accession WB42 : statistical comparisons with Holly-1-4. *Euphytica* 2003 ; 132 : 363-73.
- Gidner S, Lennefors BL, Nilsson NO, et al. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* 2005 ; 48 : 279-85.
- Grimmer M, Trybush S, Hanley S, Francis S, Karp A, Asher M. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 2007 ; 114 : 1151-60.
- Acosta-Leal R, Bryan B, Rush C. Host and viral factors that promote the emergence of resistance breaking variants of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), in 34th General Meeting of American Society of Sugar Beet Technologists. 2007, Salt Lake City, USA.
- Lauber E, Janssens L, Weyens G, et al. Rapid screening for dominant negative mutations in the Beet necrotic yellow vein virus triple gene block proteins P13 and P15 using a viral replicon. *Transgenic Res* 2001 ; 10 : 293-302.
- Lennefors BL, van Roggen PM, Yndgaard F, Savenkov EI, Valkonen JP. *Efficient dsRNA-mediated transgenic resistance to Beet necrotic yellow vein virus in sugar beets is not affected by other soilborne and aphid-transmitted viruses*. *Transgenic Res*, 2007.
- Wisler GC, Liu HY, Duffus JE. Beet necrotic yellow vein virus and its relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. *Plant Dis* 1994 ; 78 : 995-1001.
- Lee L, Telford EB, Batten JS, Scholthof KB, Rush CM. Complete nucleotide sequence and genome organization of Beet soilborne mosaic virus, a proposed member of the genus *Benyvirus*. *Arch Virol* 2001 ; 146 : 2443-53.
- Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Wasson JW, Liu HY, Wintermantel WM. Interactions between Beet necrotic yellow vein virus and Beet soilborne mosaic virus in sugar beet. *Plant Dis* 2003 ; 87 : 1170-5.
- Putz C. Composition and structure of Beet necrotic yellow vein virus. *J Gen Virol* 1977 ; 35 : 397-401.
- Tamada T, Shirako Y, Abe H, Saito M, Kigushi T, Harada T. Production and pathogenicity of isolates of Beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J Gen Virol* 1989 ; 70 : 3399-409.
- Steven A, Trus B, Putz C, Wurtz M. The molecular organization of Beet necrotic yellow vein virus. *Virology* 1981 ; 113 : 428-38.
- Schmitt C, Balmori E, Jonard G, Richards KE, Guilley H. *In vitro* mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA 2 : evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5715-9.
- Haerberle AM, Stussi-Garaud C, Schmitt C, et al. Detection by immunogold labelling of P75 readthrough protein near an extremity of beet necrotic yellow vein virus particles. *Arch Virol* 1994 ; 134 : 195-203.
- Tamada T, Schmitt C, Saito M, Guilley H, Richards K, Jonard G. High resolution analysis of the readthrough domain of beet necrotic yellow vein virus readthrough protein : a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *J Gen Virol* 1996 ; 77 : 1359-67.
- Tamada T. *Benyviruses*. In : *Encyclopedia of Virology 2nd ed*. London : Academic Press, 1999 : 154-60.
- Quillet L, Guilley H, Jonard G, Richards K. *In vitro* synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* 1989 ; 172 : 293-301.
- Link D, Schmidlin L, Schirmer A, et al. Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein : evidence for structural pathogenicity determinants. *J Gen Virol* 2005 ; 86 : 2115-25.
- Bouzoubaa S, Niesbach-Klosgen U, Jupin I, Guilley H, Richards R, Jonard G. Shortened forms of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 and -4 : internal deletions and a subgenomic RNA. *J Gen Virol* 1991 ; 72(Pt 2) : 259-66.
- Jupin I, Guilley H, Richards KE, Jonard G. Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA-3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J* 1992 ; 11 : 479-88.
- Tamada T, Abe H. Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J Gen Virol* 1989 ; 70 : 3391-8.
- Schmidlin L, Link D, Mutterer J, Guilley H, Gilmer D. Use of a Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *J Gen Virol* 2005 ; 86 : 463-7.
- Bouzoubaa S, Quillet L, Guilley H, Jonard G, Richards K. Nucleotide sequence of Beet necrotic yellow vein virus RNA-1. *J Gen Virol* 1987 ; 68 : 615-26.
- Hehn A, Fritsch C, Richards KE, Guilley H, Jonard G. Evidence for *in vitro* and *in vivo* autocatalytic processing of the primary translation product of beet necrotic yellow vein virus RNA 1 by a papain-like proteinase. *Arch Virol* 1997 ; 142 : 1051-8.
- Niesbach-Klosgen U, Guilley H, Jonard G, Richards K. Immunodetection *in vivo* of beet necrotic yellow vein virus-encoded proteins. *Virology* 1990 ; 178 : 52-61.
- Valentin C, Dunoyer P, Vetter G, Schalk C, Dietrich A, Bouzoubaa S. Molecular basis for mitochondrial localization of viral particles during beet necrotic yellow vein virus infection. *J Virol* 2005 ; 79 : 9991-10002.

37. Morozov SY, Solovyev AG. Triple gene block : modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J Gen Virol* 2003 ; 84 : 1351-66.
38. Gilmer D, Bouzoubaa S, Hehn A, Guilley H, Richards K, Jonard G. Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA-2. *Virology* 1992 ; 189 : 40-7.
39. Erhardt M, Morant M, Ritzenthaler C, et al. P42 movement protein of Beet necrotic yellow vein virus is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Mol Plant Microbe Interact* 2000 ; 13 : 520-8.
40. Erhardt M, Vetter G, Gilmer D, et al. Subcellular localization of the Triple Gene Block movement proteins of Beet necrotic yellow vein virus by electron microscopy. *Virology* 2005 ; 340 : 155-66.
41. Hehn A, Bouzoubaa S, Bate N, et al. The small cysteine-rich protein P14 of beet necrotic yellow vein virus regulates accumulation of RNA 2 in cis and coat protein in trans. *Virology* 1995 ; 210 : 73-81.
42. Dunoyer P, Pfeffer S, Fritsch C, Hemmer O, Voinnet O, Richards KE. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J* 2002 ; 29 : 555-67.
43. Lauber E, Guilley H, Tamada T, Richards KE, Jonard G. Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in Beta macrocarpa is probably dependent on an RNA-3 sequence domain rather than a gene product. *J Gen Virol* 1998 ; 79 : 385-93.
44. Koenig R, Jarausch W, Li Y, et al. Effect of recombinant beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 2243-6.
45. Haeberle AM, Stussi-Garaud C. *In situ* localization of the non-structural protein P25 encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *J Gen Virol* 1995 ; 76 : 643-50.
46. Vetter G, Hily JM, Klein E, et al. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol* 2004 ; 85 : 2459-69.
47. Klein E, Link D, Schirmer A, Erhardt M, Gilmer D. Sequence variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res* 2007 ; 126 : 53-61.
48. Whitham SA, Quan S, Chang Z, et al. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J* 2003 ; 33 : 271-83.
49. Ottenschlager I, Wolff P, Wolverton C, et al. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 2987-91.
50. Balmori E, Gilmer D, Richards K, Guilley H, Jonard G. Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* 1993 ; 75 : 517-21.
51. Jupin I, Richards K, Jonard G, Guilley H, Pleij CW. Mapping sequences required for productive replication of beet necrotic yellow vein virus RNA-3. *Virology* 1990 ; 178 : 273-80.
52. Gilmer D, Richards K, Jonard G, Guilley H. Cis-active sequences near the 5'-termini of beet necrotic yellow vein virus RNAs-3 and 4. *Virology* 1992 ; 190 : 55-67.
53. Gilmer D, Allmang C, Ehresmann C, et al. The secondary structure of the 5'-noncoding region of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 : evidence for a role in viral RNA replication. *Nucleic Acids Res* 1993 ; 21 : 1389-95.
54. Lauber E, Guilley H, Richards K, Jonard G, Gilmer D. Conformation of the 3'-end of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 analysed by chemical and enzymatic probing and mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 1997 ; 25 : 4723-9.
55. Lauber E, Jonard G, Guilley H, Gilmer D. Effects of structural modifications upon the accumulation in planta of replicons derived from beet necrotic yellow vein virus RNA-3. *Arch Virol* 1999 ; 144 : 1201-8.
56. Rahim MD, Andika IB, Han C, Kondo H, Tamada T. RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J Gen Virol* 2007 ; 88 : 1611-9.
57. Heijbroek W, Musters PMS, Schoone AHL. Variation in pathogenicity and multiplication of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugarbeet cultivars. *Eur J Plant Pathol* 1999 ; 105 : 397-405.
58. Domingo E. Viruses at the edge of adaptation. *Virology* 2000 ; 270 : 251-3.
59. Drake JW, Holland J. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 13010-3.
60. Kruse M, Koenig R, Hoffmann A, et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *J Gen Virol* 1994 ; 75 : 1835-42.
61. Koenig R, Luddecke P, Haeberle AM. Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *J Gen Virol* 1995 ; 76 : 2051-5.
62. Miyanishi M, Kusume T, Saito M, Tamada T. Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA-5. *Arch Virol* 1999 ; 144 : 879-92.
63. Suarez MB, Grondona I, Garcia-Benavides P, Monte E, Garcia-Acha I. Characterization of beet necrotic yellow vein virus from Spanish sugar beets. *Int Microbiol* 1999 ; 2 : 87-92.
64. Lennefors BL, Lindsten K, Koenig R. First record of A and B type Beet necrotic yellow vein virus in sugar beets in Sweden. *Eur J Plant Pathol* 2000 ; 106 : 199-201.
65. Sohi H, Maleki M. Evidence for Presence of Types A and B of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) in Iran. *Virus Genes* 2004 ; 29 : 353-8.
66. Kiguchi T, Saito M, Tamada T. Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. *J Gen Virol* 1996 ; 77(Pt 4) : 575-80.
67. Koenig R, Haeberle AM, Commandeur U. Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA-5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Arch Virol* 1997 ; 142 : 1499-504.
68. Dawei LY, Jialin H, Chenggui L, et al. Detection and nucleotide analysis of RNA-5 of beet necrotic yellow vein virus isolated in China. *Chin J Biotechnol* 1999 ; 15 : 253-7.
69. Koenig R, Lennefors BL. Molecular analyses of European A, B and P type sources of Beet necrotic yellow vein virus and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Arch Virol* 2000 ; 145 : 1561-70.
70. Harju VA, Mumford RA, Bockley A, et al. Occurrence in the United Kingdom of Beet necrotic yellow vein virus isolates which contain RNA-5. *Plant Pathol* 2002 ; 51 : 811.
71. Schirmer A, Link D, Cognat V, et al. Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J Gen Virol* 2005 ; 86 : 2897-911.
72. Ward L, Koenig R, Budge G, et al. Occurrence of two different types of RNA-5-containing beet necrotic yellow vein virus in the UK. *Arch Virol* 2007 ; 152 : 59-73.
73. Fares MA, Moya A, Escarmis C, Baranowski E, Domingo E, Barrio E. Evidence for positive selection in the capsid protein-coding region of the foot-and-mouth disease virus (FMDV) subjected to experimental passage regimens. *Mol Biol Evol* 2001 ; 18 : 10-21.
74. Liu HY, Sears JL, Lewellen RT. Occurrence of resistance-breaking beet necrotic yellow vein virus of sugar beet. *Plant Dis* 2005 ; 89 : 464-8.
75. Acosta-Leal R, Rush CM. Mutations associated with resistance-breaking isolates of beet necrotic yellow vein virus and their allelic discrimination using TaqMan technology. *Phytopathology* 2007 ; 97 : 325-30.
76. Liu H, Lewellen RT. Distribution and differentiation of resistance-breaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States, in 34th general meeting of American Society of Sugar Beet Technologists. Salt Lake City : USA, 2007.

77. Meunier A, Schmit JF, Stas A, Kutluk N, Bragard C. Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of beet necrotic yellow vein virus, Beet soilborne virus, and Beet virus Q and their vector *Polymyxa betae* Keskin on sugar beet. *Appl Environ Microbiol* 2003 ; 69 : 2356-60.
78. Rush CM. Ecology and epidemiology of benyviruses and plasmodiophorid vectors. *Annu Rev Phytopathol* 2003 ; 41 : 567-92.
79. Archibald JM, Keeling PJ. Actin and ubiquitin protein sequences support a cercozoan/foraminiferan ancestry for the plasmodiophorid plant pathogens. *J Eukaryot Microbiol* 2004 ; 51 : 113-8.
80. Chen JP, Swaby AG, Adams MJ, Ruan YL. Barley Mild Mosaic-virus inside its fungal vector, *polymyxa-graminis*. *Ann Appl Biol* 1991 ; 118 : 615-21.
81. Rysanek P, Stocky G, Haerberle AM, Putz C. Immunogold labelling of beet necrotic yellow vein virus particles inside its fungal vector, *Polymyxa betae* K. *Agronomie* 1992 ; 12 : 651-9.
82. Campbell RN. Fungal transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 1996 ; 34 : 87-108.
83. Verchot-Lubicz J, Rush C, Payton M, Colberg T. Beet necrotic yellow vein virus accumulates inside resting spores and zoosporangia of its vector *Polymyxa betae* BNYVV infects *P. betae*. *Viol J* 2007 ; 4 : 37.
84. Adams MJ. Epidemiology of fungally-transmitted viruses. *Soil Use and Management* 1990 ; 6 : 184-9.
85. Maraite H. Transmission of viruses by soil fungi. In : *Developments in agricultural and managed-forest ecology : biotic interactions and soil-borne diseases*. Amsterdam : Elsevier Science Publishers, 1991.
86. Legrève A, Delfosse P, Vanpee B, Goffin A, Maraite H. Differences in temperature requirements between *Polymyxa* sp. of Indian origin and *Polymyxa graminis* and *Polymyxa betae* from temperate areas. *Eur J Plant Pathol* 1998 ; 104 : 195-205.
87. Webb CR, Gilligan CA, Asher MJC. Modelling the effect of temperature on the development of *Polymyxa betae*. *Plant Pathol* 2000 ; 49 : 600-7.
88. Abe H, Tamada T. A test tube culture system for multiplication of *Polymyxa betae* and beet necrotic yellow vein virus in rootlets of sugar beet. *Proceedings of the Sugar Beet Research Association*. 1987 ; (Japan).
89. Goffart JP, Maraite H. Soil and agronomic factors affecting the inoculum potential of *Polymyxa betae* Keskin in Belgium. *Parasitica* 1991 ; 47 : 165-92.
90. Tuitert G. Assessment of the inoculum potential of *Polymyxa betae* and beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in soil using the most probable number method. *Neth J Plant Pathol* 1990 ; 96 : 331-41.
91. Mutasa ES, Chwarszczynska DM, Asher MJ. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of *Polymyxa betae* infection in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. *Phytopathology* 1996 ; 86 : 493-7.
92. Kingsnorth CS, Asher MJC, Keane GJP, Chwarszczynska DM, Luterbacher MC, Mutasa-Gottgens ES. Development of a recombinant antibody Elisa test for the detection of *Polymyxa betae* and its use in resistance screening. *Plant Pathol* 2003 ; 52 : 673-80.
93. Ward E, Kanyuka K, Motteram J, Kornyukhin D, Adams MJ. The use of conventional and quantitative real-time PCR assays for *Polymyxa graminis* to examine host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. *New Phytol* 2005 ; 165 : 875-85.
94. Rochon DA, Kakani K, Robbins M, Reade R. Molecular aspects of plant virus transmission by oloidium and plasmodiophorid vectors. *Annu Rev Phytopathol* 2004 ; 42 : 211-41.
95. Driskel BA, Doss P, Littlefield LJ, Walker NR, Verchot-Lubicz J. Soilborne wheat mosaic virus movement protein and RNA and wheat spindle streak mosaic virus coat protein accumulate inside resting spores of their vector, *Polymyxa graminis*. *Mol Plant Microbe Interact* 2004 ; 17 : 739-48.
96. Adams MJ, Antoniw JF, Mullins JG. Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane regions of virus-encoded proteins. *Arch Virol* 2001 ; 146 : 1139-53.
97. Klein J, Altenbuchner J, Mattes R. Nucleic acid and protein elimination during the sugar manufacturing process of conventional and transgenic sugar beets. *J Biotechnol* 1998 ; 60 : 145-53.
98. Lennefors BL, Savenkov EI, Mukasa SB, Valkonen JP. Sequence divergence of four soilborne sugarbeet-infecting viruses. *Virus Genes* 2005 ; 31 : 57-64.
99. Weiland JJ, Van Winckle D, Edwards MC, et al. Characterization of a US isolate of Beet black scorch virus. *Phytopathology* 2007 ; 97 : 1245-54.

Depuis la publication de cet article de revue, de nouvelles données ont été rendues accessibles dans les publications issues de notre laboratoire et de celles d'autres équipes travaillant sur cette maladie.

En ce qui concerne la protéine p25, de nouvelles "tétrades" ont été décrites (Koenig *et al.*, 2008; Koenig *et al.*, 2009). L'équipe de Tetsuo Tamada a montré que la protéine p25 est un facteur de pathogénicité et le produit d'un gène d'avirulence (Chiba *et al.*, 2008) dont la variabilité moléculaire expliquerait l'apparition d'isolats capables de contourner les résistances naturelles (Acosta-Leal *et al.*, 2010a; Acosta-Leal *et al.*, 2010b). Les résultats de transgénèse cités dans la revue ont pu être complétés par l'analyse du transcriptome d'*Arabidopsis thaliana* exprimant la protéine p25 et des dosages d'hormones végétales. Ainsi, Claire Peltier a pu montrer que l'expression constitutive de la protéine p25 induisait des branchements racinaires anormaux (**Figure 1**), une augmentation de la teneur en auxine dans la plante et une diminution du jasmonate (Peltier *et al.*, 2010).



Figure 1 : *Arabidopsis thaliana* sauvage (WT) ou exprimant la protéine p25 du BNYVV (p25). Les plantes p25 présentent des branchements racinaires rappelant ceux des betteraves rhizomanies (Peltier *et al.*, 2010).

Si la fonction exacte de la protéine p25 n'est toujours pas connue, elle possède néanmoins de très nombreuses caractéristiques communes aux facteurs de transcription. L'utilisation des systèmes double et simple hybride de levure a permis de montrer respectivement que la protéine p25 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 ou de la protéine LexA est capable de multimériser et d'activer faiblement la transcription grâce à son domaine

C-terminal acide (**Figure 2**) (Klein *et al.*, 2007). Une telle propriété est retrouvée entre autres dans le cas de l'activateur de transcription NAC (Xie *et al.*, 2000).

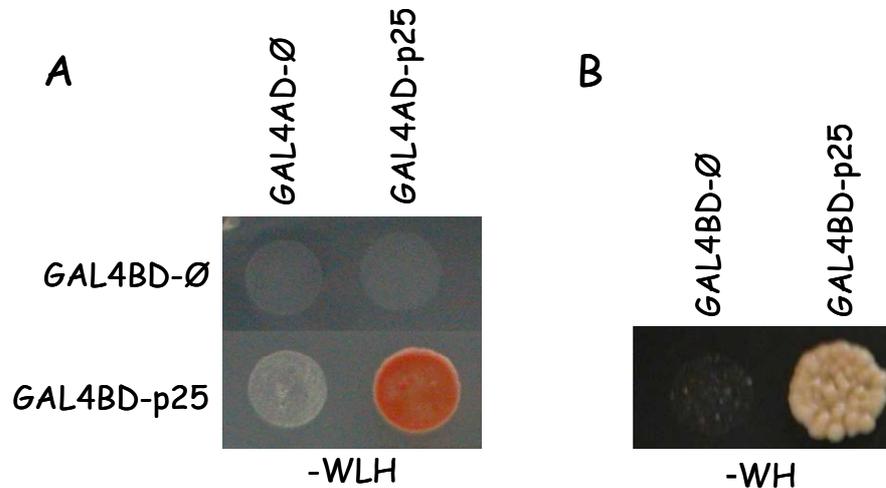


Figure 2 : Visualisation des capacités de dimérisation et d'activation de la transcription de la protéine p25. (A) représente le test en système double hybride. Les levures diploïdes sélectionnées sur milieu dépourvu en tryptophane, leucine et histidine (SD-WLH) permettent de visualiser l'activation de la transcription du gène rapporteur His3 qui rend les levures prototrophes vis-à-vis de l'histidine. La croissance sur milieu SD-WLH témoigne de l'existence d'interactions entre les protéines de fusion GAL4BD-p25 et GAL4AD-p25. (B) le test simple hybride illustre l'activation de la transcription du gène rapporteur His3 par la croissance de levure exprimant la p25 fusionnée à la protéine GAL4BD mais pas en présence de la protéine GAL4BD seule (GAL4BD-Ø).

Nous avons constaté que la séquence nucléotidique appelée "core", comprise entre les résidus 1033-1257 de l'ARN3, est responsable du mouvement systémique du BNYVV sur *Beta macrocarpa* (Lauber *et al.*, 1998a). Lors de l'étude du BSBMV et de l'obtention de clones complets infectieux de l'ARN3, nous avons pu constater que l'ARN3 de BSBMV est répliqué et encapsidé par le BNYVV. De manière plus intéressante, cet ARN est capable d'assurer le mouvement à longue distance des ARN1 et 2 du BNYVV sur *B. macrocarpa* (Ratti *et al.*, 2009). Ceci a conduit à l'identification d'une séquence conservée de 20 nts que nous avons appelée "coremin". Coremin fait partie de la séquence core décrite par Lauber mais aussi de la séquence promotrice de l'ARN subgénomique 3 (Balmori *et al.*, 1993). Curieusement, cette séquence est retrouvée sur l'ARN5 du BNYVV, l'ARN4 du BSBMV mais aussi sur les ARN subgénomiques de virus du genre *Cucumovirus*. Au laboratoire, les travaux de Claire Peltier (non publiés) ont montré que l'ARN3sub n'est pas un ARN subgénomique mais correspond à un produit de clivage de

l'ARN3 qui renferme la séquence coremin de 20 nts à son extrémité. Des mutations introduites dans cette petite séquence conduisent à l'absence d'accumulation de l'ARN3sub, à l'inhibition du mouvement systémique du virus et à une réduction de l'expression de la protéine p25 dans les tissus infectés sans affecter l'accumulation de l'ARN parental génomique (Claire Peltier *et al.*, en rédaction). En participant à ce travail, j'ai recherché des protéines virales de BNYVV capables d'interagir avec la séquence "coremin". J'ai pu ainsi identifier une interaction entre cette séquence et la protéine p14, codée par l'ARN2 du BNYVV, qui rappelons-le, est une petite protéine riche en cystéine possédant un doigt à zinc et agissant comme suppresseur de RNA silencing.

II. Enjeux de mon travail de thèse

Lors de mon arrivée au laboratoire, je me suis intéressé à la protéine p25 et plus particulièrement aux modifications post traductionnelles pouvant expliquer sa présence sous forme d'un doublet visualisé après séparation électrophorétique. Plusieurs expériences nous suggèrent que la protéine p25 subit une ou plusieurs modifications post traductionnelles. En effet, la protéine est immunocapturée sur colonne d'affinité en utilisant des anticorps dirigés contre les phosphosérines et phosphothréonines ; son immunodétection après séparation sur un gel bi dimensionnel révèle la présence de plusieurs spots correspondant à des protéines dont les points isoélectriques (pI) ne diffèrent que de la charge d'un groupement phosphate. Le **chapitre I** de ce mémoire de thèse sera consacré à la caractérisation des résidus phosphorylés par mutagenèse dirigée et par spectrométrie de masse. Nous avons ainsi recherché l'incidence des mutations introduites dans les sites potentiels de phosphorylation sur les activités connues de la protéine p25. En effet, de nombreuses protéines sont régulées par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation (Fuchs *et al.*, 2000; Pawson and Scott, 2005). Ainsi, si l'activité de la protéine p25 en contexte viral est dépendante de son état de phosphorylation, il est envisageable qu'un mutant non phosphorylable ou mimant une phosphorylation constitutive puisse ne plus être fonctionnel et entrer en compétition avec la protéine sauvage. Un tel mutant porte le nom de mutant dominant négatif et pourrait être utilisé en lutte antivirale.

La petite taille et les capacités de codage limitées de la plupart des génomes de virus de plante impliquent que les virus sont dépendants de protéines exprimées par la plante hôte.

Les interactions protéine-protéine sont critiques pour la grande majorité des processus biologiques et jouent des rôles centraux pendant le cycle viral ; par exemple, dans la formation de complexes de réplication viraux, l'assemblage de virions, le mouvement viral entre cellules ou encore la transmission par les vecteurs. Pour comprendre le rôle de la protéine p25, nous avons entrepris de rechercher les partenaires cellulaires et viraux capables d'interagir avec cette protéine de BNYVV. Deux approches ont été utilisées et sont décrites dans le **chapitre II**. D'une part, le criblage par système double hybride de levure d'une banque d'ADNc de betteraves et, d'autre part, l'identification par spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées avec la protéine p25 exprimée en contexte viral. Lors de la première approche, le criblage de banque réalisé par l'équipe du prof. M. Varrelmann (Göttingen, Allemagne) a révélé plusieurs candidats (Thiel and Varrelmann, 2009). Nous avons choisi une protéine candidate F-box à domaine Kelch qui montre une forte interaction, pour confirmer l'interaction et entreprendre la recherche de sa fonction.

Lors de l'approche d'immunoprécipitation de la protéine p25, nous avons pu identifier par spectrométrie de masse (MS-MS) un partenaire viral de la p25, la protéine p14 suppresseur de PTGS, codée par l'ARN2 du BNYVV. L'absence d'interaction en système double hybride entre la p25 et la protéine p14 suggère qu'une autre protéine et/ou un ARN pourraient intervenir dans la formation du complexe. La particularité fonctionnelle de l'ARN3 et plus précisément celle de la séquence coremin nous a conduits à suspecter l'intervention d'une protéine virale dans la stabilisation de l'ARN3 et/ou dans le mouvement à longue distance. Grâce à une approche en système triple hybride de levure, j'ai montré ainsi que la protéine p14 interagissait spécifiquement avec la séquence coremin de l'ARN3. J'ai donc continué la caractérisation de la protéine p14 et étudié son rôle dans le mouvement à longue distance du BNYVV sur les plantes *B. macrocarpa* et *Nicotiana benthamiana*. Ces résultats seront décrits dans le **chapitre III**.

Avant d'aborder l'ensemble de mes résultats, je passerai en revue les modifications post traductionnelles les plus courantes en détaillant leurs rôles dans la régulation fonctionnelle des protéines. Enfin, je conclurai et discuterai les perspectives qui permettraient de poursuivre mes travaux et d'approfondir les connaissances sur la pathogénicité du BNYVV pour envisager la mise en place de nouvelles approches antivirales.

❖ LES MODIFICATIONS POST TRADUCTIONNELLES DES PROTÉINES

Chez les eucaryotes, la synthèse peptidique nécessite la production initiale d'ARN messagers (ARNm) dans le noyau puis leur export dans le cytoplasme, à travers les pores nucléaires, où ils seront reconnus par les petites et les grandes sous-unités ribosomales qui initieront la synthèse protéique.

La régulation de l'expression des protéines se fait d'une part par des modulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles. Elles affectent respectivement la production de l'ARNm (comme les modifications épigénétiques et les modifications de la chromatine, la présence d'éléments *cis* au sein des séquences promotrices, l'action d'activateurs ou d'inhibiteurs transcriptionnels) et leur stabilité. D'autre part, l'expression protéique implique également des régulations traductionnelles qui font appel à la reconnaissance d'éléments *cis* sur l'ARNm. Enfin, plusieurs processus de contrôle post-traductionnels sont mis en œuvre pour contrôler la demi-vie et l'activité de la protéine finale. On y retrouve les événements de protéolyse (pour supprimer des séquences signal de localisation sub-cellulaire), le repliement correct des protéines (les chaperons et les isomérases) et l'activation éventuelle de protéines (*via* la phosphorylation ou d'autres types de modifications).

Si les analyses génomiques fournissent des informations statiques sur les gènes d'un organisme, l'analyse du protéome reflète au contraire des situations dynamiques qui apportent des informations sur les niveaux d'expression et les régulations de protéines dans la cellule.

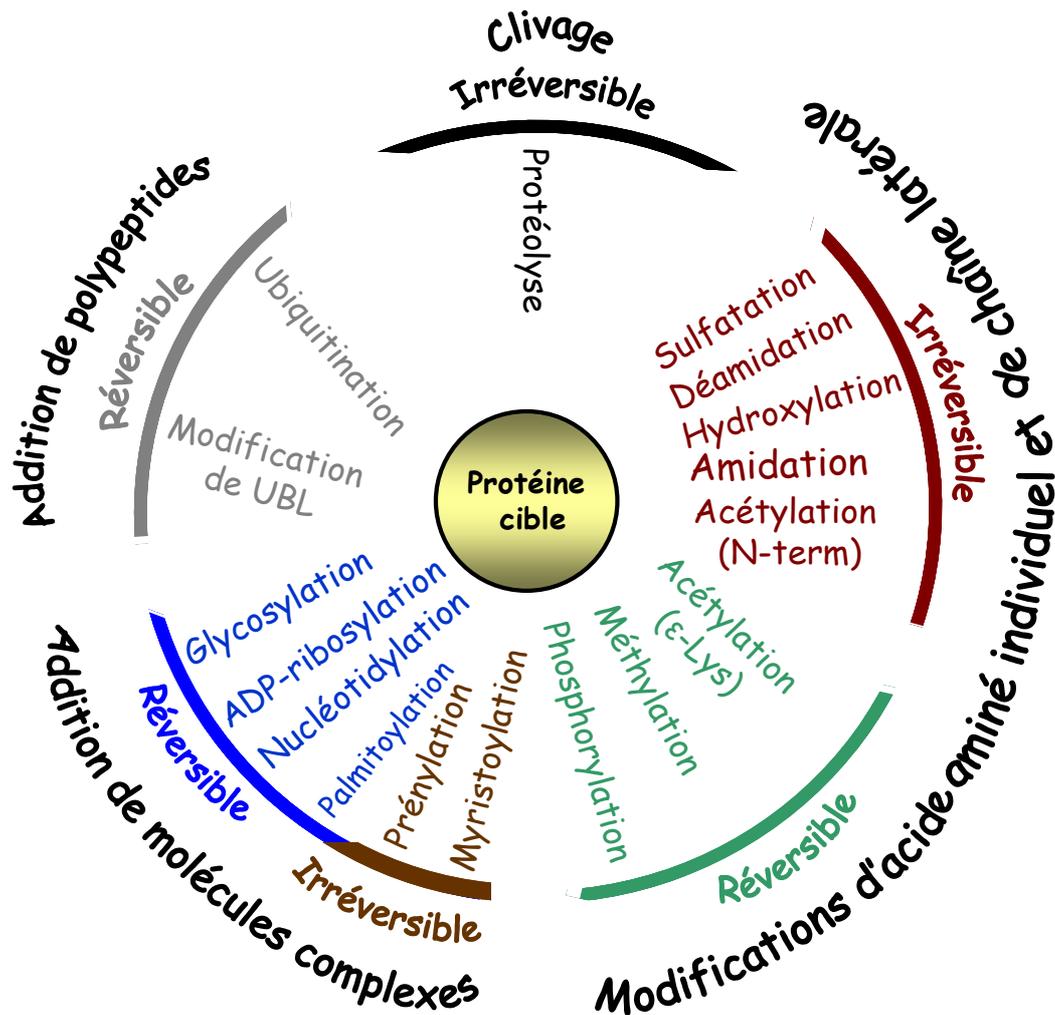


Figure 3 : Diversité des modifications post-traductionnelles réversibles et irréversibles des protéines.

L'ordre séquentiel des acides aminés d'une chaîne peptidique ne représente pas la forme finale fonctionnelle des biomolécules. En effet, des interactions non covalentes à longue distance et des changements covalents supplémentaires (modifications chimiques) ont souvent lieu pendant ou après la synthèse protéique, avant que les protéines ne soient produites sous leur forme activée (Krishna and Wold, 1993). De telles modifications post-traductionnelles (PTM) sont utilisées par les cellules procaryotes et eucaryotes pour moduler rapidement, localement et spécifiquement l'activité de facteurs clés. Ceci permet aux cellules de répondre rapidement aux changements environnementaux [pour revue voir (Ribet and Cossart, 2010)]. Chez les plantes, les réponses de défense se produisent très rapidement dès la reconnaissance d'un pathogène, ce qui implique, entre autres, l'utilisation de PTM de protéines préexistantes pour transduire des cascades de signaux.

Introduction générale

Plus de 300 types de modifications sont connues et affectent les extrémités N- et C-terminales des protéines et les chaînes latérales des acides aminés (Krishna and Wold, 1993). Elles consistent en l'ajout de groupements chimiques (phosphorylation) ou de molécules complexes (glucides, lipides et petites protéines comme l'ubiquitine et les ubiquitin-like -UBL), la modification des chaînes latérales des acides aminés (comme la déamidation) ou le clivage de parties entières de la protéine (protéolyse), elles seront décrites ci-dessous (**Figure 3**). Si certaines PTM sont facilement identifiables expérimentalement ou *in silico* (protéolyse), d'autres (alkylation, acylation, hydroxylation, phosphorylation, glycosylation, sulfatation, carboxylation, ubiquitination, sumoylation, adénylation et prénylation) sont difficilement prévisibles et leur mise en évidence requiert des analyses biochimiques *in vitro* et *in vivo*.

Ces modifications induisent des changements structuraux et fonctionnels de la protéine (**Figure 4**). Par exemple, l'arginine qui est chargée positivement peut subir une ADP-ribosylation qui va charger cet acide aminé négativement. La phosphorylation ou la sulfatation introduisent des charges négatives dans la protéine visée et par conséquent des changements de propriétés qui peuvent stabiliser ou déstabiliser des structures, des interactions et des activités enzymatiques.



Figure 4 : Schéma général d'une réaction de modification covalente. Un groupe générique (B) est transféré à un résidu spécifique accepteur (X) sur la protéine cible.

Les réactions de modifications covalentes peuvent être irréversibles ou réversibles. Des modifications irréversibles sont généralement limitées à des rôles physiologiques spécifiques comme la coagulation du sang, la fixation de complément et le renouvellement de protéines. Ainsi, le retour à un état initial implique une nouvelle synthèse de protéines. Généralement, les modifications post traductionnelles impliquées dans des processus de régulation sont réversibles. Ceci permet à la cellule de répondre rapidement aux stimuli et inclut les acteurs des voies de cascades de signalisation et les enzymes métaboliques.

Beaucoup de processus cycliques ont été identifiés et font appel par exemple à la phosphorylation/déphosphorylation, l'acétylation/dé-acétylation ou l'ADP-ribosylation/dé-ADP-ribosylation de protéines réalisées par des enzymes qui reconnaissent des séquences spécifiques sur la protéine cible. Il apparaît donc plusieurs niveaux de régulation impliquant la présence et l'activité de l'enzyme de modification, le taux d'expression de la protéine cible et son taux de modification post-traductionnelle qui affecte directement l'activité de la cible modifiée. Un autre niveau de régulation réside dans la localisation subcellulaire des acteurs. En effet, le substrat, son enzyme modificative et la molécule donneuse doivent être localisés au même endroit.

Les PTM jouent un rôle fondamental dans la physiologie cellulaire, il n'est donc pas surprenant que les agents pathogènes influencent directement ou indirectement les PTM des protéines de leur hôte en détournant la machinerie cellulaire pour leur profit.

I. Clivage protéolytique

La protéolyse est une PTM irréversible utilisée pour réguler l'activité des protéines. Elle est la dernière étape de la maturation de nombreuses protéines. Une liaison peptidique de la protéine précurseur est clivée par une protéase et libère un ou des produits biologiquement actifs (ex : clivage de prohormones en hormones) (**Figure 5**). Dans le cas du BNYVV, la polyprotéine codée par l'ARN1 est auto-clivée en deux grandes protéines essentielles à la réplication (Hehn *et al.*, 1997). La protéolyse intervient également dans le lumen du réticulum endoplasmique (RE) lors de l'élimination des signaux d'adressage (peptide signal) au cours de la traduction. Généralement, le peptide signal renferme 20 à 30 résidus hydrophobes et basiques. La méthionine N-terminale est également souvent éliminée post-traductionnellement par une méthionyl aminopeptidase. Précisons aussi que des suppressions d'acides aminés C-terminaux ont également été décrites (Sarnovsky *et al.*, 2009).



Figure 5 : Clivage protéolytique d'une protéine conduisant à son activation ou à son inactivation.

II. Addition de molécules complexes

1. Acylation

Certaines protéines sont associées par des liaisons amides à des acides gras par le groupe α -amine de polypeptides ou par des liaisons thioester sur les chaînes latérales des résidus cystéines. De telles modifications sont rencontrées sur des récepteurs cellulaires, des protéines sécrétées et impliquées dans la signalisation, dans la régulation métabolique cellulaire et dans des protéines membranaires virales.

La myristoylation, la palmitoylation et la prénylation sont des modifications distinctes. Elles consistent au transfert du groupement acyle du myristoyl-CoA dans le cas de l'acide myristique [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$] ou du palmitoyl-CoA dans le cas de l'acide palmitique [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$] sur la protéine cible. Ces deux modifications N-terminales de la protéine ont des conséquences biologiques tout à fait distinctes (Rajala, 2005). Dans le cas de prénylation, le transfert d'acides gras en C15 et C20 a lieu sur des résidus cystéine internes.

i. Myristoylation

La myristoylation est une réaction co-traductionnelle irréversible qui se produit exclusivement sur un résidu glycine après enlèvement de la méthionine initiatrice [pour revue voir (Podell and Gribskov, 2004)] (**Figure 6**). Cette modification peut se produire également post traductionnellement lors de l'apoptose après le clivage du substrat protéique par des caspases qui exposent un site interne de myristoylation (Zha *et al.*, 2000).

Introduction générale

La réaction est catalysée au sein du réticulum endoplasmique rugueux par l'enzyme N-myristoyltransférase (NMT) qui reconnaît une séquence spécifique MGXXXS/T (Maurer-Stroh *et al.*, 2002) et qui est favorisée par la présence de résidus hydrophobes en aval de la glycine cible. On estime qu'environ 0,5% des protéines eucaryotes sont myristoylées (Maurer-Stroh and Eisenhaber, 2004).

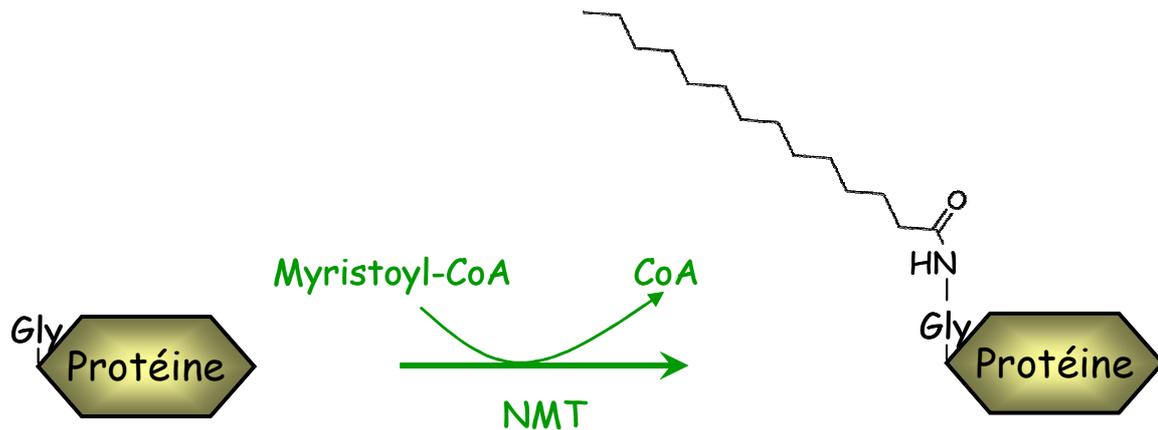


Figure 6 : La myristoylation d'une protéine est catalysée par la N-myristoyltransférase (NMT). Gly représente l'acide aminé Glycine associé au groupe de myristoyl [CH₃(CH₂)₁₂OC-]. CoA, coenzyme A.

La myristoylation modifie le ciblage, la fonction et/ou la stabilité des protéines, en les associant avec les membranes ou avec les domaines hydrophobes d'autres protéines (Zhang *et al.*, 1993; Olsen and Kaarsholm, 2000). Une majorité de protéines myristoylées agit lors de la signalisation intracellulaire. Par exemple, on peut citer la myristoylation des effecteurs AvrRpm1 et AvrPto sécrétés par les bactéries, qui affecte les fonctions d'avirulence et de virulence de ces effecteurs (Nimchuk *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2000; Thara *et al.*, 2004).

Dans le cas du HIV, la N-myristoylation de la protéine précurseur gag (Pr55gag) est essentielle pour l'infection, la réplication et pour l'assemblage structural du virus (Bryant and Ratner, 1990; Wang and Barklis, 1993; Shiraishi *et al.*, 2001) car elle permet de libérer par les protéases virales la protéine MA myristoylée mature et les protéines gag et env dans la phase tardive du cycle (Shiraishi *et al.*, 2001). L'implication de protéines myristoylées est également décrite pour l'entrée du virus de l'hépatite B (HBV) (Maurer-Stroh and Eisenhaber, 2004). Chez les plantes, la localisation au niveau des plasmodesmes des

protéines de mouvement C4 de plusieurs *Geminivirus* est supposée être dépendante de l'addition d'acide gras (Yahara *et al.*, 1998).

ii. Palmitoylation

Cette PTM appelée S-acylation ou S-palmitoylation a été identifiée chez les procaryotes et chez les eucaryotes. Elle consiste en l'addition réversible d'un acide gras comme l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique ou l'acide arachidonique au groupement thiol d'une cystéine *via* une liaison thioester [voir revue (Hannoush and Sun, 2010)]. Les protéines palmitoylées ne partagent pas de séquences consensus et la palmitoylation est trouvée dans les domaines N-, C-terminal ou interne de protéines (**Figure 7A**) (Baekkeskov and Kanaani, 2009). La palmitoylation est strictement post-traductionnelle et fortement associée avec une fonction membranaire.

Cette PTM est catalysée par des S-Acyle Transférases contenant le domaine DHHC (PAT) qui transfèrent un groupement palmitoyl à un résidu cystéine sur un substrat de protéine par la formation d'une liaison thioester (S-palmitoylation). Une autoacylation spontanée en présence d'acyle-CoA à longue chaîne et des vésicules lipidiques est également possible (Lobo *et al.*, 2002; Roth *et al.*, 2002; Stulemeijer and Joosten, 2008). Ces réactions se produisent du côté luminal et cytoplasmique des membranes et modifient des protéines membranaires à la fois solubles et intégrantes, protéines associées aux micros domaines membranaires (Shahinian and Silvius, 1995). L'élimination des groupements acyle est réalisée par des acyles thioesterases (APT, acyl-protein thioesterase) (Duncan and Gilman, 1998). La palmitoylation peut également se produire par la formation d'une liaison amide (N-palmitoylation) (**Figure 7B**). Une forme rare de palmitoylation implique l'ajout d'un acide palmitoléique par la formation d'une liaison oxyester sur une sérine (O-palmitoleoylation) (**Figure 7C**) [voir revue (Hannoush and Sun, 2010)].

Chez les plantes, les protéines S-acylées jouent un grand nombre de rôles divers et variés et affectent, entre autres, les voies de signalisation de Ca^{2+} , le mouvement de K^+ et les réponses aux stress [voir revue (Hemsley, 2009)].

Certaines protéines secrétées à partir de bactéries pathogènes subissent des S-acylation qui semblent nécessaires à leur activité. Ainsi la S-acylation de la protéine avrRpm1 de *Pseudomonas syringae* localisée dans la membrane plasmique est nécessaire à la virulence. Ceci renforce également l'idée que la S-acylation nécessite l'association préalable à la

membrane qui est assurée, comme nous l'avons vu ci-dessus, par une N-myristoylation (Nimchuk *et al.*, 2000).

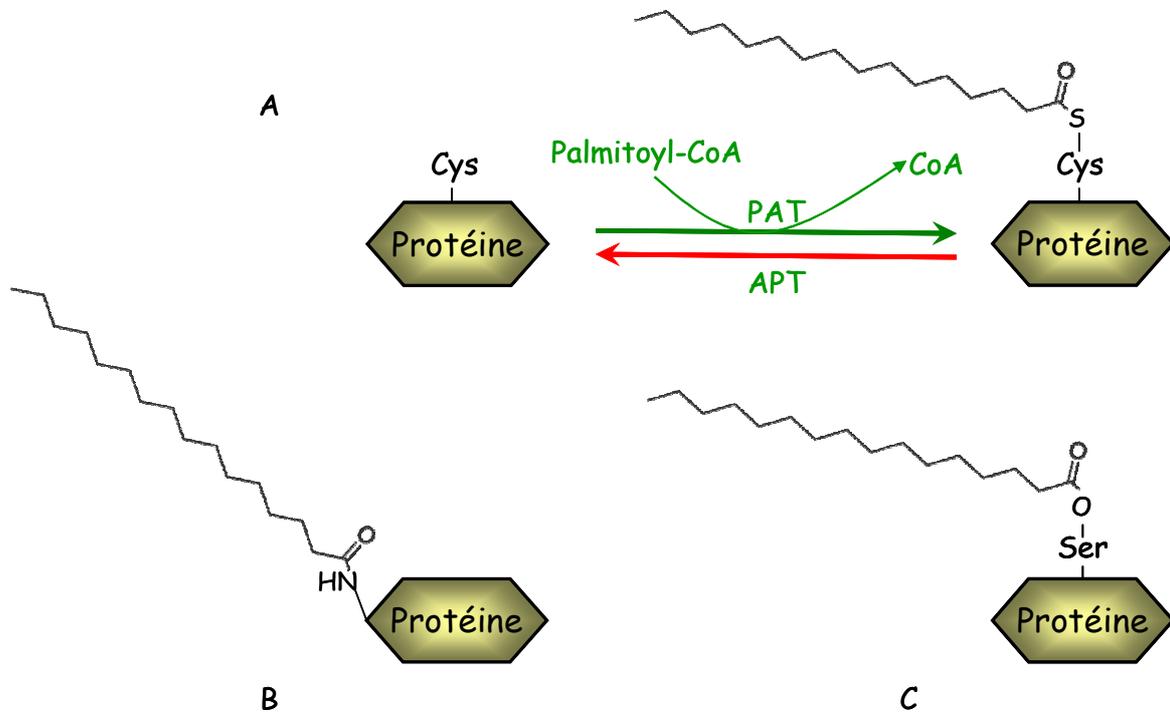


Figure 7 : Les différentes formes de palmitoylation de protéines. (A) Schéma présentant la réaction réversible de S-palmitoylation d'une cystéine catalysée par une protéine S-Acyle transférase (PAT) et Acyle-protéine thioestérase (APT). (B) la N-palmitoylation de protéines par liaison amide N-terminale est possible tout comme la O-palmitoylation par liaison oxyester est possible sur des résidus sérine (Ser) (C).

Chez les virus, la plupart des virus enveloppés renferment au moins une glycoprotéine modifiée de manière covalente par l'addition d'acide gras (Schlesinger *et al.*, 1993), c'est le cas de l'hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza, de la protéine G du *Vesicular stomatitis virus* (VSV), et des glycoprotéines E1 et E2 du *Semliki forest virus* (SFV) (Schmidt and Schlesinger, 1979; Schmidt, 1982). Chez les phytovirus, rien n'exclut le rôle de ces modifications dans l'infection virale. La protéine AC4 codée par l'*East African Cassava Mosaic Cameroon Virus* (EACMCV) (*Geminivirus bipatite*) est localisée dans la membrane des cellules infectées et possède une fonction de suppresseur de RNA silencing. La N-myristoylation et la S-acylation de l'AC4 semblent être essentielles à la suppression du silencing, à la localisation membranaire et à l'infection virale (Fondong *et al.*, 2007).

iii. Prénylation : farnésylation et géranylgeranylation

La prénylation permet l'adressage membranaire des protéines grâce au transfert d'un groupe farnésyl (C15) ou geranylgeranyl (C20) sur une cystéine présente sur le motif consensus CAAX (CAAX-COOH), situé à l'extrémité C-terminale de la protéine cible où les A représentent des acides aminés aliphatiques et X le résidu C-terminal. La nature des résidus influence la prénylation. La protéine sera farnésylée si X est Ala, Ser, Cys, Met ou Gln (**Figure 8A**) ou sera geranylgeranylée si X est Leu ou Phe (**Figure 8B**) (Maurer-Stroh and Eisenhaber, 2005). Cette réaction est catalysée par la farnesyl-transférase et les geranylgeranyl-transférases (type I, type II) qui sont des enzymes hétérodimériques distinctes partageant une sous-unité catalytique commune (β -sous-unité) et qui possèdent une sous-unité régulatrice distincte (α -sous-unité). Les deux sous-unités participent à la catalyse. Le donneur est pris en charge par la sous-unité régulatrice et l'accepteur par la sous-unité catalytique. La prénylation peut intervenir après un clivage protéolytique par une endo-protéase spécifique et le groupement α -carboxylique de la cystéine prénylée est alors méthylé par une méthyle-transférase spécifique (Clarke *et al.*, 1988; Hancock *et al.*, 1989; Hasne and Lawrence, 1999).

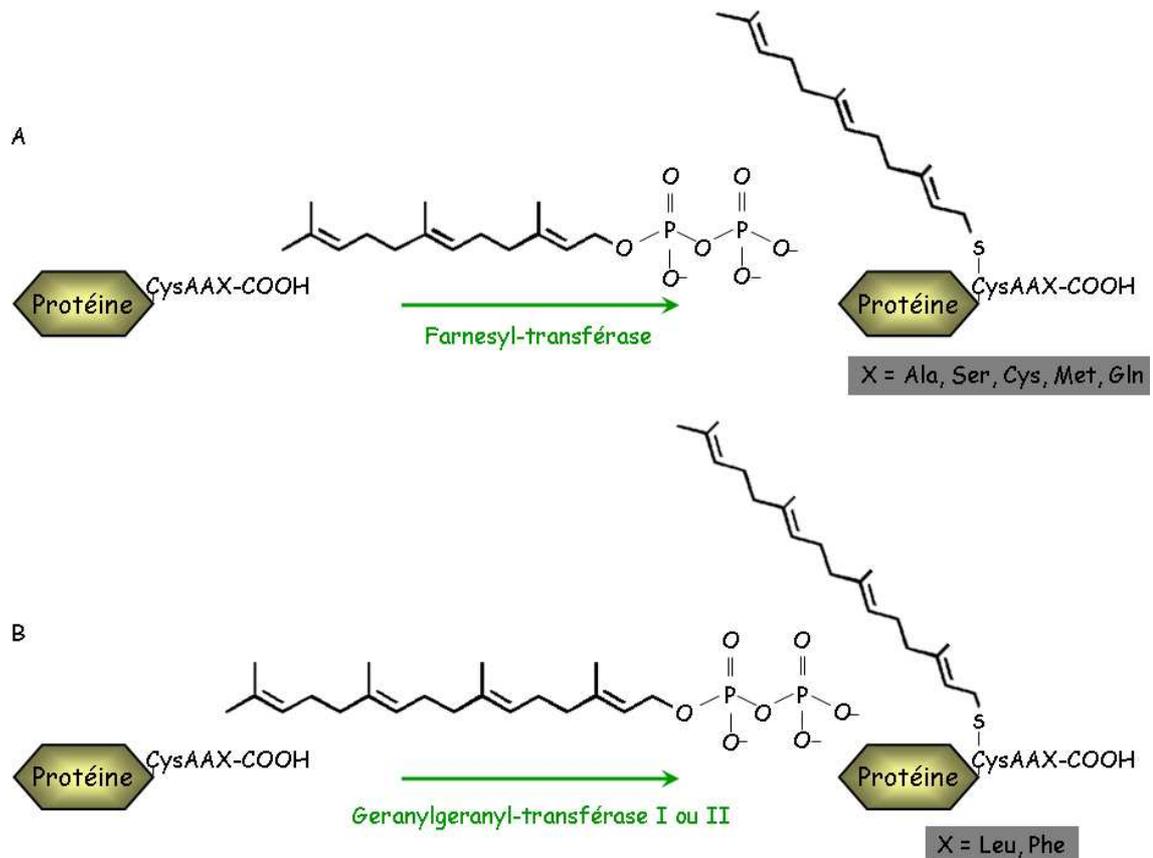


Figure 8 : Représentation schématique de prénylation par (A) farnésylation ou (B) géranylgéranylation de cystéine (Cys) au voisinage d'acides aminés aliphatiques (A) contigus au résidu C-terminal (X).

La prénylation contrôle les activités de signalisation de plusieurs protéines cellulaires. Des exemples de protéines prénylées incluent les petites GTPases Ras, Rho et Rab. La farnésylation de K-Ras4B module sa voie de translocation intracellulaire. La géranylgéranylation des protéines Rab contribue à la régulation de leur rôle dans le trafic membranaire et retrouvée associée à des maladies génétiques (Choroideremia) [pour revue voir (Pereira-Leal *et al.*, 2001; Hannoush and Sun, 2010)].

Une protéine prénylée particulièrement bien étudiée est l'oncogène p21^{ras}, qui est farnésylée. La farnésylation semble critique pour l'activité oncogène de la protéine et un effort considérable a été concentré sur le développement des inhibiteurs de farnésyle-transférase dans le but de bloquer la protéine ras et empêcher l'oncogénèse (Sebti, 2005). Des inhibiteurs de prénylation sont également étudiés comme agents antiviraux et pour la thérapie de cancers.

2. Glycosylation

Les glycoprotéines possèdent des teneurs en sucres variables (3% dans le cas d'IgG, à plus de 40 % pour l'érythropoïétine). Selon le taux d'oligosaccharides et les types de modifications, on distingue les protéoglycanes des glycoprotéines. Plus de la moitié des protéines de cellules eucaryotes sont glycosylées. La glycosylation de protéines est corrélée aux diverses fonctions comme la localisation subcellulaire, la reconnaissance cellulaire, la signalisation inter et intracellulaire, l'adhésion cellulaire, des infections bactériennes et virales, la stabilité de protéines et la résistance à la protéolyse, le contrôle de repliement correct, la liaison aux membranes, l'activité enzymatique et l'interaction entre des protéines (Hart *et al.*, 1989; Lis and Sharon, 1993; Gagneux and Varki, 1999; Helenius and Aebi, 2001). Ainsi, la glycosylation est impliquée dans la régulation des processus développementaux ou des processus de transport et joue un rôle important dans la manifestation de nombreuses maladies.

Les modifications co- et post-traductionnelles des protéines par glycosylation sont des processus complexes impliquant de nombreuses enzymes spécifiques appelées glycosyltransférases, dont plusieurs sont situées dans le RE. Différents types de glycosylation existent et sont distingués par la structure du glycane et aussi par le type d'attachement des sucres au squelette peptidique.

L'attachement covalent des chaînes de sucres aux protéines survient par *O*-glycosylation *via* une liaison glycosidique à une chaîne latérale de sérine, thréonine, tyrosine (Matsuoka *et al.*, 1995) ou hydroxy-lysine et hydroxy-proline du collagène voire à certains groupement carboxyliques (Yamauchi *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2003; West *et al.*, 2004), par *N*-glycosylation *via* le groupe amide de résidus asparagine (**Figure 9A**) (Lerouge *et al.*, 1996), ou *via* l'ancrage d'un glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) (Ferguson, 2000).

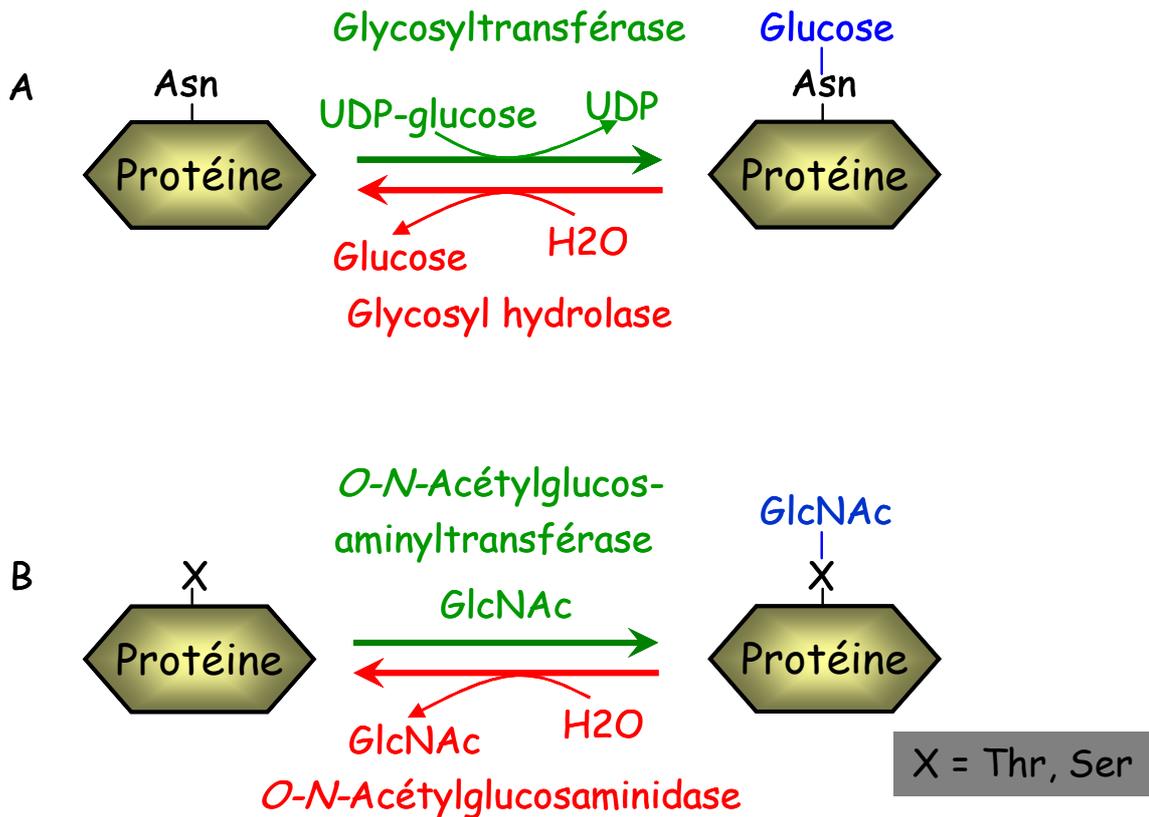


Figure 9 : Représentation des réactions de *N*-glycosylation (A) et d'*O*-GlcNAcylation (B) de protéines. Les enzymes catalysant les modifications et leurs cofacteurs ainsi que le groupe ajouté à la protéine cible sont indiqués. Asn, asparagine ; X représente les acides aminés sérine et thréonine. UDP, Uridine diphosphate ; GlcNAc, *N*-acétylglucosamine.

L'*O*-*N*-acétylglucosaminylation ou *O*-GlcNAc est une glycosylation atypique et réversible des protéines. Elle se produit par l'addition d'un résidu unique de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le groupement hydroxyle d'une sérine (Ser) ou d'une thréonine (Thr) (**Figure 9B**). Cette modification est régulée par un couple d'enzymes : l'*O*-Acétylglucosaminyltransférase (OGT) est chargée du transfert de GlcNAc sur la protéine. L'*O*-Acétylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase) (OGA) est responsable de l'hydrolyse du résidu de *O*-GlcNAc (Holt *et al.*, 1987a; Holt *et al.*, 1987b). Malgré des efforts considérables, aucune séquence consensus d'*O*-glycosylation n'a été identifiée. Mis à part chez la levure, cette PTM est retrouvée chez certaines bactéries, protozoaires, virus, champignons filamenteux et chez tous les métazoaires, y compris les plantes. L'*O*-GlcNAcylation est différente de la *N*-glycosylation car : (1) elle s'effectue presque exclusivement sur des protéines cytoplasmiques et nucléaires, par rapport à la localisation extracellulaire et luminale pour la plupart des autres fractions associées aux protéines

glycosylées ; (2) le résidu *O*-GlcNAc n'est généralement pas modifié ou allongé en structures plus complexes.

La modification *O*-GlcNAc des protéines nucléaires et cytoplasmiques est un processus dynamique, réversible et analogue à la phosphorylation. En effet, comme la phosphorylation, l'*O*-GlcNAcylation se produit rapidement et active ou désactive des polypeptides en réponse à divers stimuli physiologiques (hormones, facteurs de croissance, et mitogènes) [pour revue voir (Hart *et al.*, 2007)]. Un grand nombre de facteurs de transcription sont modifiés par l'*O*-GlcNAcylation. L'altération d'*O*-GlcNAcylation est associée à diverses maladies humaines, y compris les maladies cardio-vasculaires [pour revue voir (Laczy *et al.*, 2009; Lefebvre *et al.*, 2010)], le diabète (Dias and Hart, 2007), et le cancer (Chou and Hart, 2001). Cette modification intervient dans la régulation de la stabilité, la localisation, l'interaction protéine-protéine, la capacité de liaison des facteurs de transcription à l'ADN [pour revue voir (Ozcan *et al.*, 2010)]. L'une des fonctions connues d'*O*-GlcNAc est la régulation de la phosphorylation de sites spécifiques, soit des sites exacts de phosphorylation, soit des sites voisins, qui jouent un rôle important dans la stabilisation des protéines ou dans les interactions entre protéines (Cheng *et al.*, 2000; Cheng and Hart, 2001). Un exemple bien identifié, c'est la modification de la protéine p53 par l'*O*-*N*-acétylglucosamine qui régule ses activités et sa stabilité (Yang *et al.*, 2006b).

La séquence consensus pour la *N*-glycosylation d'Asn-X-Ser/Thr est essentielle, mais pas suffisante, et la structure secondaire locale influence cette PTM. Les glycosyl-transférases et les glycosidases sont situées dans le RE et dans l'appareil de Golgi pour ajouter et enlever des résidus de sucres. Toutefois, le *Chlorovirus* (*Phycodnaviridae*), un virus à ADN double brin qui infecte les algues eucaryotes code pour ses propres enzymes dans le but de glycosyler sa protéine de capsid indépendamment de l'appareil de Golgi et du RE de la cellule d'hôte (Van Etten *et al.*, 2010).

De nombreuses protéines structurales virales, telles que celles des *Rhabdovirus*, *Herpesvirus*, *Poxvirus* et *Paramyxovirus* sont glycosylées. La plupart renferment des glycanes complexes, associées à Asn via *N*-acétylglucosamine, mais certaines possèdent des *O*-acétylglucosamine ou acétylgalactosamine sur des résidus Ser ou Thr. Ces glycosylations sont essentielles à l'infection. La glycosylation est couramment trouvée dans les protéines d'enveloppe de virus animaux (Hart *et al.*, 1989) comme le virus VIH, le virus de la dengue et le virus de l'hépatite C ; la glycosylation induit une cascade d'événements initiés par l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe virale avec des récepteurs et des co-récepteurs d'entrée spécifique qui déclenchent la fusion membranaire

des enveloppes virales à la membrane (Altmeyer, 2004; Rudd *et al.*, 2004). Cette modification est également très bien décrite chez les virus *Herpes simplex virus* type 1 et 2 (Fries *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2010).

A l'inverse, il y a peu d'informations sur la glycosylation des protéines de virus de plante. Les glucides ont été signalés sur les particules de *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) et *Cowpea mosaic virus* (CPMV). La glycosylation de leurs protéines CP a été proposée comme un facteur déterminant de la transmission du virus *via* les graines (Partridge *et al.*, 1974). La grande protéine structurale du *Lettuce necrotic yellow virus* (LNYV) est glycosylée avec des oligosaccharides complexes contenant du β -N-acetylchitobiose liés (N-liaison) aux résidus de l'asparagine (Dietzgen and Francki, 1988). Des O-GlcNAcylation ont été retrouvées sur la CP du *Plum pox virus* (PPV) et *Potato virus X* (PVX) *Potyvirus* (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2002; Baratova *et al.*, 2004); elles pourraient protéger la surface exposée N-terminale de la CP du PVX de la dégradation (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2002; Olszewski *et al.*, 2010). Les glycoprotéines d'enveloppe du *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) jouent un rôle crucial dans l'acquisition du virus par le vecteur (Thrips) (Bandla *et al.*, 1998), et il est plausible que les N-oligosaccharides présents sur les glycoprotéines de TSWV soient essentiels lors des premières étapes d'interaction virus-vecteur (Naidu *et al.*, 2004).

3. Nucléotidylation et ADP-ribosylation

Initialement identifiée dans des systèmes bactériens, la nucléotidylation a été par la suite découverte chez les mammifères. Deux exemples de nucléotidylation sont décrits, l'adenylylation-deadenylylation et l'uridylylation-deuridylylation. Le groupe 5'-A/UMP d'adénosine/Uridine triphosphate (ATP/UTP) est transféré aux groupes phénoliques (ex : Tyr) par une liaison phosphodiester (**Figure 10A**). L'ADP-ribosylation peut aussi utiliser le nicotinamide adénine di nucléotide (NAD⁺) comme substrat (**Figure 10B**). Le groupe transféré étant un dérivé d'un sucre, l'ADP-ribosylation est parfois classée avec la glycosylation de protéine. On distingue la mono-ADP-ribosylation de la poly-ADP-ribosylation. Cette dernière est initiée par l'addition d'un groupe d'ADP-ribose simple suivi de l'allongement de la chaîne d'ADP-ribose par la poly-ADP-ribosyl polymérase. La poly-ADP-ribosylation intervient lors de la réparation de l'ADN.

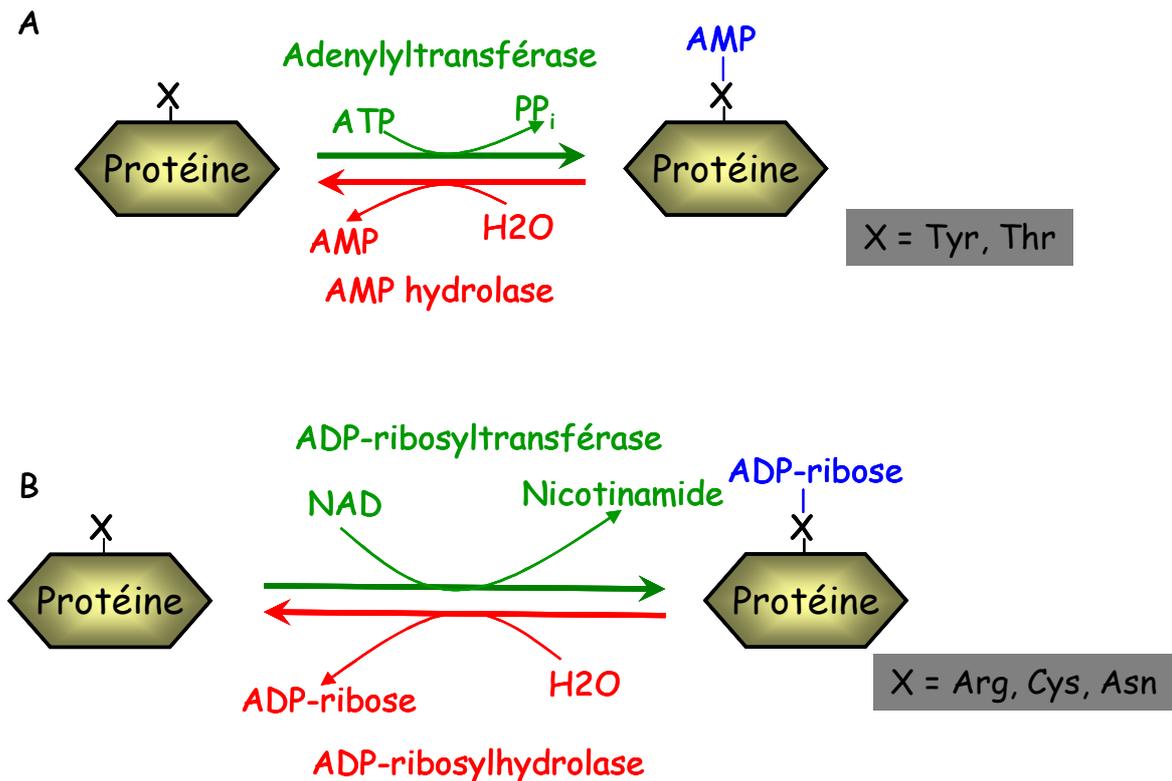


Figure 10 : Réactions réversibles d'adenylation (A) et d'ADP-ribosylation (B). Les enzymes catalysant les modifications et leurs cofacteurs ainsi que le groupe ajouté à la protéine cible sont indiqués. (X) La nature de l'acide aminé est indiquée dans le cadre gris. ATP, adénosine triphosphate ; AMP, adénosine monophosphate ; ADP, adénosine diphosphate ; PP_i, pyrophosphate inorganique ; NAD, nicotinamide adénine di nucléotide.

Ce type de modification est trouvé chez les *Picornavirus* lors de la nucléotidylation de la protéine Vpg. L'initiation de la synthèse d'ARN viral par la RdRp au cours de la réplication des *Picornavirus* exige la formation d'amorce à l'aide de la protéine virale VPg (Pathak *et al.*, 2007). Une liaison phosphodiester entre l'UMP et le groupe hydroxyle d'un résidu tyrosine de la VPg entraîne l'uridylylation de la VPg (Paul *et al.*, 1998; Paul *et al.*, 2000). Une situation similaire est retrouvée chez les *Potyvirus* (Puustinen and Makinen, 2004; Anindya *et al.*, 2005).

III. Modifications d'acide aminé individuel et de chaîne latérale

1. Déamidation

L'enlèvement spontané enzymatique ou non enzymatique d'un groupe amide des résidus glutamine et asparagine produit des changements irréversibles dans la structure des protéines et des peptides (**Figure 11**) [pour revue voir (Wright, 1991)]. La conversion de l'asparagine en acide aspartique ou en acide isoaspartique provoque un changement local de la charge (charge négative), et joue un rôle de régulation des protéines, en modifiant l'activité ou la stabilité de la protéine (Robinson and Robinson, 1991; Robinson and Robinson, 2001; Weintraub and Manson, 2004). La déamidation est reconnue comme une source potentielle de micro-hétérogénéité dans la structure des protéines. Puisque la flexibilité et la liberté de conformation du peptide sont modifiées par la nature des acides aminés, le taux de déamidation des peptides est fortement influencé par les résidus de voisinage (Robinson *et al.*, 2001), en particulier par l'acide aminé en C-terminal du résidu asparagine. Il est optimal lorsque le carboxyle voisin est la glycine (Robinson *et al.*, 2001) mais ce taux est aussi contrôlé par la structure secondaire et tertiaire de la protéine (Rivers *et al.*, 2008).

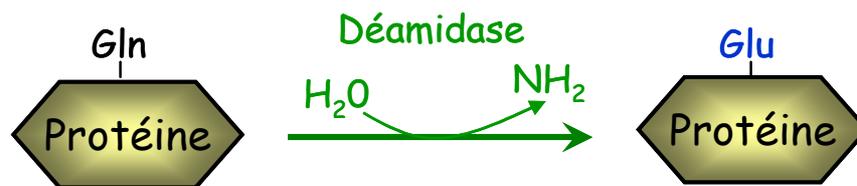


Figure 11 : La déamidation de glutamine (Gln) peut être spontanée ou catalysée par une déamidase. Elle conduit à l'apparition d'un acide glutamique (Glu). Cette modification se produit également sur l'asparagine qui est convertie en acide aspartique.

La toxine CNF1 de certaines souches pathogènes d'*E. coli* provoque des lésions tissulaires suite à la déamidation spécifique d'une glutamine des Rho GTPases. Cela génère des Rho GTPases constitutivement actives et entraîne une modification de la dynamique du cytosquelette d'actine. Cependant, cet effet n'est que transitoire car la cellule hôte

déclenche en réponse la polyubiquitylation des Rho GTPases déamidées conduisant à leur dégradation par le protéasome (Flatau *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1997; Doye *et al.*, 2002). Chez l'*Human rhinovirus* (*Picornavirus*, HRV), la protéase 3C du virus est régulée par déamidation de l'asparagine 164 (Cox *et al.*, 1999). La forme déamidée de la protéase 3C possède une réduction de son activité de clivage par rapport à la forme native.

2. Amidation (C-terminale)

L'amidation est une modification post traductionnelle qui se produit exclusivement à l'extrémité C-terminale de polypeptides, des peptides principalement courts, sécrétés et ayant des fonctions hormonales. La présence du groupe amide est souvent une exigence absolue pour l'activité biologique optimale de ces peptides. Cette réaction s'effectue par le remplacement du groupe carboxyle en C-terminal d'une protéine avec un groupe amide (Bradbury and Smyth, 1991). Le processus implique deux étapes catalysées par deux enzymes, peptidyle-glycine α -hydroxyle mono-oxygénase et peptidyle- α -amide lyase (Walsh and Jefferis, 2006). Un résidu de glycine à l'extrémité C-terminale semble être un prérequis dans l'amidation de peptide.

L'étude de l'interaction de plusieurs peptides amidés avec leurs récepteurs respectifs indique que le groupe amide peut être déterminant pour l'interaction ligand-récepteur (Edison *et al.*, 1999) et empêcherait l'ionisation C-terminale du peptide, le rendant plus hydrophobe pour interagir avec son récepteur (Bignon *et al.*, 1999).

3. Carboxylation

La carboxylation d'acide glutamique en acide γ -carboxyglutamique (Glu \rightarrow Gla) introduit une nouvelle charge et augmente l'acidité de la chaîne latérale (Castellino *et al.*, 2002, 2008). Elle est catalysée par une carboxylase vitamine K-dépendante.

Le modèle de carboxylation de protéine est la modification de prothrombine sur sa région pro-peptide suivie par un clivage à thrombine activée par une protéase. La modification du pro-peptide est une modification requise pour faciliter l'interaction de prothrombine avec sa protéase active en incitant l'association avec les membranes. Si la prothrombine n'est pas carboxylée, aucune association de membrane et aucune activation protéolytique à thrombine ne survient.

D'autres protéines sont connues pour être carboxylées et sont typiquement impliquées dans la coagulation sanguine qui est limitée lors d'une carence en vitamine K. Beaucoup de cibles de carboxylation ont la capacité de lier le calcium, facilitée par les interactions des charges carboxyliques avec Ca^{2+} .

4. Oxydation et Hydroxylation

Certaines PTM oxydatives (oxPTM) ne sont pas préjudiciables aux protéines et ne sont pas nuisibles pour la cellule mais constituent d'importants mécanismes de signalisation. Ces oxPTM sont soit réversibles et impliquées dans des processus physiologiques, ou irréversibles et contribuent alors à des situations pathologiques. Les oxPTM incluent l'oxydation, la chloration ou la nitration. L'oxPTM la mieux caractérisée concerne l'oxydation de la cystéine. En effet, les résidus contenant du soufre (cystéine et méthionine) sont généralement les cibles les plus sensibles à l'oxydation. Si la cystéine est un résidu catalyseur souvent présent dans les sites actifs, son oxydation va influencer directement l'activité de l'enzyme (positivement ou négativement). Si ce résidu n'est pas directement impliqué dans la catalyse, son oxydation peut changer la conformation locale et, éventuellement, modifier l'activité de la protéine, l'interaction entre protéines, la dégradation, ou encore influencer d'autres modifications post-traductionnelles (Spickett and Pitt, 2010). Les résidus de méthionine sont également facilement oxydés mais leur état peut être restauré par l'action de méthionine sulfoxyde réductases (Stadtman *et al.*, 2003). Des oxydations de méthionine, tyrosine, histidine et tryptophane ont également été trouvées dans le tissu de lentille. L'oxo-histidine a été observé entre autres dans le vieillissement et la carcinogénèse [pour revue voir (Schoneich, 2000; Uchida, 2003)].

L'association de groupes hydroxyles aux résidus proline est une modification qui prévaut principalement dans les protéines sécrétées. L'hydroxylation des résidus proline est catalysée par la famille des prolyl hydroxylases contenant le domaine prolyl hydroxylase (PHD). L'hydroxylation de proline a été caractérisée dans la signalisation de HIF (Hypoxia inducible factor) (Kaelin, 2005). L'élimination des groupes hydroxyle, ou une enzyme catalysant une telle réaction, n'a pas encore été découverte [pour revue voir (Deribe *et al.*, 2010)]. Les acides aminés hydroxylés peuvent être ultérieurement méthylés ou glycosylés.

Le collagène est une protéine largement étudiée, et qui possède des caractéristiques structurales uniques en triple spirale, conférées en partie par des résidus hydroxy-proline

et hydroxy-lysine. L'hydroxylation de proline semble être nécessaire à la stabilisation de la forme triple hélicoïdale du collagène. Des études ont montré des influences de stabilisation causée par la 4-hydroxy-proline et la 3-hydroxy-proline (Holmgren *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 2003) mais aussi de l'hydroxy-lysine.

Il faut aussi noter que l'hydroxylation de protéines sur des résidus aspartate en β -hydroxyaspartate (Asp \rightarrow Hya) et d'asparagines en β -hydroxyasparagines (Asn \rightarrow Hyn) est également décrite (Przysiecki *et al.*, 1987; Gronke *et al.*, 1989; Castellino *et al.*, 2002, 2008).

Le *Paramecium bursaria Chlorella virus-1* (PBCV-1) code pour un polypeptide de 242 acides aminés qui montre une similarité de séquences avec l'extrémité C-terminale de la sous unité catalytique α du prolyl 4-hydroxylase (P4H) trouvé chez les animaux. Cette prolyl 4-hydroxylase de PBCV-1 stabiliserait ainsi plusieurs protéines (Eriksson *et al.*, 1999).

5. Sulfatation (Sulfanation)

La sulfatation de tyrosine est une modification post-traductionnelle covalente irréversible, commune chez les protéines synthétisées par la voie de sécrétion de la plupart des eucaryotes, y compris les plantes supérieures, mais absente chez les procaryotes et chez la levure [pour revue voir (Moore, 2003)]. Cette modification de tyrosine est réalisée par deux enzymes appelées tyrosylprotein sulfotransférases (TPST-1 et TPST-2), qui catalysent le transfert du sulfate (SO_3^-) de 3'-phosphoadenosyl-5'-phospho-sulfate (PAPS) au groupe phénolique de la tyrosine afin de former un ester tyrosine O^4 -sulfate [voir revue (Moore, 2003)]. La sulfatation apporte une charge négative supplémentaire dans la protéine et ne cible que les résidus tyrosines. Aucune séquence consensus n'a pu être définie. En général, la sulfatation influence les interactions protéine-protéine, probablement par la modulation de la charge au sein des régions de contact (Kehoe and Bertozzi, 2000; Costagliola *et al.*, 2002).

Les récepteurs des chimiokines et leurs ligands jouent un rôle crucial dans l'immunité innée et adaptative, l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la croissance tumorale et les métastases. De nombreux récepteurs chimiokines possèdent des tyrosines sulfatées (Rossi and Zlotnik, 2000). Par exemple, des tyrosines sulfatées dans le domaine N-terminal extracellulaire de

CCR5, le principal corécepteur du VIH-1, optimisent la fixation du virus aux cellules (Farzan *et al.*, 1999; Choe *et al.*, 2003).

Chez les plantes, une seule TPST a été identifiée. Cette enzyme ne possède pas d'homologie de séquence avec les deux TPST chez les autres organismes. Deux hormones peptidiques sulfatées (PSK, un peptide sécrété de 5aa contenant 2 tyrosines sulfatées et PSY1, un peptide de 18aa contenant une tyrosine sulfatée) ont été identifiées chez les plantes et leur sulfatation est essentielle à leurs fonctions dans la croissance et le développement (Komori *et al.*, 2009).

6. Acylation (acétyle-, formyle-, pyroglutamyle-)

L'acétylation de protéines est le type de modification covalente le plus rencontré chez les eucaryotes. L'acétylation, décrite pour la première fois pour les protéines d'histones (Vidali *et al.*, 1968), implique le transfert d'un groupe acétyle « COCH₃ » d'un acétyl-Coenzyme-A à un groupe amine accepteur, typiquement un groupe α -amine des résidus terminaux de la protéine ou, moins souvent, la chaîne latérale (le groupe ϵ -amine) du résidu lysine (**Figure 12**). Les modifications de partie terminale (irréversibles) ou celles de la chaîne latérale (réversibles) sont catalysées par des acétyltransférases (Polevoda and Sherman, 2002). L'acétylation induit la neutralisation de charge de la chaîne latérale positivement chargée ou du groupe amine de N-terminal et altère les propriétés biologiques des protéines (Deribe *et al.*, 2010). Contrairement à la modification de la ϵ -Lys, l'acétylation N-terminale, catalysée par des N-terminal acétyltransférases (NAT), se produit sur la plupart des protéines eucaryotes mais rarement sur les polypeptides procaryotes (Polevoda and Sherman, 2002, 2003). Approximativement, 50% des protéines cellulaires sont acétylées à leur extrémité N-terminale. Aucun motif consensus simple n'a été déterminé et la complexité de ce type d'acétylation se reflète dans l'existence de multiples NAT, chacun agissant sur différents groupes d'extrémités N-terminales.

L'acétylation des protéines est apparue comme étant potentiellement aussi importante que la phosphorylation dans la régulation des signaux de transduction cellulaires. Au-delà de leur rôle dans l'activation/répression de la transcription, les acétyltransférases ont été impliquées dans l'un des événements qui incluent la réparation de l'ADN, la réplication, la recombinaison et l'apoptose, mais aussi dans la stabilisation des protéines, l'import et la rétention nucléaire, la progression du cycle cellulaire et la différenciation [pour revue voir

(Kouzarides, 2000; Chen *et al.*, 2001; Starheim *et al.*, 2009b; Starheim *et al.*, 2009a)]. Si cette PTM apparait cruciale dans le noyau, elle est aussi impliquée dans la régulation de processus cytoplasmiques comme la dynamique du cytosquelette, le métabolisme énergétique, l'endocytose, l'autophagie ou la signalisation à la membrane plasmique (Matthias *et al.*, 2008; Yang and Seto, 2008).

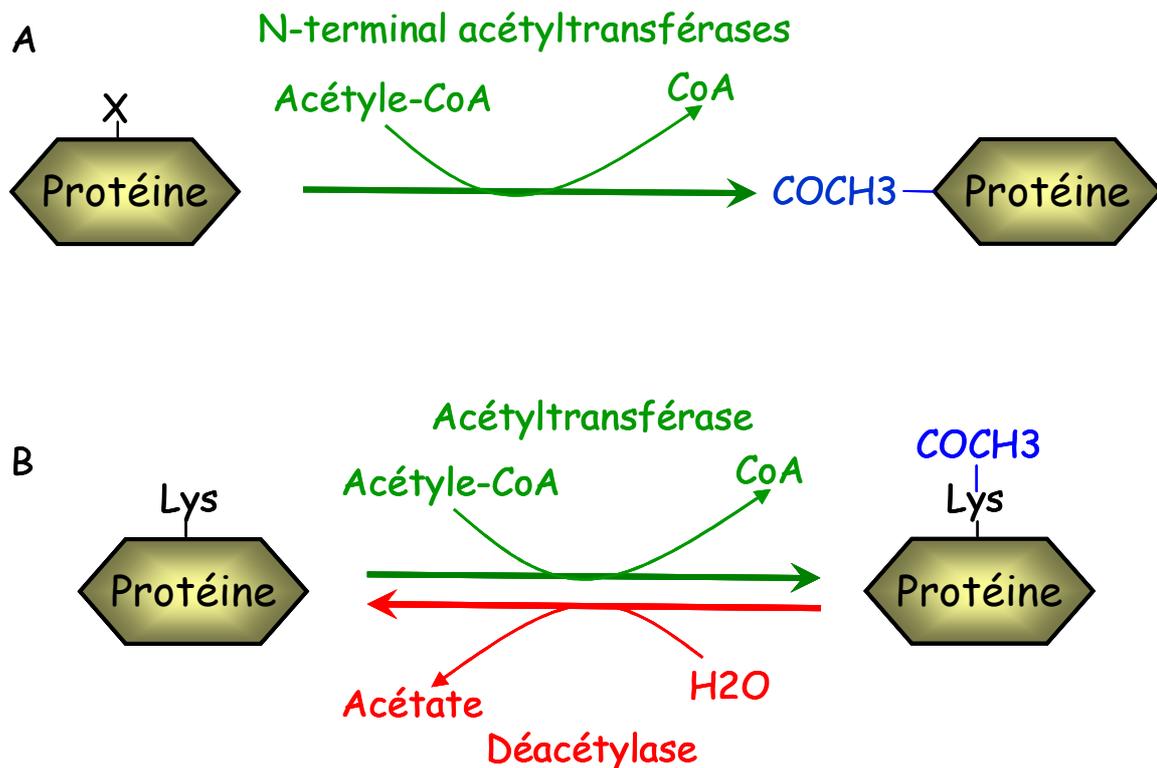


Figure 12 : Acétylation N-terminale (A) et de chaîne latérale ϵ -amine de lysine (B). Les enzymes impliqués et leurs cofacteurs sont indiqués. Lys représente la lysine modifiée dans la chaîne latérale (le groupe ϵ -amine) ; coA, coenzyme A.

L'acétylation de lysine est connue dans plus de 80 facteurs de transcription et affectant leur fixation à l'ADN, leur adressage nucléaire, leur phosphorylation, leur ubiquitination et leur stabilité [pour revue voir (Yang, 2004; Deribe *et al.*, 2010)]. La protéine p53, suppresseur de tumeur, joue un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN et en réponse à divers stress génotoxiques. Cette protéine subit plusieurs types de modifications post traductionnelles qui règlent ses fonctions. Elle est, entre autres, acétylée par la protéine p300/CBP au niveau de multiples résidus de lysine en C-terminal du domaine de fixation à l'ADN (Luo *et al.*, 2004). L'acétylation de p53 active son activité de fixation spécifique à l'ADN et augmente l'activation de ses gènes cibles. Les lysines acétylées de la protéine p53 sont identiques aux lysines cibles d'ubiquitination.

L'acétylation de la protéine p53 stabilise la protéine en empêchant sa dégradation par le protéasome (voir plus bas). L'acétylation influence également les interactions protéine-protéine. C'est le cas de la protéine de choc thermique 90 (HSP90), dont l'acétylation augmente son interaction avec le récepteur des glucocorticoïdes (Kovacs *et al.*, 2005).

Chez les virus, l'acétylation joue également un rôle clé. Puisque les protéines virales sont exprimées et dépendantes des cellules hôtes, ces protéines peuvent être des cibles de plusieurs types de modifications post traductionnelles. Il a été décrit que les protéine E2 (*Papillomavirus*) et Tat (*Lentivirus*) sont acétylées (Caron *et al.*, 2003). Dans le cas de *Hepatitis delta virus* (HDV), un virus à ARN circulaire de polarité négative, les études indiquent que la petite protéine antigène SHDAg (small hepatitis delta antigen) est une protéine acétylée et que son état d'acétylation affecte la réplication de HDV (Huang *et al.*, 2008).

Chez les virus de plantes, des protéines virales interagissent avec des acétyles transférases et/ou subissent de modification de type d'acétylation. En effet, une protéine de mouvement NSP (nuclear shuttle protein) du *Cabbage leaf curl virus* (*Begomovirus*, CaLCuV) interagit avec une acétyle transférase d'*Arabidopsis* appelé *Arabidopsis thaliana* nuclear shuttle protein interactor (AtNSI) qui est capable d'acétyler les histones H2A, H3, et la protéine de capsid du CaLCuV mais pas la NSP (McGarry *et al.*, 2003). La protéine NSP peut inhiber l'activité de la protéine AtNSI en interférant avec son assemblage dans des complexes actifs et régule l'export nucléaire du génome viral. L'inhibition de la protéine AtNSI favoriserait la différenciation cellulaire et donc la réplication virale (Carvalho and Lazarowitz, 2004; Carvalho *et al.*, 2006).

Excepté la chaîne thiol de la cystéine, l' ϵ -amine de la lysine est le plus fort groupement nucléophile retrouvé sur les protéines et il peut donc subir une variété de réactions chimiques. N^ε-acétylation, N^ε-méthylation et N^ε-formylation présentent des similarités (**Figure 13**). La formylation est reconnue comme une nouvelle modification post-traductionnelle de la lysine se produisant lors des mécanismes de régulation des histones (Jiang *et al.*, 2007). La formylation des histones sur des lysines, également cibles d'acétylation et de méthylation, influence la fonction des histones et la stabilisation des sites de liaison des protéines régulatrices comme les facteurs de transcription et les régulateurs de l'activité de la chromatine (Wisniewski *et al.*, 2008).

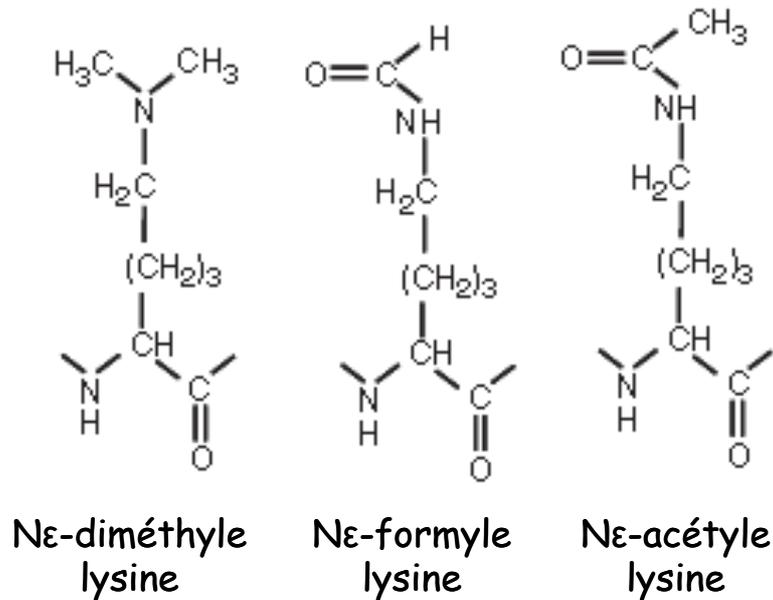


Figure 13 : Méthylation, formylation et acétylation de la chaîne latérale ε-amine de la lysine.

La formylation de lysines est stimulée par le stress oxydatif et cette modification peut être impliquée dans le développement des maladies liées au stress, y compris le cancer. En effet, la formylation de lysine peut être impliquée dans la perte de la fonction des protéines dans l'organisme d'une manière analogue à d'autres modifications chimiques, tels que la glycosylation dans le diabète (Vlassara and Palace, 2002) ou des dommages oxydatifs au cours du vieillissement (Huang and Manton, 2004).

Les protéines structurales du virus BK (*polyomavirus*, BKV) subissent plusieurs types de modifications post traductionnelles dont la formylation ; cependant le rôle de ces PTM dans le cycle d'infection du virus n'a pas encore été élucidé (Fang *et al.*, 2010).

La formation de pyroglutamate à partir d'un résidu glutamine ou d'un acide glutamique présent à l'extrémité N-terminale des protéines est un événement ubiquitaire réversible qui peut survenir spontanément ou par catalyse enzymatique. Cet élément structurel important contrôle la conformation, la stabilité thermodynamique ou l'activité de protéines cibles comme certaines ribonucléase (Lou *et al.*, 2006) et hormones sécrétées grâce à des glutaminyl cyclases (Fischer and Spiess, 1987). La présence de pyroglutamate peut augmenter la stabilité des protéines en inhibant l'action des aminopeptidases [pour revue voir (Cummins and O'Connor, 1998; Lou *et al.*, 2006)] et est retrouvée sur les immunoglobulines.

7. Méthylation

La méthylation est une modification présente sur beaucoup de résidus incluant la lysine, l'arginine, l'histidine, la cystéine, l'acide aspartique et l'acide glutamique qui sont des cibles pour différentes méthyle-transférases. La conjugaison réversible du groupe méthyle aux résidus lysine et arginine est une modification post traductionnelle importante chez les eucaryotes et les procaryotes. De façon similaire à d'autres PTM, deux groupes d'enzymes, méthyltransférase et déméthylases, régulent le statut de méthylation des protéines cibles. Le donneur de méthyle activé est la S-adenosylméthionine (AdoMet). À la différence de l'acétylation, la méthylation de résidus lysine n'a aucun effet sur la charge mais modifie l'hydrophobicité. La méthylation des protéines non histones au niveau des résidus lysine influence généralement leur stabilité et leur fonction, la régulation de leurs interactions avec l'ADN et des partenaires protéiques, et inhibe d'autres modifications sur la même lysine [voir revue (Egorova *et al.*, 2010)]. La lysine et l'arginine peuvent être multi méthylées. Certaines mono-, di-et tri-méthylations ont été observées sur des protéines d'*E. coli*, des chaînes légères de myosine, histones, le cytochrome c et des protéines ribosomales.

L'activité de la protéine p53 est principalement régulée au niveau post-traductionnel par modification de plus de 36 acides aminés. Cette protéine peut subir des méthylations de son domaine C-terminal sur les résidus K370, K372, K382, K386 (Kachirskaia *et al.*, 2008) dont l'activité sera régulée positivement ou négativement selon les sites de méthylation et leur degré de méthylation [pour revue voir (Deribe *et al.*, 2010; Egorova *et al.*, 2010)].

L'identification des enzymes Méthyle-transférase d'arginine chez l'homme, les levures, *Drosophila melanogaster*, les plantes, le *Caenorhabditis elegans*, et les poissons suggère l'importance de cette modification chez les eucaryotes (Bedford and Richard, 2005; Bedford, 2007). La méthylation de résidus arginine a été initialement observée sur les protéines abondantes telles que les protéines qui fixent l'ARN (certaines protéines ribosomales) et les histones. Depuis, une multitude de protéines possédant des arginine méthylées sont décrites. Ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la signalisation par l'interféron et des cytokines, la transcription, la traduction. On retrouve également de telles protéines modifiées dans le noyau [pour revue

voir (Egorova *et al.*, 2010)]. La méthylation des résidus arginines semble essentielle pour réguler la fonction des protéines telles que les interactions protéine-protéine. Le fait que les méthyl-arginines soient présentes dans les principales protéines de signalisation suggère que la méthylation de l'arginine représente un niveau supplémentaire de complexité dans la transduction du signal [pour voir revu (Boisvert *et al.*, 2005)].

Il existe trois formes de méthylation d'arginine chez les eucaryotes : ϵ -N^G, monométhyl-arginines (MMA), ϵ -N^G,N^G -asymétrique diméthyl-arginines (aDMA), ϵ -N^G,N^G -symétrique diméthyl-arginines (sDMA). Deux classes de protéine arginine méthyle-transférases ont été caractérisées et classifiées selon la symétrie de leurs produits de réaction (Bedford, 2007). Les enzymes de type I (qui contient les enzymes 1, 2, 3, 4, 6) et de type II (l'enzyme 5) produisent N^G-monométhyl-arginine. Cependant, tandis que les protéines de type I permettent la formation de diméthyl-arginines N^G,N^G -asymétrique, l'enzyme 5 de type II catalyse la formation de diméthylarginines N^G,N^G -symétrique (Mowen and David, 2001; Mowen *et al.*, 2001).

Une variante unique de groupe α -carboxyle méthylation est trouvée dans des résidus d'acides aspartiques. Ces modifications proviennent de la de-amidation de résidus asparagine *via* un intermédiaire cyclique-imide qui conduit à la formation d'un lien amide inhabituel avec le groupe β -carboxyle (à la place de α -carboxyle) de l'acide aspartique ou à un résidu acide iso-aspartique (Aswad, 1984). L'acide iso-aspartique est la cible spécifique de l'iso-aspartyle méthyle-transférase qui peut régénérer un acide aspartique. Il a été proposé que le processus de méthylation agisse comme un mécanisme de réparation pour rendre la structure de base natale après des dégâts de la de-amidation (Lowenson and Clarke, 1991).

La méthylation de la chaîne latérale des groupes carboxyles est aussi trouvée pour des résidus d'acides glutamiques, bien qu'elle soit propre aux protéines de chimiotactisme bactérien.

La prénylation de protéine réalisée sur la cystéine située dans le motif CAAX (décrit précédemment) en C terminale des protéines est couramment suivie par une étape protéolyse pour éliminer les résidus AAX ; une méthylation du groupe carboxyle de la cystéine se produit ensuite pour assurer la fonction de protéine [pour exemple voir (Inglese *et al.*, 1992)].

Chez l'Adénovirus Ad5, la protéine non structurale de 100-kDa de la région 4 tardive (L4-100K) est une phosphoprotéine multifonctionnelle qui présente une modification post traductionnelle de type méthylation d'arginine. L4-100K régule entre autre la traduction

des ARNm viraux en interagissant à la fois avec la séquence tripartite leader (TL) des transcrits viraux et le facteur d'initiation de la traduction eIF4G. Cette protéine contient trois motifs Arg-Gly-Gly (RGG) suivis par des séquences riches en Gly et Arg (GAR) dans son extrémité C-terminale, ces motifs sont trouvés chez toutes les protéines cibles de la méthylation d'arginine par les enzymes PRMT de type 1 (Koyuncu and Dobner, 2009).

La protéine Tat d'HIV est également méthylée sur une arginine, ce qui a pour effet de réprimer l'expression de gènes du HIV (Boulanger *et al.*, 2005). Un des facteurs de l'élongation de transcription les plus importants est le SPT5. La méthylation de ce facteur est impliquée dans la régulation de sa fonction d'élongation transcriptionnelle. Dans le même sens, l'inhibition de la méthylation de la petite protéine antigène SHDAg du *Hepatitis delta virus* (HDV) affecte sa localisation subcellulaire et inhibe aussi la réplication du virus (Li *et al.*, 2004b). Ces données suggèrent que l'inhibition de ce type de modification post traductionnelle pourrait assurer une protection contre certains virus.

8. Phosphorylation

La plupart des processus cellulaires sont régulés dans une ou plusieurs voies par la phosphorylation et la déphosphorylation (**Figure 14**). Cette modification réversible joue un rôle crucial dans la transduction du signal et la régulation de nombreux aspects de la fonction cellulaire dans des organismes divers incluant les plantes (Mukherji, 2005). Depuis sa découverte par Fischer et Krebs (Krebs and Fischer, 1964; Fischer and Krebs, 1966), l'interaction dynamique entre les protéines kinases et phosphatases constitue un très grand centre d'intérêt.

La phosphorylation de protéines est une PTM universelle [pour revue voir (Cohen, 2002; Hunter, 2007; Ribet and Cossart, 2010)]. Elle implique des protéines kinases qui transfèrent le γ -phosphate de l'ATP (plus rarement du GTP) à neuf acides aminés (sérine, thréonine, tyrosine, cystéine, arginine, lysine, aspartate, glutamate et histidine). Le groupe phosphoryle est attaché par des liaisons ester à la sérine, la thréonine et à la tyrosine, des liaisons amide à l'histidine et la lysine, des liaisons thioester sur la cystéine et enfin des liaisons anhydride sur l'acide aspartique et glutamique (Swanson *et al.*, 1994). À pH physiologique, une addition de phosphate apporte deux charges négatives supplémentaires sur la protéine.

Introduction générale

Chez les eucaryotes, les phosphorylations prédominantes concernent les acides aminés sérine, thréonine et tyrosine (Hunter, 2007). La déphosphorylation de protéines met en jeu des phosphatases (Hunter, 1995; Engh and Bossemeyer, 2001). Tout comme les autres PTM, l'état de phosphorylation d'une protéine induit des changements de structure et par conséquent influence son activité, son interaction avec d'autres protéines ou biomolécules, sa localisation subcellulaire et sa stabilité (Stone and Walker, 1995; Johnson and Lewis, 2001; Narayanan and Jacobson, 2009).

La distribution des phosphorylations majeures de résidus sérine, thréonine et tyrosine est respectivement de 86.4, 11.8 et 1.8% chez l'homme et 69, 22 et 9% chez les bactéries (Olsen *et al.*, 2006). Dans cas du système à deux composants, retrouvé chez les bactéries et chez les plantes, la phosphorylation de résidus aspartate et histidine a été bien caractérisée et est plus importante qu'initialement décrite (Macek *et al.*, 2008; Soufi *et al.*, 2008). Ce processus réversible permet aux cellules de répondre d'une façon dynamique à une myriade de signaux. Chez les plantes, la phosphorylation a pu être corrélée avec la réaction de l'organisme vis-à-vis des facteurs internes et externes, comme la lumière, l'invasion de pathogènes, des hormones, les stress abiotiques comme la température et le manque de nutrition (Hardie, 1999). Le rôle de la phosphorylation de protéine est devenu rapidement apparent avec la découverte qu'environ 4 % du génome humain peut coder les protéines kinases et phosphatases, ce qui représente plusieurs milliers d'enzymes différentes (Taylor *et al.*, 1995). Ces protéines constituent généralement 1,5-2% des gènes codés par un génome type d'eucaryotes (Manning *et al.*, 2002). La surexpression ou le dysfonctionnement de protéines kinases est souvent associé à l'apparition de certaines maladies.

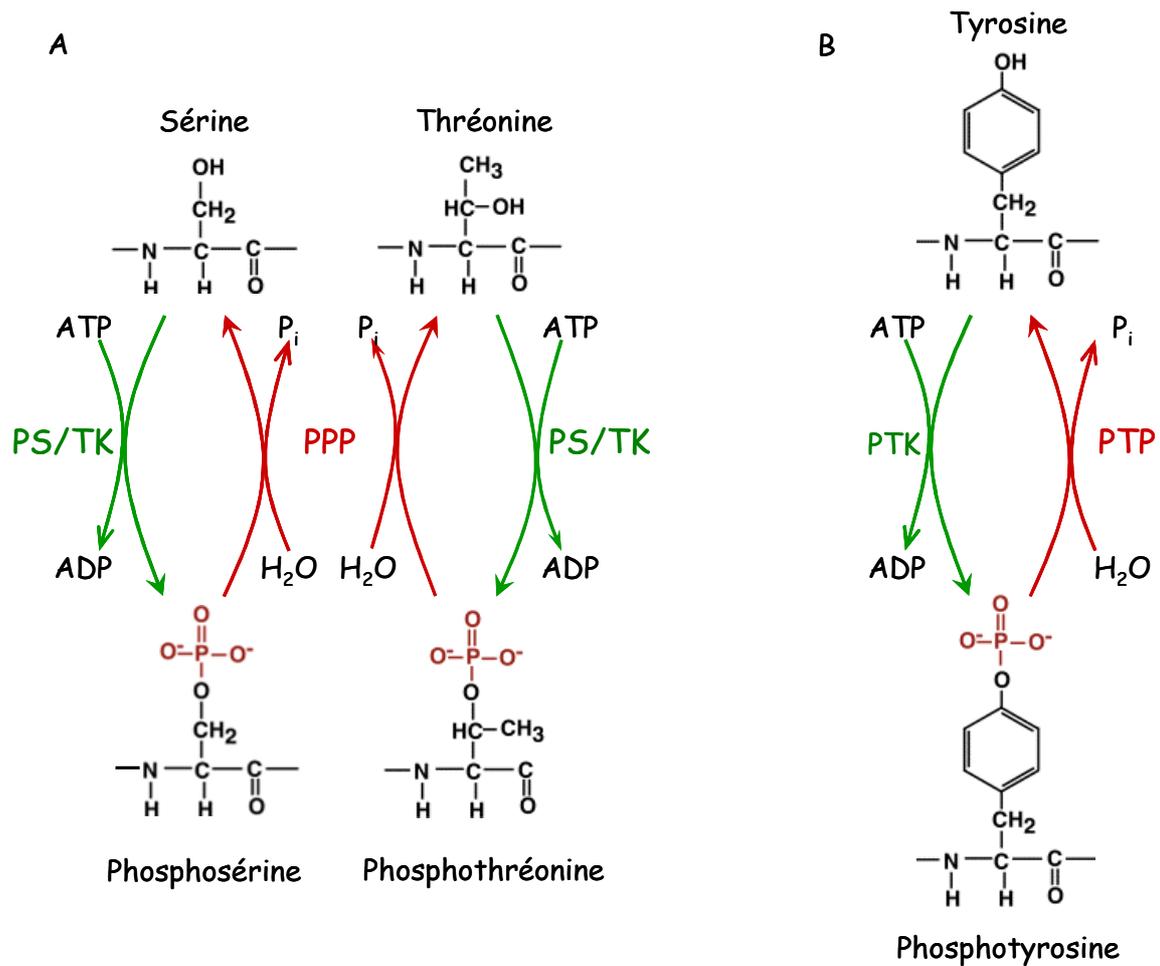


Figure 14 : Représentation schématique des réactions de la phosphorylation et de la déphosphorylation sur les résidus sérine, thréonine (A) et tyrosine (B). Les protéines kinases et phosphatases catalysant ces réactions réversibles sont indiquées. P_i, phosphate inorganique ; ATP, adénosine triphosphate ; ADP, adénosine diphosphate ; PS/TK, Protéines Sérine/Thréonine Kinase ; PTK, Protéines Tyrosine Kinase ; PPP, Phosphoprotéines Phosphatases ; PTP, Protéines Tyrosine Phosphatases.

i. Les protéines Kinases (PK)

Un réseau de protéines kinases et phosphatases reçoit des signaux de l'environnement extérieur par les protéines réceptrices et modifie la réponse de la cellule par l'utilisation de la phosphorylation des protéines ciblées. L'activation des cascades de protéines kinases est le mécanisme majeur par lequel des cellules répondent aux changements de l'environnement extracellulaire. Il semble aussi être le mécanisme majeur par lequel les processus cellulaires discontinus (comme la réplication d'ADN) sont activés et désactivés (Manning *et al.*, 2002). Dans la majorité des cas, la protéine kinase est exprimée constitutivement et activée par phosphorylation (auto phosphorylation ou non), par déphosphorylation, par un activateur allostérique (comme l'AMP cyclique, le 5'-AMP, le

Ca²⁺ ou encore le diacylglycérol), ou la liaison d'une protéine régulatrice (ex : cycline) ou par leur localisation subcellulaire.

Chez les plantes, les voies de protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) jouent plusieurs rôles dans la transduction du signal, y compris celui de la réponse à des agents pathogènes, des blessures et les stress abiotiques. Ainsi, plusieurs classes de kinases sont impliquées dans les réponses de défense des plantes. Les agents pathogènes sont perçus, ce qui induit des cascades de signaux et réponses rapides (Mundy and Schneitz, 2002; Rodriguez *et al.*, 2010).

L'annotation actuelle de familles de protéines chez *Arabidopsis* prévoit environ 1055 kinases (en comparaison avec les 518 protéines kinases identifiées chez l'homme représentant 1,7 % du génome), ce qui correspond à environ 4 % des protéines codées. *Arabidopsis* ne possède pas de gènes codant pour des composants de grandes voies de signalisation tels que Hedgehog, JAK/STAT, Notch, Wingless, et Receptor tyrosine kinase mais un grand nombre de protéines réceptrices sérine/thréonine kinases (receptor-like kinases, RLK), et des histidine kinases du système à deux composants (Champion *et al.*, 2004).

Les protéines kinases sont classées selon leur structure et leur séquence (Cheek *et al.*, 2002; Cheek *et al.*, 2005), leur localisation subcellulaire (cytosoliques ou membranaires) et l'acide aminé cible (Tyrosine kinases et Sérine/Thréonine kinases). Globalement, ces protéines sont structurellement reliées entre elles et contiennent des résidus conservés (Hanks and Quinn, 1991; Hunter, 1995; Johnson and O'Reilly, 1996). Le domaine catalytique conservé se compose d'environ 230-280 résidus et a été subdivisé en 12 sous-domaines, parfois séparés par des grandes insertions d'acides aminés (Hanks and Hunter, 1995). Les domaines catalytiques de toutes les protéines kinases semblent avoir des structures tridimensionnelles semblables et un site de fixation de Mg²⁺ et d'ATP.

Je citerai ici quelques exemples de ces protéines kinases.

a. Les protéines Sérine/Thréonine Kinases (PS/TK)

Les Sérine/Thréonine kinases phosphorylent le groupement hydroxyle de résidus sérines et/ou thréonines spécifiques d'une protéine cible (**Figure 14A**). L'activité de ces protéines est sous le contrôle d'une ou plusieurs molécules intracellulaires comme l'AMPc, le GMPc, le diacylglycérol (DAG), le Ca²⁺ et la calmoduline. La reconnaissance entre la protéine kinase et la cible s'effectue *via* des interactions ioniques et hydrophobes) et concerne dans la majorité des cas une famille de protéines substrats (et pas une protéine unique).

- **Les protéines Sérine/Thréonine Kinases dépendantes des nucléotides cycliques**

Parmi les PS/TK dépendantes des nucléotides cycliques se trouve la protéine kinase A (PKA), activée par l'AMPc, qui cible un résidu sérine (rarement un résidu thréonine) précédé de 2 ou 3 arginines. Cette protéine cytosolique participe aux régulations de nombreux processus cellulaires des voies métaboliques, à l'organisation du cytosquelette et au contrôle de la traduction de l'ARN. Son activation inhibe l'apoptose dans certains types de cellules (Cross *et al.*, 2000). La PKG, très similaire à PKA, est activée par le GMPc et cible un résidu sérine précédé de 2 à 3 Arginines ou lysines. Elle intervient dans la division cellulaire, la régulation de la relaxation du muscle lisse et dans la spermatogenèse [pour revue voir (Shi *et al.*, 2005; Vaandrager *et al.*, 2005; Schlossmann and Desch, 2009)].

Trois classes de protéines kinases C (PKC), des S/TK dépendantes des nucléotides cycliques sont quant à elles activées par le diacylglycérol (DAG). Ces protéines sont impliquées entre autres, dans la régulation de l'expression génomique, la prolifération cellulaire (Griner and Kazanietz, 2007; Saurin *et al.*, 2009). D'autres PS/TK dépendantes des nucléotides cycliques sont dépendantes du couple Ca^{2+} /calmoduline (CaM kinases). Elles interviennent principalement dans le métabolisme énergétique (Gaines *et al.*, 2008; Swulius and Waxham, 2008).

- **Les protéines Sérine/Thréonine Kinases dépendantes de la cycline (CDK)**

Les S/T protéines kinases renferment aussi des protéines kinases dépendantes de la cycline (CDK). Ces protéines interviennent dans la division cellulaire, la régulation de la transcription, la différenciation cellulaire et la mort cellulaire (Knockaert *et al.*, 2002). Elles sont nécessaires dans la réplication de certains virus comme le HIV-1, HSV-1 et HSV-2.

- **Les "Mitogen-Activated Protein Kinases" (MAPK)**

Les "Mitogen-Activated Protein Kinases" ou MAPK sont des protéines S/T kinases. Elles jouent un rôle crucial dans la transduction du signal chez les eucaryotes, participent à la régulation de plusieurs réponses cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Ces MAPK visent une grande variété de substrats tels que des protéines kinases et des facteurs de transcription (Yang *et al.*, 1997). Parmi ces protéines, les kinases p38, JNK interviennent dans les réponses au stress cellulaire.

Les protéines Sérine/Thréonine Kinases bactériennes sont souvent similaires à celles d'eucaryotes (Lee and Jia, 2009). Notons ici que la phosphorylation de sérine et tyrosine a été retrouvée dans certaines espèces de bactéries (Stulke, 2010).

b. Les protéines Tyrosine Kinases (PTK)

Les protéines Tyrosine kinases, comme leur nom l'indique, phosphorylent le groupement hydroxyle de certains résidus tyrosine d'une protéine cible (**Figure 14B**). Ces protéines TK sont membranaires ou cytosoliques.

▪ Les protéines Tyrosine Kinases cytosoliques

Ces protéines sont classées en plusieurs familles de TK cytosoliques : la famille Src (identifié du virus 'Rous Sarcoma') et Abl. Elles sont généralement activées par des facteurs de croissance et participent aux processus cellulaires distincts tels que la différenciation, la division cellulaire, la synthèse d'ADN, la migration cellulaire, et leurs dysfonctionnements induit des maladies telles que des cancers, des leucémies (Li, 2005) ou des maladies auto-immunes (Lawrence and Niu, 1998).

▪ Les protéines Tyrosine kinases réceptrices transmembranaires "transmembrane receptor-linked kinases"

Les Tyrosine Kinases membranaires présentent la propriété de récepteurs enzymatiques et sont activées par un ligand. Ces TK membranaires incluent par exemple le récepteur de l'insuline (Sun *et al.*, 1991) et les récepteurs de nombreux facteurs de croissance cellulaire comme le facteur épidermique de croissance, l'EGF, et le facteur de croissance des fibroblastes, le FGF.

Chez *Arabidopsis*, environ 630 récepteurs-like kinases (RLK) ont été identifiées et pourraient être impliquées dans divers processus physiologiques et des réponses au stress (Kameyama *et al.*, 2000; Kazuhisa *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003). Ces RLK seraient pour la plupart des sérine/thréonine kinases (Shiu and Bleecker, 2001; Lehti-Shiu *et al.*, 2009).

Des protéines kinases à double spécificité (PSTYK) ont été identifiées chez les plantes et seraient capables de phosphoryler les résidus sérines, thréonines et tyrosines (Feng *et al.*, 1993; Ali *et al.*, 1994; Tregear. *et al.*, 1996). Certaines protéines MAPK, par exemple, sont activées par double phosphorylation de la thréonine et la tyrosine dans le motif Thr-Glu-Tyr (TEY) dans la boucle d'activation (Zhang and Klessig, 2001).

c. Les protéines Histidine Kinases

Cette famille, distincte des autres familles de kinases, contient des enzymes qui fonctionnent chez les procaryotes et les eucaryotes comme un élément essentiel du système de transduction du signal connu à deux composants (two component system) qui implique des protéines histidine kinases qui ne ressemblent pas aux familles de protéines sérine/thréonine et tyrosine kinases, que ce soit en termes de séquence ou de structure.

Structurellement, le domaine histidine kinase appartient à une ancienne famille d'enzymes qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse d'ATP pour réaliser des réactions comme la topoisomérase II et la chaperone Hsp90 (Tanaka *et al.*, 1998; Bilwes *et al.*, 1999; Stock, 1999). Des similitudes de séquences restent limitées entre les histidines kinases et les protéines sérine kinases mitochondriales qui phosphorylent de grands complexes enzymatiques (Popov *et al.*, 1993; Thelen *et al.*, 1998).

Le système à deux composants est un mécanisme de régulation de la transduction des signaux chez les bactéries, les levures, les champignons et les plantes. Il est constitué d'un senseur histidine kinase et d'un régulateur de réponse affectant, par exemple, l'interaction avec d'autres protéines ou la liaison à l'ADN (Stock *et al.*, 2000; Varughese, 2002; Azuma *et al.*, 2007).

Le senseur kinase histidine est constitué d'un domaine N-terminal responsable de la détection des stimuli, un domaine contenant une histidine acceptrice (un domaine histidine kinase A, HisKA) et un domaine kinase de liaison à l'ATP (histidine kinase ATPase, HATPase). Le résidu histidine conservé du domaine HisKA subit une autophosphorylation par le domaine HATPase. La plupart des régulateurs de réponse consistent en un domaine N-terminal récepteur (REC) et un domaine C-terminal effecteur. Un résidu aspartate conservé du domaine REC reçoit le groupe phosphoryle de l'histidine du domaine HisKA du senseur histidine kinases qui régule l'activité du domaine effecteur. Ceci implique une réaction unique de transfert de phosphate (His-Asp). Il existe un autre système comprenant des étapes multiples qui catalysent trois réactions de transfert de phosphate (His-Asp-His-Asp). Ces réactions de transfert s'effectuent entre l'histidine phosphorylée d'un domaine HisKA et le domaine intermédiaire REC puis le transfert du phosphate à une seconde histidine (HPT, Histidine phospho transfert) et enfin la phosphorylation d'un acide aspartique du domaine REC du régulateur de réponse (Stock *et al.*, 2000; Lohrmann and Harter, 2002).

ii. Les protéines Phosphatases

Les protéines phosphatases catalysent la déphosphorylation de phosphoprotéines (**Figure 14**) et jouent donc un rôle essentiel dans le maintien de la stabilité entre état phosphorylé et non phosphorylé d'une protéine. Les protéines phosphatases contrôlent les mêmes fonctions cellulaires que les kinases et sont régulées en réponse aux stimuli intra et extracellulaires. Contrairement aux protéines kinases, les protéines phosphatases sont plus variées et regroupées en quatre familles structurellement et fonctionnellement distinctes selon leur type de substrat, leurs structures secondaires et tertiaires (Barford, 1995; Moorhead *et al.*, 2009).

Tableau 1 : Résumé du nombre et des types de protéines phosphatases codées par des gènes chez Arabidopsis et l'Homme [adapté de (Kerk *et al.*, 2008)].

Famille de Protéine Phosphatase	Gènes d'<i>Arabidopsis</i>	Gènes Humains
Famille de Ser/Thr phosphatase PPP	26	13
Famille de PPM (PP2C)	76	18
Superfamille PTP (CX5R)	24	103
Class I PTP (classic)	1	38
Class I PTP (DSP)	22	61
Class II PTPs (CDC25)	0	3
Class III PTPs (LMWPTP)	1	1
Asp-based catalysis (DXDXT/V)	23	13
FCP-like	19	8
Famille de HAD (chronophins)	3	1
Famille HAD (EYA)	1	4
Total	149	147

a. Les protéines Sérines/Thréonine Phosphatases (PPP)

Les sérines/thréonines phosphatases sont des protéines multimériques (à l'exception des phosphatases 2C, monomériques) considérées comme étant très anciennes et qui appartiennent à une grande famille distincte des tyrosines phosphatases (PTP). La famille PPP, ubiquitaire, est définie par les trois motifs (-GDXHG-, -GDXVDRG- et -GNHE-) retrouvés dans un domaine catalytique d'environ 280 acides aminés. Elle comporte quatre sous-familles, les protéines phosphatases 1 (PP1), les protéines phosphatases 2A (PP2A), les protéines phosphatases 2B (PP2B) et les protéines phosphatases 2C (PP2C) actuellement classées dans la famille PPM (Kerk *et al.*, 2008). Les protéines PP2B sont absentes chez les plantes qui possèdent un plus grand nombre de protéines de type PP1 (au moins 9 gènes), PP2A (6 gènes), PP2C (76 gènes) et une douzaine d'autres phosphatases (PP4, PP5, PP6 et PP7) (Kinoshita *et al.*, 1993; Andreeva *et al.*, 1998; Kerk *et al.*, 2008). La phosphatase PPKL appartient à une famille unique de type PP1 possédant un domaine N-terminal renfermant le motif Kelch répété. La famille PPKL contient 4 protéines identifiées chez *Arabidopsis thaliana* et la protéine PfPP α identifiée chez *Plasmodium falciparum*. Des membres de cette famille ont été identifiés chez d'autres espèces de plantes, mais à ce jour aucun membre n'a été identifié chez les animaux, les champignons ni chez les procaryotes (Moorhead *et al.*, 2009).

b. Les Protéines Phosphatases Magnésium-dépendant (PPM)

Un isoforme α de PP2C a été identifié et est appelé (PP2C α) ou Protéine Phosphatase Magnésium-dépendant 1A (PPM1A). Les phosphatases PPM, qui comprennent les PP2C et le pyruvate déshydrogénase phosphatase, sont des enzymes à Mn^{2+}/Mg^{2+} spécifiques des sérines/thréonines (Barford, 1996; Cohen, 1997). Chez les eucaryotes, elles possèdent 11 motifs renfermant neuf acides aminés hautement conservés, dont quatre acides aspartatiques. La majorité des déphosphorylations de phospho-sérines et phospho-thréonines fait appel à des PPP et PPM (Moorhead *et al.*, 2009).

Contrairement aux enzymes de la famille PPP qui sont en grande partie conservées dans la structure primaire chez les plantes et les animaux, les PP2C de plantes partagent une faible homologie avec celles des animaux (seulement 20-35% d'identité au niveau des acides aminés) et possèdent une extension unique N-terminale absente des enzymes animales ou fongiques (Luan, 2003). Les PP2C de plantes interviennent dans la transduction du signal ABA, la régulation de la fonction d'au moins quelques récepteurs-like kinases, et elles ont un rôle négatif dans la régulation de voie de MAPK (Luan, 2003).

c. Les Protéines Tyrosine Phosphatases (PTP)

Les PTP représentent la plus grande famille. Selon leurs fonctions, leurs structures et la séquence en acides aminés de leurs domaines catalytiques, les PTP sont classées en 4 familles (**tableau 1**) (Alonso *et al.*, 2004). Ces protéines déphosphorylent principalement les phospho-tyrosines et rarement les phospho-sérines et les phospho-thréonines. Ces enzymes sont caractérisées par un domaine conservé contenant un motif CX₅R où la cystéine est essentielle à l'attaque nucléophile du phosphate maintenu par l'arginine. Ces protéines ciblent des substrats trouvés dans la majorité des voies de signalisation comme les récepteurs tyrosine kinases (Tonks, 2006).

Les protéines tyrosine phosphatases de plantes supérieures ont été découvertes dix ans après celles des animaux (Tonks *et al.*, 1988) et ont conduit à des controverses concernant la phosphorylation des résidus tyrosines chez les végétaux, jusqu'à la découverte des tyrosines phosphatases et MAPK. La première protéine tyrosine phosphatase (AtPTP1) et la première protéine phosphatase à double spécificité (AtDsPTP1) ont été caractérisées chez *Arabidopsis* en 1998 (Gupta *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998) puis chez d'autres espèces végétales (Fordham-Skelton *et al.*, 2002). Les protéines phosphatases à double spécificité DsPTP, agissent, comme leur nom l'indique, en tant que protéines tyrosine phosphatases (où elles sont considérées comme un sous groupe (**tableau 1**)) ou en tant que sérine/thréonine phosphatases. Elles sont aussi capables de déphosphoryler l'ARNm et les phosphoinositides (Patterson *et al.*, 2009). Les génomes qui ne codent pas de tyrosine kinases possèdent également très peu de PTP (Andreeva and Kutuzov, 2008). On recense 103 à 107 PTP dans le génome humain, 24 PTP putatives chez *Arabidopsis* et une demi-douzaine dans la levure. Parmi les 24 gènes de l'Arabette, un seul gène code pour une protéine tyrosine phosphatase spécifique et les autres codent pour des DsPTP ce qui laisse penser que la fonction commune de PTP chez les eucaryotes concerne la déphosphorylation à double spécificité (Luan, 2003). En effet, chez *Arabidopsis*, 22 DsPTP ont été identifiées parmi lesquelles 5 protéines contiennent un site DSP actif étendu avec le motif de séquence VHC-x₂Gx-SRS-x₅AYLM caractéristique des MAPK phosphatases (MKP) des mammifères. La cascade de MAPK chez les plantes supérieures et chez les animaux implique ces PTP et DsPTP dans la régulation des activités (Mizoguchi *et al.*, 1997; Tena *et al.*, 2001; Luan, 2003). Leurs protéines cibles sont généralement retrouvées dans les voies de signalisation immunitaire et la voie MAPK

(Jeffrey *et al.*, 2007; Bartels *et al.*, 2010) et chez les régulateurs du cycle cellulaire (Kerk *et al.*, 2008; Moorhead *et al.*, 2009).

d. Aspartate Based Phosphatases (Asp-based PTP)

Les aspartate based phosphatases (Asp-based PTP), pouvant également être classées dans le groupe des PTP, sont caractérisées par un mécanisme catalytique différent basé sur une signature de l'acide aspartique (DXDXT/V). Contrairement à la plupart des autres membres de la famille PPP, la spécificité de la fonction est acquise grâce à l'addition de domaines à l'unité de catalyse, et non par l'association avec d'autres protéines. Un domaine commun supplémentaire est le domaine BRCT, qui peut fonctionner en dirigeant ces phosphatases vers des substrats phosphorylés (Moorhead *et al.*, 2009). Elles incluent également HAD (Haloacid Dehalogenase) (Moorhead *et al.*, 2009). Ces protéines sont spécifiques des phospho-tyrosines et des phospho-sérines et interviennent dans l'organogenèse (Li *et al.*, 2003; Tootle *et al.*, 2003; Jemc and Rebay, 2007).

Selon leur substrat, des études citent également les phosphatases à lipides qui interviennent principalement dans l'initiation des voies de signalisation (Brindley, 2004), les histidines phosphatases impliquées dans le métabolisme et dans la modulation des voies de signalisation (Rigden, 2008).

iii. Importance de la phosphorylation

a. Importance

Les protéines cibles peuvent disposer d'un ou de plusieurs sites de phosphorylation. Certaines de ces phosphorylations peuvent servir de régulateur de la ou des fonctions des protéines, en influençant leur stabilité (Fuchs *et al.*, 2000) et leur dégradation par le protéasome (King *et al.*, 1996; Bibby and Litchfield, 2005), leur localisation subcellulaire (Brunet *et al.*, 2001), la formation de complexes protéiques (homo ou hétéromultimérisation) (Pawson and Scott, 1997, 2005), de liaisons aux acides nucléiques ou encore pour moduler une activité transcriptionnelle (Chi *et al.*, 2001; Holmberg *et al.*, 2001).

La régulation par phosphorylation de la fonction de protéines peut être illustrée par l'exemple du proto-oncogène humain c-rel (codant pour une protéine de la famille NFκB). Le remplacement de la serine 471 par un aspartate, mimant l'état phosphorylé de REL, réduit son pouvoir transformant mais favorise sa capacité à activer la transcription (Starczynowski *et al.*, 2005).

Introduction générale

De nombreuses kinases sont régulées par la phosphorylation d'un ou plusieurs résidus clés au sein de leur segment d'activation, une région de 20 à 40 résidus situés dans le grand lobe de la protéine kinase (Nolen *et al.*, 2004; Pike *et al.*, 2008).

La multiplicité des événements de phosphorylation sur les complexes d'initiation suggère que la phosphorylation joue un rôle central dans le contrôle du niveau de la synthèse protéique. La phosphorylation de facteurs d'initiation varie au cours de la croissance cellulaire et du développement des organes. Chez les animaux et les plantes, les facteurs eIF2, eIF4E, eIF4A et eIF4B sont hyperphosphorylés lors de stress. Selon le type de facteur d'initiation et des conditions environnementales, la phosphorylation à différents sites peut se traduire soit par une augmentation, soit par une diminution de la traduction des protéines (Pierrat *et al.*, 2007). De nombreux virus manipulent le contrôle des voies de la traduction cellulaires pour leur propre besoin (Mohr, 2006). Chez les animaux, l'activation de la protéine PKR par l'interféron conduit à la phosphorylation d'eIF2 α qui inhibe la traduction (Gunnery and Mathews, 1998). La protéine Tat d'HIV1 est connue pour détourner ce système antiviral en interagissant avec le domaine de fixation à l'ARN de PKR pour empêcher la phosphorylation de eIF2 α (Brand *et al.*, 1997; Gunnery and Mathews, 1998). La phosphorylation de protéine Tat de HIV-1 par la CDK2 est nécessaire à la transcription du RNA viral (Ammosova *et al.*, 2006).

De telles régulations sélectives par phosphorylation peuvent aussi activer la rétention cytoplasmique, l'import ou l'export nucléaire de protéines (Hunt, 1989; Forbes, 1992; Whiteside and Goodbourn, 1993) comme cela a été décrit pour la protéine Dorsal de *Drosophila* (Roth *et al.*, 1989), de la protéine NF- κ B de mammifère (Kerr *et al.*, 1991), de la protéine SWI5 de la levure (Moll *et al.*, 1991) et pour la protéine p53, régulée par plusieurs types de modifications traductionnelles dont plusieurs événements de phosphorylation (Cox and Meek, 2010). Ces processus sont également au cœur de la reconnaissance et de la défense des cellules contre les pathogènes.

Chez les animaux, le facteur de transcription STAT1, un médiateur de la réponse cellulaire à l'interféron α , est impliqué dans la réponse à plusieurs cytokines et facteurs de croissance. Il est activé par les récepteurs de cytokines, des kinases de la famille JAK. La protéine STAT1 est phosphorylée et forme un dimère qui pénètre dans le noyau et déclenche la transcription de ses cibles (Najjar and Fagard, 2010). Certaines protéines virales comme la phosphoprotéine P du *Measles virus* (MV) inhibent la phosphorylation de STAT1 et bloquent ainsi sa fonction (Devaux *et al.*, 2007).

Chez les plantes, lors d'infection par les pathogènes, la reconnaissance des produits de gènes d'avirulence de pathogènes par les produits de gènes de résistance induit une réaction de défense dite hypersensible (épaississement de la paroi cellulaire, production d'espèces réactives de l'oxygène, expression des gènes de défense et mort cellulaire programmée locale). Plusieurs produits de gènes de résistance et d'avirulence sont des protéines kinases, des protéines phosphatases ou des protéases dirigées contre les kinases et les phosphatases. Ceci implique un rôle majeur de la phosphorylation et/ou la déphosphorylation dans la régulation de l'infection par le pathogène ou dans la régulation de la réponse de défense par la plante.

b. Phosphorylation des protéines virales

Chez les virus, la phosphorylation d'une ou plusieurs protéines est essentielle à leur cycle de vie. Pour illustrer ce concept, plusieurs exemples ont été tirés de la littérature.

▪ Virus à ARN de polarité négative

Les virus de la famille *Rhabdoviridae* comme le *Wheat rosette stunt virus* (WRSV, un phytovirus) et le *Vascular stomatitis virus* (VSV, *Vesiculovirus*) partagent une organisation génomique comparable (exception faite de la protéine de mouvement retrouvée chez le phytovirus) et possèdent un génome à ARN simple brin de polarité négative. Parmi les protéines codées par ce virus, on retrouve la phosphoprotéine (P) qui fait partie intégrante du complexe « RNA-dependent RNA polymerase » (RdRp) viral (Banerjee and Barik, 1992). La phosphorylation de résidus situés dans le domaine N-terminal acide de la protéine P module sa multimérisation et permet la formation d'un complexe avec la polymérase virale (L) qui sera dédié à l'activité transcriptionnelle de L, c'est à dire la synthèse d'ARNm viraux (Das *et al.*, 1995; Gao and Lenard, 1995a, b; Lenard, 1999). La phosphorylation de résidus dans le domaine C-terminal II est quant à elle essentielle à l'activité de réplication optimale de l'ARN polymérase du VSV (Pattnaik *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1999).

La protéine P du WRSV est également nécessaire *in vitro* pour l'activité RdRp virale (Sun and Gong, 1988) et pourrait constituer, comme dans le cas du VSV, l'une des sous-unités de l'ARN polymérase virale (Xie *et al.*, 2003).

▪ Virus à ADN double brin

Dans le cas de l'antigène T (T-Ag) de *Simian virus 40* (SV40) (Jans *et al.*, 1991), la phosphorylation de la serine 120, tout comme le mimétisme de son état phosphorylé par

une substitution S₁₂₀D, augmente l'efficacité de sa reconnaissance par l'importine α , grâce à une meilleure exposition de son NLS (Xiao *et al.*, 1997; Jans *et al.*, 2000).

Le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, *Caulimoviridae*), un phytovirus à ADN double brin circulaire, code pour une protéine pré-capside (CP57) de 489 acides aminés. Plusieurs clivages produisent trois principaux types de protéines de capsid, CP44, CP39, CP37 qui partagent la même séquence centrale, mais diffèrent dans leurs extrémités. La protéine CP44 est phosphorylée par la kinase CKII en N- et C-terminal sur plusieurs résidus sérines et thréonine, et la phosphorylation d'au moins une des sérines S82, S86, S88 en N-terminal semble être essentielle pour l'infection virale (Martinez-Izquierdo and Hohn, 1987; Chapdelaine *et al.*, 2002). D'autres phosphorylations sont également nécessaires à l'infectivité du virus (Champagne *et al.*, 2007).

▪ Virus à ADN simple brin

L'utilisation du programme Netphos 2.0 a permis l'identification de sites potentiellement phosphorylables (15 sérines, trois thréonines et une tyrosine conservées) sur la protéine de mouvement MP (ou BC1) de l'*Abutilon mosaic virus* (AbMV, *Begomovirus*) (Kleinow *et al.*, 2008). La phosphorylation de la MP a été confirmée dans la levure et dans la plante (Kleinow *et al.*, 2008; Kleinow *et al.*, 2009). Le remplacement de trois de ces sites par des alanines ou des acides aspartiques a révélé que la phosphorylation de ces résidus influence le développement des symptômes et l'accumulation de l'ADN viral (Kleinow *et al.*, 2009). D'autres protéines virales de *Begomovirus* interagissent avec des protéines kinases. C'est le cas de la phosphoprotéine, activateur de la transcription (TrAP ou AL2, un suppresseur de silencing) du *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Lorsqu'elle est exprimée dans des cellules d'insectes, la phosphorylation de TrAP régule sa localisation nucléo-cytoplasmique et son interaction avec une adénosine kinase qui réprime une voie de signalisation impliquée dans la défense antivirale (Hartitz *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003). De la même manière, la phosphoprotéine NSP (nuclear shuttle protein ou BV1) du *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV, *Geminivirus*) facilite le transport intracellulaire de l'ADN viral entre le noyau et le cytoplasme et est impliquée avec la MP (BC1) dans le mouvement intercellulaire. Elle interagit spécifiquement avec des protéines à leucine-rich-repeat (LRR) receptor-like-kinases (RLKs) LRR-RLKS, [NIK1, NIK2 et NIK3 (pour NSP Interacting Kinase)] (Fontes *et al.*, 2004; Mariano *et al.*, 2004) et avec une protéine proline-rich extensin-like receptor kinase (PERK) (Florentino *et al.*, 2006). La NSP n'est pas un substrat pour les NIK et cette interaction inhibe l'activité kinase de NIK1, 2 et 3, mais pas

celles d'autres kinases, suggérant leur implication dans les réactions de défense antivirale et la NSP comme jouant un rôle de facteur de pathogénicité (Fontes *et al.*, 2004) Cependant, la NSP est régulée positivement par une phosphorylation médiée par PERK (Florentino *et al.*, 2006). De telles interactions sont retrouvées chez d'autres *Geminivirus* et suggèrent qu'elles jouent un rôle crucial lors de l'infection et du développement des symptômes.

▪ Virus à ARN de polarité positive

Comme nous l'avons vu précédemment pour les protéines de mouvement de *Geminivirus*, différentes protéines de mouvement virales (MP) de virus à ARN⁺ existent sous forme de phosphoprotéines dans les cellules végétales et leur état de phosphorylation détermine leurs fonctions (Waigmann *et al.*, 2004). On peut citer celles du *Tomato mosaic virus* (TMV) (Kawakami *et al.*, 1999; Matsushita *et al.*, 2000), du *Potato leafroll virus* (PLRV) (Sokolova *et al.*, 1997), mais le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'activité de transport de MP a surtout été largement étudié chez le virus de la mosaïque du tabac (TMV; *Tobamovirus*) (Watanabe *et al.*, 1992; Haley *et al.*, 1995).

La protéine MP du TMV possède trois sites de phosphorylation en C-terminal phosphorylés *in vitro* et *in vivo* par des kinases associées à la paroi cellulaire (Citovsky *et al.*, 1993; Waigmann *et al.*, 2000). La phosphorylation de MP pourrait jouer un rôle de transition entre la réplication, la traduction et la propagation virale (Karpova *et al.*, 1997; Karpova *et al.*, 1999). Des expériences de mutagenèse dirigée, introduisant des phospho mimétismes sur des acides aminés cibles de phosphorylation ont conduit à l'altération du mouvement viral de cellule à cellule dans la plante hôte *Nicotiana tabacum* car les MP perdent leur capacité à atteindre les plasmodesmes (Waigmann *et al.*, 2000; Trutnyeva *et al.*, 2005). De la même manière, la Thréonine 104 de la MP du TMV est phosphorylée *in vitro* et *in vivo* par une activité ER-kinase associée. Un mutant Thr₁₀₄Asp, mimant l'état phosphorylé, est fortement inhibé dans son mouvement de cellule à cellule, suggérant que la phosphorylation de la thréonine 104 inhibe la fonction de la MP ou sa conformation. Cependant, il n'y a pas de preuve directe d'une phosphorylation de Thr₁₀₄, qui pourrait toutefois survenir transitoirement *in vivo* (Karger *et al.*, 2003). En effet, si une phosphorylation conduit à l'amélioration de la capacité de transport du virus, de multiples phosphorylations ont un effet négatif sur le transport (Waigmann *et al.*, 2000; Trutnyeva *et al.*, 2005). La MP du *Tomato mosaic tobamovirus* (ToMV) est phosphorylée (Kawakami *et al.*, 1999) et semble renforcer la stabilité de la protéine *in vivo*. Cette phosphorylation est importante mais pas nécessaire pour la fonction de la protéine et elle pourrait jouer un rôle

dans la régulation de la localisation subcellulaire de la MP (Kawakami *et al.*, 1999; Kawakami *et al.*, 2003; Waigmann *et al.*, 2004).

Les *Potyvirus* codent pour plusieurs protéines multifonctionnelles (MRP) associées dans le transport du virus de cellule à cellule. Ces protéines MRP incluent la protéine de capsid (CP), la protéase (HC-Pro), la protéine d'inclusion cylindrique (CIP), et la VPg [pour revue voir (Revers *et al.*, 1999)]. Les protéines CP et VPg du *Potato virus A* (PVA, *Potyvirus*) sont phosphorylées par une Sérine/Thréonine kinase (CK2) de *Nicotiana tabacum*. La phosphorylation de la CP du PVA inhibe sa fixation à l'ARN *in vitro* et régule probablement la fonction de CP dans le mouvement de cellule à cellule et dans la régulation du cycle viral (Ivanov *et al.*, 2001; Ivanov *et al.*, 2003). La protéine de capsid du *Plum pox virus* (PPV, *Potyvirus*) est phosphorylée mais aussi *O*-glycosylée. Ces deux modifications semblent jouer un rôle dans la régulation de la protéine de capsid (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2002).

Les virus du genre *Potexvirus* codent trois protéines impliquées dans le mouvement de cellule à cellule appelées "triple gene block", TGB1, TGB2, TGB3. Ces trois protéines avec la protéine CP sont responsables du mouvement viral. Le rôle de la phosphorylation de la protéine TGB1 par des protéines kinases de plantes de tabac n'a pas encore été déterminé mais, là encore, elle pourrait intervenir dans la régulation d'une ou plusieurs fonctions de cette protéine multifonctionnelle (Modena *et al.*, 2008).

Comme dans le cas des virus à ARN-, la phosphorylation des RdRp de virus à ARN+ joue un rôle majeur dans la régulation de la réplication virale. En effet, ces phosphorylations peuvent réguler les interactions entre les protéines virales et des partenaires cellulaires au sein du complexe de réplication, la stabilité des protéines impliquées dans la réplication virale, les interactions protéine/ARN, ou encore la fonction catalytique de l'ARN polymérase ARN-dépendante [pour revue voir (Jakubiec and Jupin, 2007)].

L'*Hepatitis C virus* (HCV, *Flaviviridae*, *Hepacivirus*), un virus à ARN simple brin de polarité positive code pour une polyprotéine clivée en protéines structurales et non structurales, dont la protéine NS5B qui contient un motif « RNA-dependent RNA polymerase ». NS5B interagit avec la kinase PRK2 (protein kinase C-related kinase 2) qui la phosphoryle (Hwang *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2004) et régule positivement la réplication de l'ARN viral (Kim *et al.*, 2004). De même, l'hyper-phosphorylation par plusieurs protéines kinases de NS5A, une autre protéine non structurale, intervient indirectement dans la régulation de la réplication virale en modulant l'interaction de NS5A avec hVAP-A

(human vesicle-associated membrane protein-associated protein A) essentielle pour la réplication virale (Evans *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007).

La phosphorylation de la protéine de réplication p33 du *Cucumber necrosis tobusvirus* (CNV) est nécessaire à la réplication du CNV car elle module les interactions protéine-protéine et protéine-ARN de la réplicase virale et donc la pathogénicité virale (Shapka *et al.*, 2005; Stork *et al.*, 2005). Dans le cas du *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*), la phosphorylation de la protéine polymérase 2a (RdRp) inhibe la formation du complexe de réplication en bloquant l'interaction entre la protéine 2a et 1a (Kim *et al.*, 2002).

La phosphorylation de la RdRp de 66K du *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV, famille *Tymoviridae*, genre *Tymovirus*) intervient dans les différentes étapes du cycle viral (Hericourt *et al.*, 2000; Jakubiec *et al.*, 2006). Si la phosphorylation des résidus Thr₆₄ et Ser₈₀ intervient sur le niveau d'accumulation de la protéine 66K, la phosphorylation de Ser₃₂₆ serait impliquée dans le contrôle de la synthèse de l'ARN (Jakubiec *et al.*, 2006).

La phosphorylation de Thr₆₄ et Ser₈₀, localisés dans une séquence appelée PEST, riche en résidus proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T), a un effet négatif sur l'accumulation de la réplicase. Les séquences PEST constituent des signaux conditionnels pour la dégradation de protéines par le protéasome 26S (Rogers *et al.*, 1986; Marchal *et al.*, 1998). La phosphorylation de Thr₆₄ et Ser₈₀ pourrait activer le signal PEST contrôlant la stabilité de la protéine (Hericourt *et al.*, 2000; Jakubiec *et al.*, 2006). Cependant, la présence de la protéine 140K constitutive de la réplicase virale, inhibe la phosphorylation des résidus Thr₆₄ et Ser₈₀, en masquant ces sites de phosphorylation. La phosphorylation de la sérine 326 constitue quant à elle un processus dynamique, agissant probablement comme un régulateur de la réplication virale, comme le montrent les mutants S₃₂₆A et S₃₂₆D, tous les deux ont diminué la réplication du génome viral (Jakubiec *et al.*, 2006).

Ces différents exemples illustrent parfaitement le rôle des phosphorylations dans le contrôle de la stabilité et de la fonction de protéines non structurales virales (réplicase, MP, MRP).

IV. Addition de polypeptides

Ce type de PTM concerne l'ubiquitination des protéines et les modifications comparables à l'addition d'ubiquitine : la rubylation, la sumoylation qui font partie des ubiquitin like (UBL). Ces modifications induisent des modifications structurales et fonctionnelles plus

complexes que la phosphorylation et ajoutent des surfaces moléculaires permettant de nouvelles interactions protéine-ligand (Schlesinger and Bond, 1987; Seet *et al.*, 2006). Il existe quatre sous-familles d'UBL fonctionnelles chez les plantes : SUMO (small ubiquitin-related modifier), RUB [related to ubiquitin, orthologue de NEDD8 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8)], et ATG8 et ATG12 (autophagy 8 and 12) (Miura and Hasegawa, 2010). Comme chez les autres eucaryotes, les UBL chez les plantes sont impliquées dans de nombreux processus biologiques essentiels tels que la régulation du cycle cellulaire, la croissance et le développement (Bassham, 2007; Miura *et al.*, 2007). Les protéines UBL sont constituées de 72 à 186 acides aminés. Elles partagent avec l'ubiquitine la même structure tertiaire de type β -GRASP (β -Golgi reassembly stacking protein) et un mécanisme similaire de conjugaison par le groupe carboxyle C-terminal (Kerscher *et al.*, 2006; Hochstrasser, 2009).

1. Polypeptide RUB

Les RUB sont des peptides de 76 acides aminés possédant 52 à 63% d'identité à l'ubiquitine. La rubylation est essentielle pour la croissance végétative et le développement embryonnaire chez les plantes (Miura and Hasegawa, 2010) et est impliquée dans l'autophagie responsable de la dégradation des protéines et les organites afin de recycler les éléments nutritifs dans les plantes. La mort cellulaire autophagique, en plus de son rôle dans le développement, contribue à la réponse hypersensible de l'immunité innée de plantes (Bassham, 2009; Hofius *et al.*, 2009; Nakatogawa *et al.*, 2009). La rubylation de la Cullin permet de dissocier l'inhibiteur CAND (cullin-associated and neddylation-dissociated) et l'association de SKP1 et la protéine F-box à la Cullin (Lechner *et al.*, 2006) et régule un mécanisme de conjugaison de l'ubiquitine (voir plus loin). L'activité peptidase du signalosome COP9 (CSN), en particulier la sous-unité CSN5, assure la dérubylation chez *Arabidopsis* (Wei *et al.*, 2008).

2. Polypeptide SUMO

La protéine SUMO (small ubiquitin-related modifier) appartient à la famille ubiquitine-like protéine (UBL). Le peptide SUMO est traduit comme une pré-protéine qui subit un clivage par une SUMO protéase (une C-terminal hydrolase) qui expose un résidu glycine à l'extrémité C-terminale. La SUMOylation implique quatre réactions enzymatiques médiées

par des SUMO protéases ULP (ubiquitin-like proteases) et les enzymes E1, E2 et E3 (Johnson, 2004; Kerscher *et al.*, 2006) qui mènent à la formation d'un lien iso-peptide entre la glycine C-terminale de SUMO et le groupe amine d'un résidu lysine de la protéine cible (**Figure 15**). La SUMOylation est une modification réversible, en effet, les substrats modifiés sont soumis à dé-SUMOylation par l'activité isopeptidase de protéases SUMO, fournissant ainsi un mécanisme de régulation important permettant de contrôler la quantité de substrat modifié et la disponibilité de protéine SUMO (Mukhopadhyay and Dasso, 2007; Lois, 2010). Malgré la structure et le mécanisme de conjugaison communs, Ub et SUMO montrent des différences significatives. SUMO, contrairement à Ub, ne cible pas les protéines pour la dégradation. Toutefois, des découvertes récentes dans la levure et les cellules humaines ont montré que la SUMO peut agir comme un signal pour le recrutement des ubiquitine ligases E3, ce qui conduit à l'ubiquitination et la dégradation de la protéine modifiée (Geoffroy and Hay, 2009).

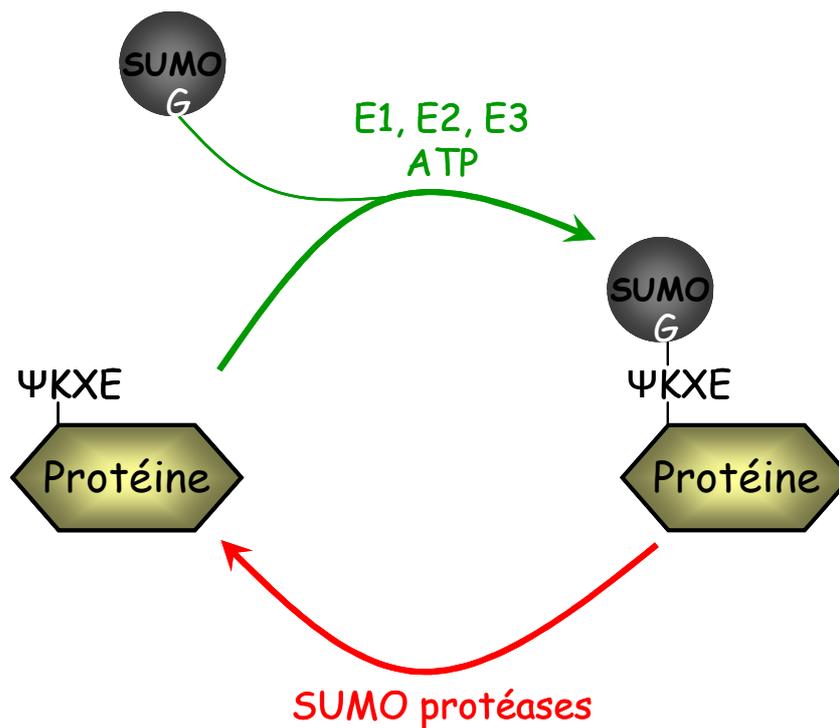


Figure 15 : Représentation de la SUMOylation d'une protéine. Les enzymes E1, enzyme d'activation ; E2, enzyme de conjugaison; E3, enzyme de ligation, permettent la formation d'une liaison spécifique entre la glycine (G) de la protéine SUMO et une lysine de la protéine cible qui est présente dans un motif consensus Ψ , un acide aminé hydrophobe large ; K, la lysine modifiée ; X, un acide aminé quelconque ; E, un acide aminé glutamique. ATP, adénosine triphosphate.

Introduction générale

La séquence consensus de SUMOylation correspond à Ψ KXE (où Ψ est un acide aminé hydrophobe large, K est la lysine modifiée, X un acide aminé quelconque et E est l'acide aminé glutamique). Cependant, certaines protéines SUMOylées ne contiennent pas cette séquence exacte, comme les protéines HIPK2 et Cdc3 de levure (Yeh *et al.*, 2000).

De nombreuses cibles de SUMOylation correspondent à des protéines nucléaires dont la protéine RanGAP (localisée dans le noyau et dans le cytoplasme) est la première cible SUMOylée identifiée en 1996 (Matunis *et al.*, 1996; Mahajan *et al.*, 1997; Mahajan *et al.*, 1998). Elles ont des rôles importants dans la régulation de la transcription, la structure de chromatine et la réparation d'ADN (Johnson, 2004). La SUMOylation influence la structure, la fonction et la localisation de protéines substrat dans les compartiments cellulaires [pour revue voir (Gill, 2004)]. Elle réprime l'activité des activateurs de transcription (Gill, 2003), modifie les histones, influence la réparation d'ADN (Muller *et al.*, 2004) et la progression du cycle cellulaire (Hay, 2005). Au niveau moléculaire, la SUMO peut masquer une surface d'interaction spécifique avec d'autres molécules comme des protéines ou l'ADN, elle peut constituer une surface d'interaction supplémentaire. Des données récentes suggèrent que plusieurs maladies incluant l'infection par des pathogènes, le cancer et des troubles neuro-dégénératifs soient associées à une SUMOylation.

Chez les plantes, la SUMOylation intervient dans les mécanismes de défense, de réponses aux stress abiotiques, le contrôle de la signalisation d'acide abscissique, la floraison et le développement de graine. Les mécanismes moléculaires par lesquels la SUMO régule ces processus biologiques ne sont pas connus (Lois, 2010). Chez *Arabidopsis*, 9 SUMO et 13 ULP ont été identifiés (Kurepa *et al.*, 2003; Murtas *et al.*, 2003). Trois approches ont été principalement utilisées afin d'identifier les cibles de la SUMOylation : les analyses de prédiction, la recherche des cibles d'E3 ligases et la purification biochimique (Lois, 2010). Un nombre réduit de cibles a pu être identifié. Ces cibles sont des facteurs de transcription ou participent aux processus liés à l'ARN/ADN, ce qui reste compatible avec la localisation nucléaire prédite de la plupart des conjugués endogènes. La ou les conséquences fonctionnelles de SUMOylation de ces protéines restent inconnues (Saracco *et al.*, 2007).

Certaines protéines virales inhibent la SUMOylation de cibles spécifiques ou modifient le mécanisme de SUMOylation (Boggio and Chiocca, 2006). Parmi ces protéines virales, Gam1, une protéine d'Adenovirus aviaire, cible l'enzyme E1 SUMO en induisant le recrutement de l'hétérodimère SAE1/SAE2 au complexe ubiquitine ligase (Cul2/5-EloB/C-Roc1) conduisant à la dégradation par le protéasome de SAE1 (Boggio *et al.*, 2004;

Boggio *et al.*, 2007). Cette séquestration de la machinerie de SUMOylation conduit à une dé-SUMOylation des protéines de l'hôte.

La protéine Rep (AC1 ou AL1) de plusieurs geminivirus, y compris le *Begomovirus* bipartite *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) et le *Begomovirus* monopartite *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) interagit avec une protéine de *Nicotiana benthamiana* (NbSCE1) homologue de l'enzyme E2-SUMO-conjugaison UBC9. NbSCE1 conjugue SUMO mais pas l'ubiquitine (Castillo *et al.*, 2004). Il n'est pas encore établi si la protéine Rep/RepAC1 est un substrat de SUMOylation mais trois sites potentiels de SUMOylation sont situés dans des domaines fonctionnels connus. Puisque les effets biologiques de SUMOylation sont très divers, et puisque les mécanismes et les voies de signalisation impliquées dans la plupart d'entre eux restent obscurs, il est difficile de suggérer une simple hypothèse qui expliquerait un rôle pour l'interaction entre Rep et NbSCE1 (Castillo *et al.*, 2004).

3. Polypeptide UBIQUITINE

L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 76 acides aminés hautement conservés, "ubiquitaire" dans le règne eucaryote. La séquence en acides aminés d'Ub est identique chez toutes les plantes supérieures et varie de un à trois résidus chez les animaux et la levure. L'ubiquitine est associée de façon covalente à des protéines d'une manière dépendante de l'ATP. La poly-ubiquitination d'une cible concerne l'addition d'au moins quatre molécules d'ubiquitine enchainées au niveau de leur Lys₄₈, et marque généralement la protéine pour sa dégradation (Chau *et al.*, 1989; Thrower *et al.*, 2000). La mono-ubiquitination et des multi-ubiquitinations (moins de quatre ubiquitines attachées) (**Figure 16**) sont des phénomènes réversibles et modulent l'activité des protéines, leur localisation ou des interactions entre protéines (Springael *et al.*, 1999; Hicke, 2001; Hoegge *et al.*, 2002; Schnell and Hicke, 2003; Shi and Kehrl, 2003; Smalle and Vierstra, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2010; Selvarajah and Moumen, 2010).

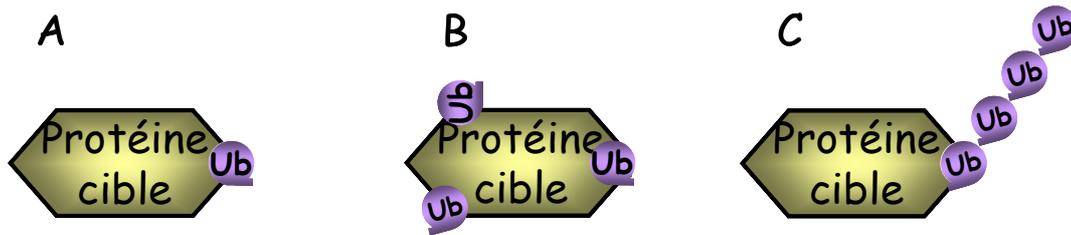


Figure 16 : Représentation schématique de protéines monoubiquitinée (A), multiubiquitinée (B) et polyubiquitinée (C).

La mono-ubiquitination de protéines membranaires est importante pour la localisation endosomale, sur membranes plasmiques ou lysosomales. En plus de Lys₄₈, les six autres lysines présentées sur la **Figure 17** (K₆, K₁₁, K₂₇, K₂₉, K₃₃ et K₆₃) de l'ubiquitine peuvent être utilisées pour d'autres types de polyubiquitination et fournir des topologies différentes et donc des fonctions spécifiques (Arnason and Ellison, 1994; Xu and Peng, 2006; Xu *et al.*, 2009a; Xu *et al.*, 2009b). La polyubiquitination impliquant Lys₆₃ est retrouvée dans la modulation d'activité de protéines, la réponse au stress, et la réparation des dommages de l'ADN [pour revue voir (Hoegge *et al.*, 2002; Shi and Kehrl, 2003; Zhou *et al.*, 2004; Selvarajah and Moumen, 2010)].

La famille des gènes Ub d'*Arabidopsis thaliana* renferme 14 membres répartis en trois types de gènes Ub : (1) cinq sont des "poly-ubiquitin genes" (*UBQ3*, *UBQ4*, *UBQ10*, *UBQ11* et *UBQ14*); (2) cinq sont des "ubiquitin-like genes", car ils présentent des substitutions d'acides aminés ou des insertions/délétions d'acides aminés dans au moins une des ubiquitines répétées (*UBQ7*, *UBQ8*, *UBQ9*, *UBQ12* et *UBQ13*); et (3) quatre sont "ubiquitin extension genes" (*UBQ1*, *UBQ2*, *UBQ5* et *UBQ6*) dans lesquels la région codante est fusionnée à l'un des deux gènes des protéines ribosomiques (52aa et 81aa) (Schlesinger and Bond, 1987; Callis *et al.*, 1990; Callis *et al.*, 1995; Wing, 2003).

Ces différentes protéines Ub sont libérées des produits de traduction initiale par des enzymes de dé-ubiquitination (Wing, 2003).

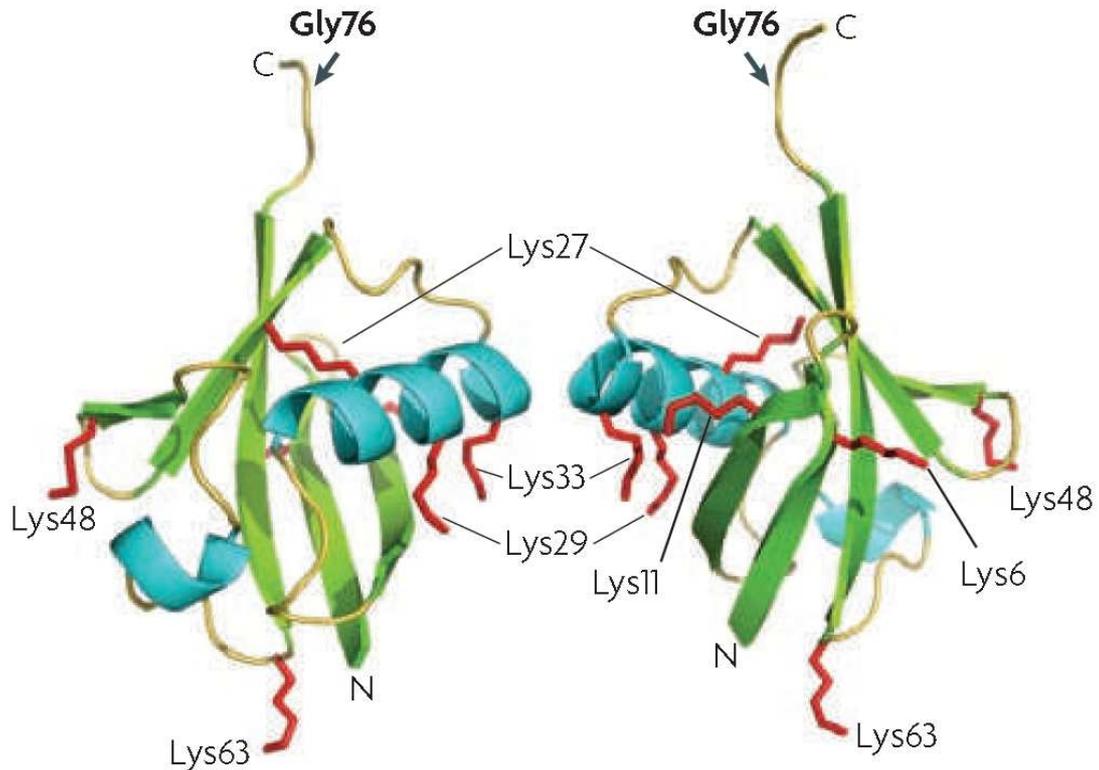


Figure 17 : Structure tridimensionnelle de l'ubiquitine (Vierstra, 2009). Les sept résidus lysine (Lys) pouvant être ubiquitinylés et la position de la glycine (Gly76) impliquée dans la liaison à la protéine cible sont indiqués.

i. Ubiquitination

La dégradation des protéines (protéolyse) est un moyen de contrôle fonctionnel de protéines. Le lysosome est connu pour son rôle dans la dégradation des protéines intracellulaires. Cependant, un mécanisme de dégradation sélective des protéines ATP-dépendant a été découvert et nommé protéasome. La majorité des protéines destinées à la dégradation est marquée par l'ubiquitine et adressée au protéasome. Dans ce système, l'ubiquitine (Ub, 76 acides aminés), est attachée *via* un lien iso-peptidique entre son extrémité carboxyle et le groupe amine d'une lysine présent sur une protéine cible pour réguler sa fonction ou pour sa destruction par le protéasome 26S (Vierstra, 1996; Hershko and Ciechanover, 1998; Passmore and Barford, 2004; Smalle and Vierstra, 2004; Welchman *et al.*, 2005).

Les protéasomes sont retrouvés dans toutes les cellules eucaryotes et constituent jusqu'à 2% des protéines cellulaires. Un protéasome 26S est un grand complexe oligomérique composé de plusieurs sous-unités protéases ATP-dépendantes, qui reconnaît et dégrade les

protéines contenant une étiquette constituée d'une succession d'au moins quatre poly-ubiquitine (Voges *et al.*, 1999; Hanna and Finley, 2007). Il est composé de deux sous-complexes, un noyau de protéase 20S (CP) de forme cylindrique limité à chaque extrémité par un couvercle et une base 19S (RP) (**Figure 18**). CP contient un domaine catalytique ATP-indépendant et RP, dépendant de l'ATP, et confère une spécificité pour les protéines poly-ubiquitinylées. Le couvercle est assemblé à partir d'au moins huit sous-unités coordonnées qui éliminent la chaîne ubiquitine du substrat protéique et dirigent les protéines vers CP pour la dégradation (Fu *et al.*, 2001; Gallastegui and Groll, 2010).

L'étiquette poly-ubiquitine est clivée par des enzymes de dé-ubiquitination et la protéine est dépliée et activement transportée vers la chambre centrale du noyau 20S. Cette dernière est formée de deux structures toriques externes (sous-unités α) et de deux structures toriques centrales (sous-unités β) qui possèdent des activités protéolytiques qui vont dégrader aléatoirement la cible en courts peptides. Après l'hydrolyse, les peptides sortent de la chambre catalytique (Fu *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2004; Santner and Estelle, 2010).

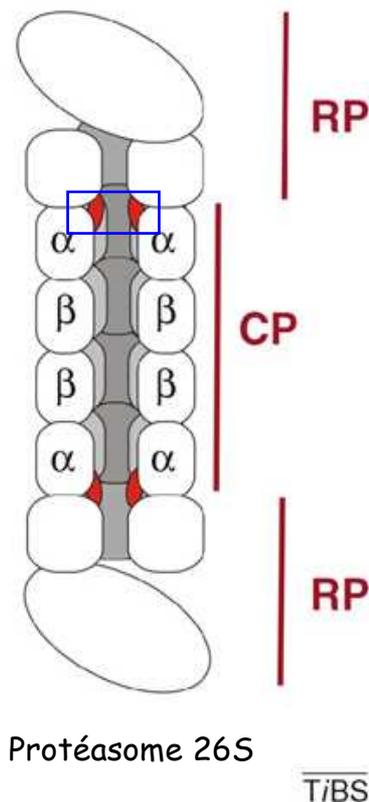


Figure 18 : Le protéasome 26S (Gallastegui and Groll, 2010) est représenté schématiquement avec un noyau protéasique central (CP), constitué de sous unités α et β , et de deux parties régulatrices (RP) situées aux extrémités de CP. Le rectangle bleu souligne l'entrée des pores formés par les segments de la queue N-terminale des sous-unités α (en rouge).

Il faut préciser ici qu'un certain nombre de protéines sont dégradées par le protéasome 26S de manière indépendante de l'ubiquitination [pour revue (Orlowski and Wilk, 2003; Kurepa and Smalle, 2008)]. Le protéasome intervient également lors de processus appelés regulated Ub/proteasome-dependent processing (RUP), essentiels pour la fonction de certains facteurs de transcription [pour revue voir (Rape and Jentsch, 2004)].

Les protéines ciblées par ce système sont des protéines de courte durée de vie, dont beaucoup sont des protéines régulatrices contrôlées en partie par leur synthèse et leur dégradation rapide. Il concerne également des protéines qui ne sont pas correctement synthétisées, suite à des erreurs lors de la traduction ou à la présence de mutations génétiques, mal repliées ou encore endommagées suite à un stress oxydatif. De telles protéines peuvent affecter le fonctionnement cellulaire normal, en particulier chez les plantes dont les cellules ne se divisent pas assez vite pour diluer les concentrations toxiques de telles protéines. La protéolyse participe également au recyclage des acides aminés nécessaires à la croissance. Les plantes, incapables d'échapper à des modifications d'environnement défavorables parce qu'immobiles, utilisent le système ubiquitine-protéasome (UPS) pour moduler presque tous les aspects de la croissance et du développement comme le cycle cellulaire, l'embryogenèse, la signalisation hormonale, la sénescence, la défense contre les pathogènes et les réponses vis à vis de l'environnement (Vierstra, 2009).

ii. Le système ubiquitine-protéasome (UPS)

L'analyse du génome d'*Arabidopsis* révèle que plus de 6% du protéome participe directement à l'UPS qui ciblerait des milliers de protéines [pour revue voir (Vierstra, 2003; Smalle and Vierstra, 2004; Vierstra, 2009)].

L'ubiquitination implique trois composants protéiques présentés sur la **Figure 19**. L'étape initiale est l'activation de l'ubiquitine par la protéine Ub-activatrice E1, qui transfère le groupe ubiquitine à la protéine de conjugaison E2 (Ub-conjugating). L'Ub-protéine ligase E3 transfère ensuite l'ubiquitine sur une lysine de la protéine cible [pour revue voir (Vierstra, 2003; Smalle and Vierstra, 2004; Finley, 2009)]. L'ensemble de ces réactions est détaillé plus loin dans ce chapitre. Certains chaperons moléculaires peuvent intervenir et faciliter la dégradation de protéines mal repliées [pour revue voir (McClellan *et al.*, 2005)]. On peut citer l'exemple de la protéine de choc thermique Hsp70, nécessaire à la

dégradation de certaines protéines mal repliées *in vitro* (Bercovich *et al.*, 1997). L'interaction entre protéines chaperons et des Ub-protein ligases E3 a permis d'avancer l'hypothèse que ces chaperons pourraient réguler la dégradation de cibles par le recrutement direct d'une enzyme E3 (Esser *et al.*, 2004).

Parce que les cibles d'ubiquitination sont classiquement dégradées, cette PTM n'est pas considérée comme un événement réversible. Cependant, en plus de la dégradation des protéines, l'ubiquitination peut activer des protéines kinases, intervenir dans les interactions protéine-protéine et marquer des protéines pour l'endocytose. Ainsi, l'ubiquitination constitue une PTM aussi importante que la phosphorylation. En effet, l'UPS est impliqué dans des voies de signaux incluant le cycle cellulaire, la transcription, la transduction de signal, l'apoptose et la réponse immunitaire (Muratani and Tansey, 2003). La poly-ubiquitination tout comme la poly-ADP-ribosylation est impliquée dans des mécanismes de réparation d'ADN [pour revue voir (Thomson and Guerra-Rebollo, 2010)]. Aussi, l'existence d'enzymes de de-ubiquitination (DUB) indique la réversibilité de cette PTM (Sun and Chen, 2004). Les enzymes DUB sont impliquées dans la genèse d'Ub à partir de son produit de traduction initial, au recyclage de l'Ub après dégradation des cibles par le protéasome et dans la dé-ubiquitination de cibles pour réguler leur demi-vie (**Figure 20**) (Doelling *et al.*, 2001; Smalle and Vierstra, 2004; Katz *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis*, on dénombre au moins 32 gènes potentiels codant pour des DUB (Vierstra, 2003).

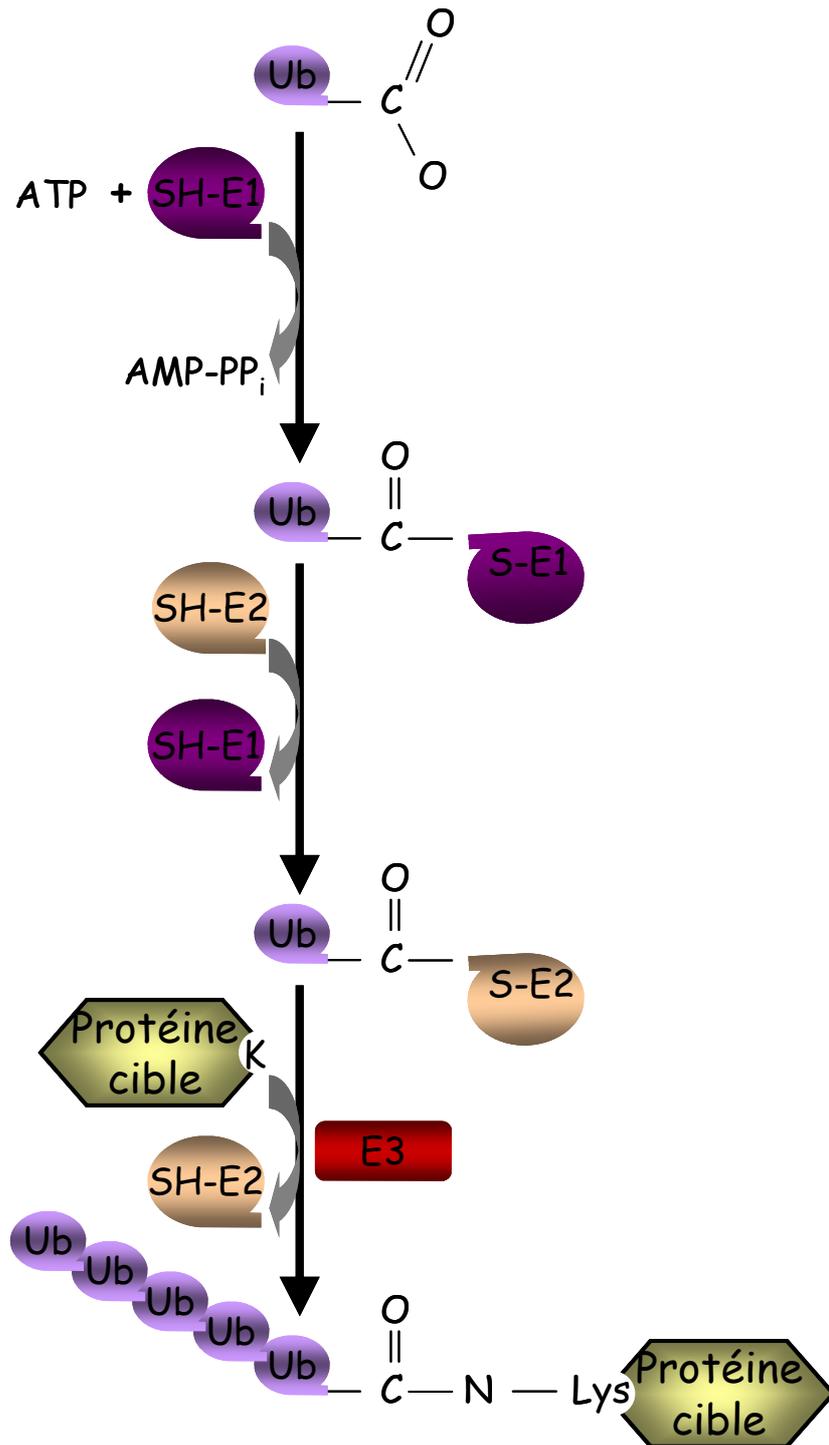


Figure 19 : Représentation simplifiée des trois étapes de réaction de conjugaison, d'activation et de liaison de l'ubiquitine (Ub) à une protéine cible. L'ubiquitine est conjuguée à l'enzyme E1 et activée sur l'enzyme E2 par des réactions de thioesterification sur résidus cystéine (SH) avant d'être transférée sur la lysine (Lys ou K) de la protéine cible.

a. Cascade de conjugaison de l'ubiquitine

L'ubiquitination nécessite l'action successive de trois enzymes (E1 → E3).

▪ E1 (Ub-activating enzyme)

La conjugaison d'ubiquitine, dépendant d'ATP, nécessite la formation de l'intermédiaire Ub-AMP par l'enzyme d'activation E1 (**Figure 19**) (UBA, 115-125 kDa). La réaction est initiée par l'activation intermédiaire de la molécule d'Ub sur sa glycine C-terminale par une liaison thiol-ester riche en énergie, suivie de la conjugaison d'Ub à une cystéine de l'enzyme E1 par liaison thiol-ester qui libère l'AMP (Scheffner *et al.*, 1995; Lake *et al.*, 2001; Pickart and Fushman, 2004). Les enzymes E1 n'ont pas d'influence sur la spécificité de cible et leur nombre de gènes est faible. Deux enzymes E1 sont par exemple retrouvées chez *Arabidopsis* (Hatfield *et al.*, 1997).

▪ E2 (Ubiquitin conjugating enzymes)

L'enzyme E2 (UBC) est impliquée dans les fonctions de conjugaison d'ubiquitine. Elle fixe par trans-estérification l'ubiquitine fournie par l'enzyme E1, ce qui conduit à la formation de l'intermédiaire Ub-E2 (**Figure 19**). Ub-E2 fournira l'ubiquitine nécessaire à la modification spécifique des cibles par l'enzyme E3 (Sullivan and Vierstra, 1991; Vierstra, 2003). De nombreux gènes d'enzymes E2 sont retrouvés dans les organismes et *Arabidopsis* en exprime au moins 42 (Mazzucotelli *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2006; Wiborg *et al.*, 2008). Ces enzymes E2 contiennent une séquence catalytique conservée de 150 acides aminés qui entourent la cystéine du site actif (Jentsch *et al.*, 1990; Sullivan and Vierstra, 1991; Hamilton *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis*, certaines enzymes E2 ne présentent pas d'activité de conjugaison (Kraft *et al.*, 2005).

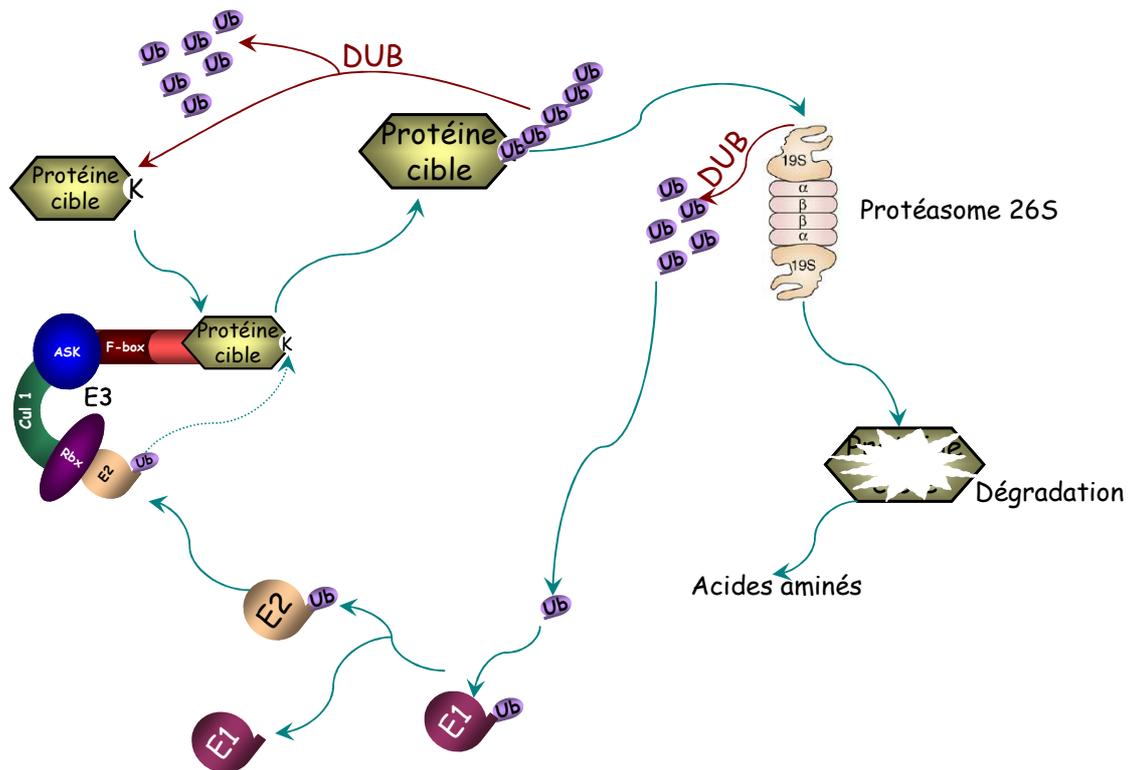


Figure 20 : Représentation schématique de l'ubiquitination suivie de la dégradation de la protéine par le protéasome 26S. [Schéma du protéasome d'après (Lechner *et al.*, 2006)]. DUB, enzymes de de-ubiquitination.

- **E3 (Ubiquitin ligating enzymes)**

La dernière étape dans la cascade de conjugaison d'ubiquitine est catalysée par des enzymes E3. En effet, les enzymes E3 sont chargées d'identifier les cibles de l'ubiquitination. Ces enzymes E3 catalysent deux processus : le premier est la fixation d'Ub sur la cible, et le second est la fixation d'Ub sur la précédente. Ces enzymes recrutent le substrat, le placent pour un transfert optimal de l'ubiquitine et initient la formation de la liaison iso-peptidique. La répétition de ces réaction conduit à l'addition en chaîne d'Ub (**Figure 19**) [pour revues voir (Sullivan *et al.*, 2003; Smalle and Vierstra, 2004)].

Il existe deux mécanismes de transfert d'Ub de l'enzyme E2 à la cible : dans le premier, l'enzyme E3 catalyse simplement le transfert d'Ub de E2 à la cible. Dans le second l'enzyme E3 est ubiquitinée et constitue un intermédiaire réactionnel (Craig *et al.*, 2009).

Ces enzymes E3 interviennent dans la spécificité de reconnaissance des cibles et sont par conséquent les acteurs les plus nombreux dans la cascade d'ubiquitination. En effet, le

génomique d'*Arabidopsis* contient environ 1415 gènes qui codent pour des sous-unités putatives d'E3 (Smalle and Vierstra, 2004; Mazzucotelli *et al.*, 2006). HECT (Homologous to E6-Associated Protein Carboxyl Terminus), RING et U-box (Real Interesting New Gene; UFD2 homology protein), APC/C (Anaphase-Promoting Complex/cyclosome) et enfin SCF (SKP1, Cullin/CDC53, et F-box protein complex) sont les quatre types d'E3 décrites chez les plantes et présentées sur la **Figure 21**. Elles se distinguent d'après leur structure et leur mécanisme d'action (Vierstra, 2003).

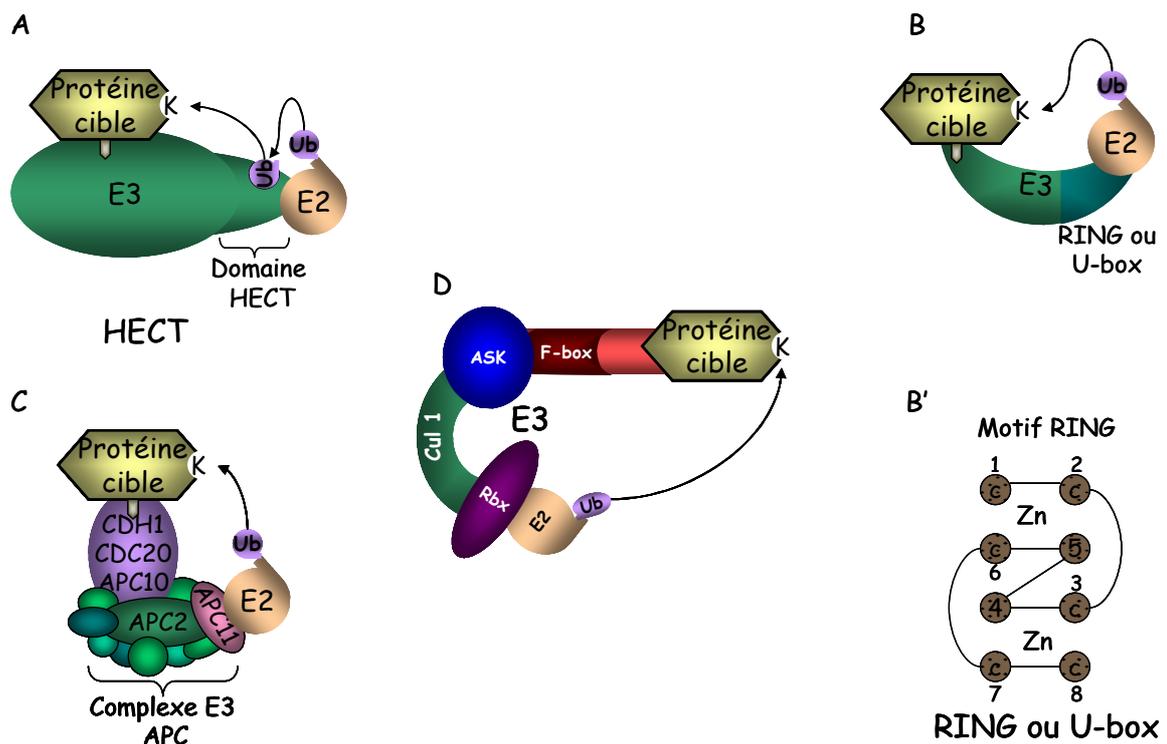


Figure 21 : Représentation simplifiée des quatre types de ligase E3 retrouvées chez les plantes [Adapté de (Vierstra, 2003)]. (A), HECT ; (B), RING/U-box ; (B') schéma du motif RING, où dans le domaine RING-HC, le résidu 5 représente la cystéine ou l'histidine dans le domaine RING-H2; (C), APC ; (D), SCF.

①. HECT

La protéine associée à la protéine E6 du *Papillomavirus* est le membre type de cette famille de protéine initialement identifiée chez l'homme. Elles sont caractérisées par un domaine C-terminal conservé de 350 acides aminés appelé HECT (Homologous to E6-Associated Protein Carboxyl Terminus) qui contient le site de liaison à l'E2-Ub et une cystéine conservée fixant l'ubiquitine, produisant une E3-Ub intermédiaire avant le transfert final de l'ubiquitine sur la cible (**Figure 21A**) (Hershko and Ciechanover, 1998;

Downes *et al.*, 2003). La région en amont de HECT participe à la reconnaissance des cibles (Downes *et al.*, 2003). Ce type d'E3 ligases possède la particularité de pouvoir lier une chaîne d'Ub avant son transfert sur le substrat (Smalle and Vierstra, 2004). Sept gènes d'E3 HECT sont retrouvés chez *Arabidopsis* (Downes *et al.*, 2003; Vierstra, 2003).

②. RING et U-box

Les protéines RING forment la plus grande catégorie d'ubiquitine ligases E3. Le domaine RING finger se compose d'un motif riche en cystéines (C) (7 à 8 cystéines conservées) et en histidines (H), chélateur de Zn^{2+} grâce à un arrangement en quatre points des acides aminés C et H (**Figure 21B'**). Ce motif est défini par la présence du consensus Cys-X₂-Cys-X₉₋₃₉-Cys-X₁₋₃-His-X₂₋₃-(Cys/His)-X₂-Cys-X₄₋₄₈-Cys-X₂-Cys, où X_n représente un nombre d'acides aminés quelconque. Les protéines à motif RING sont subdivisées en différentes sous-classes, RING-H2, RING-HC (Borden and Freemont, 1996), RING-v, RING-D, RING-G, RING-S/T, RING-C2, PHD (plant homeodomain) (Coscoy and Ganem, 2003; Stone *et al.*, 2005) et l'U-box (Ohi *et al.*, 2003). Ces E3 ligases interviennent dans plusieurs fonctions de régulation comme l'apoptose (Fang *et al.*, 2000), la réparation de l'ADN et la régulation transcriptionnelle (Morris and Solomon, 2004), le cycle cellulaire (Leverson *et al.*, 2000), la photo-morphogenèse (Torii *et al.*, 1999), la signalisation (Xie *et al.*, 2002) et les réponses de défense des plantes (Ramonell *et al.*, 2005). Le doigt à RING de 70 acides aminés se lie directement à E2 (Seol *et al.*, 1999) et augmente la probabilité d'une interaction entre la lysine du substrat et l'E2-Ub (**Figure 21B**) (VanDemark and Hill, 2002).

Le motif U-box possède une structure semblable à celle du domaine RING (**Figure 21B**), mais il n'utilise pas des ions de zinc afin de stabiliser le motif (Haglund and Dikic, 2005). Les U-box E3, basées sur une conception modulaire similaire aux protéines F-box (voir ci-dessous), renferment un motif U-box et un domaine de reconnaissance des cibles tels que les domaines armadillo repeats (ARM) à l'extrémité C-terminale. Ces U-box E3 ligases sont impliquées dans la défense des plantes contre les stress biotiques et abiotiques (Zeng *et al.*, 2006). *Arabidopsis* exprime environ 480 protéines à domaine RING et 64 protéines U-box (Smalle and Vierstra, 2004; Stone *et al.*, 2005).

③. APC/C

L'APC/C est une ubiquitine ligase E3 spécialisée qui rassemble les chaînes polyubiquitine sur des cyclines en vue de leur destruction par le protéasome 26S. L'APC/C est composée d'une douzaine de sous-unités distinctes (**Figure 21C**) et ne fonctionne qu'en présence des co-facteurs Cdc20 (cycle de division cellulaire 20) et Cdh1, qui interagissent uniquement

de façon transitoire et régulent l'activité d'ubiquitination. Une sous-unité de ce complexe, Apc11, contient un motif doigt à RING, définit l'activité minimale de l'ubiquitine ligase de ce complexe, et lie l'Ub-E2 (Leverson *et al.*, 2000). La sous-unité Apc2 possède une homologie avec le composant Cullin du complexe SCF (voir plus loin) et s'associe avec le domaine RING d'Apc11 (Tang *et al.*, 2001). L'action d'APC est contrôlée par de multiples phosphorylations et déphosphorylations (Harper *et al.*, 2002). Chez *Arabidopsis*, de multiples protéines orthologues de la plupart des sous-unités d'APC ont été identifiées, suggérant que l'APC de plante pourrait reconnaître plusieurs cibles (Capron *et al.*, 2003).

Un tel complexe APC/C est impliqué dans la progression du cycle cellulaire en régulant la dégradation de cyclines [connues sous le nom Cdks (kinases cycline-dépendantes)] en permettant la séparation des couples chromatides, la transition de la métaphase à l'anaphase et la sortie de la mitose (Hames *et al.*, 2001; Peters, 2006; Manchado *et al.*, 2010). L'APC/C a récemment été impliquée dans la différenciation cellulaire et dans la physiologie neuronale, ce qui suggère des rôles supplémentaires dans les cellules non-mitotiques telles que les neurones et les cellules musculaires (Manchado *et al.*, 2010).

④. SCF

Le complexe SCF renferme une protéine Skp1, un membre de la famille Cullin (Cul1), une protéine F-box et une protéine contenant un domaine RING (Roc1/Rbx1) (**Figure 21D**). Le nom SCF est basé sur trois de ces sous-unités (SKP, Cullin, F-box protéine). Pour fonctionner, la sous-unité Cullin doit être dissociée de CAND1 (pour Cullin-Associated Neddylation Dissociated 1) par une PTM proche de l'ubiquitination qui conjugue NEDD8, une Ubiquitin like protein (Zheng *et al.*, 2002). Une fois la sous-unité Cullin Neddylatée, elle pourra s'associer à l'hétérodimère Skp1-F-box (Liu *et al.*, 2002a; Zheng *et al.*, 2002). Dans le complexe SCF, la sous-unité Cullin (Cul1) fonctionne comme un échafaudage moléculaire et interagit simultanément avec l'extrémité N-terminale de la sous-unité Skp1 (S-phase-kinase-associated protein-1) et l'extrémité C-terminale d'une protéine à domaine RING (Rbx1, Ring-box protéine). Rbx1 recrute l'E2-Ub et catalyse le transfert des chaînes de poly-ubiquitines (Deshaies, 1999; Risseuw *et al.*, 2003) sans former d'intermédiaire E3-Ub (**Figure 20**) (Gagne *et al.*, 2002). Skp1 se lie à l'une des nombreuses F-box protéines (FBP) responsables de la spécificité de reconnaissance de la cible. Grâce à son motif F-box, cette protéine est associée à la protéine Skp1 du complexe SCF et fixe sa cible par un/des domaine/s d'interaction protéine-protéine présents dans sa partie C-terminale (**Figure 22**). La reconnaissance SCF-cible peut être dépendante de la phosphorylation du substrat (Pickart, 2001). Contrairement à d'autres eucaryotes,

Introduction générale

Arabidopsis est capable de synthétiser un nombre impressionnant de complexes SCF en raison de l'énorme diversité des protéines à F-box. Cette diversité, associée à la présence de deux sous-unités Rbx1 (Gray *et al.*, 2002; Lechner *et al.*, 2002), d'au moins cinq Cullins (Shen *et al.*, 2002) et d'environ 21 protéines SKP-like (Farras *et al.*, 2001), pourrait générer une infinité distincte d'ubiquitine E3 ligases SCF.

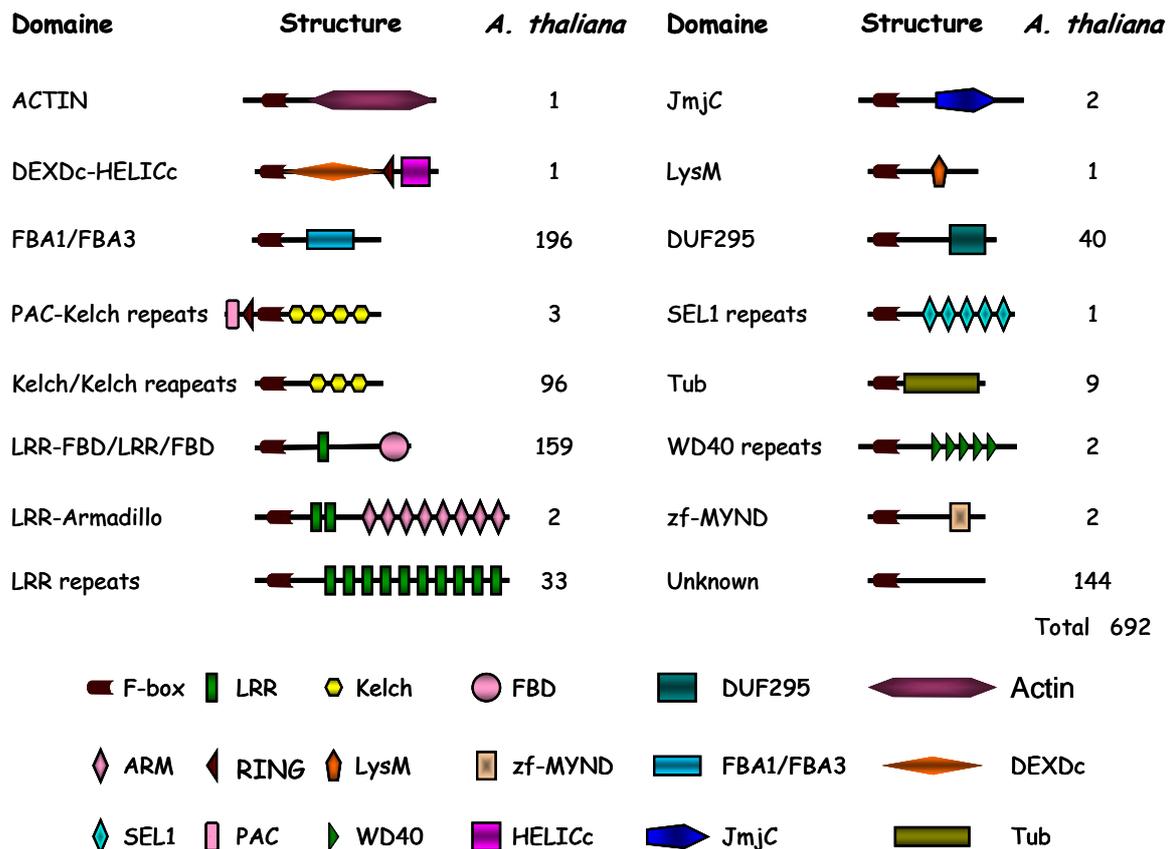


Figure 22 : Représentation des différentes protéines à domaine F-box et leur nombre retrouvé chez *Arabidopsis thaliana* [Adaptée de (Xu *et al.*, 2009a)].

- Les sous-unités du SCF ligase E3
 - CUL

Le génome d'*Arabidopsis* contient 11 gènes associés aux protéines Cullins (Shen *et al.*, 2002), cinq protéines Cullin ont été identifiées CUL1, CUL2, CUL3A, CUL3B et CUL4. CUL1 et CUL2 forment des sous-unités des complexes SCF (Gray *et al.*, 1999; Risseuw *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2004). Toutefois, les autres protéines Cullins peuvent également former des complexes de protéines avec une activité Ub-ligase (Dieterle *et al.*, 2005; Thomann *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005; Bernhardt *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006).

- Rbx (Ring-box protéine)

Deux protéines Rbx sont retrouvées chez *Arabidopsis* (Rbx1a ou Rbx1;1 et Rbx1b ou Rbx1;2) et appartiennent à la sous-classe RING-H2 (Gray *et al.*, 2002; Lechner *et al.*, 2002). Rbx1a est exprimée dans tous les organes de la plante et Rbx1b est exprimée dans des types cellulaires particuliers ou à des niveaux d'expression très bas. La modification dans l'expression de Rbx1 induit de graves altérations dans la croissance et le développement (Lechner *et al.*, 2002).

- SKP (S-phase-kinase-associated protein) ou ASK (pour Arabidopsis SKP1-like protein)

Chez *Arabidopsis*, on dénombre 21 gènes de protéines SKP1-like (ASK) (Farras *et al.*, 2001; Gagne *et al.*, 2002; Risseuw *et al.*, 2003). ASK1 est la première protéine SKP1-like identifiée chez *Arabidopsis* (Porat *et al.*, 1998). La protéine ASK1 interagit avec CUL1 et constitue une composante du complexe SCF en interagissant avec diverses protéines à F-box (Gray *et al.*, 1999; Gagne *et al.*, 2002). ASK1 et ASK2 sont les représentants les plus abondants et leurs profils d'expression sont semblables au cours du développement des plantes (Marrocco *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003). ASK1 et ASK2 présentent 75,4% d'identité en acides aminés et 84,8% de similarité (Gagne *et al.*, 2002).

- Protéine F-box

Le nombre de gènes *F-box* est très variable selon les espèces. Il en existe 14 chez la levure, 68 chez l'homme et 692 à 724 et 779 gènes *F-box* ont été respectivement identifiés chez *A. thaliana* et *Oryza sativa*. Ainsi, chez les plantes, les gènes *F-box* forment l'une des plus grandes familles multigéniques et contrôlent de nombreuses fonctions biologiques (**tableau 2**). Le motif F-box, identifié sur la cycline F (Bai *et al.*, 1996) se caractérise par le consensus L P X [E, K] I L X K [I, V] L X₂ L D P X D L/R X [L, F] [R, S] K V [S, C] [K, R] [K, R] [W, F] [R, K] X L V D X₈ I, localisé en N-terminal de la protéine (Kipreos and Pagano, 2000). Sur des bases phylogénétiques et d'organisation de domaine, la superfamille des gènes F-box chez les plantes a été divisée en 42 familles, dont chacune contient des gènes codant pour des protéines avec les organisations de domaines d'interactions protéine-protéine dans la partie C-terminale, identiques ou similaires (Mazzucotelli *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009a). Ces motifs C terminaux comme par exemple WD40, LRR (leucine-rich repeat) ou Kelch repeat présentés sur la **Figure 22**, sont responsables d'interactions protéine-protéine et assurent la spécificité lors du choix des substrats à dégrader (Kipreos and Pagano, 2000; Lechner *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009a). Citons comme exemple la famille des protéines F-box

contenant le Kelch motif (KFB). Le motif Kelch, de 44 à 56 acides aminés, a été initialement identifié dans la protéine KELCH de *Drosophila melanogaster* (Xue and Cooley, 1993; Bork and Doolittle, 1994). Ce motif est caractérisé par quatre résidus hautement conservés : deux glycines adjacentes (G), et une paire de tyrosine (Y) et de tryptophane (W) séparées par environ six résidus (Adams *et al.*, 2000; Prag and Adams, 2003). Un seul motif Kelch forme quatre feuillets bêta, et de multiples motifs Kelch peuvent s'associer, en formant une bêta-hélice (propeller) qui assure l'interaction avec d'autres protéines (Ito *et al.*, 1991). Chez *Arabidopsis*, il existe près de 97 gènes codant pour des protéines KFB contenant de un à cinq motifs Kelch (Sun *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009a). Les plus étudiées sont très semblables (ZTL, FKF, LKP2) et impliquées dans le contrôle du temps de floraison et du cycle circadien (Nelson *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2004; Yasuhara *et al.*, 2004; Imaizumi *et al.*, 2005; Baudry *et al.*, 2010).

Si de multiples complexes SCF sont présents et ne diffèrent que par la nature de la FBP, une même protéine F-box peut également s'associer à différents homologues de SKP1, rendant possible la formation d'un très grand nombre de complexes SCF (Takahashi *et al.*, 2004). De plus, certaines protéines F-box semblent fonctionner sans liaison à Skp1 et ne feraient donc pas partie d'un complexe SCF, suggérant que leurs cibles pourraient ne pas être ubiquitinées et dégradées par le protéasome. D'autres FBP agissent également de manière indépendante du complexe SCF (Kipreos and Pagano, 2000; Hermand, 2006) et possèdent donc à la fois des fonctions protéolytiques et non protéolytiques [pour revue voir (Ho *et al.*, 2008)].

Dans la majorité des organismes, la phosphorylation des cibles est une condition préalable à leur reconnaissance par les FBP. Il est crucial qu'un ou plusieurs résidus de la phosphoprotéine substrat soient phosphorylés pour interagir avec la FBP (Hao *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2008) excepté pour le facteur de transcription Atf1 dont la phosphorylation affecte négativement son interaction avec la protéine F-box (Lawrence *et al.*, 2009). En plus de la phosphorylation, d'autres modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, la méthylation, l'acétylation et l'ADP-ribosylation peuvent affecter cette reconnaissance de cible (Cardozo and Pagano, 2004). Chez les plantes, les hormones peuvent moduler l'interaction entre les protéines F-box et leurs substrats. Ainsi, l'auxine régule l'interaction de la protéine F-box TIR1 et son substrat AUX/IAA (Tan *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2008).

Les FBP étant placées à l'interface enzymatique pour associer des substrats et les ubiquitiner, ce placement permet également aux FBP elles-mêmes de devenir des cibles

d'ubiquitination (Wirbelauer *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2008) et de libérer des complexes SCF disponibles pour de nouvelles FBP.

A l'inverse, des niveaux élevés de substrat peuvent conduire à la stabilisation de la FBP correspondante. On peut citer comme exemple l'auto-ubiquitination et la dégradation de la FBP β -Trop2 de mammifère qui est inhibée lorsque les niveaux de la protéine substrat phosphorylé I κ B α sont augmentés (Li *et al.*, 2004a). La disponibilité du substrat joue un rôle dans la protection de la FBP contre son auto-ubiquitination. On peut supposer que lorsque les niveaux de substrat sont faibles, la FBP n'est plus physiquement protégée par l'interaction avec le substrat, et elle devient disponible pour la destruction catalytique par le complexe SCF.

Les protéines F-box connectent l'ubiquitination à de nombreux processus cellulaires (Lechner *et al.*, 2006) et contrôlent par exemple la stabilité de facteurs de transcription impliqués dans la signalisation de phytohormones, la formation des racines latérales (Dharmasiri *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2006; Santner and Estelle, 2010), le développement (Gonzalez-Carranza *et al.*, 2007; Schwager *et al.*, 2007). Elles sont impliquées dans les interactions plantes-pathogènes (Kim and Delaney, 2002; Ho *et al.*, 2008; van den Burg *et al.*, 2008).

Introduction générale

Tableau 2 : Vue d'ensemble des protéines F-box de plantes et de leurs fonctions biologiques connues. [Adapté de (Lechner *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2008)].

Protéine F-box	Motif	substrat	Rôle
TIR1 AFB1-3	LRR	AUX/IAA	Signalisation auxine
ABF5	LRR	?	Synthèse d'auxine
SLY1 SNE GID2	-	DELLA	Signalisation de Gibbérelline
EBF1 et 2	LRR	EIN3 et EIL	Réponse à l'éthylène
TLP9	domaines Tubby	?	Signalisation ABA ?
COI1	LRR	Histone déacétylase ?	Signalisation Jasmonate, contrôle de la croissance des racines, la fertilité du pollen et la réponse de défense
SON1	-	?	Réponse de défense
UFO FIM	-	?	Contrôle du développement des fleurs
AFR	Kelch repeats	?	Signalisation PhyA
EID1	Leucine-zipper	?	Photomorphogenèse, Signalisation PhyA
ZTL	Domaine LOV/PAS, Kelch repeats	TOC1, PRR5	Contrôle de temps de floraison et du cycle circadien
FKF	Domaine LOV/PAS, Kelch repeats	CDF1	Contrôle de temps de floraison et du cycle circadien
LKP2	Domaine LOV/PAS, Kelch repeats	?	Contrôle de temps de floraison et du cycle circadien
ORE9/MAX2	LRR	?	Contrôle de la sénescence des feuilles et de la ramification latérale
ARABIDILLO-1 et 2	Arm-repeats	?	Contrôle du développement des racines latérales
CEG	-	?	Formation de racines latérales
VFB1-4	LRR	?	Formation de racines latérales
SFB/SLF	-	S-RNases	Contrôle de l'auto- incompatibilité
SKP2A	LRR	?	Contrôle du cycle cellulaire
P0 (viral)	-	AGO1	Contrôle de l'ARN silencing de l'hôte
CINK (viral)	LxCxE motif	pRB?	Réplication de l'ADN d'hôte
VirF (Bacterial)	-	?	Déprotéinisation de l'ADN-T

b. Implication de l'ubiquitine/protéasome 26S dans la défense des plantes

Les plantes sont les cibles d'attaques par un grand nombre de pathogènes et ont développé plusieurs stratégies de défense contre ces attaques. En effet, les plantes utilisent les barrières physiques et chimiques comme la paroi cellulaire et l'expression des enzymes et la synthèse d'antimicrobiens, mais aussi des réactions de défense inductibles qui s'activent dès l'infection.

Les réactions de défense des plantes contre l'infection font partie intégrante de la réponse immunitaire innée qui inclut le Post-transcriptional gene silencing (PTGS) ou RNAi, un mécanisme de défense antivirale (Voinnet, 2005). Un premier mécanisme reconnaît des molécules communes à plusieurs classes de micro-organismes [MAMP ou PAMP (microbial- ou pathogen-associated molecular patterns, respectivement) comme la flagelline] en induisant une réponse de type PTI (PAMP triggered immunity) (Schwessinger and Zipfel, 2008). Un second mécanisme agit principalement dans la cellule et fait appel à l'expression de gènes de résistance (R), dont les produits interagissent directement ou indirectement avec les produits de gènes d'avirulence (Avr) de pathogènes (Jones and Dangl, 2006). Ce mécanisme, appelé la résistance "gène-à-gène", induit l'activation des mécanismes de défense et un arrêt de la croissance des agents pathogènes (Flor, 1971; Nishimura and Dangl, 2010).

Plusieurs études ont montré un rôle d'UPS dans la transduction des signaux de défense contre les pathogènes. En effet, la dégradation par le protéasome 26S d'un activateur ou d'un répresseur de signalisation de la défense conduit à améliorer la sensibilité ou la résistance au pathogène, respectivement. Ces réactions comprennent l'accumulation de niveaux élevés de composés endogènes de l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène, l'induction de plusieurs gènes associés à la pathogenèse (PR) (pathogenesis-related) et la production de phytoalexine comme la camalexin [pour revue voir (Glazebrook, 2005; Thatcher *et al.*, 2005; Nishimura and Dangl, 2010). Ces réactions de défense ne font pas obstacle à l'initiation de maladie, mais limitent l'agressivité des agents pathogènes et leur propagation.

Les complexes SCF jouent un rôle positif ou négatif dans la résistance aux maladies. Chez *A. thaliana*, la protéine Coronatine Insensitive 1 (COI1 et son homologue JA1 de Tomate) contient un motif F-box suivi d'un domaine répété riche en leucine (LRR) ; elle a été identifiée récemment comme un récepteur de l'acide jasmonique (JA) requis pour la

défense contre les insectes et certains pathogènes (Katsir *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009). Le lien entre gène de résistance et UPS est également illustré par la répression du gène SGT1 (SUPPRESSOR OF G-2 ALLELE OF SKP1) qui conduit à la perte de la réaction hypersensible (HR) conférée par les gènes de résistance *Cf-9* et *Cf-4* en réponse à l'infection de *Cladosporium fulvum* (Peart *et al.*, 2002) ou du *Tobacco mosaic virus* (TMV), dans des plantes possédant le gène de résistance N. Dans ces plantes, la perte de réaction HR est également observée lorsque les gènes SKP1 et COI1 sont réprimés (Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b). La protéine à F-box ACRE189 ou ACIF1 (Avr9/Cf-9-INDUCED F-BOX1) possède 14 motifs riches en leucine (LRR) et elle interagit avec les sous-unités du complexe SCF (ASK1/ASK2/CUL1) pour réguler la mort cellulaire et les réponses de défense après reconnaissance du pathogène (van den Burg *et al.*, 2008). Les photorécepteurs de lumière bleue, cryptochrome (CRY) 2 et phototropin (PHOT) 2, sont requis pour la stabilité de la protéine R (HRT), et par conséquent pour la résistance au *Turnip Crinkle virus* (TCV). En effet, les CRY 2 et PHOT 2 régulent la stabilité de HRT en réprimant l'activité de COP1 dans l'UPS (Jeong *et al.*, 2010).

A l'inverse, certains complexes SCF peuvent favoriser la maladie (Kim and Delaney, 2002). SON1 (Suppressor of Nim1) est une FBP impliquée dans la compatibilité plante-pathogène. Cette FBP agit négativement sur la régulation des réponses de défense des plantes vis-à-vis de *Hyaloperonospora parasitica* et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, indépendamment de la résistance systémique acquise et de l'accumulation de l'acide salicylique (SA). Une fonction identique a été trouvée pour la protéine F-box CPR30 d'*Arabidopsis* (Gou *et al.*, 2009).

Les virus et les bactéries pathogènes détournent les SCF et reprogramment les fonctions cellulaires à leur avantage. La bactérie pathogène *Agrobacterium tumefaciens* attaque les cellules hôtes par la dégradation des protéines *via* le SCF. Ces bactéries reprogramment génétiquement leur hôte en introduisant un ADN-T dans le génome de cellules hôte. Lors de son injection dans le cytoplasme et sa migration au noyau, l'ADN-T bactérien est associé aux protéines bactériennes VirD2, VirE2 et à la protéine VIP1 de plante. La déprotéinisation de l'ADN-T en vue de son intégration dans le génome d'hôte est favorisée par une FBP bactérienne, la protéine VirF. Cette protéine de virulence VirF est sécrétée par la bactérie. VirF interagit avec l'homologue de SKP1 de plante hôte (Schrammeijer *et al.*, 2001) et cible la protéine VIP1 en vue de sa dégradation SKP1-dépendante par le protéasome 26S. La dégradation de VIP1 pendant le processus d'infection est probablement cruciale pour faciliter l'infection (Tzfira *et al.*, 2004).

Introduction générale

Les virus utilisent également le système UPS pour favoriser l'infection (Banks *et al.*, 2003) ; ils codent directement pour des composants d'E3 ou modulent les activités UPS de leur hôte. La protéine p33 du *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), un virus à ARN de polarité positive, interagit avec plusieurs composants de système UPS (Panavas *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008) et son ubiquitination est requise pour son interaction avec les partenaires cellulaires comme la protéine Vps23p ESCRT (endosomal complexes required for transport) et facilite l'assemblage optimal du complexe de réplication sur des surfaces membranaires (Barajas and Nagy, 2010). De même, la quantité de l'ARN polymérase RNA dépendant du *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) pourrait être régulée par l'ubiquitination (Hericourt *et al.*, 2000), et la poly-ubiquitination de la protéine du mouvement du TYMV joue probablement un rôle dans sa dégradation et dans la régulation des processus du mouvement de cellule à cellule (Drugeon and Jupin, 2002).

Le *Faba bean necrotic yellow virus* (FBNYV, *Nanovirus*), code une FBP nommée CLINK (Cell cycle link) qui interagit avec SKP1 (Aronson *et al.*, 2000) et intervient dans le cycle cellulaire, probablement en modulant l'activité de RBR, Retinoblastoma related protein (Lageix *et al.*, 2007).

Un motif F-box est retrouvé dans la protéine P0 du *Beet western yellow virus* (*Polerovirus*), un suppresseur de PTGS (Pfeffer *et al.*, 2002). Pour combattre cette réaction de défense, de nombreux virus de plantes codent pour des suppresseurs de silencing de nature très variée (Voinnet *et al.*, 1999). La F-box P0 interagit avec les protéines ASK1 et ASK2 d'*Arabidopsis* (Pazhouhandeh *et al.*, 2006). Les mutations ponctuelles dans le motif F-box abolissent l'interaction P0-ASK, réduisent l'activité suppresseur de PTGS et la pathogénicité du virus (Pazhouhandeh *et al.*, 2006). De plus, le knock-down de l'homologue de SKP1 dans des plantes de *Nicotiana benthamiana* les rend résistantes à l'infection de *Polerovirus*, ce qui soutient l'idée que la P0 fait partie du complexe SCF et cible les protéines de l'hôte impliquées dans le mécanisme de PTGS (Pazhouhandeh *et al.*, 2006). En effet, la protéine P0 favorise la dégradation de l'ARGONAUTE1 (AGO1), qui est un élément clé du complexe RISC (RNA induced silencing complex) (Bortolamiol *et al.*, 2007). Toutefois, cette dégradation d'AGO1 s'effectue de manière indépendante du protéasome (Baumberger *et al.*, 2007). Récemment Csorba *et al.*, ont suggéré que la P0 empêche l'assemblage d'AGO1 dans le complexe RISC, conduisant à sa dégradation (Csorba *et al.*, 2010). Dans la même étude, ils ont observé une accumulation massive de protéines poly-ubiquitinées en présence de P0 sauvage ou d'un mutant F-box de P0

(POLP1) suggérant à la fois un ciblage F-box-dépendant d'AGO1 et la polyubiquitination F-box-indépendante des protéines cellulaires.

V. Autres PTM

Il existe d'autres types de modification post-traductionnelle qui ne seront pas détaillées dans cette thèse (e.g. carbonylation, incorporation de sélénocystéine). Je résume les PTM présentées dans **le tableau 3**.

Tableau 3 : Vue d'ensemble de modifications co- et post traductionnelles citées dans ce mémoire de thèse et leurs fonctions biologiques connues.

Modification	cible	Processus cellulaires
Protéolyse	N- et C-terminal	Régulation et maturation
Myristoylation	Gly (N-terminal)	Association membranaire Interaction protéine-protéine
Palmitoylation	Cys (N- et C-terminal)	Association membranaire
Prénylation	Cys (C- terminal)	Signalisation, oncogenèse
Glycosylation	Asn, Ser, Thr	Stabilisation, interactions
ADP-ribosylation	Arg, Cys, Tyr, Asn, Glu, Lys	Réparation d'ADN, croissance cellulaire
Nucléotidylation (Adenylylation, Uridylylation)	Tyr, Thr	Initiation de transcription
Déamidation	Asn, Gln	Changement structural, régulation
Amidation	Gly (C-terminal)	Peptides bioactifs, stabilisation
Carboxylation	Glu	Fixation de calcium
Oxydation	Cys, Met, Tyr, Trp, His	Activité enzymatique
Hydroxylation	Pro, Lys, Asn, Asp	Stabilisation structurale et interactions
Sulfation	Tyr	Interaction protéine-protéine
Acétylation	Lys ou N-terminal	Expression de gène, interaction protéine-protéine, Stabilisation,
Formylation	Lys	Réponse aux stress
Pyroglutamation	Gln, Glu (N-terminal)	Activation et stabilisation
Méthylation	Arg, Lys, His, Glu, IsoAsp, Cys	Réparation d'ADN, régulation
Phosphorylation	Ser, Thr, Tyr	Activation d'enzyme, signalisation, régulation
SUMOylation	Lys	Régulation de transcription, réparation d'ADN, localisation
Ubiquitination	Lys	Dégradation de protéine, réparation d'ADN

VI. Relations entre les PTM

Comme nous avons pu le voir au travers d'exemples cités ci-dessus, un aspect très intéressant des PTM est la possibilité d'interactions croisées entre les différents types de modifications. Certaines PTM sont en concurrence lors de processus de régulation cellulaires, en particulier lorsque deux PTM ciblent un même acide aminé ou des résidus voisins. La SUMOylation, par exemple, peut entrer en compétition avec l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007) et l'acétylation peut entrer en concurrence avec la phosphorylation (Mukherjee *et al.*, 2006). L'*O*-GlcNAcylation et la phosphorylation se produisent sur la chaîne latérale d'une sérine ou thréonine. En général, les sites de phosphorylation peuvent être des cibles de l'*O*-GlcNAcylation. Ces vastes et complexes interactions sont synergiques ou antagonistes en jouant un rôle de réciprocité dans la régulation de la fonction des protéines par compétition pour la modification d'une même sérine ou thréonine. Cette relation de réciprocité a été démontrée entre autres pour l'ARN Pol II (Slawson and Hart, 2003). Ces dualités de PTM sont à replacer dans le contexte de la localisation subcellulaire de la cible modifiée (Hu *et al.*, 2010). Des synergies entre PTM apparaissent essentielles pour l'obtention d'une fonction donnée, comme par exemple la S-acylation précédée d'une association de la protéine à la membrane induite par prénylation, myristoylation ou par des interactions protéine-protéine (Sorek *et al.*, 2007; Batistic *et al.*, 2008). La phosphorylation d'une cible en aval d'un site de SUMOylation, peut augmenter le niveau de SUMOylation d'une protéine en favorisant la fixation de Ubc9 (Hietakangas *et al.*, 2006). Toujours dans le cas des modifications liées à l'UPS, l'ubiquitination de protéines SUMOylées fait intervenir les ubiquitine ligases SUMO-dépendantes, qui interviennent spécifiquement dans la polyubiquitylation et la dégradation des protéines polySUMOylées (Geoffroy and Hay, 2009). L'interaction entre ces deux modifications post-traductionnelles peut être : (i) coopérative et successive, le plus souvent, SUMO précède et facilite la conjugaison d'Ub en visant le même effet ; (ii) compétitive sur le même résidu lysine, une modification écarte l'autre et agit contradictoirement par exemple sur la stabilité/la dégradation de protéine ou sur l'activation/l'inactivation de l'enzyme ; et (iii) différentielle, selon les stimuli cellulaires, ces modifications alternatives déclenchent des résultats physiologiques distincts [voir revue (Denuc and Marfany, 2010)].

Introduction générale

Les PTM sont donc organisées en réseaux très complexes. Il faut noter que les modifications post-synthétiques essentielles pour la biologie de la cellule se produisent sur d'autres molécules que les protéines comme sur des lipides (phosphorylation, la glycosylation) ou sur des acides nucléiques (méthylation, ADP-ribosylation) qui jouent un rôle fondamental dans la biologie cellulaire. Les agents pathogènes modulent également les modifications de ces autres composants cellulaires pendant l'infection.

**Chapitre I : Étude des modifications post
traductionnelles de la protéine p25 dans le
but d'identifier un mutant dominant négatif
utilisable dans la lutte contre le BNYVV**

I. Introduction

Si la sélection variétale de betteraves tolérantes à l'infection du BNYVV maintient des rendements en sucre acceptables, elle assure la multiplication du vecteur virulifère dans les sols infestés. Certaines variétés, (*Beta patellaris* et *Beta procumbens*) quant à elles sont résistantes à *Polymyxa betae* mais les tentatives de transfert de ces résistances par les techniques de génétique classique dans *B. vulgaris* ont échoué (Barr *et al.*, 1995; Scholten and Lange, 2000; Rush, 2003).

D'autre part, la forte pression de sélection des gènes de résistance utilisés (*Rz1* et *Rz2*) conduit à l'émergence d'isolats de BNYVV contournant la ou les résistances utilisées. Ces isolats mutants sont principalement modifiés au niveau de la séquence codante de la protéine p25 (Schirmer *et al.*, 2005; Acosta-Leal *et al.*, 2008; Chiba *et al.*, 2008; Acosta-Leal *et al.*, 2010b). Ainsi, une meilleure compréhension de la biologie du virus et de son vecteur devrait permettre de trouver d'autres moyens de lutte efficace contre ce virus.

1. Lutte antivirale par transgénèse

La lutte antivirale par transgénèse peut être effectuée par diverses approches. Voici les méthodes le plus souvent utilisées :

- L'expression de scFv (single chain antibody variable fragment), mimant les domaines fonctionnels d'immunoglobulines, permet l'inactivation de protéines virales tout comme le feraient des anticorps neutralisants. Des anticorps dirigés contre les virus entiers/virions, protéines de la nucléocapside ou RdRp peuvent être utilisés pour concevoir des plantes résistantes aux virus en adaptant l'inactivation de différentes protéines virales. Des *N. benthamiana* exprimant des scFv dirigés contre la protéine N du virus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) présentent des niveaux élevés de résistance contre le virus (Prins *et al.*, 2005).
- L'expression de protéines possédant des activités antivirales et qui ciblent et inhibent différentes étapes essentielles du cycle de multiplication virale. Une classe de protéines d'inactivation du ribosome (RIP) et des inhibiteurs de protéases ont été les plus exploités dans cette méthode de lutte par la transgénèse chez les plantes (Gutierrez-Campos *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2004).

- L'expression ectopique de gènes de résistance R provenant d'une autre plante semble être une stratégie durable de lutte antivirale par transgénèse. On peut citer, comme exemples, l'expression du gène Tm-2(2) de tomate dans le tabac qui lui confère une résistance durable au *Tomato mosaic virus* (Lanfermeijer *et al.*, 2003), ou celle du gène N de tabac dans la tomate qui la protège de l'infection par le TMV (Whitham *et al.*, 1996).
- La résistance dérivée du pathogène ou PDR (pathogen-derived resistance) repose sur l'utilisation de gènes ou de séquences de gènes viraux pour transformer les plantes hôtes afin de conférer une résistance aux pathogènes ciblés. La première approche de PDR est l'expression par transgénèse d'une protéine virale structurale ou d'une protéine non structurale non fonctionnelle (par exemple une protéine de mouvement, MP) pour bloquer une fonction virale et induire une résistance plus ou moins efficace. L'expression de CP mutées de TMV par des plantes transgéniques induit une plus forte résistance que celle apportée par la protéine sauvage (Bendahmane *et al.*, 1995; Bendahmane *et al.*, 1997). Il est supposé que l'expression ectopique de CP empêche la décapsidation des virions et que la présence de protéine mutée influe sur les interactions protéine-protéine (Bendahmane *et al.*, 1995; Beachy, 1997, 1999). La surexpression de polypeptides mutés dans un domaine fonctionnel essentiel peut supplanter les protéines sauvages et perturber leur activité. Ce type de mutant est appelé mutant "dominant négatif" (Herskowitz, 1987). Ces approches ont été testées pour lutter contre le BNYVV en introduisant dans des plantes hôtes la protéine CP (Mannerlof *et al.*, 1996) ou la protéine de mouvement p15 (une des trois protéines de mouvement faisant partie du triple gène block, TGB) mutée. Le mutant dominant négatif de la protéine p15 exprimé dans *Beta vulgaris* confère une excellente résistance contre l'infection virale naturelle (Lauber *et al.*, 2001).

Une seconde approche de PDR consiste à induire la reconnaissance spécifique du génome du pathogène pour induire sa dégradation par « Post transcriptional gene silencing » (Smith *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2000). L'utilisation de séquences répétées et inversées de part et d'autre d'un intron permet la synthèse d'ARN double brin dans les cellules de plantes transformées. Cet ARN est pris en charge par la machinerie impliquée dans le RNA silencing (RNAi/PTGS) et conduit à la production de siRNA immunisant la plante (Waterhouse *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 1999; Waterhouse *et al.*, 2001). Cette méthode appelée IR-PTGS (Inverted-Repeat Post Transcriptional

Gene Silencing) a notamment été utilisée efficacement dans la betterave en introduisant une construction en tige-boucle dirigée contre 400 nts de la réplicase virale du BNYVV (Lennfors, 2006). Des plantes de *Beta vulgaris* exprimant une tige boucle dirigée contre la protéine p15 (TGB-3) du BNYVV ont également montré une diminution significative des symptômes dans le champ (brevet Lauber *et al.*, N°11/418,384).

La protéine NtCPIP (capsid protein interacting protein) a été identifiée comme un partenaire cellulaire de la protéine CP de *Potato virus Y* (PVY). Des plantes transgéniques (*Nicotiana tabacum*) exprimant NtCPIP délétée de sa partie N-terminale et toujours capable d'interagir avec CP, sont partiellement résistantes au PVY qui voit son mouvement restreint. Cependant, l'utilisation de plantes transgéniques "silenciées" spécifiquement pour NtCPIP1 ou pour NtCPIP2 permet une résistance locale mais seulement passagère au PVY (Hofius *et al.*, 2007). Apparemment, une telle stratégie de silencing d'une protéine cellulaire pourrait être limitée par le degré insuffisant de suppression, par l'existence de complémentations fonctionnelles par des isoformes non-ciblées, ou encore par l'inhibition du PTGS par les supprimeurs de silencing (Voinnet *et al.*, 1999). S'il est donc délicat de cibler des facteurs cellulaires, une alternative est envisagée par l'utilisation des protéines virales modifiées. La capacité des protéines virales à former des complexes suggère qu'une co-expression de protéine virale non fonctionnelle peut entrer en compétition avec la protéine sauvage. Ceci suggère que l'effet de cette protéine non fonctionnelle doit être dominant en présence de la protéine sauvage pour pouvoir affecter l'infection virale.

Si des plantes transgéniques résistantes au BNYVV sont disponibles, le maintien de telles résistances au champ est difficile à prévoir. Aussi, la recherche de nouveaux moyens de lutte doit être poursuivie afin de disposer de stratégies alternatives ou pouvant être combinées aux résistances déjà disponibles.

Le mécanisme intime de la résistance vis à vis du BNYVV n'est pas connu mais il semblerait faire intervenir une restriction de la multiplication virale et de la translocation du virus dans les racines (Scholten *et al.*, 1994; Tamada *et al.*, 1999). La protéine p25 pourrait être impliquée dans le contournement de cette résistance dans le cultivar résistant Rizor (Tamada *et al.*, 1999). En effet, la protéine p25 est responsable de plusieurs manifestations au sein de la plante infectée. Elle exacerbe les symptômes foliaires (**figure I.1**), racinaires (de rhizomanie) et est impliquée dans la dérégulation de la balance hormonale dans la plante (Pollini *et al.*, 1990; Jupin *et al.*, 1992; Tamada *et al.*, 1999;

Klein *et al.*, 2007; Peltier *et al.*, 2010). Cette protéine à localisation nucléaire et cytoplasmique (Vetter *et al.*, 2004) est considérée comme un facteur d'avirulence dans les feuilles des plantes résistantes *B. vulgaris* (Chiba *et al.*, 2008). Des isolats contournant la résistance ont été identifiés, ils possèdent des variations de séquence au sein de p25 dans une région hypervariable appelée Tétrade (Schirmer *et al.*, 2005; Chiba *et al.*, 2008; Acosta-Leal *et al.*, 2010a; Acosta-Leal *et al.*, 2010b). Nous avons constaté au laboratoire que la protéine p25 subit des modifications post-traductionnelles. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, ces modifications pourraient moduler les activités de cette protéine multifonctionnelle. Ainsi, l'utilisation d'un mutant dominant négatif de p25, mimant ou inhibant constitutivement une ou plusieurs modifications post synthétique, pourrait empêcher la translocation du virus et l'apparition de la rhizomanie.

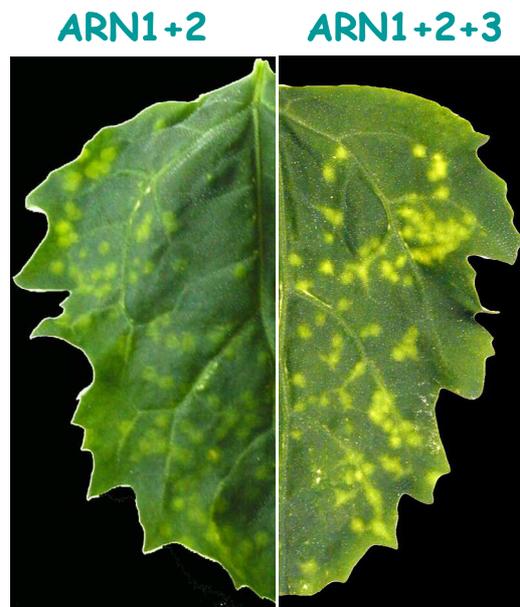


Figure I.1 : Mise en évidence de l'aggravation des symptômes induits par l'expression de la protéine p25 sur feuilles de *C. quinoa* infectées. A gauche, l'inoculation des ARN1 et 2 du BNYVV provoque l'apparition de lésions locales chlorotiques vertes. À droite, l'addition de l'ARN3 induit un changement phénotypique des lésions qui deviennent chlorotiques jaunes. L'utilisation d'ARN3 n'exprimant pas la protéine p25 conduit à des symptômes comparables à ceux de l'image de gauche (Jupin *et al.*, 1992).

II. Étude des modifications post traductionnelles (PTM) de la protéine p25¹

L'analyse par western blot d'extraits de feuilles de *C. quinoa* infectées par les ARN 1, 2 et 3 du BNYVV [Stras123 ; (Quillet *et al.*, 1989)] permet de détecter la protéine de capsidite et un doublet de protéine p25 à l'aide d'anticorps spécifiques (**figure I.2**). L'existence de ce doublet nous laisse penser que la protéine p25 subit une ou plusieurs modifications post traductionnelles.

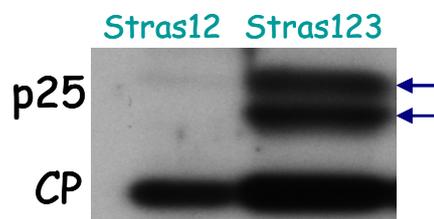


Figure I.2 : La protéine p25 est présente sous la forme d'un doublet après migration sur gel de poly-acrylamide dénaturant. Des extraits totaux de lésions obtenues 6 jours après inoculation de feuilles de *C. quinoa* en absence (Stras12) et en présence d'ARN3 (Stras123) sont analysés par western blot à l'aide d'anticorps poly-clonaux dirigés contre la protéine p25 et contre la protéine de capsidite (CP).

Des expériences préliminaires effectuées au laboratoire par D. Gilmer ont permis de montrer qu'une protéine de 25 kDa est immunodétectée par des anticorps anti thréonine phosphorylée dans les extraits de lésions locales issues de l'infection par les ARN 1, 2 et 3 mais pas lorsque l'ARN3 est absent de l'inoculum. Cette bande différentielle de 25 kDa peut correspondre à la protéine p25 ou à une protéine induite par la présence de l'ARN3 (**figure I.3A**). La purification de protéines phosphorylées de ces extraits à l'aide d'une colonne d'affinité spécifique de phosphosérines et phosphothréonines permet l'immunocapture de la protéine p25. Un doublet de p25 est révélé par western blot après élution (**figure I.3B**). Nous avons donc supposé que la protéine p25 existait sous deux formes phosphorylées ou qu'une forme non phosphorylée était capable d'interagir

¹ Au laboratoire nous travaillons principalement avec l'isolat B de BNYVV et nous disposons des clones cDNA infectieux. Sauf précision contraire, les expériences réalisées pendant ma thèse concernent la protéine p25 de l'isolat B.

fortement avec une p25 phosphorylée. Chez le TYMV, la protéine de 66k apparaît également sous la forme d'un doublet. Les analyses protéomiques ont révélé l'existence d'acides aminés phosphorylés au sein des deux isoformes de p66 (Hericourt *et al.*, 2000). Pour caractériser plus en détail l'existence de PTM sur la protéine p25, nous avons analysé son comportement par électrophorèse bidimensionnelle.

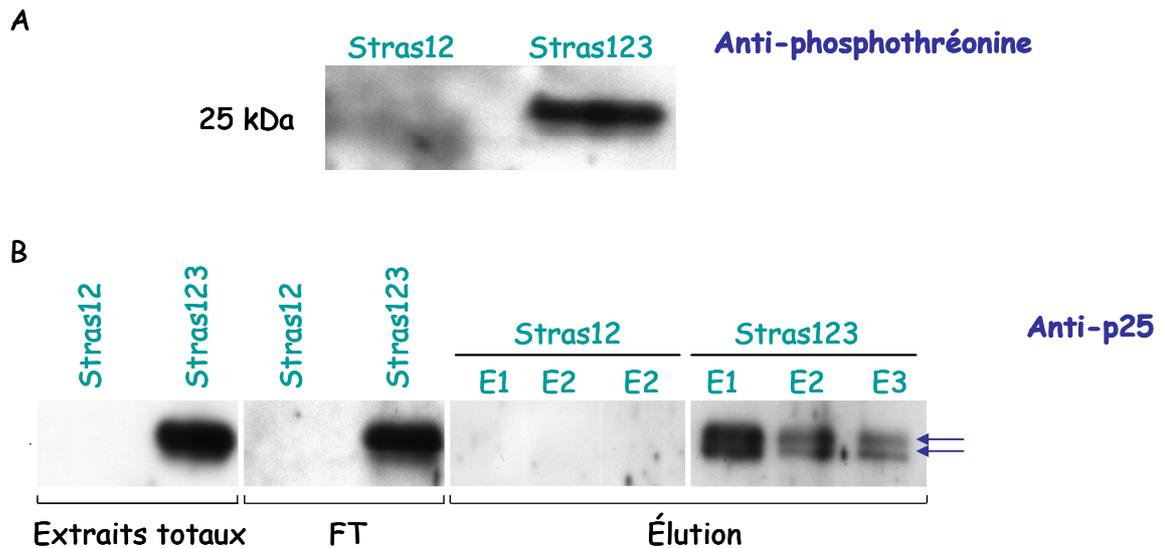


Figure I.3 : La protéine p25 est phosphorylée *in vivo*. (A) Des extraits totaux de lésions obtenues 6 jours après inoculation de feuilles de *C. quinoa* en absence (Stras12) et en présence d'ARN3 (Stras123) sont analysés par western blot à l'aide d'anticorps anti-thréonine phosphate. (B) Ces extraits sont déposés sur colonne d'affinité spécifique de résidus phosphosérines et phosphothréonines. Les protéines non retenues (FT) et éluées (E1 à E3) après lavage de la colonne ont été précipitées et analysées par western blot à l'aide d'anticorps dirigé contre la protéine p25.

Les deux étapes de la séparation de protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2D) permettent de les séparer en fonction de leur point isoélectrique (pI) puis de leur poids moléculaire (PM). Le point isoélectrique représente le pH auquel la charge nette d'une protéine est nulle. Il est donc influencé par la nature des chaînes latérales des acides aminés. Des modifications post traductionnelles introduisant ou supprimant des charges (phosphorylation, N-acétylation, déamidation, glycosylation, sulfatation,...etc) changent le pI de la protéine mais aussi l'accessibilité du SDS sur la protéine et par conséquent le poids moléculaire apparent sur gel dénaturant (SDS-PAGE).

Les protéines séparées par électrophorèse bi-dimensionnelle apparaissent sous la forme de spots après coloration ou immunodétection et leur contenu peut être analysé par

spectrométrie de masse. Une telle approche permet de détecter certains changements de masse d'une protéine connue. Le **tableau I.1** résume quelques changements de masses peptidiques après une modification co- ou post traductionnelle. On peut citer par exemple, que la phosphorylation d'un acide aminé induit une augmentation de masse du peptide de 80 Da.

Tableau I.1 : Les modifications en masse peptidique produites après des modifications des protéines [d'après (Mann and Jensen, 2003)].

Type de PTM	Changement en masse (Da)
Phosphorylation	+80
Acétylation	+42
Méthylation	+14
Sulfatation	+80
Déamidation	+1
Acide pyroglutamique	-17
Myristoylation	+210
Palmitoylation	+238
Farnésylation	+204
Glycosylation	> 800
Ubiquitine	> 1000

Identification des PTM sur la protéine p25

1. Approche protéomique

Une séparation par électrophorèse bidimensionnelle (2D) couplée à une analyse par spectrométrie de masse a été initiée au laboratoire par Audrey Schirmer dans le but d'identifier et de localiser les modifications présentes sur la protéine p25. Cette analyse a été conduite en collaboration avec Dimitri Heintz et Philippe Hammann (CNRS, Strasbourg).

L'analyse différentielle du contenu protéique de tissus contenant ou non la protéine p25 a permis de localiser la protéine p25 au sein de différents spots. La présence de plusieurs spots dans lesquels la protéine p25 est retrouvée suggère qu'elle existe sous plusieurs isoformes, bien qu'elle soit codée par un seul gène viral. L'analyse MS-MS a révélé, entre autres, l'existence d'une N-acétylation et de déamidations.

i. N-acétylation et déamidation de la protéine p25

La protéine p25 a été exprimée dans *Nicotiana benthamiana* par agro-infiltration des feuilles en présence du suppresseur de RNAi du BWYV (P0). Après séparation sur deux gels 2D et immunodétection de p25 par western blot de l'un des gels, la protéine p25 a été localisée au sein de 5 spots (**figure I.4A**). Le contenu de ces spots a été caractérisé par MALDI-MS et MS-MS. L'analyse MALDI-MS du spot b a révélé une N-acétylation et la présence de phosphorylations avec un recouvrement de 76% (**figure I.4B**). L'analyse MS-MS (**figure I.4C**) a confirmé la N-acétylation de p25 (recouvrement de 30 %) mais pas la présence de phosphorylations. Il faut noter qu'une phosphatase est également détectée au sein du spot.

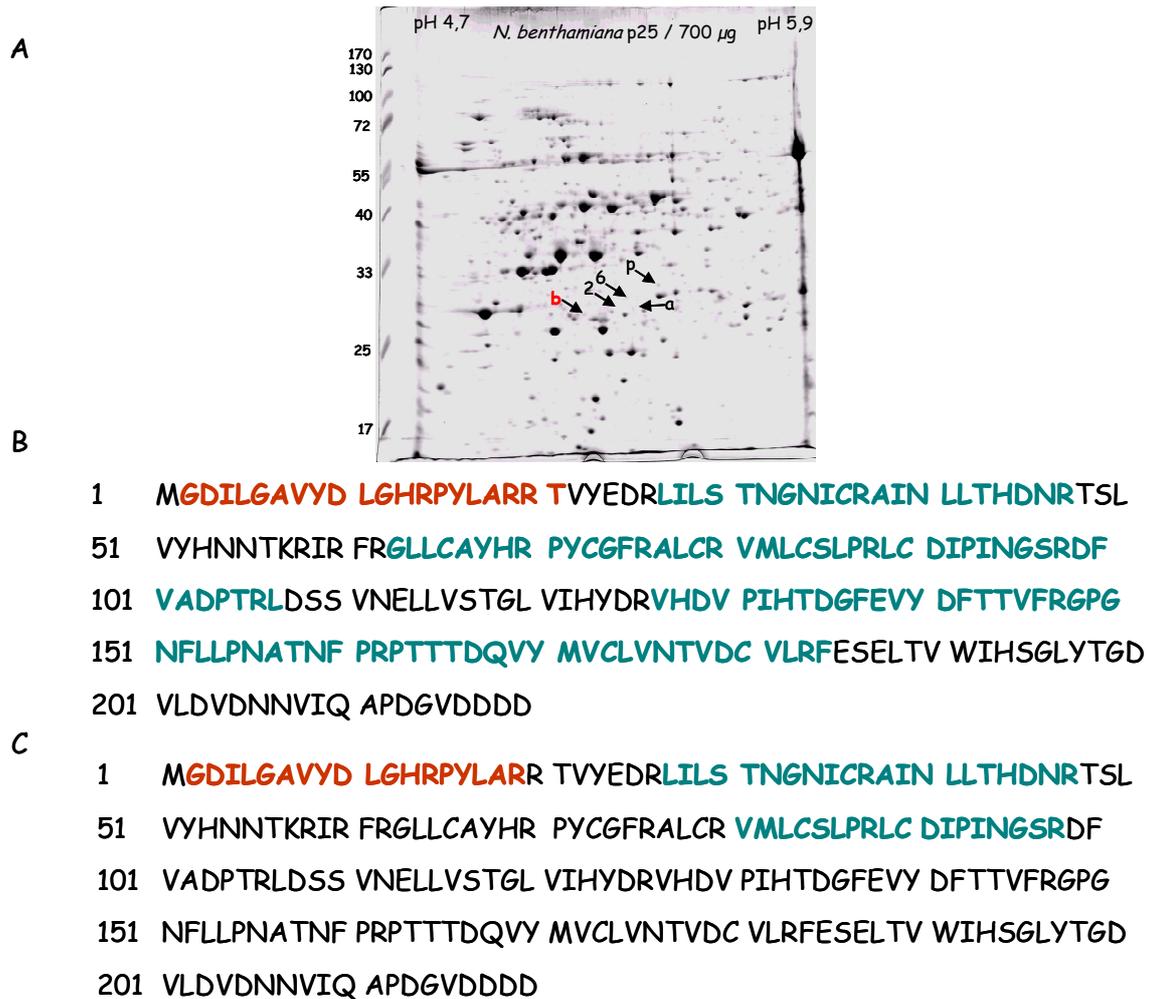


Figure I.4 : Identification d'une N-acétylation de la protéine p25 après séparation bidimensionnelle. (A) Les cinq spots contenant la protéine p25 sont indiqués par les flèches. Le spot b a été analysé par MS et par MS-MS. (B) L'analyse de MS montre une couverture de séquence de 76 % avec N-acétylation et 68 % avec phosphorylation. (C) L'analyse par MS-MS a confirmé la N-acétylation dans ce spot avec 30 % de recouvrement mais sans détecter de phosphorylation. Les peptides identifiés sont marqués en bleu et le peptide N-acétylé en rouge.

Une autre expérience a permis l'identification de trois spots renfermant la protéine p25. L'analyse MS-MS (16 % de recouvrement) a révélé une déamidation (**figure I.5**) mais pas de N-acétylation ni de phosphorylation. Le peptide identifié (₈₉LCDIPIDGSRD₉₉) ne contient pas un résidu d'asparagine N mais un acide aspartique D correspondant au site de déamidation.

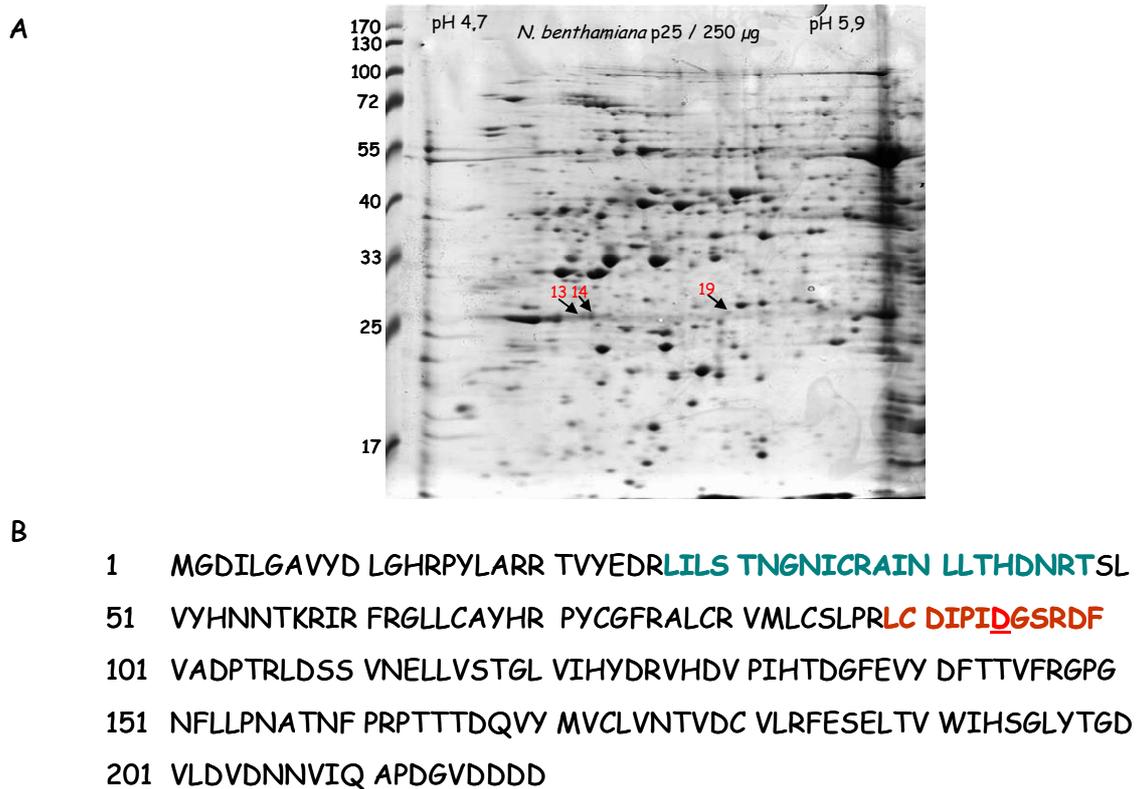


Figure I.5 : Identification d'une déamidation de la protéine p25 après séparation bidimensionnelle. (A) Trois spots contenant la protéine p25 ont été identifiés sur le gel bidimensionnel et analysés par MS-MS. (B) L'analyse de MS-MS couvrant 16% de la séquence de p25 a révélé la déamidation N95D. Les peptides détectés sont marqués en bleu et le peptide déamidé en rouge.

La déamidation chimique d'une protéine (artéfact) peut se produire lors de son contact avec une base forte. Cependant, lors de la préparation des échantillons, ceux-ci n'ont jamais été en présence d'une base forte. Ceci laisse penser que la déamidation N95D pourrait correspondre à une PTM de la protéine servant à moduler l'une de ses fonctions. Lors de ces deux dernières expériences, aucun peptide phosphorylé n'a été détecté. L'absence de détection n'exclut pas l'existence de phosphorylations de la protéine p25 mais illustre le manque de sensibilité lors de la coloration des protéines issues de l'expression transitoire de p25 hors contexte viral. En effet, l'immunodétection de p25 dans ces extraits révèle la présence d'un chapelet de spots (**Figure I.6**) pouvant correspondre à plusieurs événements de phosphorylations combinés ou non à la N-acétylation et la déamidation. L'ensemble de ces spots n'apparaît pas après coloration au bleu colloïdal (comparer les **figures I.4** et **I.5** à **I.6**). Si plusieurs peptides potentiellement phosphorylés ont été identifiés par MALDI-MS et si deux peptides ont été identifiés par MS-MS, les données obtenues n'ont pas été reproductibles.

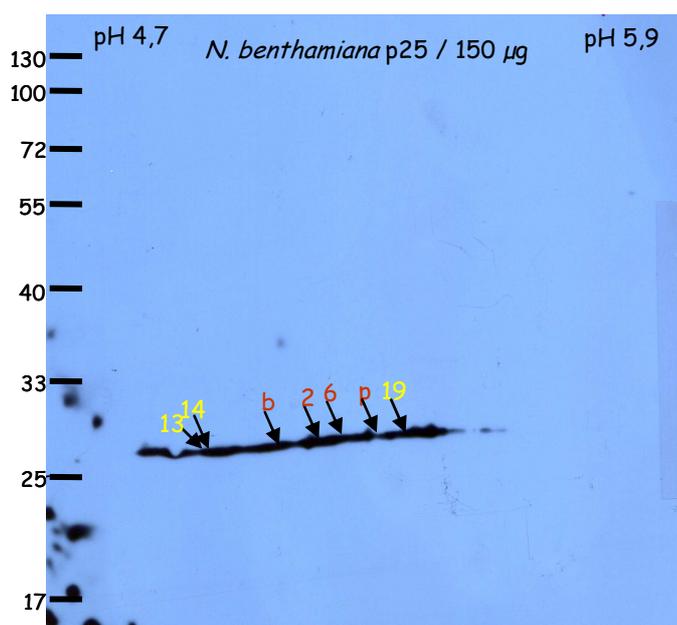


Figure I.6 : Différentes isoformes de la protéine p25 identifiées en western blot. Ces isoformes sont positionnées en chapelet de spots. Le spot b représente la protéine p25 N-acétylée et phosphorylée tandis que les spots 2, 6 et P représentent des isoformes de la p25 N-acétylées, alors que les spots 13, 14 et 19 sont des isoformes déamidées.

ii. Phosphorylation de la protéine p25

L'identification par spectrométrie de masse des peptides phosphorylés ayant échoué, nous avons utilisé une approche biochimique pour démontrer la présence de phosphates sur la protéine. Pour cela, nous avons traité ou non les extraits protéiques à l'aide de la phosphatase alcaline puis analysé le comportement électrophorétique de la protéine p25 sur gel 2D après immunodétection. Le traitement par la phosphatase alcaline induit la perte de phosphorylations sur les phosphoprotéines qui induit la disparition de charge(s) négative(s) (HPO_3^-). La protéine sera focalisée au sein d'un pH plus basique correspondant à son nouveau pI. Nous avons réalisé cette expérience à partir des extraits protéiques totaux de *N. benthamiana* infiltrées. Ces extraits ont été séparés en deux fractions identiques. La première fraction est traitée par la phosphatase alcaline et l'autre par un cocktail d'inhibiteur de phosphatases. L'immunodétection de la protéine p25 réalisée après électrophorèse 2D sur les deux échantillons révèle une disparition des spots de la région acide au profit de l'apparition de nouveaux spots vers un pH basique après le traitement par la phosphatase alcaline (**figure I.7**). Un tel résultat confirme que la protéine p25 est

bien une phosphoprotéine. Lors de cette expérience, nous avons réussi à immunodétecter la protéine p25 sous la forme de deux chapelets de deux à trois spots de poids moléculaire proche de 50-55 kDa, probablement en raison du choix d'une dénaturation modérée des protéines focalisées (figure I.7, flèche bleue). Ces spots pourraient correspondre à des dimères de p25.

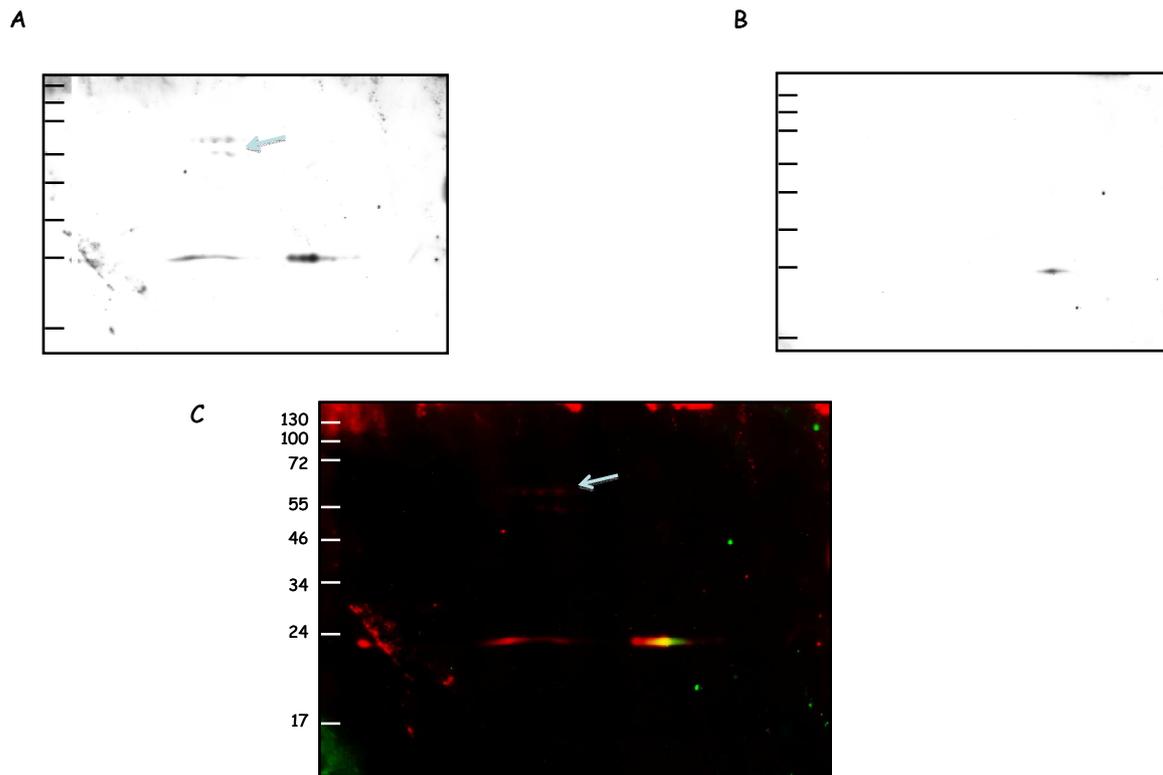


Figure I.7 : Confirmation de l'existence de phosphorylations par traitement à la phosphatase alcaline. Analyse en western-blot de la protéine p25 correspondant à une séparation par électrophorèse 2D des protéines totales extraites de *N. benthamiana* agroinfiltrée non traitées (A) ou traitées (B) à la phosphatase alcaline. (C) La superposition des images A (rouge) et B (vert) à l'aide d'un logiciel de traitement d'image permet de visualiser l'existence de protéines phosphorylées (rouge) et non phosphorylées (jaune) dans la fraction non traitée. Les spots apparaissant en vert correspondent également à des protéines p25 non phosphorylées. Des spots correspondant à des dimères de protéine p25 phosphorylées apparaissent dans l'échantillon non traité à la phosphatase (flèche).

Nous avons émis l'hypothèse que l'adressage subcellulaire de la protéine p25 pourrait être modulé par phosphorylation. Nous avons entrepris d'exprimer en contexte viral la protéine p25 étiquetée en N-terminal par un épitope HA (HAp25) d'une part pour faciliter sa détection et d'autre part pour éviter la N-acétylation. Nous avons choisi d'infecter des plantes à réponse systémique pour augmenter nos chances de récupération des protéines après séparation d'extraits totaux ou de fractions nucléaires. L'infection de *B. macrocarpa*

a conduit à une infection systémique retardée alors qu'aucune différence d'infection n'a pu être constatée sur *Spinacea oleracea*. La protéine HAp25 a pu être immunodétectée sous la forme d'un chapelet de quatre spots dans les extraits totaux de *B. macrocarpa* (**figure I.8A**) et de trois spots dans des extraits nucléaires de *S. oleracea* (**figure I.8B**) séparés sur gel 2D et révélés à l'aide d'anticorps dirigés contre l'épitope HA. Ces spots sont séparés par un pI correspondant à l'addition d'une charge phosphate. Un tel résultat nous a conduit à suspecter l'existence de trois événements de phosphorylation successifs et est à corréluer au résultat présenté dans la figure I.7, où deux chapelets de trois spots de PM 55-55 kDa sont immunodétectés dans les extraits traités à l'aide d'inhibiteurs de phosphatases.

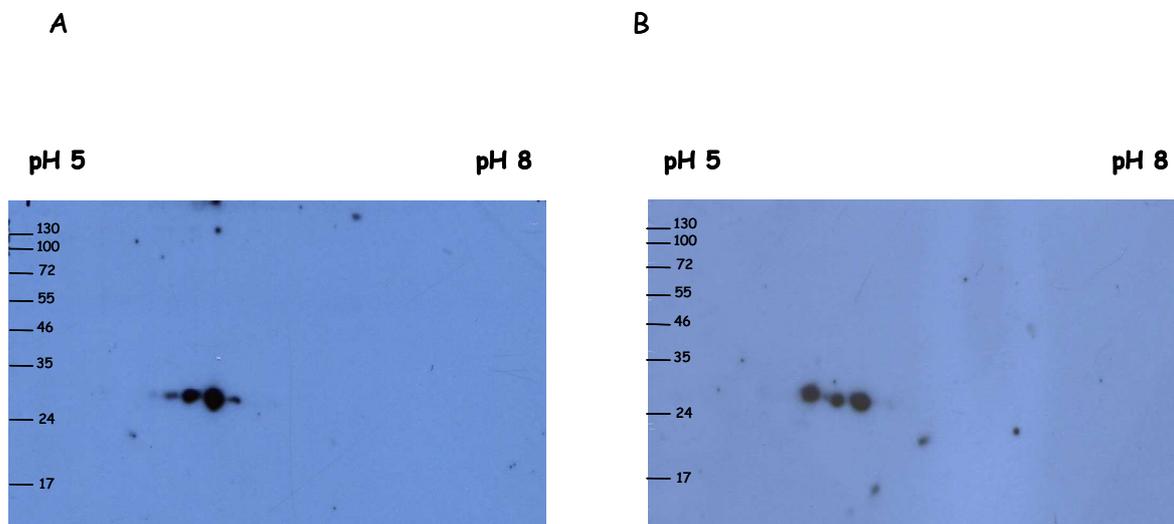


Figure I.8 : Immunodétection de la protéine HAp25 après séparation par électrophorèse bidimensionnelle. (A) L'analyse à partir des extraits protéiques de *B. macrocarpa* infectée par les ARN1+ 2 et Rep-3-HAp25 révèle la présence de quatre spots positionnés en chapelet. (B) L'analyse à partir des extraits nucléaires enrichis de *Spinacea oleracea* infectée par les ARN1+ 2 et Rep-3-HAp25 révèle trois spots.

Pour isoler la protéine p25 à partir d'extraits protéiques de plantes infectées et ensuite effectuer des expériences de marquage *in vivo* ou co-purifier ses partenaires cellulaires (voir chapitre II), nous avons procédé à une approche d'immunoprécipitation de protéines étiquetées par l'épitope HA.

La capture de la protéine HAp25 est réalisée à partir d'extraits totaux de lésions locales de *C. quinoa* infectées par les ARN 1, 2 et rep3 HAp25. Une telle approche permet l'élimination d'un grand nombre de protéines cellulaires et la récupération dans l'éluat de la protéine p25 visible après coloration au bleu colloïdal (Figure I.9A) ou immunodétection (Figure I.9B) sous la forme d'un doublet ou d'un complexe de 50 kDa.

L'analyse MS et MS-MS de ces bandes a permis de détecter deux nouveaux phosphopeptides issus de la protéine HAp25. Malheureusement, ces résultats ne sont pas reproductibles et sont distincts des résultats obtenus après séparation 2D des protéines. Nous avons néanmoins détecté les phosphopeptides $_{37}\text{RAINLLTHDNR}_{47}$, $_{108}\text{DSSVNELLVSTGLVIHT}_{124}$, ainsi qu'un grand peptide issu de la partie C-terminale acide de la protéine p25.

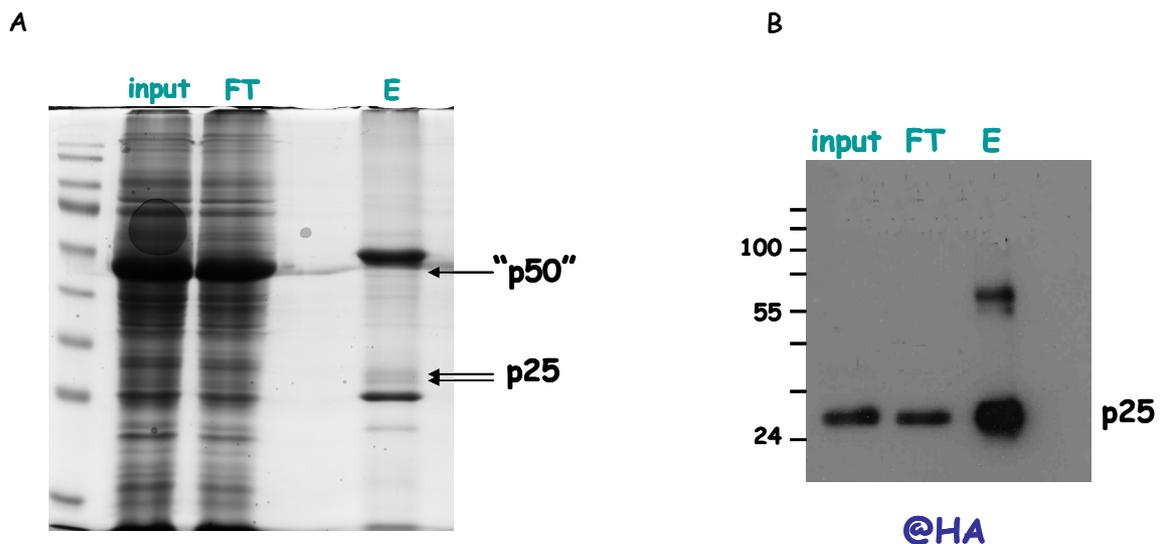


Figure I.9 : Immunoprécipitation de la protéine HAp25 à partir des feuilles de *C. quinoa* infectées. (A) Visualisation des protéines par coloration au bleu colloïdal. L'éluat correspond à un pool de cinq immunoprécipitations regroupées. La protéine p25 est présente sous la forme d'un doublet et d'un complexe d'environ 50 kDa correspondant probablement à un dimère de la protéine p25. (B) Immunodétection de la protéine HAp25. Input : protéines totales présentes dans l'extrait, FT: protéines non retenues par la résine ; E: protéines présentes dans l'éluât.

Pour tenter de confirmer la phosphorylation de la protéine p25, nous avons entrepris des expériences de marquage au phosphore radioactif *in vivo*.

Cette technique permet d'incorporer du phosphate radioactif (^{32}P ou ^{33}P) lors de la biosynthèse des protéines. La confirmation de l'état phosphorylé requiert l'immunoprécipitation de la protéine recherchée par un anticorps spécifique et sa migration sur gel dénaturant suivi d'une autoradiographie. L'utilisation de l'électrophorèse 2D permet également de visualiser des spots.

J'ai réalisé cette expérience, plusieurs fois, à partir des plantes *C. quinoa* ou *B. macrocarpa* infectées à l'aide des transcrits des ARN1, 2 et 3 ou par des ARN1, 2 et Rep-

3-HAp25. Six (*C. quinoa*) ou 13 jours (*B. macrocarpa*) après l'inoculation, des disques foliaires ont été incubés 24 heures dans un tampon ne contenant pas ou très peu de phosphate mais supplémenté de ^{32}P ou ^{33}P . Les disques ont été broyés et la protéine p25 immunoprécipitée (**figure I.10B, pistes de droite**). Les anticorps anti-p25 n'étant pas hautement spécifiques, nous n'avons pas détecté des quantités suffisantes de la protéine p25 marquée (**figure I.10C, pistes de droite**). C'est pourquoi j'ai également effectué une expérience parallèle en utilisant un anticorps (anti-HA) dirigé contre une étiquette HA fusionnée en N-terminal de la protéine p25 exprimée à partir des transcrits rep3-HAp25. Grâce à cette approche, j'ai réussi à purifier la protéine HA-p25 sous deux formes, monomérique et multimérique (**figure I.10A**). Là encore, l'autoradiographie ne m'a pas permis de détecter la protéine p25 phosphorylée (**figure I.10C**). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette absence de détection de marquage. D'une part, le maintien en survie des disques foliaires en présence de phosphore marqué peut ne pas suffire à la production d'ATP marqué en quantité suffisante. D'autre part, la phosphorylation de la protéine p25 pourrait correspondre à un événement transitoire lors du cycle viral que nous ne ciblons pas en effectuant ce marquage *in vivo*. Enfin, la quantité de protéine p25 dans les cellules infectées n'est pas majoritaire et il est possible que les protéines cellulaires entrent en compétition avec la protéine virale pour le marquage. Nous avons reproduit l'expérience plusieurs fois avec ou sans phosphate radioactif pour affiner la mise au point de ce protocole, mais malheureusement sans succès.

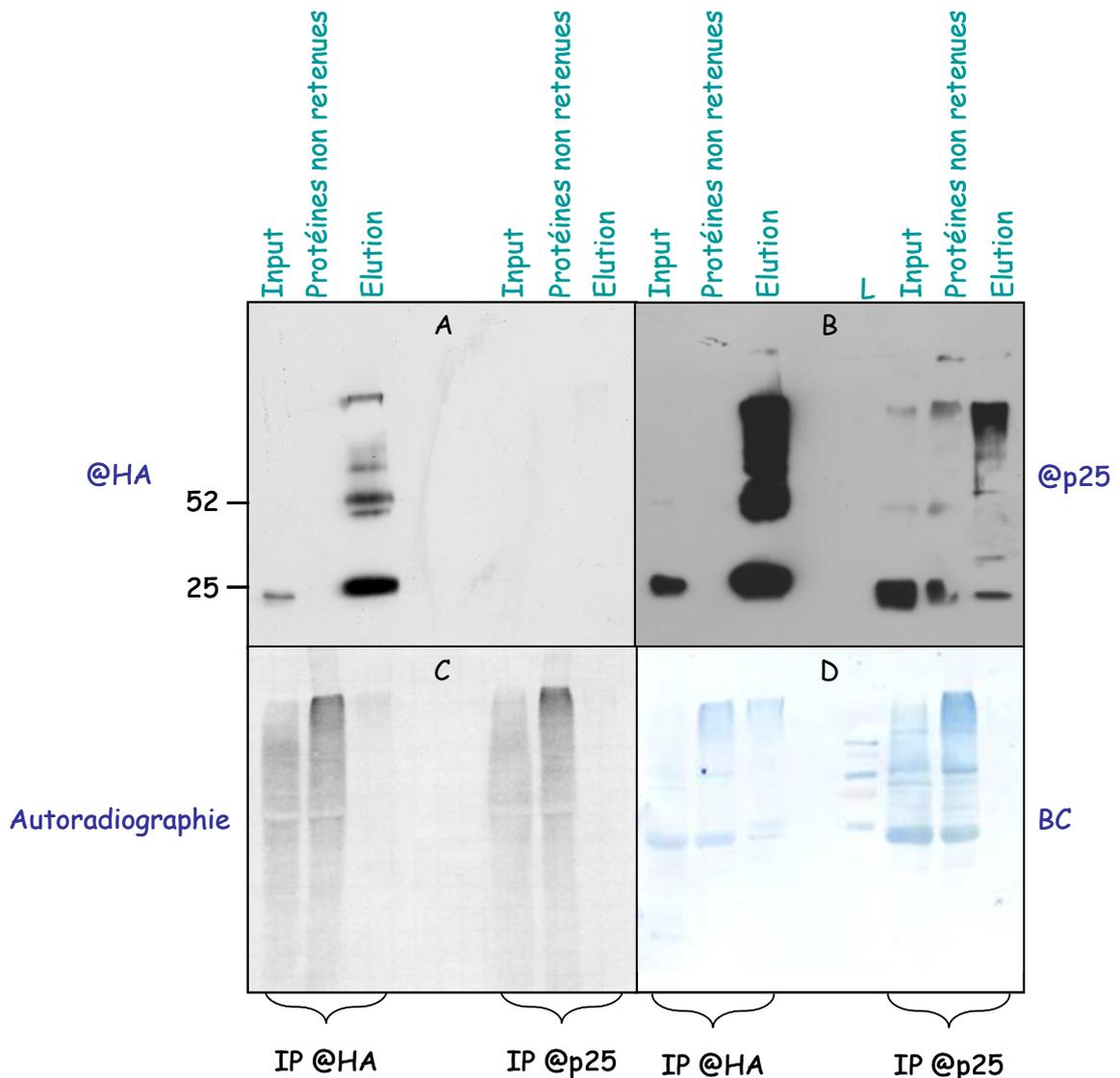


Figure I.10 : Immunoprécipitation de la protéine p25 après marquage *in vivo*. Des disques foliaires de *B. macrocarpa* provenant de feuilles systémiques infectées par les ARN 1, 2 et Rep3-HAp25 ont été incubés 24 heures dans un tampon dépourvu de phosphate supplémenté d'acide phosphorique radioactif ^{32}P avant d'immunoprécipiter la protéine p25 (gauche) ou HAp25 (droite). Les protéines totales sont visualisées par coloration (D) ou après révélation par immunodétection à l'aide d'anticorps anti-HA (A), ou anti-p25 (B) ou par autoradiographie (C). L, représente le marqueur de poids moléculaire. Les chiffres à gauche représentent les poids moléculaires.

D'autres expériences de marquage *in vivo* ont été mises en œuvre lors de l'expression de la protéine p25 hors contexte viral. Pour disposer d'une plus grande quantité de protéine p25, j'ai agro-infiltré des feuilles de *N. benthamiana* par des vecteurs binaires exprimant la protéine p25, l'EGFP-p25 ou l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du CaMV en présence de la protéine p0, le suppresseur de RNA silencing du BWYV. Les immunoprécipitations effectuées à l'aide

d'anticorps dirigés contre la protéine p25 ou la protéine GFP ne m'ont pas permis de purifier la p25 ou GFP-p25 (non montré). Là encore, plusieurs protocoles d'extraction et de purification ont été testés, mais malheureusement, sans succès.

Ajoutons ici que j'ai essayé d'exprimer la protéine p25 par d'autres approches pour procéder au marquage *in vivo*. Je vais citer ces expériences sans les détailler car elles ne m'ont pas permis de mettre en évidence la phosphorylation de la protéine p25. Tout d'abord, j'ai commencé par l'infection de protoplastes de feuilles de *C. quinoa* par les transcrits des ARN1, 2 et 3 du BNYVV. Cette expérience a été réalisée trois fois mais malheureusement la quantité de la protéine p25 produite s'est révélée très faible probablement en raison d'un faible pourcentage d'infection par les trois ARN viraux (non montré). J'ai ensuite tenté de créer des lignées de cellules BY-2 transgéniques exprimant constitutivement la protéine p25 ou la protéine de fusion GFP-p25 pour pouvoir les utiliser dans le cadre d'expériences de marquage *in vivo* et pour disposer d'un outil supplémentaire d'étude de la protéine. Cette expérience a été réalisée quatre fois sans succès. Dans ces cellules, l'expression de la protéine p25 semble avoir un effet toxique. Cet effet a été également observé lors de tentatives d'obtention de *N. benthamiana* exprimant la protéine p25 [(Peltier, 2010), Thèse de doctorat, UdS].

2. Approche de mutagenèse « Alanine et Aspartate scanning »

En parallèle à l'approche protéomique, une approche de mutagenèse par « Alanine et Aspartate scanning » réalisée sur les résidus sérine et thréonine potentiellement phosphorylés de la protéine p25 a été initiée au laboratoire par Guillaume Vetter. En utilisant l'algorithme Netphos 2.0, des sites potentiels de phosphorylation ont été prédits sur la séquence de protéine p25, en particulier les positions S109, S110, T21, T56, T164, T165, Y23, Y52 (**figure I.11A**). Ces résidus sont conservés sur les protéines p25 des isolats A et P et sont prédits comme cibles de phosphorylation (**figure I.11B**). Le logiciel NetPhosK 1.0 a permis de déterminer que les protéines kinases PKC, PKA et CKII seraient potentiellement impliquées dans la phosphorylation de la p25 (**figure I.11C**).

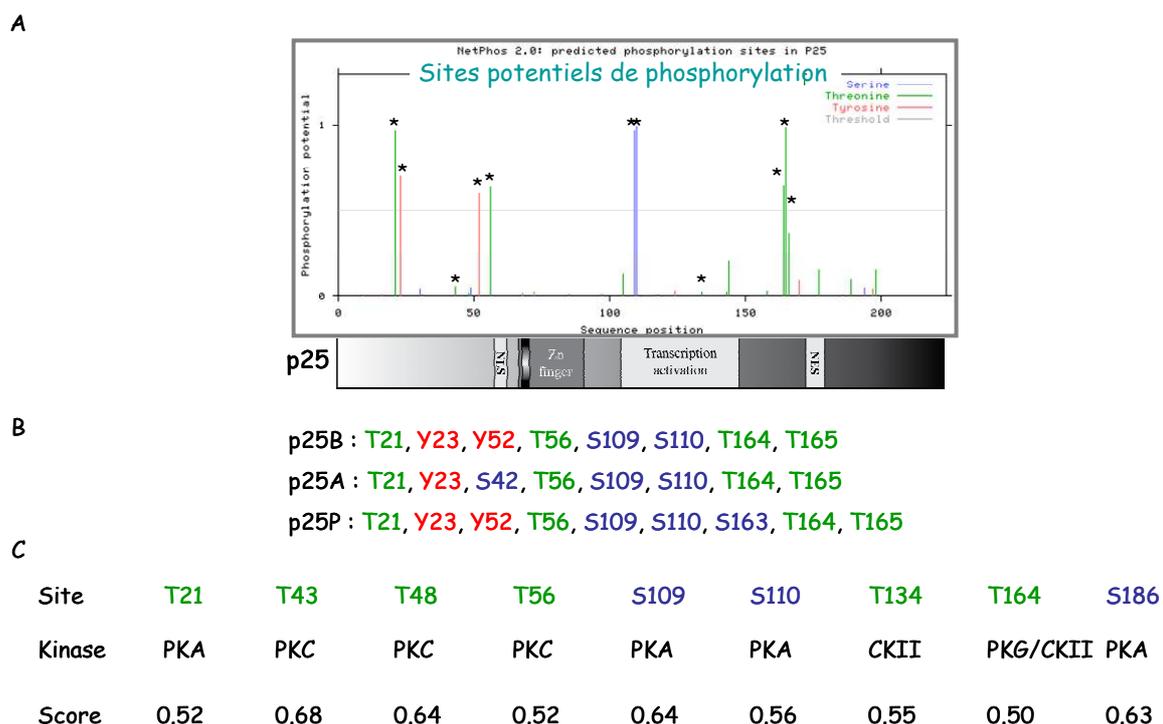


Figure I.11 : Identification des résidus potentiellement phosphorylés sur la protéine p25. (A) Localisation des sites potentiels de phosphorylation présents sur la protéine p25 du BNYVV identifiés par l’algorithme Netphos 2.0. Les sites de phosphorylation analysés dans cette étude par alanine et aspartate scanning sont indiqués par un astérisque. (B) Sites potentiellement phosphorylés sur les protéines p25 provenant de trois isolats du BNYVV. (C) Analyse prédictive des kinases impliquées dans la phosphorylation des résidus cibles présents sur la protéine p25 à l’aide du logiciel NetPhosK 1.0.

J’ai dans un premier temps complété la collection de mutants de phosphorylation de la protéine p25 disponibles au laboratoire en remplaçant les résidus cibles (Y23, Y52, T43, T134) par une alanine pour empêcher toute phosphorylation ou par un acide aspartique pour mimer un état de phosphorylation (Xiao *et al.*, 1997; Adachi *et al.*, 1999). J’ai également produit des doubles et des triples mutants. Dans un deuxième temps, j’ai recherché l’influence de ces remplacements, d’une part sur la localisation subcellulaire de la protéine p25 fusionnée à la protéine GFP, et d’autre part sur les propriétés d’activation de la transcription et de la dimérisation des protéines p25 mutées. Enfin, les mutants de la protéine p25 ont été placés en contexte viral et leur comportement testé sur plantes hôtes pour tenter de corréler les symptômes observés aux propriétés biologiques et biochimiques de ce facteur de pathogénicité viral.

Mutagenèse de la protéine p25

Les remplacements de codons de la protéine p25 wt ont été effectués par mutagenèse PCR et les séquences des protéines p25 ainsi modifiées ont été placées en fusion avec celle de la protéine EGFP dans le vecteur d'expression pCK pour analyser leur localisation subcellulaire comme décrit précédemment (Vetter *et al.*, 2004).

i. Effet des résidus phosphorylables sur la localisation subcellulaire de la protéine p25 du BNYVV

Il a été précédemment démontré que le poids moléculaire des protéines GFP-p25 sauvage ou mutées de 52 kDa n'est pas compatible avec une diffusion passive à travers les pores nucléaires (Vetter *et al.*, 2004). En effet, la protéine p25 possède dans sa région N-terminale une séquence de localisation nucléaire NLS classique monopartite ($_{57}\mathbf{KRIRFR}_{62}$) dont les résidus K57, R58 et R62 sont essentiels à l'import nucléaire de la protéine p25 par l'importine α (**figure I.12A**) (Vetter *et al.*, 2004). La protéine p25 renferme également dans sa partie C-terminale une séquence responsable de l'export nucléaire NES, dépendante de la voie de l'exportine 1 ($_{169}\mathbf{VYMVCLVNTV}_{178}$) (**figure I.12A**). Si l'interaction directe entre la protéine p25 et l'exportine 1 n'a pas été confirmée par système double hybride de levure, l'export nucléaire de la protéine p25 était quant à lui sensible à la Leptomycine B, inhibiteur d'export nucléaire dépendant de l'exportine 1 (Vetter *et al.*, 2004). Ces séquences NLS et NES pourraient permettre à la protéine p25 d'effectuer une navette nucléo-cytoplasmique. A l'instar de la localisation subcellulaire décrite pour l'antigène T du virus SV40 qui possède un NLS classique contenant cinq acides aminés basiques (Kalderon *et al.*, 1984a; Kalderon *et al.*, 1984b), nous avons recherché l'incidence des remplacements de cibles de phosphorylation sur la localisation subcellulaire de la protéine p25 dans les cellules BY-2 de tabac.

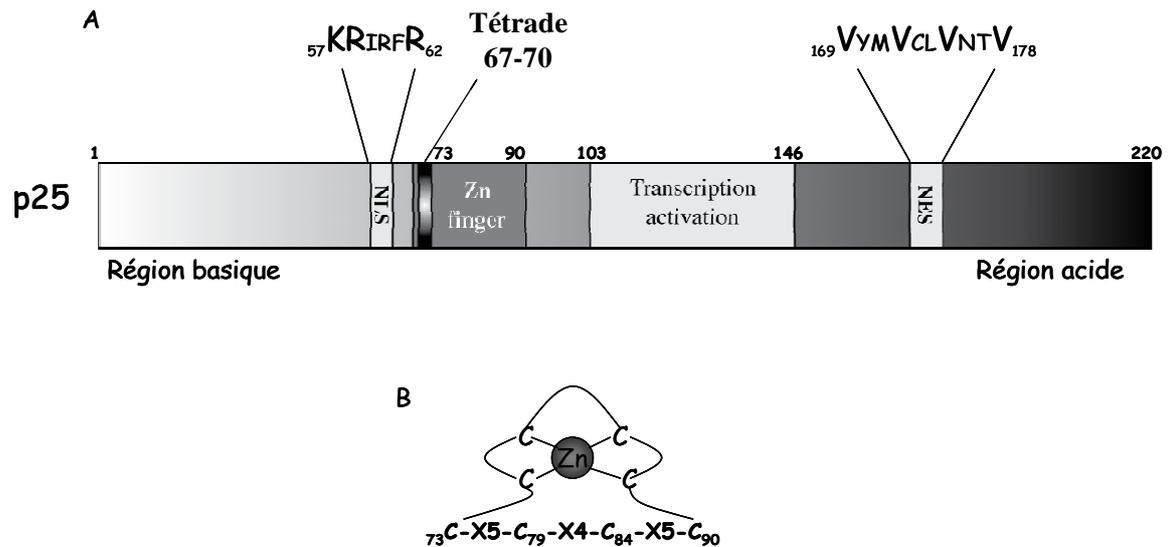


Figure I.12 : Représentation schématique de la protéine p25 du BNYVV. (A) Caractéristiques principales de la protéine p25. Localisation du motif en doigt à zinc putatif (Zinc finger), des séquences d'adressage nucléaire (NLS), d'export (NES), et d'activation de la transcription de la protéine p25. (B) Représentation schématique du doigt à zinc.

a. Expression transitoire en cellules BY2

Les protéines de fusion GFP-p25 sauvage et mutées ont été exprimées transitoirement dans des cellules de tabac (*Nicotiana tabacum*) BY-2 transfectées par biolistique à l'aide des vecteurs pCK recombinants qui apportent un contexte de traduction identique pour chaque construction. L'expression et les localisations subcellulaires des protéines de fusion ont été comparées de manière statistique.

Pour contrôler l'expression des protéines de fusion GFP-p25 sauvage ou mutées et exclure la possibilité d'apparition de formes tronquées fluorescentes dans les cellules de BY2, une partie des cellules prélevées a été utilisée pour des analyses par western blot et l'autre partie pour la caractérisation de la localisation subcellulaire par microscopie confocale à balayage laser (LSM 510). En effet, l'immunodétection de la protéine de fusion en utilisant des anticorps poly clonaux dirigés contre la protéine EGFP ou contre la protéine p25 sur des extraits protéiques de cellules BY2 transfectées révèle des protéines de fusion de taille attendue (52 KDa) (**figure I.13 A et C**). Cependant, une exposition prolongée de la membrane révèle la présence d'une protéine d'environ 27 KDa dans les cellules transfectées (Figure I.13.B, flèche rouge) qui pourrait être une forme tronquée de la protéine de fusion. L'utilisation de l'anti-p25 ne permet pas de retrouver cette bande de 27kDa, suggérant que cette protéine pourrait correspondre à la protéine EGFP. A ce stade,

nous sommes dans l'incapacité de déterminer si la protéine tronquée est présente dans l'ensemble des cellules fluorescentes ou si cela correspond à une faible proportion de cellules. Une telle analyse n'a donc pas été effectuée pour l'ensemble des constructions.

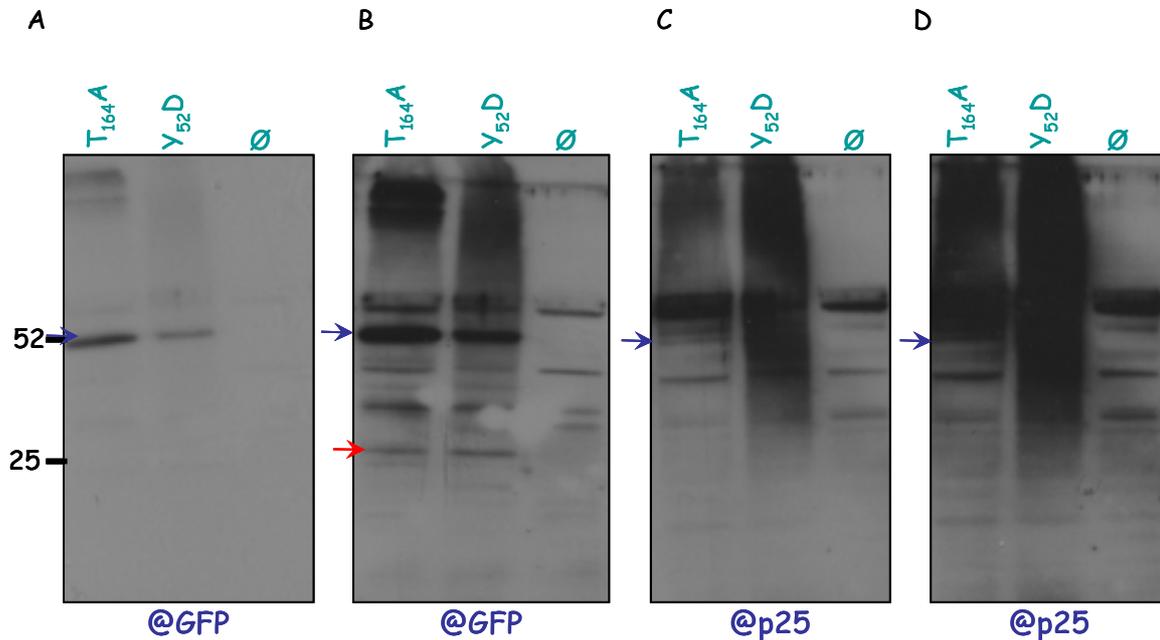


Figure I.13 : Analyse par western blot (16 h après transfection) des extraits protéiques de cellules BY-2 transfectées par le vecteur pCK permettant l'expression des protéines EGFP-p25 mutées (Y₅₂D et T₁₆₄A) à l'aide d'anticorps dirigés contre l'EGFP (@GFP) (A et B) ou contre la protéine p25 (@p25) (C et D). Ø représente des extraits de cellules BY-2 non transfectées. Les poids moléculaires sont indiqués à gauche. (A et C) exposition courte. (B et D) exposition longue. La flèche rouge indique une bande à environ 27 KDa présente uniquement dans les cellules exprimant la fusion EGFP-p25. Les flèches bleues indiquent les bandes correspondant à 52 KDa.

b. Observation de la localisation subcellulaire des protéines p25 mutées

Les cellules fluorescentes ont été prélevées 6, 12 et 16 heures après bombardement et l'observation de la localisation subcellulaire des protéines GFP-p25 a été ensuite effectuée en utilisant la microscopie confocale à balayage laser. Les expériences ont été répétées entre trois et seize fois (pour la protéine mutée T₁₆₄A) et plus de vingt cellules fluorescentes ont été observées pour chaque expérience.

Des exemples de localisation obtenus sont présentés sur la **figure (I.14)** et permettent de comparer le comportement des protéines de fusions mutées avec celui de la protéine GFP-p25.

La localisation subcellulaire de la protéine GFP-p25 sauvage (**figure I.14**) est identique à celle décrite précédemment (Vetter *et al.*, 2004). Sur les coupes optiques réalisées en

microscopie confocale, le noyau fluoresce en vert, tout comme les travées cytoplasmiques. La protéine GFP-p25 s'accumule plus dans le noyau que dans le cytoplasme. Les vacuoles et le nucléole ne fluorescent pas. Dans le cas de protéines mutées, nous avons retrouvé des protéines possédant les mêmes caractéristiques que p25 et d'autres qui se localisaient principalement dans le noyau ou dans le cytoplasme (**figure I.14 et tableau I.2**).

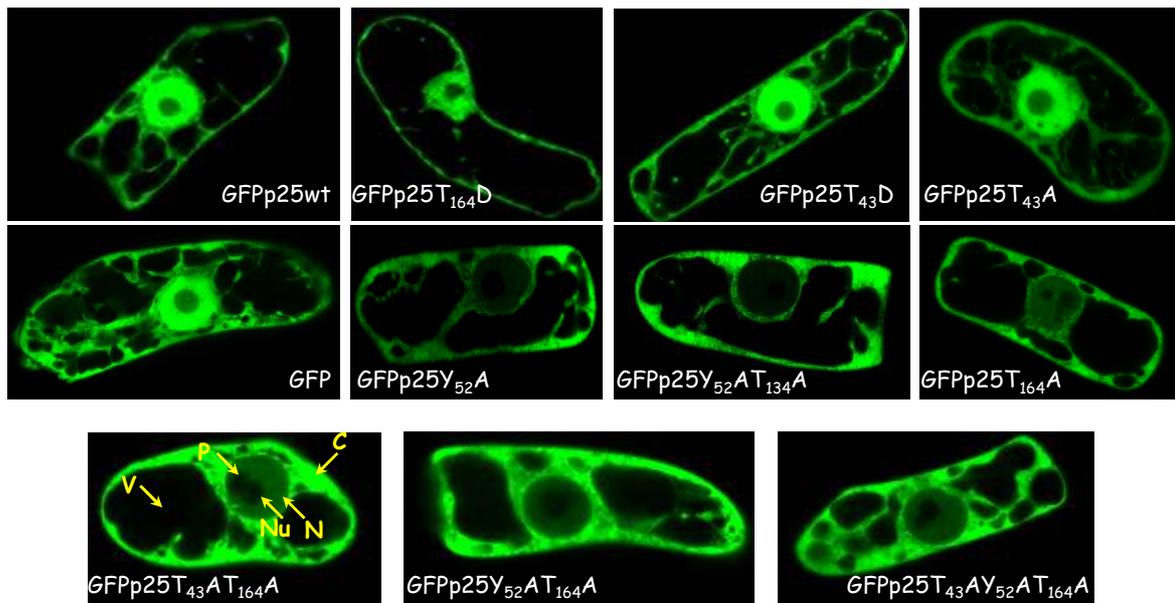


Figure I.14 : Analyse comparative par microscopie confocale de la localisation subcellulaire des protéines EGFP et de protéines p25 sauvage (wt) ou mutées, fusionnées à l'EGFP et exprimées transitoirement dans des cellules BY-2 de tabac. Les annotations jaunes permettent de localiser les compartiments subcellulaires. N, noyau ; C, cytoplasme ; Nu, nucléole ; V, vacuole ; P, particule de tungstène.

Pour confirmer ces localisations en cellules BY-2, une expérience d'agroinfiltration sur feuilles de *Nicotiana benthamiana* a été menée. Ainsi, j'ai cloné quelques mutants de la protéine de fusion GFP-p25 dans un vecteur binaire (pBinplus) sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur 35S du CaMV. J'ai choisi de réaliser cette expérience avec les vecteurs qui permettent l'expression de la protéine EGFP seule, de la protéine EGFP-p25 sauvage et de la forme tronquée EGFP-p25 Δ SB (Vetter *et al.*, 2004) ainsi que l'expression des protéines EGFPp25 T₁₆₄A et T₄₃A-T₁₆₄A. Les vecteurs recombinants ont été introduits dans *A. tumefaciens* qui ont été infiltrés sur feuille de *N. benthamiana*. Les tissus infiltrés ont été observés sous microscopie confocale après 3, 4 et 5 jours. Toutes les localisations observées sur feuilles infiltrées (**figure I.15**) correspondent à celles observées dans les cellules BY-2 [(ce travail et (Vetter *et al.*, 2004)].

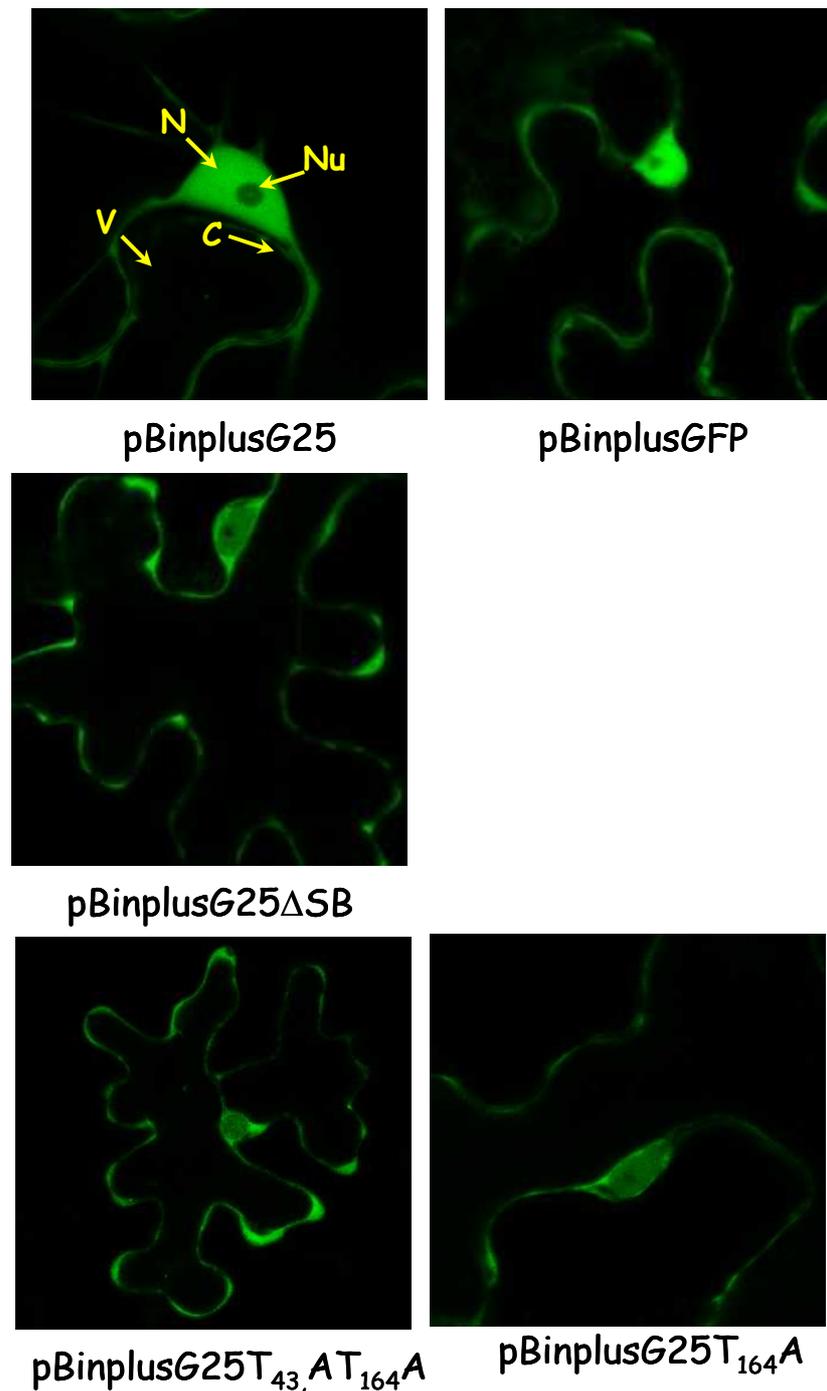


Figure I.15 : Recherche par microscopie confocale de la localisation subcellulaire de protéines fusionnées à l'EGFP 4 jours après agroinfiltration de feuilles de *N. benthamiana*. Les constructions pBinPlus utilisées permettent d'exprimer la protéine EGFP, la protéine EGFP-p25 (G25), la protéine EGFP-p25 déléetée de la partie N-terminale de p25 (G25 Δ SB), les protéines EGFP-p25 mutée (G25T₁₆₄A ou G25T₄₃A-T₁₆₄A). Les annotations jaunes permettent de localiser les compartiments subcellulaires. N, noyau ; C, cytoplasme ; Nu, nucléole ; V, vacuole.

Ici encore, l'immunodétection des protéines par les anticorps anti-GFP ou anti-p25 révèle les protéines à leur taille attendue mais aussi la présence de produits plus courts (**figure I.16**) et mutés (non montré). Curieusement, la protéine de 27 kDa observée dans l'analyse des cellules BY-2 est absente mais semble remplacée par une protéine de 35 kDa reconnue par les deux anticorps. Compte tenu de ces résultats, j'ai opté pour l'analyse systématique de la localisation des protéines GFP-p25 dans les cellules BY-2.

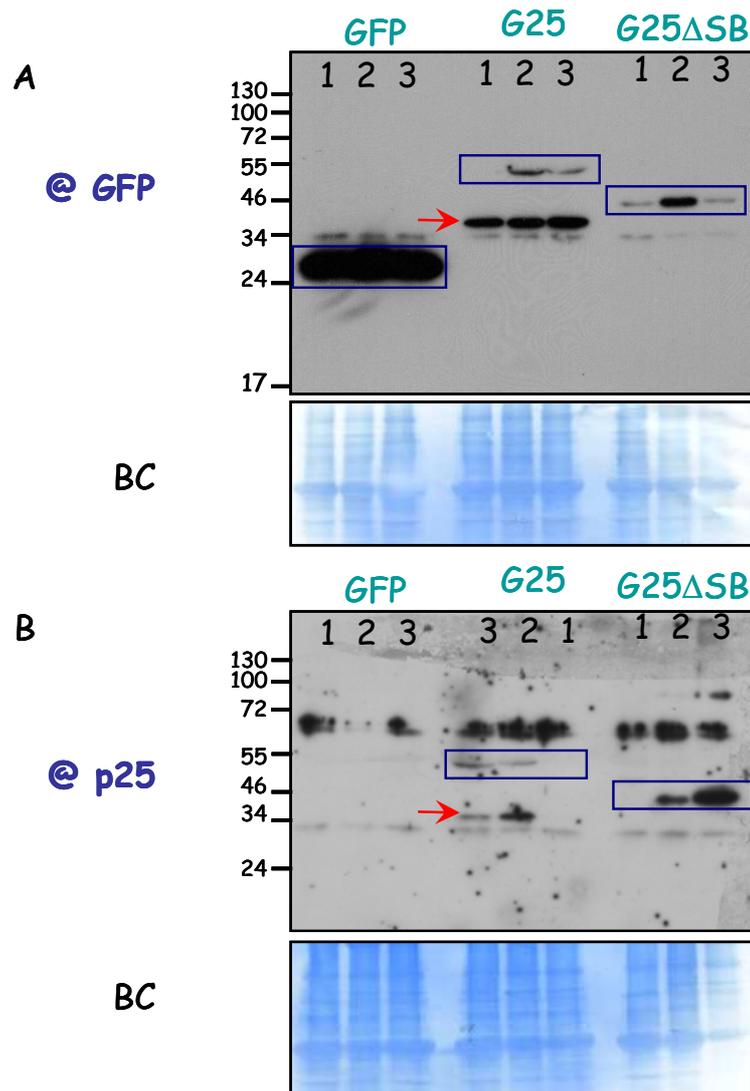


Figure I.16 : Immunodétection des protéines EGFP (GFP), EGFP-p25 (G25) et de la protéine eGFP-p25ΔSB (G25ΔSB) dans *N. benthamiana* 4 jours post agroinfiltration. BC représente les protéines totales transférées sur membrane et colorées par bleu de Coomassie. Les numéros 1, 2 et 3 représentent les plantes agroinfiltrées par différentes concentration d'*A. tumifaciens* (DO₆₀₀ 0,1- 0,5 et 0,7 respectivement) à partir desquelles les extractions ont été faites. Les rectangles entourent les bandes attendues. Les flèches rouges indiquent la bande à environ 35 kDa correspondant à une forme tronquée de la protéine de fusion. Les chiffres à gauche indiquent les poids moléculaires.

Les protéines de fusion p25 mutées ($T_{43}A/D$, $T_{34}A$, $Y_{52}D$ et $T_{164}D$) sont détectées principalement dans le noyau et dans le cytoplasme, tout comme la protéine sauvage GFP-p25. D'autres mutants ($T_{21}A/D$, $S_{109}A-S_{110}A$, $S_{109}D-S_{110}E$, $T_{165}A/D$ et $T_{166}A/D$) qui n'apparaissent pas dans le tableau I.2 se comportent comme la protéine GFP-p25wt. A l'inverse, les protéines de fusion mutées ($Y_{52}A$, $T_{56}D$ et $T_{164}A$) se localisent principalement dans le cytoplasme (**tableau I.2**). Un comportement particulier a été observé dans le cas des constructions GFP-p25 $Y_{23}A$ et GFP-p25 $Y_{23}D$. Ces deux protéines de fusion présentent à la fois une localisation nucléo-cytoplasmique et une localisation principalement cytoplasmique dans environ 50% des cellules transfectées (**tableau I.2**). Un tel résultat pourrait s'expliquer par l'existence de modifications post traductionnelles supplémentaires ou de facteurs cellulaires qui pourraient affecter la localisation de la protéine et qui seraient dépendants de l'état physiologique des cellules BY2.

Globalement, nos résultats indiquent que les modifications introduites au niveau de certains sites de phosphorylation influencent la localisation subcellulaire de la protéine p25. Cet effet est soit lié à une perturbation de l'état de la phosphoprotéine ou à une modification de structure majeure de la protéine. En d'autres termes, cet effet peut être la conséquence de modifications majeures de la structure tridimensionnelle, de l'activation ou de l'inhibition de l'import nucléaire, ou encore de l'activation constitutive de l'export nucléaire.

Tableau I.2 : Récapitulatif des localisations subcellulaires de protéines p25 sauvage et mutées, fusionnées à l'EGFP et exprimées en cellules BY-2. N>C : Localisation nucléaire et cytoplasmique ; C>N : Localisation principalement cytoplasmique. *, indique les mutants dont la localisation subcellulaire a été réalisée par Guillaume Vetter [(Vetter, 2003), Thèse de doctorat, ULP].

Construction pCKGFp25	Nombre de cellules observées	Intensité relative de la localisation		Traitement Leptomycin B (Exportin 1 inhibitor)
		C>N %	N>C %	
wt	500	<2	>98	Non testé
Y ₂₃ A	105	46,66	53,33	pas d'effet
Y ₂₃ D	219	51,59	48,4	pas d'effet
T ₄₃ A	60	23,33	76,66	Non testé
T ₄₃ D	60	20	80	Non testé
Y ₅₂ A	171	85,97	14,02	pas d'effet
Y ₅₂ D	185	23,24	76,76	pas d'effet
T ₅₆ A*			N>C	Non testé
T ₅₆ D*		C>N		pas d'effet
T ₁₃₄ A	64	8,47	91,52	Non testé
T ₁₆₄ A	306	78,43	21,57	pas d'effet
T ₁₆₄ D ou ₁₆₅ A/D ou ₁₆₆ A/D			N>C	Non testé
T ₄₃ A-T ₁₆₄ A	291	84,87	15,12	pas d'effet
T ₄₃ D-T ₁₆₄ D	144	26,39	73,61	Non testé
T ₄₃ A-T ₁₆₄ D	195	51,8	48,2	pas d'effet
T ₄₃ D-T ₁₆₄ A	27	0	100	Non testé
Y ₅₂ A-T ₁₆₄ A	180	95	5	pas d'effet
Y ₅₂ D-T ₁₆₄ D	93	46,24	53,76	pas d'effet
T ₄₃ A-Y ₅₂ A-T ₁₆₄ A	191	94,76	5,23	pas d'effet

c. Effet de doubles et triples substitutions sur la localisation subcellulaire de la protéine p25

Les processus d'activation de fonction protéiques font parfois appel à des cascades de PTM. La détection de plusieurs spots en analyse 2D nous a poussés à rechercher l'incidence de la phosphorylation à l'aide de doubles et de triples mutants. La purification de p25 à partir de noyaux isolés révèle la présence de protéines phosphorylées (**figure I.8**). Une telle approche a été réalisée pour rechercher s'il existait un effet coopératif de phosphorylation ou un effet compensatoire entre les mutations introduites. Les remplacements Y₅₂A ou T₁₆₄A induisent une rétention cytoplasmique de la protéine et les substitutions de T43 affectent très légèrement la localisation de p25. J'ai donc effectué un double mutant qui empêche toute phosphorylation des deux positions, Y₅₂A-T₁₆₄A et un autre qui mime leur état phosphorylé, Y₅₂D-T₁₆₄D. Par la même occasion, j'ai produit les mutants T₄₃A-T₁₆₄A, T₄₃D-T₁₆₄D, T₄₃A-T₁₆₄D et T₄₃D-T₁₆₄A. J'ai également créé le triple mutant T₄₃A-Y₅₂A-T₁₆₄A mais je ne suis jamais parvenu à obtenir le triple mutant T₄₃D-Y₅₂D-T₁₆₄D.

Tout comme les simples mutants Y₅₂A et T₁₆₄A, les doubles mutants T₄₃A-T₁₆₄A, Y₅₂A-T₁₃₄A, Y₅₂A-T₁₆₄A et le triple mutant T₄₃A-Y₅₂A-T₁₆₄A restent localisés dans le cytoplasme (**tableau I.2**). Cette localisation cytoplasmique est liée à une absence d'import nucléaire car je n'ai pas observé d'effet de l'inhibiteur d'export nucléaire : la Leptomycine B, LMB (Kudo *et al.*, 1998). Ces résultats m'ont amené à suspecter qu'une phosphorylation de résidus aux positions 43, 52 et 164 pouvait être impliquée dans l'import nucléaire de p25. Les mutants T₄₃A-T₁₆₄D et Y₅₂D-T₁₆₄D affectent partiellement la localisation subcellulaire de la protéine p25, comme dans le cas de Y23, la protéine mutée se localise soit dans le noyau soit reste cytoplasmique. Le mutant T₄₃D-T₁₆₄D présente quant à lui un comportement intermédiaire et la construction T₄₃D-T₁₆₄A se localise essentiellement dans le noyau. Cette étude par mutagenèse nécessite pour être complétée l'obtention de triples mutants T₄₃D-Y₅₂D-T₁₆₄D et T₄₃D-Y₅₂D-T₁₆₄A pour modéliser les processus de phosphorylation et d'entrée nucléaire de p25. Bien entendu, nous gardons à l'esprit que d'autres modifications post-traductionnelles peuvent intervenir dans la régulation du transport nucléo-cytoplasmique et des fonctions de la protéine p25. Si de telles modifications n'ont pas encore été observées lors de l'immunodétection de la

protéine p25 après séparation par électrophorèse bidimensionnelle, leur existence reste toutefois à envisager.

ii. Influence de mutants de phosphorylation de la protéine p25 sur l'interaction avec l'importine α *in vitro*

L'importation nucléaire active des protéines possédant un NLS classique (mono ou bipartite) chez les plantes se fait par l'intermédiation des différents types de partenaires associés aux noyaux (Merkle *et al.*, 1996; Merkle, 2001). La première étape de l'import est la reconnaissance entre le NLS de la protéine à importer par les répétitions de type Armadillo (ARM) situées dans la partie centrale de l'importine α . La seconde étape implique l'intervention de l'importine β 1 qui est reconnue par les pores nucléaires. L'importine β 1 interagit avec le domaine IBB de l'importine α (Importine β -binding domain). Grâce à la reconnaissance de l'importine β 1 par certaines nucléoporines du pore nucléaire, ce complexe est transporté dans le noyau. Dans le noyau, la protéine RanGTP (GTPase Ran pour Ras-related nuclear protein) induit la dissociation du complexe en interagissant avec l'importine β 1 *via* la même région fixant IBB de l'importine α .

La protéine p25 interagit avec l'importine α et cette interaction est nécessaire à son import nucléaire (Vetter *et al.*, 2004). Nous avons recherché la capacité de la protéine p25 modifiée aux positions clé de phosphorylation à interagir avec l'importine α . Pour cela, nous avons utilisé la technique de "GST-pull down", largement utilisée pour étudier des interactions protéine-protéine *in vitro*. Elle repose sur la capacité de la Glutathion S-transférase (GST) à se fixer sur des billes de glutathion-sépharose. La protéine fusionnée à la GST ainsi que sa/ses partenaires seront retenues sur ces billes. L'utilisation des partenaires marquées au ^{35}S ou l'utilisation des anticorps spécifiques permet de révéler cette interaction. J'ai choisi d'exprimer des mutants de la protéine p25 que j'ai clonés en fusion avec le tag Histidine (HA) dans le vecteur d'expression pIVEX[®] 2.3. Les protéines p25 sauvages et mutées ont été produites *in vitro* dans un lysat d'*E. coli* en utilisant le kit RTS100 (Rapid Translation Système). Ces protéines ont été analysées par western blot, la présence des protéines a été vérifiée *via* les anticorps contre la protéine p25 (**figure I.17A**) ou les anticorps monoclonaux anti-HA ou par autoradiographie (non montré). Nous avons effectué le test de GST-pull down et recherché les capacités de ces protéines à interagir

avec l'importine α de riz fusionnée à la GST, utilisée précédemment au laboratoire (Vetter *et al.*, 2004). La GST seule, produite dans *E. coli* a été utilisée comme témoin négatif.

Les résultats sont présentés sur la **figure (I.17B)**. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le tag HA, ou poly clonaux dirigés contre la p25, a révélé que toutes les protéines p25 sauvage et mutées testées (p25, p25T₄₃A/D, p25Y₅₂D, p25T₁₆₄A/D et Y₂₃A) interagissent avec l'importine α de riz à l'exception du mutant Y₅₂A. Ce mutant est affecté dans sa localisation subcellulaire qui est fortement cytoplasmique. D'autres mutants présentaient des défauts de localisation subcellulaires, comme par exemple T₁₆₄A, mais l'interaction entre la protéine mutée et l'importine α ne semble pas altérée dans ce cas.

Ainsi la phosphorylation de Tyr52 est nécessaire à l'import nucléaire. À l'opposé, la protéine p25T₁₆₄A, qui reste un partenaire de l'importine α , n'est pas importée dans le noyau (Tableau I.2). Il est probable que la thréonine 164 soit impliquée dans une interaction entre l'importine α avec l'importine β 1 ou la reconnaissance de l'importine β 1 par les nucléoporines du NPC. Le signal de localisation nucléaire (NLS) est situé dans la partie N terminale de la protéine, ce résultat suggère qu'il existe des interactions entre les parties N et C terminales de la protéine et que ces interactions seraient nécessaires à l'import nucléaire de la protéine p25 à l'instar de la protéine Rev du virus HIV1 (Stauber *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2001).

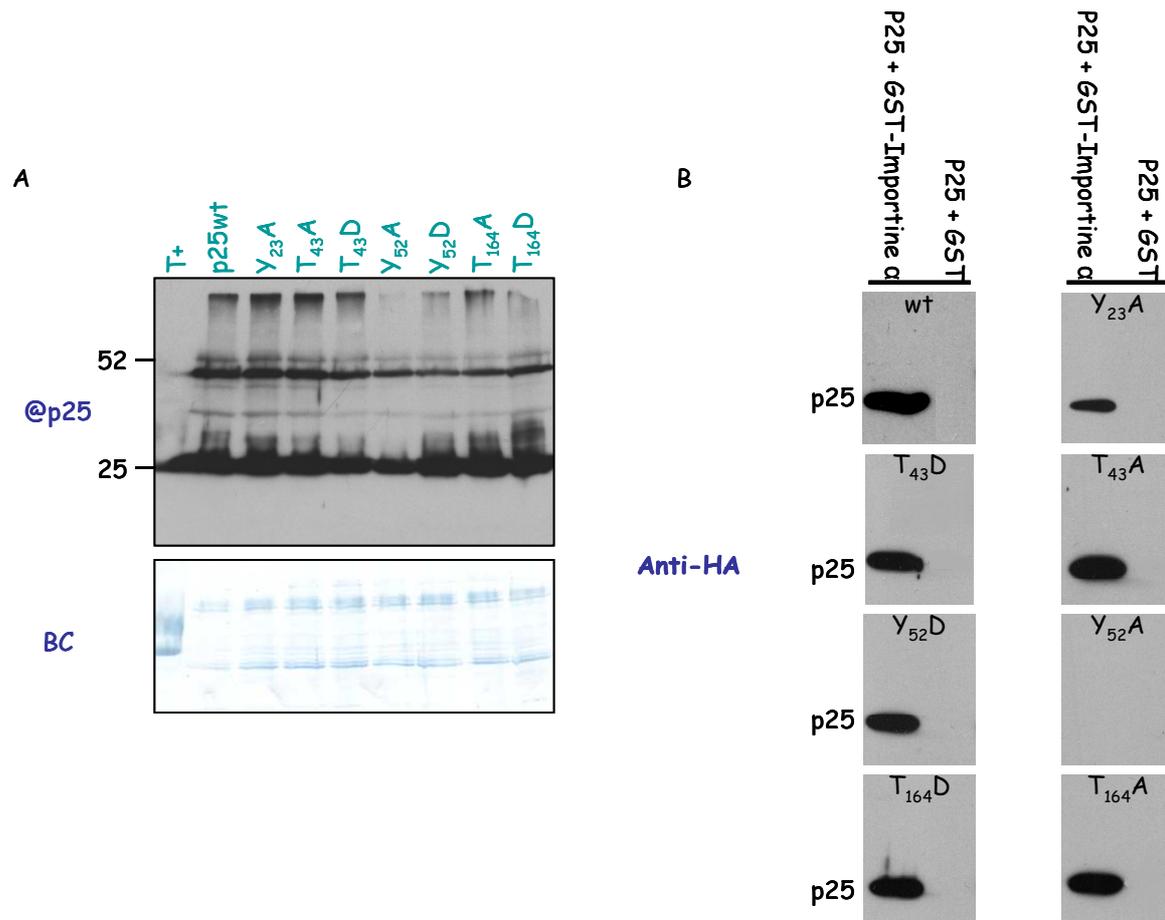


Figure I.17 : Immunodétection des protéines p25 produites *in vitro* (A), capables d'interagir avec l'importine α de riz (B). A. Les protéines produites en lysat d'*E. coli* (système RT100) ont été analysées à l'aide des anti-p25 (@p25) pour vérifier leur présence et pour les quantifier afin d'utiliser la même quantité ultérieurement. Les poids moléculaires sont indiqués à gauche. T+ représente la protéine p25 extraite à partir des plantes de *B. macrocarpa* infectées par le BNYVV. Les protéines totales ont été transférées sur membrane et colorées par bleu de Coomassie (BC). **B.** La protéine p25 sauvage ou mutée a été incubée avec des quantités similaires GST ou GST-importine α de riz. Après lavages, la moitié de chaque milieu réactionnel a été analysée par western blot et à l'aide d'anticorps anti-HA (ou anti-p25, non montré).

iii. Rôle des résidus phosphorylables sur la capacité d'activation de la transcription de la protéine p25 : utilisation de l'approche de "simple hybride"

Un tel système a déjà été mis à profit pour rechercher des protéines capables d'activer la transcription et pour caractériser leur domaine d'activation (AD). Décrit précédemment dans le cas de la protéine VP16 de l'Herpes simplex virus (Sadowski *et al.*, 1988; Cousens *et al.*, 1989), de l'activateur de transcription STAT6 (Yang *et al.*, 2002), du domaine d'activation de la transcription de Gal4 fusionné à la protéine LexA (Rhee *et al.*, 2000) ou

encore de la protéine d'avirulence AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* (Szurek *et al.*, 2001), ce système a été utilisé au laboratoire pour caractériser le domaine d'activation de la transcription de la protéine p26 (Link *et al.*, 2005) et de la protéine p25 (aa 103-145) (Klein *et al.*, 2007). En plus de son domaine d'activation de la transcription (**figure I.12A**), la protéine p25 comporte un domaine zinc-finger putatif (Jupin *et al.*, 1992) composé du motif ${}_{73}\text{CX5-CX4-CX5-C}_{90}$ (**figure I.12B**).

J'ai réalisé le clonage de l'ensemble des mutants de la protéine p25 en fusion à la séquence du domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (GAL4BD), dans le vecteur navette pGBT9. Les plasmides recombinants ont été introduits dans la souche de levure HF7c.

Les levures recombinantes ont ensuite été sélectionnées sur milieu dépourvu de tryptophane et repiquées à la fois sur milieu SD-W (**figure I.18, colonnes de gauche**) et sur milieu SD-WH, pour visualiser l'activation du gène rapporteur *His3* (**figure I.18, colonnes de droite**). En absence d'histidine, la protéine p25 sauvage et les formes mutées T₂₁D, T₄₃D, Y₅₂D, T₅₆A, S₁₀₉A-S₁₁₀A, T₁₆₅A/D et T₄₃A-T₁₆₄A sont capables de reconstituer un facteur de transcription chimérique dont l'expression rend les levures prototrophes pour l'histidine (**figure I.18**). Si certains des mutants concernent directement le domaine d'activation de la transcription de p25 (aa 103 à 145), d'autres sont localisés à l'extérieur. Il est important de préciser que l'activation de la transcription nécessite la présence d'une protéine p25 complète (Klein *et al.*, 2007) et que l'adressage nucléaire de la protéine de fusion est assuré par GAL4BD. Des changements d'acides aminés réalisés au sein de la région hypervariable de la protéine p25 avaient mis en évidence l'importance de la structure de la protéine pour le recrutement de la RNA polymérase II. L'interaction probable des domaines N et C terminaux de p25 est encore illustrée ici par les mutants T₄₃A, T₁₆₄A qui sont incapables d'activer la transcription, alors que le double mutant T₄₃A-T₁₆₄A le devient. Curieusement, si ce double mutant est capable de recruter la RNA polymérase, il est incapable d'être adressé au noyau. Il est donc envisageable que la protéine p25 subisse une phosphorylation pour son transport au noyau et subisse un déphosphorylation pour recruter la RNA polymérase. Comme aucun transformant n'a été obtenu pour le mutant T₄₃D-T₁₆₄D, je ne peux pas discuter cet aspect.

L'activation de transcription médiée par GAL4-p25 disparaît lorsqu'un autre plasmide est présent dans la levure (Klein *et al.*, 2007) ce qui rend possible les études d'interaction protéine-protéine en système double hybride de levure.

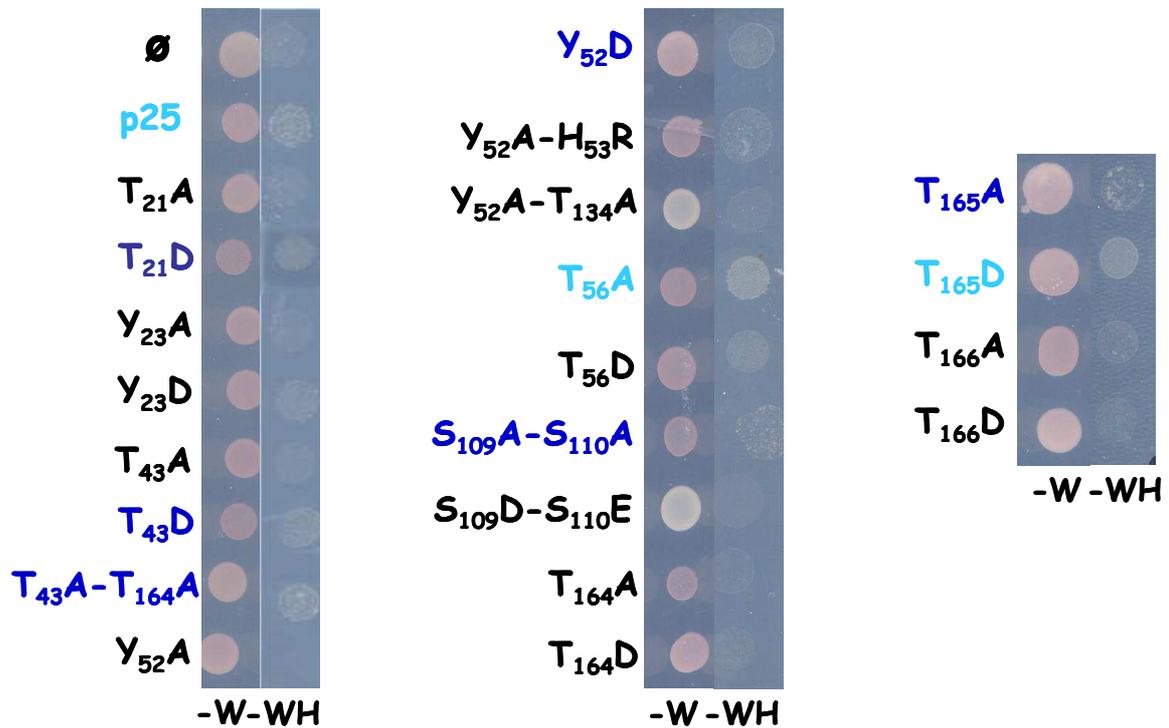


Figure I.18 : Analyse en système simple hybride de levure de l'effet de l'expression des protéines chimériques GAL4BD-p25 mutées sur l'activation de la transcription du gène rapporteur *His3*. Les levures HF7c exprimant la protéine GAL4BD seule (\emptyset) ou fusionnée à la protéine p25 et à ses formes mutées sélectionnées sur milieu SD-W peuvent pousser sur un milieu dépourvu en histidine (SD-WH) uniquement lorsque le gène rapporteur *His3* est exprimé. Les protéines p25wt, T₅₆A et T₁₆₅D activent la transcription plus fortement que les protéines T₂₁D, T₄₃D, Y₅₂D, S₁₀₉A-S₁₁₀A, T₁₆₅A et T₄₃A-T₁₆₄A.

iv. Rôle des résidus phosphorylables sur les capacités d'interaction entre protéine p25 : utilisation de l'approche de "double hybride"

Le système du "double hybride" est une méthode génétique utilisée pour rechercher l'existence d'interactions entre protéines dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Fields and Song, 1989; Bartel *et al.*, 1993). Son principe repose sur la possibilité de séparer l'activité du facteur de transcription GAL4 en deux domaines : le domaine de fixation à l'ADN (BD) qui associe à l'Upstream Activating Sequence (UAS) et le domaine d'activation de la transcription (AD) qui recrute l'ARN polymérase II. Ces deux domaines gardent leurs propriétés et, lorsqu'ils sont rassemblés par une interaction, il y a reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel permettant l'expression d'un ou de plusieurs gènes rapporteurs. Ainsi, l'interaction entre deux protéines fusionnées

respectivement à chaque domaine, reconstitue le facteur de transcription qui activera l'expression du ou des gènes rapporteurs.

L'utilisation de ce système a permis de montrer que la protéine p25 est capable d'interagir avec elle-même sans pour autant déterminer la stoechiométrie de l'interaction. L'interaction entre protéines p25 requiert l'intégrité de la séquence puisqu'aucun des mutants de délétion testés n'est capable de maintenir des interactions en système double hybride de levure (Klein *et al.*, 2007).

J'ai cloné l'ensemble de nos mutants dans le vecteur pGAD424 en fusion avec le domaine d'activation de la transcription de GAL4 (GAL4AD). Pour rechercher les capacités d'interaction entre nos mutants, j'ai utilisé l'approche de "mating" entre levures de signe sexué opposé. Les mutants ponctuels testés précédemment en système simple hybride ont été exprimés dans les levures HF7c de signe sexuel a (MATa). Aussi, j'ai transformé des levures Y187 de signe sexuel α (MAT α) avec les plasmides pGAD424 recombinants. Les levures ont été mises en contact deux à deux pour produire des levures diploïdes qui ont été sélectionnées. Des quantités identiques de cellules diploïdes ont été déposées sur milieu SD-WL et sur milieu minimum dépourvu de tryptophane, leucine et histidine (SD-WLH) pour rechercher leur prototrophie vis-à-vis de l'histidine. Cette prototrophie reflète l'activation de la transcription du gène rapporteur *His3* par le facteur de transcription reconstitué et donc par l'interaction des deux protéines de fusion. Les interactions plus ou moins fortes sont reflétées par la vitesse de croissance des levures pendant 48 heures en absence ou en présence du compétiteur de l'histidine 3-amino de triazole (3AT) à des concentrations différentes 3, 5 et 10 mM dans le milieu.

Les résultats obtenus sont illustrés par la **figure (I.19)** et résumés dans le **tableau I.3**. Toutes les levures diploïdes sont capables de croître sur milieu SD-WL (non montré). L'absence de croissance des levures exprimant la protéine p25 sauvage et le domaine GAL4-AD seul est expliquée par la faible activation de la transcription de la protéine GAL4BD-p25 dans un système où le seuil de détection des interactions est plus élevé que dans des levures haploïdes HF7c. La protéine p25 interagit avec elle-même et avec les mutants T₂₁A/D, Y₂₃A, T₄₃D, Y₅₂D, T₅₆A, S₁₀₉A-S₁₁₀A, T₁₆₅A/D, T₁₆₆A/D. En effet, la **figure I.19** présente une seule expérience en absence du compétiteur 3AT et elle ne contient pas toutes les combinaisons testées. Le **tableau I.3** résume tous les résultats de tests simple et double hybride issus de trois expériences différentes.

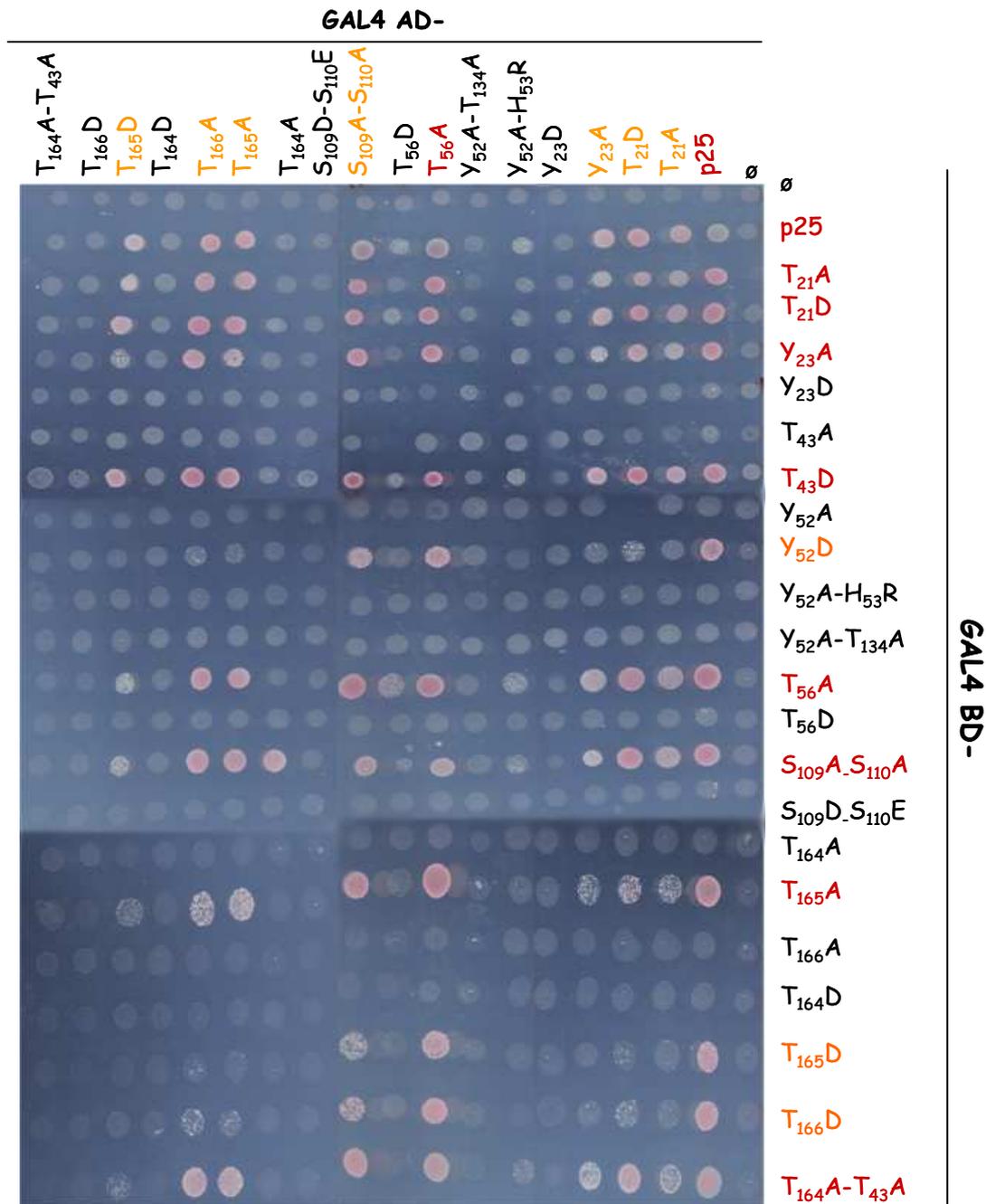


Figure I.19 : Caractérisation des capacités de dimérisation de protéines p25 sauvage et mutées par la technique du "double hybride". Les levures diploïdes sélectionnées sur milieu dépourvu en tryptophane et en leucine sont déposées en quantités identiques sur milieu SD-WL (non montré) pour visualiser leur croissance et sur milieu SD déplété en tryptophane, leucine et histidine (SD-WLH) pour visualiser l'activation de la transcription du gène rapporteur *His3* qui rend les levures prototrophes vis-à-vis de l'histidine. Une croissance sur milieu SD-TLH témoigne de l'existence d'interactions entre les protéines de fusion GAL4BD-p25 sauvage ou mutées et les protéines de fusion GAL4AD-p25 sauvage ou mutées. La mutation H₅₃R a été introduite par erreur de l'ADN polymérase lors de la réaction PCR pour produire la mutation Y₅₂A. Nous avons gardé cette double mutation (Y₅₂AH₅₃R) et elle a été aussi testée pour la suite avec les autres formes mutées.

Nos résultats nous permettent de conclure que les remplacements Y₂₃D, T₅₆D, S₁₀₉D-S₁₁₀E, T₁₆₆D abolissent les capacités de dimérisation des p25 mutées. Il en est de même pour le mutant T₁₆₄D, incapable de dimériser. Les mêmes mutations introduites sur les résidus adjacents (T₁₆₅D, T₁₆₆D) n'abolissent pas la dimérisation, ce qui permet d'écarter en partie un effet lié à la charge négative apportée par l'aspartate, et conforte l'importance d'une phosphorylation de cette thréonine 164. Il est donc envisageable que la ou les phosphorylations des résidus Y23, T56, S109-S110 et T164 soient impliquées en partie ou en totalité dans la régulation de la dimérisation des protéines p25. À l'opposé, les remplacements T₄₃A, Y₅₂A abolissent les capacités de dimérisation des protéines mutées en supposant que la phosphorylation d'un de ces résidus est indispensable pour cette propriété de dimérisation. Enfin, comme on l'a cité précédemment, le simple mutant T₄₃A ou T₁₆₄A empêche l'interaction avec la p25 sauvage ainsi que la dimérisation de ces mutants. De façon surprenante, le double mutant T₄₃A-T₁₆₄A a restauré la capacité de la protéine à interagir avec la protéine sauvage, et faiblement la dimérisation. Une fois encore, un tel résultat renforce l'idée de la présence d'interaction entre les parties N et C terminales de la p25 et l'importance de la structure de la protéine p25 dans sa capacité à dimériser et probablement à interagir avec des partenaires cellulaires.

Un mutant dominant négatif de la protéine p25 devrait donc être capable d'interagir avec la protéine p25 wt, être incapable d'activer la transcription dans la levure et posséder une localisation subcellulaire soit nucléaire, soit cytoplasmique. Un tel mutant devrait également être incapable d'induire des symptômes sévères sur plante. Nous avons donc recherché l'effet des mutations sur les symptômes produits dans trois plantes hôtes.

v. Rôle des résidus phosphorylables sur les propriétés de la protéine p25 :
Effet des remplacements sur le développement des symptômes foliaires

Les formes mutées de la protéine p25 ont été introduites dans le clone complet ADNc de l'ARN3 pour produire des transcrits infectieux *in vitro* (Quillet *et al.*, 1989). Ces transcrits ont été supplémentés des ARN1 et 2 (Stras12) et inoculés sur feuille de *Chenopodium quinoa*, *Tetragonia expansa* et *Beta macrocarpa*. Pour chacune de ces espèces, les expériences ont été répétées trois fois et ont consisté à inoculer deux ou trois plantes. Les feuilles de *C. quinoa* ou *T. expansa* ont été récoltées six à huit jours après inoculation. Les feuilles de *B. macrocarpa* ont été récoltées treize à vingt jours après inoculation. Les feuilles ont été photographiées et les lésions ont été récoltées pour caractériser l'expression des ARN viraux et des protéines CP et p25. Les symptômes observés sont résumés sur la **figure I.20**. L'utilisation des plantes hôtes *C. quinoa* et *T. expansa* a permis d'identifier trois groupes de mutants de la protéine p25. Le premier groupe concerne les mutants de la protéine p25 produisant des lésions chlorotiques jaunes identiques à celles obtenues en présence d'ARN3 sauvage ; c'est le cas des mutants T₂₁A, -Y₂₃A, -T₄₃A/D, -S₁₀₉A-S₁₁₀A, -T₁₆₄A, -T₁₆₅A et -T₁₆₆A (**figure I.20**). Le deuxième groupe regroupe les mutants de la protéine p25 induisant des lésions chlorotiques vertes, comparables à celles obtenues en absence d'ARN3 (**figure I.20**) ; c'est le cas des mutants Y₅₂A/D, -Y₅₂A-H₅₃A, -Y₅₂A-T₁₃₄A, -S₁₀₉D-S₁₁₀E, -T₁₆₄D et -T₁₆₆D. Le troisième groupe concerne les mutants produisant des symptômes intermédiaires et regroupe les mutants T₂₁D, -Y₂₃D, -T₅₆A, -T₁₆₅D et le double mutant T₄₃A-T₁₆₄A.

De façon surprenante, l'infection systémique de *B. macrocarpa* apparaît également comme étant affectée par certains changements d'acides aminés introduits dans la séquence de la protéine p25. Pourtant, aucune des mutations n'affecte la séquence "core" responsable du mouvement viral à longue distance (Lauber *et al.*, 1998a). Les mutants -Y₅₂A, -S₁₀₉D-S₁₁₀E et -T₁₆₄D ont montré un retard dans l'apparition des symptômes systémiques tandis que les mutants -Y₅₂A-H₅₃A, -Y₅₂A-T₁₃₄A et -Y₅₂D ne sont plus propagés à longue distance. Il faut noter que le point commun de tous ces mutants est qu'ils possèdent tous une Tyrosine 52 mutée qui modifie les symptômes locaux et l'infection systémique.

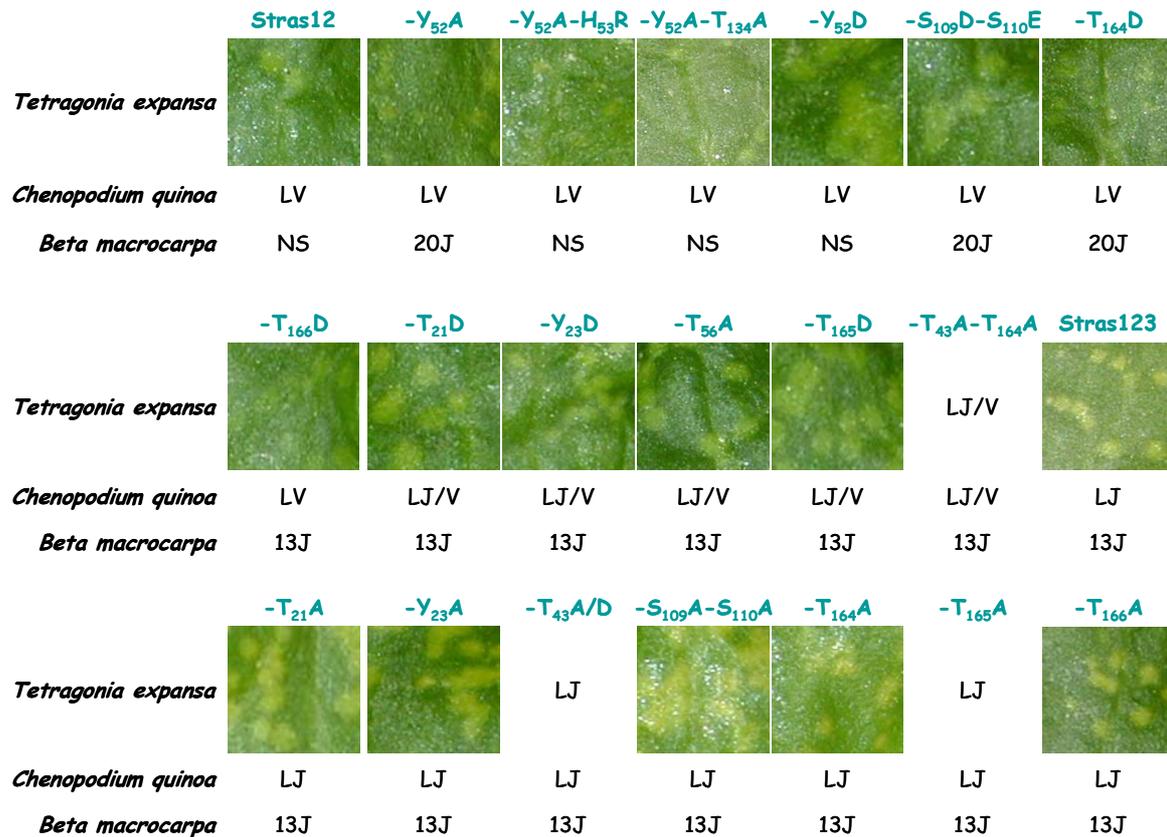


Figure I.20 : Effet de l'expression de la protéine p25 mutée sur le développement des symptômes foliaires 8 jours après inoculation mécanique d'ARN infectieux du BNYVV sur *T. expansa* et *C. quinoa* ainsi qu'après 20 jours après inoculation sur *B. macrocarpa*. Les lésions vertes (LV) induites lors de l'infection locale des feuilles par les ARN1 et 2 seuls (Stras12) sont exacerbées lors de l'expression de la protéine p25 codée par l'ARN3 (Stras123). Si des formes mutées de la protéine p25 restent capables d'induire ce jaunissement caractéristique (Stras123-T₂₁A, -Y₂₃A, -T₄₃A/D, -S₁₀₉A-S₁₁₀A -T₁₆₄D, -T₁₆₅A, -T₁₆₆A), d'autres perdent cette capacité et produisent des lésions similaires à celles obtenues en présence des ARN1 et 2 seuls (Stras123-Y₅₂A/D, -Y₅₂A-H₅₃R, -Y₅₂A-T₁₃₄A, -S₁₀₉D-S₁₁₀E -T₁₆₄D, -T₁₆₆D). L'expression des autres protéines p25 mutées (Stras123-T₂₁D, -Y₂₃D, -T₅₆A, -T₁₆₅D, -T₄₃A-T₁₆₄A) retarde l'apparition des lésions jaunes (LJ). Sur *B. macrocarpa* l'infection systémique a été visualisée après 13 jours (13J) ou a été retardée à 20 jours (20J), ou les plantes n'ont pas développé une infection systémique (NS).

J'ai analysé respectivement par northern blot et par western blot les ARN et les protéines virales issues des lésions récoltées. Comme nous pouvons le constater sur la **figure I.21D et I.22D**, l'ARN 3 est présent dans l'ensemble des constructions testées à l'exception de la souche helper Stras12. Le niveau d'accumulation des ARN viraux est comparable, ce qui semble indiquer que les mutations de p25 ont peu d'influence sur l'accumulation des ARN viraux.

Les lésions récoltées sur les différentes plantes ont également été analysées par western blot pour chercher d'éventuelles différences d'accumulation des protéines virales p25 et CP.

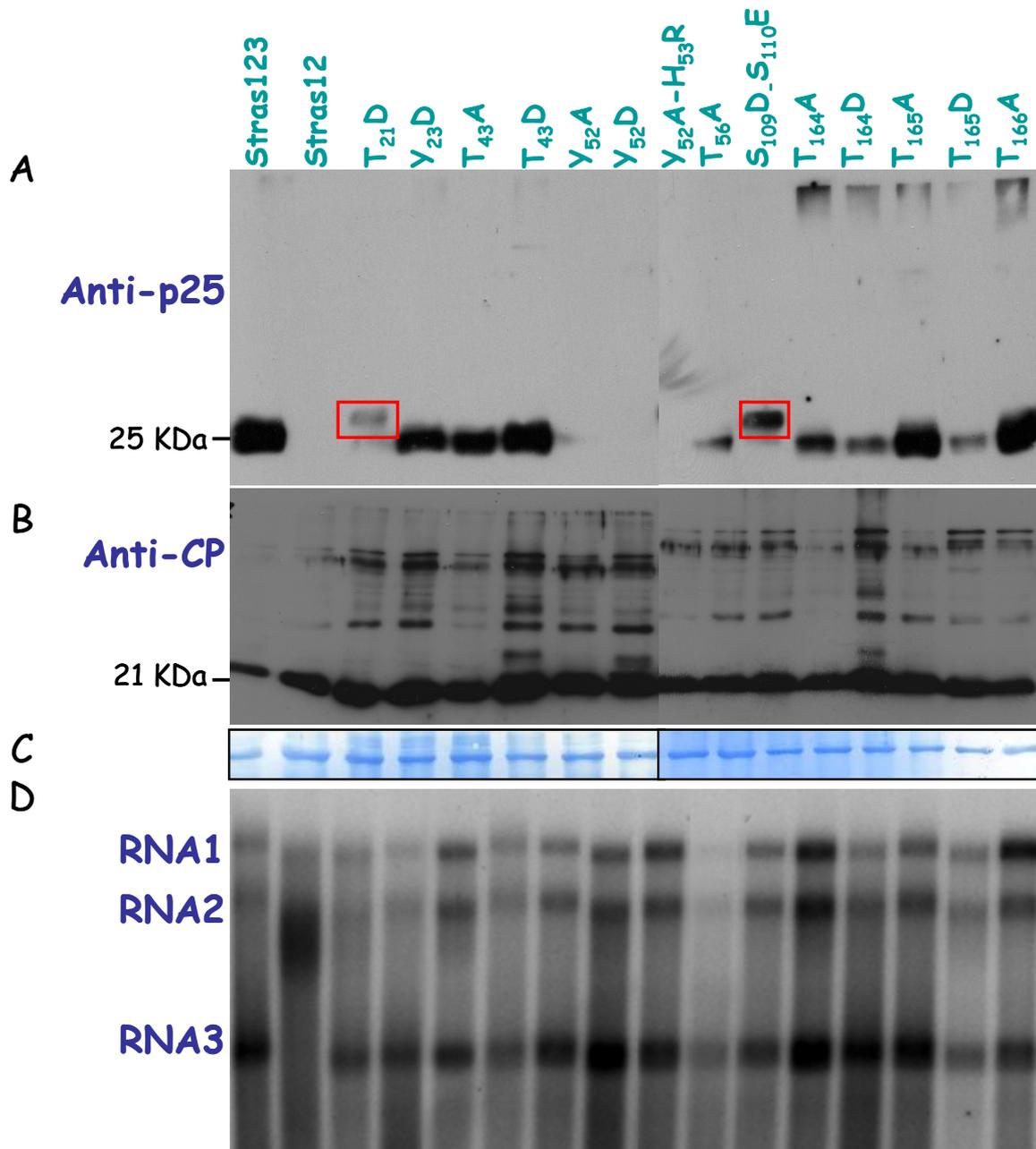


Figure I.21 : Analyse de l'accumulation des protéines virales et des ARN viraux dans des lésions locales de feuilles de *T. expansa* inoculées par la souche helper Stras12 ou supplémentée des transcrits t35 sauvage ou portant la protéine p25 mutée. (A) Analyse par western blot de la présence de la protéine p25 en utilisant des anticorps anti-p25. Les rectangles rouges entourent les bandes avec un retard de migration. (B) Analyse par western blot de la présence de la protéine CP en utilisant des anticorps anti-CP. (C) Coloration de membrane par bleu de Coomassie montre les protéines totales. (D) détection des ARN viraux par northern blot.

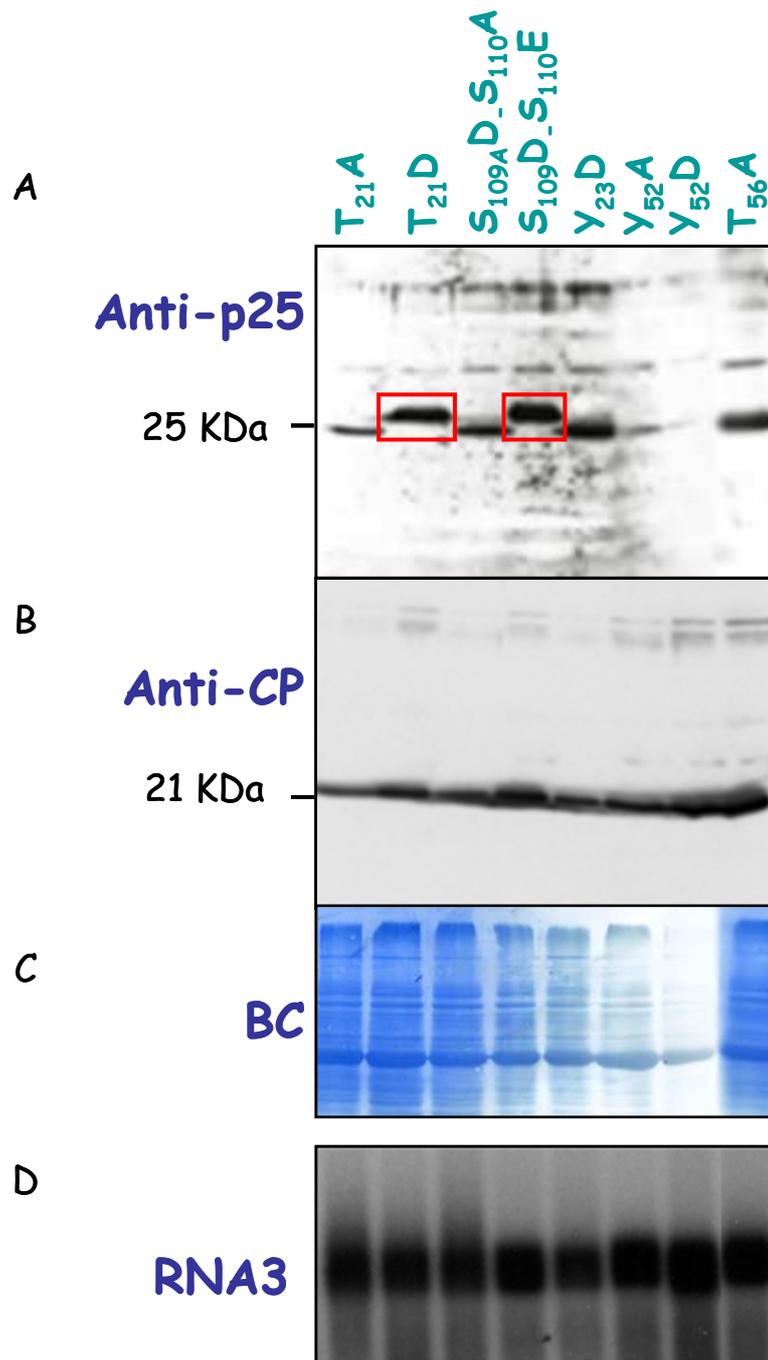


Figure I.22 : Étude de l'influence des protéines virales p25 mutées sur l'expression protéique et sur la réplication des ARN viraux dans des lésions locales de feuilles de *C. quinoa* inoculées par Stras12 ou supplémentées des transcrits t35 sauvage ou portant la protéine p25 mutée. Détection par western blot de l'accumulation des protéines p25wt ou mutées par l'anti-p25 (A), ainsi que de la protéine CP par l'anti-CP (B). (C) Coloration de membrane au bleu de Coomassie. (D) Analyse par northern blot de l'accumulation de l'ARN3 (Lauber *et al.*, 1997). Les rectangles rouges entourent les bandes présentant un retard de migration. Les bandes observées pour p25Y₅₂A/D correspondent aux détections les plus fortes obtenues pour l'ensemble des analyses effectuées.

L'immunodétection des protéines virales en utilisant les anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine p25 et la protéine de capsid nous a permis de visualiser des niveaux d'expression comparables pour la protéine CP (**figure I.21B** et **figure I.22B**) mais différents pour la protéine p25 indépendamment de la plante hôte utilisée et de l'expérience (**figure I.21A** et **I.22A**). Ainsi, j'ai constaté une modification de la mobilité électrophorétique des mutants T₂₁D et S₁₀₉D-S₁₁₀E et une baisse de l'accumulation (**figure I.21A** et **I.22A**) voire l'absence de détection (**figure I.21A**) de la protéine mutée Y₅₂A et Y₅₂D. Nous avons pu conclure que les mutations du résidu Y52 affectent la stabilité de la protéine p25 *in vivo* et particulièrement *in planta* puisque ces protéines étaient stables dans *E. coli* (**Figure I.17A**).

La faible mobilité électrophorétique des protéines mutées T₂₁D et S₁₀₉D-S₁₁₀E ne peut pas s'expliquer uniquement par un changement de charge lié à la présence de l'acide aspartique (comparer T₂₁D et Y₂₃D) et correspond très probablement à des modifications post traductionnelles consécutives au phosphomimétisme des résidus mutés. De telles protéines ne sont pas visualisées en contexte viral en présence de p25 sauvage mais pourraient exister et posséder une demi-vie très courte voire subir une déphosphorylation des résidus T₂₁ ou S₁₀₉₋₁₁₀, suggérant un rôle de ces résidus conservés.

Nous pouvons observer sur western blot que l'immunodétection de la protéine p25 sauvage ou mutée sous la forme d'un doublet n'est pas toujours observée. La présence ou l'absence de doublet est dépendante de la plante hôte et de la méthode d'extraction des protéines. Les phosphorylations peuvent ne pas affecter la mobilité électrophorétique d'une protéine, comme cela a été montré pour la protéine 66K du TYMV (Jakubiec *et al.*, 2006).

L'utilisation de formes tronquées de la protéine p25 fusionnées à l'eGFP avait permis de corrélérer une sévérité de symptômes et la localisation de la protéine p25 (Vetter *et al.*, 2004). L'utilisation de mutants ponctuels de p25 qui affectent la localisation subcellulaire de la protéine fournit des informations complémentaires et augmente la complexité du mode de fonctionnement de p25.

Afin de faciliter l'analyse de l'incidence de nos mutants de phosphorylation de la protéine p25 sur ses propriétés biologiques, j'ai résumé dans le **tableau I.4** nos résultats concernant la localisation subcellulaire, l'activation de la transcription, la multimérisation, et les symptômes sur *T. expansa* et *B. macrocarpa*.

La protéine p25-T164A, toujours reconnue par l'importine α *in vitro*, présente une localisation principalement cytoplasmique et induit des lésions jaunes comparables à celles obtenues en présence de la protéine p25 sauvage. Ce mutant nous a permis de suspecter l'existence d'interactions à longue distance sur la protéine p25. De telles interactions sont confortées par le double mutant T₁₆₄A-T₄₃A qui restaure partiellement les fonctions de la protéine p25. La protéine p25-T₁₆₄D, localisée dans le noyau et le cytoplasme, induit une atténuation des symptômes foliaires. Les remplacements de la Thr165 adjacente par une alanine ou un acide aspartique ne montrent aucun effet significatif sur les propriétés de la protéine p25. Ceci suggère que c'est effectivement la phosphorylation de la Thr164 et pas la présence d'une charge négative dans cette région qui active l'import nucléaire de la protéine. La détection d'un long peptide phosphorylé dans la partie C terminale de la protéine nous laisse penser que la Thr164 constitue le site de phosphorylation.

À l'opposé, si le remplacement T₅₆A est sans effet, le phosphomimétisme T₅₆D affecte les propriétés de la protéine p25 et bloque l'import nucléaire. Cela est certainement dû à la neutralisation des charges positives du NLS (₅₇KRIRFR₆₂).

Nous avons observé que les mutations Y₅₂A/D, Y₅₂A-H₅₃A, Y₅₂A-T₁₃₄A atténuent la sévérité des symptômes locaux mais aussi retardent voire empêchent l'infection systémique de la plante par le virus (**Figure I.20**). Nous avons observé que les protéines p25 mutées en position Y52 n'étaient pas ou faiblement détectées *in planta*. Ainsi la mutation Y₅₂A affecte la localisation subcellulaire et les capacités d'activation de transcription et d'interaction de p25. Il est probable que le remplacement Y₅₂A induit un bouleversement global de la structure de la protéine. Un tel effet n'est pas observé lors du remplacement Y₅₂D, puisque la protéine reste capable d'activer la transcription et d'interagir avec elle-même et l'importine α . Toutefois, si cette protéine conserve certaines de ses capacités, son expression semble inhiber le mouvement à longue distance du virus. En l'absence d'analyse de la descendance de l'ARN 3 modifié (Y₅₂A) à partir des feuilles systémiques de *B. macrocarpa*, nous ne pouvons pas exclure la présence d'une réversion dans la protéine p25.

Tableau I.4 : Résumé de l'ensemble des résultats de l'incidence des mutations introduites au niveau des sites potentiels de phosphorylation de la protéine p25 sur ses caractéristiques connues, la localisation subcellulaire des protéines de fusion GFP-p25 en cellules BY-2, l'activation de transcription en système simple hybride, les capacités de dimérisation en système double hybride et des symptômes observés sur feuilles de plantes hôtes. *, indique que cette forme mutée montre une rétention cytoplasmique dans environ 50 % de cellules transfectées.

	Localisation subcellulaire	Activation de la transcription	Multimérisation	Symptômes	
				<i>T.expansa</i>	<i>B.macrocarpa</i>
p25 wt	N/C	+	+	jaune	Systemique
T₂₁A	N/C	-	+/-	jaune	Systemique
T₂₁D	N/C	+	+	Vert/jaune	Systemique
Y₂₃A	N/C*	-	+/-	jaune	Systemique
Y₂₃D	N/C*	-	-	Vert/jaune	Systemique
T₄₃A	N/C	-	-	jaune	Systemique
T₄₃D	N/C	+	+	jaune	Systemique
Y₅₂A	C	-	-	Vert	Systemique retardé
Y₅₂A-H₅₃R	Non testé	-	-	Vert	Non Systemique
Y₅₂A-T₁₃₄T	Non testé	-	-	Vert	Non Systemique
Y₅₂D	N/C	+/-	+/-	Vert	Non Systemique
T₅₆A	N/C	+	+	Vert/jaune	Systemique
T₅₆D	C	-	-	Non testé	Non testé
S₁₀₉A-S₁₁₀A	N/C	+	+	jaune	Systemique
S₁₀₉D-S₁₁₀E	N/C	-	-	Vert	Systemique retardé
T₁₆₄A	C	-	-	Vert/jaune	Systemique
T₁₆₄D	N/C	-	-	Vert	Systemique retardé
T₄₃A-T₁₆₄A	C	+	+/-	Vert/jaune	Systemique
T₁₆₅A	N/C	+	+	jaune	Systemique
T₁₆₅D	N/C	+	+	Vert/jaune	Systemique
T₁₆₆A	N/C	-	-	jaune	Systemique
T₁₆₆D	N/C	-	-	Vert	Systemique

III. Conclusion

Nous avons montré que la protéine p25 est la cible de plusieurs modifications post traductionnelles dont la N-acétylation, la déamidation et la phosphorylation. Les remplacements T₂₁D, T₂₁A, S₁₀₉D-S₁₁₀E et S₁₀₉A-S₁₁₀A ne modifient pas la localisation subcellulaire de la protéine p25. L'absence de résidus phosphorylables accentue les symptômes alors que le phosphomimétisme atténue les symptômes foliaires. L'expression des symptômes de chlorose jaune ne semble donc pas directement liée à l'accumulation de la protéine dans le cytoplasme. La tyrosine 52 représente un acide aminé particulier de p25 puisque les mutations introduites en remplacement de Y52 bouleversent le comportement de la protéine p25 mais aussi du virus. L'inhibition de la phosphorylation sur ce résidu inhibe la capacité de la protéine à recruter l'ARN polymérase II, à multimériser, à interagir avec l'importine α . Les remplacements effectués sur la Tyr52 induisent la déstabilisation de la protéine p25 *in vivo*. L'immunodétection de la protéine p25 dans les extraits des cellules BY2 transfectées révèle la présence de la protéine mutée GFP-p25Y₅₂D (**figure I.13**). Il faut toutefois noter des différences temporelles entre les deux expériences puisque l'immunodétection de la protéine p25 dans les cellules BY-2 est réalisée 12 à 16 h après transfection contre 6 à 13 jours après inoculation dans les plantes. Un phosphomimétisme sur ce résidu restaure la capacité d'interaction de la protéine avec l'importine α et par conséquent son import nucléaire tout comme ses propriétés d'activation de transcription et la multimérisation.

Nous ne pouvons pas exclure la présence d'autres types de modifications post traductionnelles de la protéine p25. L'analyse *in silico* des sites de O-GlcNAcylation par le logiciel YinOYang 1.2 a révélé la présence de deux acides aminés potentiellement O-GlcNAcylés (T165 et T166) sur les protéines p25 d'isolats A, B et P et sur le résidu S117 de la protéine p25 de l'isolat B (**figure I.23**). Les mutations T₁₆₆A/D empêchent l'activation de la transcription et la multimérisation sans affecter la localisation subcellulaire. Thr165 et 166 sont prédits O-GlcNAcylés, ce qui expliquerait qu'un remplacement de la thréonine 166 par une alanine ou par un acide aspartique produise le même effet. Rappelons ici qu'une O-GlcNAcylation peut réguler la phosphorylation au même site ou sur un site voisin (voir introduction).

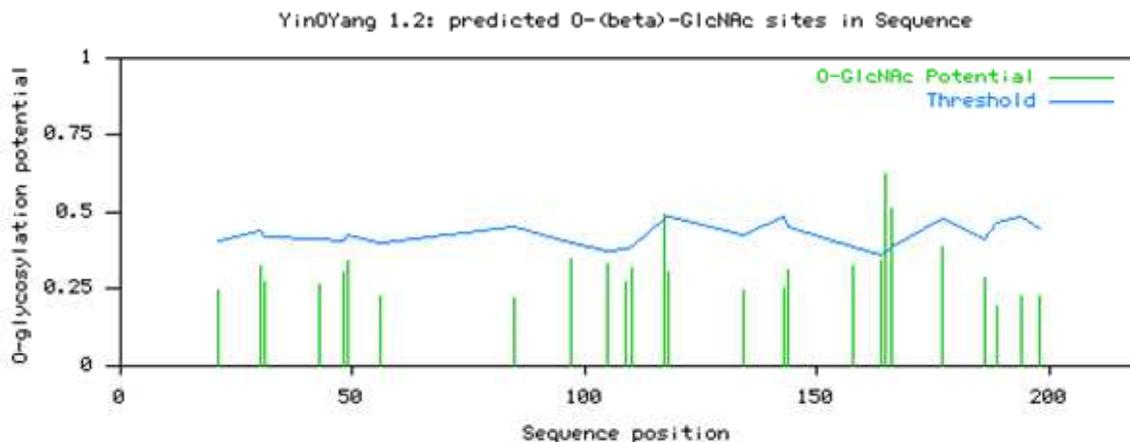
Sites potentiels de l'*O*-GlcNAcylation

Figure I.23 : Analyse prédictive des résidus potentiellement *O*-GlcNAcylés présents sur la séquence de la protéine p25 (isolat B) à l'aide du logiciel YinOYang 1.2. Les résidus S117, T165 et T166 sont probablement *O*-GlcNAcylés.

L'approche protéomique n'a pas permis d'identifier avec précision les sites de phosphorylation mais a localisé deux sérines phosphorylées au sein du peptide $_{108}\text{DSSVNELLVSTGLVIHT}_{124}$. Ces résultats n'ont pas encore été confirmés par d'autres analyses. Nous pouvons toutefois suggérer qu'une phosphorylation peut avoir lieu sur l'une des deux sérines S109 et S110. Parmi les peptides potentiellement phosphorylés détectés par l'analyse de MS, on trouve également le peptide $_{37}\text{RAINLLTHTDNR}_{47}$ qui renferme la thréonine T43. Contrairement aux deux sérines (S109 et S110), la mutation T₄₃A, inhibant la phosphorylation, bloque l'activation de la transcription et la multimérisation de la protéine mais n'affecte pas les symptômes sur plantes.

Nous avons pu remarquer qu'il existait un lien entre la multimérisation et l'activation de la transcription.

Au vu de ces résultats, certains mutants de la protéine p25 pourront être testés pour rechercher s'ils possèdent ou non un effet dominant négatif. Pour cela, ces mutants devront être co exprimés en contexte viral, par le biais d'un réplicon dérivé de l'ARN5, ou par transgénèse. Si la première solution semble la plus aisée à mettre en œuvre, il est difficile de contrôler la présence des ARN3 et 5 dans les mêmes sites d'infection et d'écartier tout risque d'infection par les sauvages sans ARN5 exprimant le mutant p25 à tester. Aussi, l'approche par transgénèse semble la mieux adaptée mais requiert des compétences spécifiques à la betterave sucrière.

Si j'avais la possibilité de continuer sur cette voie, je choiserais d'utiliser les mutants Y₅₂A/D, T₁₆₄D et le double mutant T₄₃A/T₁₆₄A comme compétiteurs de la protéine p25 sauvage. Avant d'initier une transgénèse sur *B. vulgaris*, l'obtention de plantes *Arabidopsis* transgéniques exprimant les protéines p25 mutées permettra de connaître l'incidence de leur expression sur la balance hormonale et la prolifération racinaire.

**Chapitre II : Recherche des partenaires
cellulaires et viraux capables d'interagir
avec la protéine p25 du BNYVV**

I. Introduction

Plantes et phytovirus entretiennent des relations dont l'issue n'est pas nécessairement dommageable pour la plante. Si un virus parvient à initier une infection, une sélection de mécanismes de l'immunité innée peut combattre le virus. Si ce dernier parvient à contourner les mécanismes de défense, la maladie peut se développer. Les mécanismes de défense caractérisés chez les plantes incluent les gènes de résistance (R) et le mécanisme de RNA silencing qui sera présenté dans le chapitre III.

Un gène de résistance R confère une résistance à un pathogène spécifique qui induit le développement d'une réponse hypersensible (HR) et d'une résistance systémique acquise (SAR). La réaction HR comprend la mort cellulaire programmée, qui se produit dans les cellules au niveau du site d'infection et se manifeste par des lésions nécrotiques limitant généralement la progression virale. Ces réactions incluent des changements de flux ioniques, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la production d'oxyde nitrique (NO), l'activation des voies de signalisation (Kinases/phosphatases) et des modifications des profils transcriptionnels. Les activités cellulaires sont modifiées et une signalisation hormonale va participer au mécanisme de défense, notamment pour mettre en place la SAR. La résistance systémique acquise se produit dans les tissus qui sont éloignés du site de l'infection initiale et les rend immuns à l'infection. La SAR est durable et peut durer plusieurs semaines. Elle se caractérise entre autre par l'augmentation de l'expression des gènes codant pour les protéines PR qui possèdent des actions antimicrobiennes.

Le modèle récepteur ligand proposé pour décrire les interactions entre produit du gène de résistance R et produit du gène d'aviorulence Avr est difficilement applicable aux infections virales (**figure II.1A**). Un modèle plus élaboré implique la participation des complexes protéiques contenant le produit du gène R. L'hypothèse de la garde "guard", initialement proposée par Van der Biezen et Jones (Van der Biezen and Jones, 1998), suppose que les protéines R "guards" sont constitutivement associées aux protéines cellulaires "gardees" qui sont requises par des agents pathogènes de l'infection (**figure II.1B**). Lors de l'infection, l'agent pathogène provoque des modifications de "gardee" qui est détectée par la protéine "guard" en déclenchant une cascade de signalisation qui aboutit à une réponse de résistance. Ainsi, toute modification de protéines altérant la structure quaternaire de "gardee" ou encore leur recrutement par la machinerie virale peut aboutir à la détection de

l'agent pathogène. En effet, le répertoire limité des génomes viraux implique l'accaparement de facteurs cellulaires (dont certains peuvent constituer des "gardees") par l'intermédiaire d'interactions entre protéines cellulaires et virales.

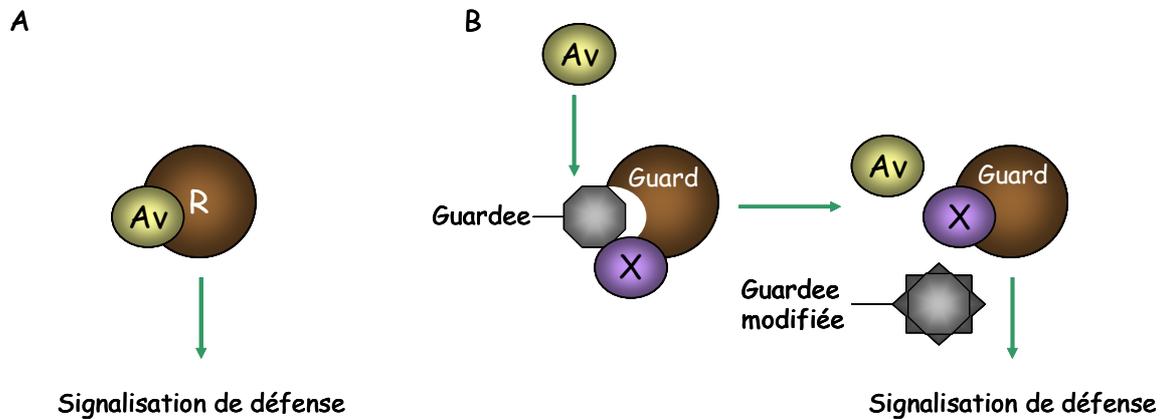


Figure II.1 : Les hypothèses de reconnaissance entre les produits de gène d'avirulence (Av) d'un agent pathogène et celui de gène de résistance (R) de l'hôte [Adapté de (Soosaar *et al.*, 2005)]. (A) Le modèle récepteur ligand implique une interaction directe entre les Av et R. (B) L'hypothèse de "Guard" présume une interaction constitutive entre la protéine Guard (qui représente le produit du gène de résistance R) et une protéine cellulaire appelée Guardee. L'infection par un agent pathogène induit *via* la protéine Av des modifications dans la protéine Guardee en altérant l'interaction avec la protéine Guard qui va déclencher la signalisation de défense.

Si certaines protéines virales possèdent des signatures caractéristiques (ARN polymérase ARN dépendante, Helicase, ...) d'autres ne présentent aucune similarité de séquence avec des protéines connues. Aussi, la caractérisation de la fonction d'une protéine virale peut passer par l'identification de ses partenaires cellulaires. L'analyse d'interactions entre protéines est donc cruciale pour comprendre les fonctions d'une protéine et identifier les mécanismes moléculaires de processus biologiques.

Le système double hybride de levure (Y2H ou YTH) est couramment utilisé pour identifier des interactions entre protéines *in vivo*. Il repose sur la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel par le biais d'interaction entre deux protéines chimériques. Ces protéines chimériques consistent en la fusion de la séquence du domaine de fixation à l'ADN d'un facteur de transcription à une séquence de protéine X et la fusion de la séquence du domaine d'activation de la transcription à celle d'une protéine Y (voir matériel et méthodes, **figure MM.2**). Lorsque X interagit avec Y, le facteur de transcription est fonctionnel et active la synthèse d'un gène de sélection. Un tel système est utilisé de deux manières. Une première approche, dite matricielle, consiste à cloner un

nombre relativement élevé de gènes en phase avec le domaine de fixation à l'ADN (BD) et avec le domaine d'activation de la transcription (AD). Il suffit alors de tester chacun des gènes contre tous les autres. Cette approche a été utilisée pour caractériser les capacités de multimérisation des mutants de phosphorylation (voir chapitre I). La seconde approche repose sur un criblage d'une banque d'ADNc. Les protéines appâts sont clonées en fusion avec le domaine BD. Des cellules de levure co-transformées avec une copie du plasmide BD et l'un des plasmides de la banque sont sélectionnées pour l'expression du gène rapporteur qui reflète l'interaction entre la protéine appât et une protéine proie. Le séquençage du plasmide permet d'identifier la nature de la protéine proie par comparaison aux banques de données.

Les approches de co-immunoprécipitation de partenaires peuvent également être mises en œuvre et sont souvent associées à une caractérisation par spectrométrie de masse des partenaires cellulaires de la protéine immunoprécipitée.

II. Recherche des partenaires de la protéine p25

L'équipe du Prof. Mark Varrelmann (Göttingen) a réalisé le criblage double hybride d'une banque d'ADNc de betteraves résistantes *Rz2* infectées et a identifié 27 candidats interagissant avec la protéine p25 (**tableau II.1**) (Thiel and Varrelmann, 2009).

Si une partie de ces interactions a été confirmée par la méthode de Bimolecular fluorescence complémentation (BIFC), l'interaction entre la protéine p25 et le candidat n°1 n'a pas pu être validée en raison de l'induction rapide de nécroses suite à l'agroinfiltration des feuilles de *N. benthamiana*. Le candidat n°1 présente une forte similarité de séquence avec une protéine à F-box d'*A. thaliana*. Il faut noter que deux autres protéines impliquées dans le processus d'ubiquitination ont été également isolées lors de ce criblage (candidats 12 et 24c, **tableau II.1**). En collaboration avec l'équipe de Prof. Varrelmann, nous avons d'abord confirmé l'interaction entre p25 et un membre potentiel de SCF, puis recherché ses possibles conséquences dans la plante.

Tableau II.1 : Liste des partenaires potentiels de la protéine p25 identifiés par criblage double hybride d'une banque d'ADNc de betterave sucrière *Rz2* [Adapté de (Thiel and Varrelmann, 2009)]. Cat, représente la catégorie fonctionnelle de la protéine identifiée a) Système ubiquitine/protéasome ; b) Réponse aux stress et pathogènes, signalisation phytohormone ; c) Structure cellulaire, cycle cellulaire, trafic cellulaire; d) Traduction et modification de protéine ; e) Métabolisme ; f) Régulateur d'expression de gène; g) non déterminé.

No.	cDNA (bp)	Accession no.	Fonction (organisme)	e-value	Cat
1	1,149	NM_126342.3	Kelch repeat-containing F-box family protein (<i>A. thaliana</i>)	1e⁻⁸⁵	a
2	533	NM_100310.5	Thioesterase family protein (<i>A. thaliana</i>)	2e ⁻⁵²	d
3	535	AY589695.1	Putative universal stress protein family protein/ethylene responsive (<i>Mirabilis jalapa</i>)	1e ⁻⁴⁹	b
4	535	NM_115492.3	40S ribosomal protein S26 (<i>A. thaliana</i>)	1e ⁻⁴¹	d
5	260	NM_180927.3	Protein (serine/threonine) phosphatase 7 (PP7) (<i>A. thaliana</i>)	1e ⁻¹⁰¹	d
6	404	AY906938.1	Actin (<i>Carica papaya</i>)	2e ⁻⁶⁹	e
7	311	NM_103837.1	Leucine rich repeat family protein/extensin family protein (<i>A. thaliana</i>)	5e ⁻¹⁹	b
8	429	DQ335796.1	Cytochrome P450 Monooxygenase (<i>Medicago truncatula</i>)	5e ⁻⁰⁸	e
9a	442	AJ507317.1	Potyviral helper component protease-interacting protein 2 (hip2 gene) (<i>Solanum tuberosum</i>)	3e ⁻²²	c
9a		NM_118840.4	TOR1 (TORTIFOLIA 1) (<i>A. thaliana</i>)	1e ⁻¹³	c
10	453	NM_112733.2	CCAAT displacement protein-related/ CDP-related (ATCASP) (<i>A. thaliana</i>)	3e ⁻⁸⁷	c
11	571	U15657.1	Jasmonate-induced protein (<i>Atriplex canescens</i>)	1e ⁻⁰⁴	b
12	508	NM_102054.3	Kelch repeat-containing F-box family protein (<i>A. thaliana</i>)	5e ⁻³⁶	a
13	349	NM_115171.3	Low expression of osmotically responsive genes 1 (LOS4) (<i>A. thaliana</i>)	2e ⁻²⁵	d
14	477	NM_101941.2	RNA recognition motif (RRM)-containing protein (<i>A. thaliana</i>)	3e ⁻³⁰	-
15	560	NM_001111723.1	SET domain-containing protein SET104 (<i>Zea mays</i>)	4e ⁻⁶¹	f
16	564	U89609.1	Fiber annexin (<i>Gossypium hirsutum</i>)	3e ⁻⁹⁴	c
17	307	NM_113308.5	Hydroxyethylthiazole kinase (<i>A. thaliana</i>)	1e ⁻¹⁹	g
18	335	AB040471.1	Bzip transcriptional activator	3e ⁻¹⁸	f

			RSG (Repression of shoot growth) (<i>Nicotiana tabacum</i>)		
19	454	NM_102305.1	Zinc finger protein 7 (ZFP7) (C2H2 type) (<i>A. thaliana</i>)	$4e^{-16}$	f
20	388	AY191304.1	Ethylene responsive element binding protein (<i>Sesuvium portulacastrum</i>)	$2e^{-38}$	b
21	578	NM_113083.4	Cyclin-dependent protein kinase (CYCP2.1) (<i>A. thaliana</i>)	$2e^{-53}$	c
22	698	NM_129754.3	Zinc finger (CCCH-type) family protein (<i>A. thaliana</i>)	$4e^{-05}$	f
23	589	NM_127633.3	Lumazine-binding protein (<i>A. thaliana</i>)	$2e^{-22}$	e
24a	751	EF091878.1	ACRE 276-like protein (<i>Solanum tuberosum</i>)	$1e^{-120}$	a
24b	-	AY220483.1	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 276 (ACRE276) (<i>N. tabacum</i>)	$3e^{-109}$	a
24c	-	NM_102674.3	PUB17 (PLANT U-BOX17); ubiquitin-protein ligase (PUB17) (<i>A. thaliana</i>)	$5e^{-74}$	a
25	751	AF123508.1	Nt-iaa28 deduced protein (<i>N. tabacum</i>)	$3e^{-17}$	b
26	431	DQ200399.1	Triosephosphate isomerase (<i>S. tuberosum</i>)	$4e^{-106}$	e
27	417	AK230200.1	Clathrin binding protein (<i>A. thaliana</i>)	$5e^{-08}$	c

III. Résultats

La première partie des résultats est présentée sous forme de publication qui sera resoumise prochainement après sa modification. L'article se focalise sur l'interaction entre la protéine p25 (de différents isolats) et la protéine F-box à motif Kelch. Des analyses complémentaires demandées par les relecteurs sont présentées dans la seconde partie de ce chapitre et seront incluses dans une nouvelle version de l'article.

1. Interaction entre la protéine p25 et une protéine F-box à deux motifs Kelch

- i. **Article: Identification of a sugar beet F-box protein involved in the induction of a hypersensitive resistance response physically interacting with the beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor**

Résumé de la publication

L'interaction entre la protéine p25 et la protéine F-box a tout d'abord été confirmée et quantifiée dans le système double hybride de levure (GAL4) puis à l'aide d'une approche

pull down en utilisant la protéine GST-F-box produite dans *E. coli*, et la protéine p25 produite soit dans *E. coli*, soit en cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant. Nous avons également confirmé que la protéine candidate est effectivement une protéine à F-box car elle est capable d'interagir avec les deux protéines SKP1-like d'*Arabidopsis* (ASK1 et ASK2). Les protéines ASK font partie des complexes SCF (Skip, Cullin, F-box) impliqués dans la voie d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome 26S.

Les mesures d'activités de β -galactosidase (β -gal) dans les levures diploïdes ont révélé une très forte interaction entre la protéine p25 et la protéine F-box de betterave qui apparaît deux fois plus élevée que celle du contrôle positif constitué de l'antigène T de SV40 et la protéine p53 murine. Nous avons pu observer que la protéine F-box-kelch interagissait plus fortement avec ASK1 que ASK2. Nous avons également recherché si des protéines p25 provenant d'isolat contournant les résistances pouvaient influencer l'interaction avec la protéine de betterave ou si les protéines F-box-Kelch issues de betterave sensible et résistante Rz1 étaient toujours capables d'interagir avec p25. En d'autres termes, nous avons cherché si la protéine F-box candidate pouvait être directement liée ou non à un mécanisme de résistance contre le BNYVV. Nos résultats nous ont permis de conclure que l'interaction entre p25 et F-box était indépendante de l'origine de p25 et de la sensibilité à la résistance de la betterave au BNYVV. Cependant, les interactions observées ont toutes nécessité l'intégrité des séquences p25 et F-box. Nous n'avons donc pas pu cartographier les domaines nécessaires à l'interaction entre ces deux protéines.

Les trois protéines F-box-Kelch induisent une réaction de nécrose sur feuilles de *N. benthamiana* accompagnée de l'accumulation des transcrits codant pour les PR proteins. Nous avons donc associé cette nécrose à une réaction hypersensible. Là encore, l'expression des domaines séparément, N terminal (F-box) ou C terminal (Kelch) n'a pas induit de nécrose, démontrant ainsi l'importance du maintien d'intégrité de la protéine.

Les résultats obtenus suggèrent que l'interaction entre ces deux protéines pourrait avoir un rôle dans la pathogénicité du BNYVV et dans la suppression de la résistance.

Identification of a sugar beet F-box protein involved in the induction of a hypersensitive resistance response physically interacting with the beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor

Heike Thiel^{1*}, Kamal Hleibieh^{2*}, David Gilmer² and Mark Varrelmann³

¹Department of Crop Sciences, Section Plant Virology, University of Göttingen, Grisebachstrasse 6, D-37077 Göttingen, Germany

²Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, laboratoire propre du CNRS (UPR 2357) conventionné avec l'Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

³Institute of Sugar Beet Research, Department of Phytopathology, Holtenser Landstrasse 77, D-37079 Göttingen, Germany,

* Both authors contributed equally to this paper.

Author for correspondence: Mark Varrelmann, e-mail: varrelmann@ifz-goettingen.de, tel: +49 551 5056270, fax: +49 551 5056299

Word Count: All manuscript parts except the References and Summary: ?, Summary: 247, Introduction: 758, Methods: 1468, Results: ?, Discussion: 1173, Legends: ?, Number of tables and figures combined: 6

Running title: BNYVV sugar beet interaction

Key words: Benyvirus, avirulence gene, virus resistance, hypersensitive resistance, rhizomania, *Beta vulgaris*

SUMMARY

A sugar beet gene product with high homology to an Arabidopsis F-box protein of unknown function was previously selected in a LexA yeast two-hybrid (YTH) *Rz2* cDNA-library screen which physically interacts with the beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) RNA3-encoded P25 pathogenicity factor. By demonstrating the YTH-interaction with *Arabidopsis thaliana* SKP1 orthologs, the F-box identity was proven

here. The F-box BNYVV-P25 interaction could be confirmed in two additional independent assays with both GAL4-YTH system and in an *in vitro* pull-down assay. As full-length F-box clones issued from two BNYVV resistant (*Rz1* and *Rz2*) and one susceptible sugar beet line still interacted with P25, a resistance independent P25-F-box interaction is suggested. This is supported by the finding that a P25 mutation involved in increased viral aggressiveness at amino acid 67-70 tetrad composition did not interfere with the F-box interaction. Remarkably F-box transient agrobacterium mediated expression in *Nicotiana benthamiana* leaves induced necrosis and increased transcript levels of pathogenesis-related proteins. This indicated the involvement of this sugar beet F-box protein in a stress or hypersensitive response to pathogens. The full-length F-box protein consists of one F-box domain followed by two kelch motifs. These two domains were tested separately for P25 interaction and necrosis induction. Neither interaction with P25 nor cell-death was induced by F-box or kelch domain, pinpointing the entire F-box protein to be necessary for P25 interaction and cell-death induction. The observed P25-F-box interaction suggests an involvement in the BNYVV pathogenicity or suppression of resistance response in sugar beet.

INTRODUCTION

BNYVV (genus *Benyvirus*) is transmitted by the soil-borne plasmodiophoromycete *Polymyxa betae* (Keskin, 1964). Typical rhizomania symptoms occur only in the presence of RNA3 encoded P25 (Koenig *et al.*, 1991; Tamada *et al.*, 1999). P25 and its composition, is associated with the resistance response and formation of necrotic lesions in mechanical inoculated leaves of *Beta vulgaris* and *B. maritima* (Koenig *et al.*, 1991; Tamada, 2007; Chiba *et al.*, 2008). Chiba and co-workers (2008) suggested P25 to function as an avirulence (Avr) gene product in resistant and pathogenicity factor in susceptible genotypes.

Due to the severe disease symptoms generated by BNYVV, high yielding sugar beet production is only reliable by growth of resistant cultivars. Therefore genetic resistance is the approach of choice for the control of the disease and is based on major dominant resistance genes *Rz1-Rz4* (Whitney, 1989; Scholten *et al.*, 1999; Scholten & Lange, 2000; Biancardi *et al.*, 2002; Grimmer *et al.*, 2007). *Rz*-carrying plants do not possess resistance

to infection but display reduced virus titers and restricted systemic virus spread (Scholten *et al.*, 1994; Tamada *et al.*, 1996; Heijbroek *et al.*, 1999, Luterbacher *et al.*, 2005).

The P25 avirulence gene - pathogenicity factor hypothesis is supported by the coincidence of the occurrence of *Rz1* overcoming BNYVV isolates from several locations in the USA and Europe (Liu *et al.*, 2005; Liu & Lewellen 2007; Pferdmenges *et al.*, 2008) with P25 proteins harbouring specific mutations in the amino acid hypervariable tetrad 67-70 (Schirmer *et al.*, 2005). In a previous YTH screen of an *Rz2*-resistant sugar beet cDNA library with P25, representing an incompatible host virus interaction, we identified several candidates and confirmed some yeast interactions using *in planta* bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC) (Thiel & Varrelmann, 2009). One cDNA encoded candidate displayed significant homology to *Arabidopsis thaliana* kelch repeat containing F-box family protein. Interestingly agrobacterium mediated transient expression of this F-box candidate in BiFC assay induced an early and rapid leaf tissue necrosis in *N. benthamiana* 24 hours post infiltration (hpi). F-box proteins are involved in the ubiquitin-proteasome-system (UPS) as part of the E3 ligase. The E3 ligase is necessary to recruit the specific target protein recognised for destruction to the 26S proteasome. The SCF complex is characterised as a crucial type of ubiquitin E3 ligase and consists of four major components SKP1, Cull1, Rbx1 and an F-box protein (Cardozo & Pagano, 2004; Ho *et al.*, 2006; Lechner *et al.*, 2006). F-box proteins display a common architecture sequence motif which was initially described by Bai *et al.* (1996). The F-box candidate with homology to *A. thaliana* F-box (Acc. no. NM_126342.3) identified in our study, contains two C-terminal kelch repeats. F-box proteins connect the ubiquitylation machinery to many cellular processes by regulating the stability of substrate proteins like transcription factors involved in e.g. phytohormone signaling, light signaling and lateral root formation (Gagne *et al.*, 2002,; Kuroda *et al.*, 2002). In addition to developmental processes, F-box proteins as part of the E3 ligase complex SCF have been described to be involved in the plants resistance response to infection with pathogens. Several studies describe the involvement of the SCF-complex in plant defense mechanisms induced by a hypersensitive response (HR) or involved in systemic acquired resistance (SAR). In *Arabidopsis* SON1 represents an F-box protein involved in targeting SAR regulators to protein degradation (Kim & Delaney, 2002) and COI1 is required for jasmonate-regulated defense (Xie *et al.*, 1998). In tobacco, the F-box protein ACRE189 is necessary for the plant hypersensitive response to *Cladosporium fulvum* Avr9 (van den Burg *et al.*, 2008) and SGT1 as part of

the SCF-complex is required for N-gene mediated resistance against tobacco mosaic virus (Liu *et al.*, 2002). Our observation that transient overexpression of P25 interacting sugar beet F-box candidate induced necrosis in *N. benthamiana* leaf tissue raised the hypothesis that the candidate might be either involved in the sugar beet resistance against BNYVV or alternatively, represents a target of P25 necessary for viral pathogenicity. The targets of the F-box candidate homologue from Arabidopsis and tobacco have not been identified yet and prediction of putative function remained impossible due to the wide involvement of F-box proteins in different cellular processes.

In this study, different *in vivo* and *in vitro* interaction assays were used to confirm the interaction. In addition, plant SCF components were applied to find evidence for the F-box identity of the candidate and transcriptional activation of pathogenesis related proteins (PR-proteins), to support the HR hypothesis, were tested. Finally full-length homologues from rhizomania susceptible and resistant homozygous sugar beet genotypes were isolated and applied for P25 interaction analysis.

METHODS

Construction of F-box and P25 yeast expression vectors. All cloning procedures and manipulations were performed following standard techniques according to Sambrook *et al.* (1989) and applied modifications were otherwise specified. The yeast vector pJG4-5 (MoBiTec) carrying the partial F-box-cDNA-*Rz2* encoding sequence inserted via *EcoRI*-*XhoI* (pJG4-5-F-box-cDNA) was obtained from a P25-B YTH screen of a sugar beet (*Rz2*) cDNA library (Thiel & Varrelmann, 2009). Additionally a coding sequence of a P25 variant from an *Rz1* resistance breaking isolate (Imperial Valley, Salinas USA, kindly provided by Syngenta Seeds AB, Landskrona)) (Liu *et al.*, 2005) was PCR amplified and cloned into pEG202 as described (Thiel & Varrelmann, 2009). Similarly to P25-B (₆₇AYHR₇₀), P25-IV (₆₇VLHG₇₀) i) did not autoactivate transcription in yeast (Figure 2a) and ii) was able to interact with F-box-cDNA candidate at comparable strength (Figure 2b and c).

RT-PCR from total RNA of healthy sugar beet breeding lines (MS150 susceptible, MS298 *Rz1* resistant, kindly supplied by Syngenta Seeds AB, Lanskrona, Sweden and 8T_0015 *Rz2* resistant kindly supplied by KWS, Einbeck, Germany) with specific oligonucleotides (5'-ATGAATTCCTTGGAAGATCTTTCATTTGC-3' and

3'-ATCTCGAGTTAGCAGCCCATTATTGCAC-5' restriction sites introduced are underlined) led to amplification products that were further introduced into pJG4-5. Resulting plasmids were named pJG4-5-F-box-susc., -Rz1 and -Rz2, respectively. To confirm cDNA-library F-box candidate P25 interaction in GAL4 YTH, F-box-cDNA, F-box full-length and P25 coding sequence were subcloned into pGAD424, pGBKT7 or pGBT9 plasmids (Clontech) using *EcoRI* and *SalI*. pGBT and pGAD-P25 vectors were described previously (Klein *et al.*, 2007).

Construction of Rz2 derived F-box N- and C-terminal deletion mutants, expressing the 187 N-terminal F-box domain-spanning amino acids (aa) and C-terminal 255 aa including the two kelch motifs was carried out as follows. Both 5' 561nt and 3' 765nt fragments were amplified with the corresponding full-length primers (see above) together with specific oligonucleotides (5'-low: 3'-TATCTCGAGCTAAACCGCAAG TGACTCCTTATCC-5' and 3'-up: 5'-ATGAATTTCGGTACCGAACTTTTGGTC TTTG-3'). Both PCR fragments were cloned into pJG4-5, resulting in pJG4-5-F-box-ΔN and -ΔC respectively.

Construction of binary vectors for transient *in planta* F-box expression. All F-box full-length and F-box deletion mutant sequences described above were cloned under control of the CaMV 35S promoter (35S) and pA signal into a binary vector pBin modified for direct subcloning with *EcoRI* and *XhoI* for transient agroexpression in *N. benthamiana* leaf tissue resulting in pBin-F-box-cDNA, -susc., -Rz1, -Rz2, -ΔN and -ΔC.

Protein-protein interaction *in vitro* - GST pull-down assay. Histidine tagged BNYVV B-type P25 was cloned into plasmid pIVEX[®] 2.3 (In Vitro EXpression, Roche) and expressed by a rapid translation system (RTS100; Roche Molecular Biochemicals). Flag-P25 was produced in *Sf9* insect cells infected with recombinant Baculovirus. F-box candidate cDNA PCR amplified with specific primers 5'-AAAGGATCCATGGAAGTCGATTTC-3' and 5'-AAAGAATTCTCAGTCCAAGTC CGTC-3' (Restriction sites introduced are underlined) and the amplicon cloned into pGEX 2TK vector to obtain pGEX-F-box (Pharmacia Biotech) using *BamHI* and *EcoRI*. *E.coli* BL21-codon Plus (DE3)-RIL strain was used to express the GST fusion proteins (Stratagene). A fresh 5 ml overnight culture of *E.coli* BL21(DE3)RIL carrying pGEX-2TK or pGEX-F-box was added to 50 ml of LB-medium and the cultures were incubated and shaken for 1 h at 37 °C for pGEX-2TK and for 1 h at 25 °C for pGEX-F-box. Expression of GST or GST-F-box was induced by the addition of 0.2 mM final IPTG for 4 hrs. Cells were harvested by centrifugation at 5,000 g for 10 min at 4 °C and resuspended in 5 ml of

NET buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol). The cells were disrupted by French Press and the lysates mixed with 60 μ l of glutathione-Sepharose 4B beads, previously washed and resuspended in NET buffer, and were incubated overnight at 4 °C with gentle shaking. The beads were then washed three times by short centrifugation and resuspended in 60 μ l of NET buffer. 10 μ l was analysed in SDS-PAGE and judged by Coomassie staining. Beads and NET buffer (25 μ l) were mixed with 10 μ l of *in vitro* translation reaction mixture or flag-P25 protein and the volume completed to 400 μ l with BB buffer (50 mM Tris-HCL 7.5, 100 mM NaCl), Reaction was first incubated for 1 h at room temperature and then overnight at 4 °C with gentle shaking. The beads were then washed three times as described above but using BB buffer, resuspended in 40 μ l of dissociation buffer (Laemmli, 1970), boiled for 10 min and finally pelleted. Aliquots (20 μ l) of the supernatants were subjected to 12 % SDS-PAGE, and the proteins were immunodetected using specific P25, histidine or flag antibodies.

YTH interaction assay of sugar beet F-box candidate with *A. thaliana* ASK1 and ASK2. *A. thaliana* ASK2 (Acc. no. At5g42190) and ASK1 (Acc. no. At1g10940) were kindly provided by Dr. V. Ziegler-Graff (IBMP).

Sequence analysis. All inserts in clones were sequence verified using standard primers. Sequencing reactions were carried out by Eurofins MWG Operon, or by Malek Alioua (IBMP) using a BigDye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems) and specific primers with a Hitachi 3100 Genetic Analyzer Applied Biosystems.

Sequence alignments with ClustalW algorithms (Thompson *et al.*, 1994) and assembly of full-length F-box cDNA sequences were carried out using DNASTar Lasergene Software (GATC Biotech). *In silico* manipulations of plasmids and primer design were performed with VectorNTI software (Invitrogen). Identification of F-box functional domains was carried out using the “Simple Modular Architecture Research Tool” (SMART 5) (Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2004).

Yeast strains, media and YTH systems. Two different YTH systems were used in this study. The Grow'n'Glow YTH system (MoBiTec) is a modified version of the LexA/B42 YTH system (Fields & Song, 1989). It consists of pEG202 as bait and pJG4-5 as prey vector (Gyuris *et al.*, 1993) and an additional LexA-operator controlled GFP reporter plasmid pGNG1 (Cormack *et al.*, 1998). All yeast transformations, media preparations and mating procedures were carried out as described (Thiel & Varrelmann, 2009). Total area optical density analysis of GFP fluorescence was carried out by epifluorescence

microscopy of yeast cells carried out Gel-Pro analyser software 6.0 (Media Cybernetics) (Thiel & Varrelmann, 2009).

The GAL4 based YTH system (Clontech) consists of pGAD424 (Clontech) as bait and pGBT9/pGBKT7 as prey plasmids. The YTH procedures were performed by using the Matchmaker two-hybrid system based on the Yeast Protocol Handbook (BD Biosciences Clontech) and also as described (Haasen *et al.*, 1999; Link *et al.*, 2005; Szurek *et al.*, 2001, Klein *et al.* 2007). HF7c strain was transformed with GAL4-BD-p25 fusions (pGBT9, Clontech) and GAL4-BD-F-box full-length, GAL4-BD-ASK1 and -ASK2 (pGBKT7) whereas Y187 strain was transformed with bait plasmids (GAL4-AD-P25 or -F-box fusions). Mating was used to obtain diploids expressing both fusion proteins. Interactions were identified by the ability of diploids to grow on minimal medium depleted with tryptophan, leucine and histidine and in the presence of x- α gal or of 3-aminotriazole (AT) at 1, 5, 15 or 25 mM. The strength of the yeast interaction was quantified using β -galactosidase liquid culture assay with o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) as substrate (OD₄₂₀) and displayed as β -galactosidase units as described in Yeast Protocols Handbook of the Clontech protocol.

Immunodetection of LexA and haemagglutinin (HA) tagged proteins in yeast. Protein extraction from yeast cells and immunodetection procedure was carried out as described (Thiel & Varrelmann, 2009) with some modifications. The protein samples were separated by 12 % SDS-PAGE and electroblotted on nitrocellulose (Amersham) for LexA-detection or PVDF (Roche) membranes for HA-detection.

Plant material and plant growth conditions. *N. benthamiana* plants were cultivated in a glasshouse with day length of 14 h at 22 °C under continuous artificial light in a mixture of turf and sand (1:1).

Transient expression following agroinfiltration and particle bombardment of F-box candidates. Binary vectors were mobilized into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 (pGV2260) and cultures were prepared for agroinfiltration essentially as described (Voinnet *et al.*, 2003) with an OD₆₀₀ adjusted to 1.0. The DsRed coding sequence (Clontech) under control of 35S and pA (pe35-DsRed, original pDsRed-C1; Clontech) was applied for microprojectile co-bombardment with pBin-F-box-Rz2 and pBin on detached leaves of 4-5 weeks old *N. benthamiana* plants using a particle inflow gun (Gray *et al.*, 1994). At 3 dpi 5 leaves of each treatment were rated for single epidermal cells displaying DsRed expression using epifluorescence microscopy (Leica DMR) with a DsRed filter

(Emitter HQ 620/60, Beamsplitter Q 585 LP, and Exciter HQ 565/30). Dead cells were visualized by the autofluorescence they displayed using a GFP filter (Emitter D 510/40, Beamsplitter 425 DCLP and Exciter D 395/40). Photographs were taken using a Leica DFC camera, DFC300 FX.

Detection of pathogenesis related protein transcripts. Total RNA from *N. benthamiana* agroinfiltrated leaf tissue was prepared (RNeasy; Qiagen) and treated with DNase (RQ1; Promega). Primers specific for *N. tabacum PR-1a* (D90196), *PR-1b* (X05453) and *PR-1c* (X05454) (Pfitzner & Goodman, 1987) were applied for RT-PCR amplification of the *N. benthamiana* orthologues. As internal control the constitutively expressed translation elongation factor gene *EF1 α* (AF120093) was used. Primers and PCR conditions were used according to (Zhang *et al.*, 2004).

RESULTS

Sequence analysis of BNYVV P25 interacting sugar beet encoded F-box protein and confirmation of LexA-YTH interaction with GAL4-YTH

The previously identified cDNA clone with 1149 bp in length was identified in a YTH screen of an *Rz2* resistant sugar beet cDNA library among others applying BNYVV P25 (Thiel & Varrelmann, 2009). The *Rz2* derived cDNA encoded F-box protein displayed typical conserved domains of F-box proteins (one F-box and two kelch repeats) and a stop-codon, however, its 5'-end sequence was not included in the cDNA clone. Sequence alignment between sugar beet EST sequence (genotype KWS2320 kindly provided by KWS, Einbeck Germany) and the identified sugar beet cDNA-F-box sequence identified the missing 5'-end of the sequence required to complete the F-box open reading frame (data not shown). The translated full-length protein sequence was 34 N-terminal amino acids longer than the cDNA encoded F-box candidate.

In order to strengthen the significance of the interaction detected in yeast applying LexA-binding domain (-BD) and activation domain (-AD) mediated transcriptional activation of reporter gene expression, GAL4-YTH interaction assay was additionally performed (Figure 1a). The oligomerisation of P25 was retrieved in the presence of up to 5 mM of the competitive inhibitor (3-aminotriazole; AT) that prevents self-activation of the reporter gene (Figure 1a). In this test, the interaction between p25 and F-box was detected whatever the combination up to 5 (when F-box full-length fused to BD) and up to 25 mM of AT (when cDNA-F-box fused to AD) (Figure 1a). The quantification of

β -galactosidase (β -gal) activity for estimating the strength of the P25-F-box interaction resulted in a mean of 16 β -gal Miller units significantly two times higher than the P53-LTA control (Figure 1b). The oligomerization of the P25 protein that did not give significant activation of the β -gal reporter gene can be explained by the growth of yeasts in interaction non-selective conditions.

Interaction of BNYVV P25 with sugar beet F-box protein is independent of the P25 amino acid tetrad 67-70 composition

We wanted to investigate if P25-F-box interactions are dependent on the P25 hypervariable sequence, which was shown to influence viral aggressiveness, resistance breaking abilities and oligomerization (Liu *et al.*, 2005; Pferdmenges *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2007). Similarly to P25-B (₆₇AYHR₇₀), P25-IV (₆₇VLHG₇₀) i) did not autoactivate transcription in yeast (Figure 2a) and ii) was able to interact with F-box-cDNA candidate at comparable strength (Figure 2b and c).

Sugar beet cDNA encoded F-box candidate interacts with BNYVV P25 *in vitro*

In order to definitely confirm the F-box P25 interaction, we performed an *in vitro* pull-down assay using GST-tagged F-box expressed in *E. coli* (Vetter *et al.*, 2004). The analyses were conducted and the P25 was similarly immunodetected by the use of either anti-P25, anti-histidine antibodies (data not shown) or Flag antibody only on GST-Imp- α and GST-F-box fusion proteins (Figure 3) confirming that F-box protein was indeed a partner of the P25 protein.

The F-box candidate interacts with *A. thaliana* SKP1-related protein (ASK1) and ASK2 in yeast

If the candidate identified would represent an F-box protein, it should physically interact with plant subunits of the SCF complex as shown in different studies applying several F-box proteins (Risseuw *et al.*, 2003). *A. thaliana* ASK1 (At1g10940) and ASK2 (At5g42190) fused to GAL4-BD in pGBTKT7-ASK1 and -ASK2 vectors respectively (Pazhouhandeh *et al.*, 2006) were used for YTH interaction study with the F-box candidate (pGAD-F-box) (Figure 1a). The absence of transcriptional autoactivation was observed for BD-ASK1 and -ASK2 fusion proteins (Figure 1a, left). These two components of the SCF complex were not able to interact with P25 (Figure 1a) but with the F-box even in the presence of 15 mM AT (Figure 1a). The interaction assay, however, revealed a lower strength interaction as compared to the F-box-P25 assay (Figure 1b).

P25 interacts with sugar beet full-length F-box from *Rz1*, *Rz2* resistant and susceptible sugar beet breeding lines

The questions remained, if BNYVV encoded P25 interacts as well with the F-box proteins from *Rz1* and susceptible sugar beet genotype.

The F-box open reading frame displayed a length of 1257 bp for all three genotypes. Sequence comparison of the three full-length clones on amino acid level resulted in the detection of a total of eight exchanges, three aa-exchanges between susceptible and *Rz1*, three aa-exchanges between *Rz1* and *Rz2* and two aa-exchanges between *Rz2* and susceptible (data not shown).

LexA-YTH interaction studies of P25 (pEG202-P25) with F-box-cDNA clone (pJG4-5-F-box) were repeated and carried out with all three full-length clones. Yeast expression (Figure 4a) as well as physical interaction was confirmed in all three cases (Figure 2b). Remarkably but unexplained, the expression level of all full-length F-box proteins was much lower than those displayed by the cDNA encoded incomplete variant. The strength of the P25-F-box interaction was determined indirectly by quantification of the Leu-driven GFP expression relative to a negative (pEG202-P25, pJG4-5) and in comparison to the P53-LTA positive control (pEG202-P53, pJG4-5-LTA) (Li & Fields, 1993; Iwabuchi *et al.*, 1993). As shown in Figure 2c, no significant differences in interaction strength were detectable between the different alleles.

P25 interacting F-box protein from resistant and susceptible genotypes induce necrosis in *N. benthamiana* leaves

Previously P25 open reading frame (ORF) and F-box cDNA were cloned into binary vectors for agrobacterium mediated BiFC. When they were used for transient expression in *N. benthamiana* leaf tissue to confirm the yeast interaction *in planta*, the F-box candidate induced necrosis (Thiel & Varrelmann, 2009). Due to the speed by which it occurred, the necrosis resembled a hypersensitive resistance reaction.

To confirm that the F-box candidate alone and not the translational fluorescent marker-F-box fusion was responsible for the observed effect, F-box-cDNA candidate and all three F-box full-length sequences were cloned into pBin plant expression vector. Subsequent agroinfiltration exactly reproduced a necrotic reaction already starting to develop at 24 hpi in all F-box treatments but not when the empty vector was applied. Figure 5 shows *N. benthamiana* leaves at 3 dpi following treatment with pBin and pBin-F-box-*Rz2*. In order to verify if P25 interferes with the induction of necrosis, it was used for co-infiltration with

F-box-*Rz2*, resulting in no visible difference in time of occurrence and severity of the necrotic reaction in comparison to infiltration with F-box-*Rz2* alone (data not shown). The F-box agroinfiltration experiment was repeated with leaves of resistant and susceptible sugar beet genotypes, but tissue necrosis was not observed (data not shown). Although agroinfiltration with pBin did not induce the tissue necrosis, the possibility remained that the agroinfection process might have interfered with it. Transient expression via particle bombardment with co-expression of a fluorescent marker was chosen to exclude the possible agrobacterium effect. *N. benthamiana* leaves were used for bombardment with pBin-F-box-*Rz2* plus the gene for DsRed (PCR-amplified from pDsRed-C1, Clontech) under control of CaMV 35S and pA (pe35-DsRed) and pBin-F-box-*Rz2* alone. pe35-DsRed plus pBin were co-bombarded as positive control. At 3 dpi five leaves of each treatment were analysed under epifluorescence microscopy (FM). Bombardment with F-box alone resulted in detection of 67 single epidermal cells showing autofluorescence induced by necrosis indicative for cell death, while no DsRed fluorescence was detected. Co-bombardment of F-box plus DsRed resulted in 87 green and 7 red fluorescing cells. In contrast bombardment with DsRed alone led to 131 cells showing red and only 5 cells displaying green fluorescence, demonstrating that i) a high percentage of cells was hit with both plasmids and ii) transient DsRed expression was suppressed when F-box protein was co-expressed. These observations suggested that with or without agrobacteria, the transient expression of sugar beet F-box protein induced cell death in *N. benthamiana* leaf cells.

Transient F-box protein expression induces the accumulation of pathogenesis-related protein transcripts in *N. benthamiana* leaf tissue

To evidence for a relation of the necrosis rapidly produced by transient F-box expression with cell death induced by a hypersensitive response, we attempted to show the accumulation of PR protein transcripts. To address this issue, *N. benthamiana* leaf tissue was agroinfiltrated with pBin-F-box-*Rz2* and pBin. As no coding sequences from *N. benthamiana* related to PR-proteins are known, specific primers for *N. tabacum PR-1a*, *PR-1b* and *PR-1c* genes, known to be closely associated with the hypersensitive resistance response in tobacco, were applied.

At 24 and 36 hpi, total RNA was extracted and used for RT-PCR amplification of *PR-1a*, *PR-1b* and *PR-1c* transcripts with specific primers. Amplification of constitutively expressed translation elongation factor gene transcripts (EF1 α) with specific primers served as internal control (Figure 6). Strongly increased expression levels, relative to tissue

infiltrated with pBin, were observed for all three *PR-1a*, *PR-1b*, *PR-1c* transcripts at 24 as well as 36 hpi, suggesting a connection of sugar beet F-box protein with the induction of HR in *N. benthamiana*.

Full-length F-box protein is necessary for BNYVV P25 interaction as well as for cell-death induction in *N. benthamiana* leaf tissue

To find a first indication if P25 interferes with F-box substrate recognition or F-box SCF complex interaction, LexA-YTH studies were performed with N- and C-terminal parts of the *Rz2* full-length F-box protein containing the conserved F-box motifs and kelch repeats, respectively. The coding sequence for the N-terminal 187 and C-terminal 255 aa, respectively, were re-amplified with specific primers and cloned into LexA-BD vector (pJG4-5-F-box- Δ N and Δ C). However, in YTH analysis both deletion variants did not interact with P25 (Figure 2a and b), despite detectable yeast expression was observed (Figure 4).

Subsequently we wanted to figure out, if the cell-death induced by the full-length F-box protein can be ascribed to one of the two functional domains of the protein. Therefore, F-box-*Rz2*- Δ N and Δ C were transiently expressed from pBin vectors in *N. benthamiana* leaf tissue, but no cell death was observed for both treatments.

DISCUSSION

Several lines of evidence established during the last two decades have connected BNYVV RNA3 encoded P25 protein and its aa67-70 tetrad composition to virus pathogenicity in *Beta vulgaris* roots (Koenig, *et al.* 1991; 2009; Tamada, *et al.* 1999) and necrosis induction in leaves of *B. maritima* as well as *Tetragonia expansa* (Klein *et al.*, 2007; Tamada, 2007; Chiba, *et al.* 2008). In addition both transcriptomic (Schmidlin *et al.*, 2008) and proteomic (Larson *et al.*, 2008) studies applying BNYVV infected susceptible sugar beet tissue revealed induction of defence and oxidative stress related genes, fitting to the typical virus-induced root cell necrosis and phytohormone imbalance (Pollini & Giunchedi, 1989). Taken together the observations strongly suggest a hypersensitive resistance response against virus infection, unable to limit virus spread in susceptible genotypes. Even though, the underlying resistance mechanism mediated by *Rz* major genes has not been resolved yet and the identification of the *Rz*-gene product is currently missing.

With the work presented here, we have identified a YTH derived sugar beet cDNA clone displaying strong interaction with the BNYVV dominant pathogenicity factor P25 to be a

member of the F-box family. This protein is connected to the plant UPS as shown by interaction with Arabidopsis ASK1 as well as ASK2 and displays predicted F-box and kelch domains. With the confirmation of the yeast interaction by the GAL4-system plus the *in vitro* GST pull-down interaction, we were able to rule out any artificial nature of our observations.

The F-box P25 interaction was *Rz*- or resistance-independent and a P25-IV₆₇VLHG₇₀ tetrad mutation involved in *Rz1* resistance breaking (Liu *et al.*, 2005; Koenig *et al.*, 2009) was not interfering with it too. This indicated the sugar beet F-box protein to represent a target for P25 what might enable the virus to exert a pathogenic influence on the host. Remarkably, isolation of full-length sequences was performed from healthy non-infected sugar beet seedlings, suggesting a constitutive instead of pathogen inducible expression of this F-box protein.

In contrast the fortuitous finding of necrosis induction in *N. benthamiana* leaf tissue suggested an involvement of the protein in the induction of a hypersensitive resistance response. This was supported by the induced expression of PR-protein transcripts. As Tamada (2007) and Chiba *et al.* (2008) had observed necrotic lesions in leaves of BNYVV resistant *B. maritima* plants following rub-inoculation thus limiting BNYVV replication and spread, we expected to reproduce the necrosis via agrobacterium mediated overexpression in sugar beet leaf tissue in unnatural high concentrations but failed to do so. A possible explanation is the extraordinary high agrobacterium-mediated expression level in *N. benthamiana* leaf tissue compared to sugar beet, where *A. tumefaciens* transient expression of reporter genes like green fluorescent protein result only in very poor fluorescence (data not shown). The observation, that the separated domains of the F-box (N-terminal F-box and C-terminal kelch repeats) did not induce necrosis, are indicative for the targeting of a plant protein (e.g. a transcriptional factor) to the UPS, whose absence allows HR related genes to be expressed only when both domains are available in one protein. Co-expression of both F-box domain and the kelch repeats via transient agroinfection in two separate molecules as well did not lead to induction of necrosis supporting the idea that an unknown F-box target needs to be directed to the UPS to induce HR. Several studies have demonstrated that targets of F-box proteins can represent transcription regulators and their UPS mediated degradation induced gene expression (van den Burg *et al.*, 2008). As the C-terminal kelch-repeat target interaction domain structure is different from those F-box proteins with a known role in HR or SAR (COI1, SON1 and

ACRE189) and no significant sequence similarity was observed, functional homology cannot be deduced. Secondary YTH sugar beet cDNA library screens might be useful to identify cellular ubiquitylation targets of the F-box identified in this study to unravel the F-box function and prove its possible role as a central component of the HR response in sugar beet. It is widely accepted that the F-box C-terminal kelch-repeat domain is usually responsible for the target binding (Cardozo & Pagano, 2004), but a P25 interaction with this domain was not identified. This suggested that P25 targeting for UPS degradation cannot be expected although final evidence was not supplied. All these findings account for a resistance independent interaction and in addition a relation to resistance breaking could be ruled out. On the contrary, the findings support the F-box target hypothesis and suggest that P25 might interact with F-box to suppress a resistance reaction, which is *Rz*-independent. The finding, however, that P25 F-box transient overexpression in *N. benthamiana* leaves was not reducing or delaying the necrotic reaction is an argument against this, although conclusions are difficult to draw as *N. benthamiana* is a BNYVV host which displays only very mild symptoms and no necrosis or comparable resistance reaction. Sugar beet F-box sequence was passed to all three major sugar beet breeding companies (KWS SAAT AG, Einbeck, Germany; STRUBE-DIECKMANN GmbH & Co. KG, Söllingen, Germany and Syngenta Seeds AB, Landskrona, Sweden) and used for genomic mapping. The F-box gene was mapped to chromosome 5 (data not shown) and therefore can be excluded to represent an *Rz* major gene which has been mapped to chromosome 3 (Scholten *et al.*, 1999).

The findings of this study suggest that P25 interferes with the plants UPS at independent positions. Previous work on P25 functional characterization determined nuclear shuttling abilities (Vetter *et al.*, 2004) and the tendency to form oligomers as well as slight transcriptional activation. In addition the protein contains a Zinc-finger and acidic domain (Klein *et al.*, 2007). However SMART analysis of the P25 aa sequence did not result in prediction of domains which indicate a relation to the UPS and GAL4-YTH did not identify an interaction with SKP1. Several viruses developed mechanisms to target host proteins for degradation to the 26S proteasome to favour their multiplication. The silencing suppressor protein P0 of the Poloroviruses contains an F-box motif at the N-terminus (Pazhouhandeh *et al.*, 2006) and the authors demonstrated that P0 targets a component of the RNA silencing to the SCF-complex. In contrast, the movement protein (MP) of tobacco mosaic virus is degraded following ubiquitylation and Reichel & Beachy (2000) suggested

that the virus uses the process to control virus movement via limiting the damaging influence of the MP on the structure of the cortical endoplasmic reticulum. Remarkably, another potyviral silencing suppressor (HC-Pro) has revealed interactions with plant proteins similar to the P25 partners. Jin *et al.* (2007) detected potato virus Y (PVY) HC-Pro interactions with subunits of the Arabidopsis 20S proteasome. The ways by which plant virus proteins interfere with the UPS are quite diverse and although few studies exist which show at least some similarities, the final understanding how P25 exerts its function as pathogenicity factor is still missing. Future studies performing functional characterization of other candidates identified previously (Thiel & Varrelmann, 2009) will help to finally resolve the sugar beet antiviral resistance mechanism and understand the virus life cycle to develop sustainable control strategies against rhizomania.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research project has been carried out with the financial support of the Federal Ministry of Economics and Technology (BMWi), administered via the Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen e.V. (AiF) and the Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutschen Pflanzenzüchtung e.V. (GFP). K.H. was supported by a Franco-Syrian grant. The authors are grateful to Danielle Scheidecker for technical assistance.

REFERENCES

- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W. & Elledge, S. J. (1996).** SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**, 263-274.
- Biancardi, E., Lewellen, R. T., De Biaggi, M., Erichsen, A. W. & Stevanato, P. (2002).** The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* **127**, 383-397.
- Cardozo, T. & Pagano, M. (2004).** The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 739-751.
- Chiba, S., Miyanishi, M., Andika, I. B., Kondo, H. & Tamada, T. (2008).** Identification of amino acids of the beet necrotic yellow vein virus p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *J Gen Virol* **89**, 1314-1323.
- Cormack, R. S., Hahlbrock, K. & Somssich, I. E. (1998).** Isolation of putative plant transcriptional coactivators using a modified two-hybrid system incorporating a GFP reporter gene. *Plant J* **14**, 685-692.
- Fields, S. & Song, O. K. (1989).** A Novel Genetic System to Detect Protein Protein Interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Gagne, J. M., Downes, B. P., Shiu, S. H., Durski, A. M. & 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 U S A* **99**, 11519-11524.

- Gray, D. J., Hiebert, E., Lin, C. M., Compton, M. E., McColley, D. W., Harrison, R. J. & Gaba, V. P. (1994).** Simplified Construction and Performance of a Device for Particle Bombardment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **37**, 179-184.
- Grimmer, M., Trybush, S., Hanley, S., Francis, S., Karp, A. & Asher, M. (2007).** An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus. *Theor Appl Genet* **114**, 1151-1160.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. & Brent, R. (1993).** Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**, 791-803.
- Haasen, D., Kohler, C., Neuhaus, G. & Merkle, T. (1999).** Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **20**, 695-705.
- Heijbroek, W., Musters, P. M. S. & Schoone, A. H. L. (1999).** Variation in pathogenicity and multiplication of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars. *Eur J Plant Pathol* **105**, 397-405.
- Ho, M. S., Tsai, P. I. & Chien, C. T. (2006).** F-box proteins: the key to protein degradation. *J Biomed Sci* **13**, 181-191.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. & Fields, S. (1993).** Use of the 2-Hybrid System to Identify the Domain of P53 Involved in Oligomerization. *Oncogene* **8**, 1693-1696.
- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Jin, J., Li, D., Deng, C. & Wang, T. (2007).** HC-Pro protein of Potato virus Y can interact with three *Arabidopsis* 20S proteasome subunits in planta. *J Virol* **81**, 12881-12888.
- Keskin, B. (1964).** Polymyxa betae Nsp Ein Parasit in Den Wurzeln Von Beta Vulgaris Tournefort Besonders Während Der Jugendentwicklung Der Zuckerrübe. *Arch Mikrobiol* **49**, 348-374.
- Kim, H. S. & Delaney, T. P. (2002).** *Arabidopsis* SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell* **14**, 1469-1482.
- Klein, E., Link, D., Schirmer, A., Erhardt, M. & Gilmer, D. (2007).** Sequence Variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res* **126**, 53-61.
- Koenig, R., Jarausch, W., Li, Y., Commandeur, U., Burgermeister, W., Gehrke, M. & Luddecke, P. (1991).** Effect of Recombinant Beet Necrotic Yellow Vein Virus with Different Rna Compositions on Mechanically Inoculated Sugar-Beets. *J Gen Virol* **72**, 2243-2246.
- Koenig, R., Loss, S., Specht, J., Varrelmann, M., Lüddecke, P. & Deml G. (2009).** A single U/C nucleotide substitution changing alanine to valine in the beet necrotic yellow vein virus P25 protein promotes increased virus accumulation in roots of mechanically inoculated, partially resistant sugar beet seedlings. *J Gen Virol* **90**, 759-763.
- Kuroda, H., Takahashi, N., Shimada, H., Seki, M., Shinozaki, K. & Matsui, M. (2002).** Classification and expression analysis of *Arabidopsis* F-box-containing protein genes. *Plant Cell Physiol* **43**, 1073-1085.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larson, R. L., Wintermantel, W. M., Hill, A., Fortis, L. & Nunez, A. (2008).** Proteome changes in sugar beet in response to Beet necrotic yellow vein virus. *Physiol Mol Plant Pathol* **72**, 62-72.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T. & Genschik, P. (2006).** F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 631-638.
- Letunic, I., Copley, R. R., Schmidt, S., Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C. P. & Bork, P. (2004).** SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* **32**, D142-144.
- Li, B. & Fields, S. (1993).** Identification of Mutations in P53 That Affect Its Binding to Sv40 Large T-Antigen by Using the Yeast 2-Hybrid System. *FASEB J* **7**, 957-963.
- Link, D., Schmidlin, L., Schirmer, A., Klein, E., Erhardt, M., Geldreich, A., Lemaire, O. & Gilmer, D. (2005).** Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *J Gen Virol* **86**, 2115-2125.

- Liu, H. Y. & Lewellen, R. T. (2007).** Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States. *Plant Dis* **91**, 847-851.
- Liu, H. Y., Sears, J. L. & Lewellen, R. T. (2005).** Occurrence of resistance-breaking Beet necrotic yellow vein virus of sugar beet. *Plant Dis* **89**, 464-468.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X. W. & Dinesh-Kumar, S. P. (2002).** Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1483-1496.
- Luterbacher, M. C., Asher, M. J. C., Beyer, W., Mandolino, G., Scholten, O. E., Frese, L., Biancardi, E., Stevanato, P., Mechelke, W. & Slyvchenko, O. (2005).** Sources of resistance to diseases of sugar beet in related Beta germplasm: II. Soil-borne diseases. *Euphytica* **141**, 49-63.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K. E., Genschik, P. & 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**, 1994-1999.
- Pferdmenges, F., Korf, K. & Varrelmann, M. (2008).** Identification of rhizomania-infected soil in Europe able to overcome Rz1 resistance in sugar beet and comparison with other resistance-breaking soils from different geographic origins. *Eur J Plant Pathol* **124**, 31-43.
- Pfützner, U. M. & Goodman, H. M. (1987).** Isolation and characterization of cDNA clones encoding pathogenesis-related proteins from tobacco mosaic virus infected tobacco plants. *Nucleic Acids Res* **15**, 4449-4465.
- Pollini, C. P., & Giunchedi, L. (1989).** Comparative histopathology of sugar beets that are susceptible and partially resistant to rhizomania. *Phytopathol Mediterr* **28**, 16-21.
- Reichel, C. & Beachy, R. N. (2000).** Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J Virol* **74**, 3330-3337.
- Risseuw, E. P., Daskalchuk, T. E., Banks, T. W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D. E. & Crosby, W. L. (2003).** Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *Plant J* **34**, 753-767.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Schmidlin, L., de Bruyne, E., Weyens, G., Lefebvre, M. & Gilmer, D. (2008).** Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease. *Mol Plant Pathol* **9**, 741-51.
- Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., Bragard, C., Gilmer, D. & Lemaire, O. (2005).** Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J Gen Virol* **86**, 2897-2911.
- Scholten, O. E. & Lange, W. (2000).** Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. *Euphytica* **112**, 219-231.
- Scholten, O. E., Paul, H., Peters, D., Vanlent, J. W. M. & Goldbach, R. W. (1994).** In-Situ Localization of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (Bnyvv) in Rootlets of Susceptible and Resistant Beet Plants. *Arch Virol* **136**, 349-361.
- Scholten, O. E., De Bock, T. S. M., Klein-Lankhorst, R. M. & Lange, W. (1999).** Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus in Beta vulgaris conferred by a second gene for resistance. *Theor Appl Genet* **99**, 740-746.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C.P. (1998).** SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U. & Van den Ackerveken, G. (2001).** Eukaryotic features of the Xanthomonas type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* **26**, 523-534.
- Tamada, T. (2007).** Susceptibility and resistance of Beta vulgaris subsp. maritima to foliar rub-inoculation with Beet necrotic yellow vein virus. *J Gen. Plant Pathol* **73**, 76-80.
- Tamada, T., Kusume, T., Uchino, H., Kiguchi, T. & Saito, M. (1996).** Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. In: *Sherwood, J.L.; Rush, C.M. (Hrsg.). Proc. 3rd Symp. of the Int. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Dundee (UK)*, 49-52.

- Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T. & Saito, M. (1999).** RNA 3 deletion mutants of beet necrotic yellow vein virus do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* **89**, 1000-1006.
- Thiel, H. & Varrelmann, M.** Identification of beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor interacting sugar beet proteins which represent putative virus targets or components of plant resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 999-1010.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- van den Burg, H. A., Tsitsigiannis, D. I., Rowland, O., Lo, J., Rallapalli, G., Maclean, D., Takken, F. L. & Jones, J. D. (2008).** The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defense responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. *Plant Cell* **20**, 697-719.
- Vetter, G., Hily, J. M., Klein, E., Schmidlin, L., Haas, M., Merkle, T. & Gilmer, D. (2004).** Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol* **85**, 2459-2469.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. (2003).** An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**, 949-956.
- Whitney, E. D. (1989).** Identification, Distribution, and Testing for Resistance to Rhizomania in Beta-Maritima. *Plant Dis* **73**, 287-290.
- Xie, D., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M. & Turner, J. G. (1998).** *COII*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.
- Xue, F. Y. & Cooley, L. (1993).** Kelch Encodes a Component of Intercellular Bridges in *Drosophila* Egg Chambers. *Cell* **72**, 681-693.
- Zhang, Z.-G., Wang, Y.-C., Li, J., Ji, R., Shen, G., Wang, S.-C., Zhou, X. & Zheng, X.-B. (2004).** The role of SA in the hypersensitive response and systemic acquired resistance induced by elicitor PB90 from *Phytophthora boehmeriae*. *Physiol Mol Plant Pathol* **65**, 31-38.

FIGURE and LEGENDS

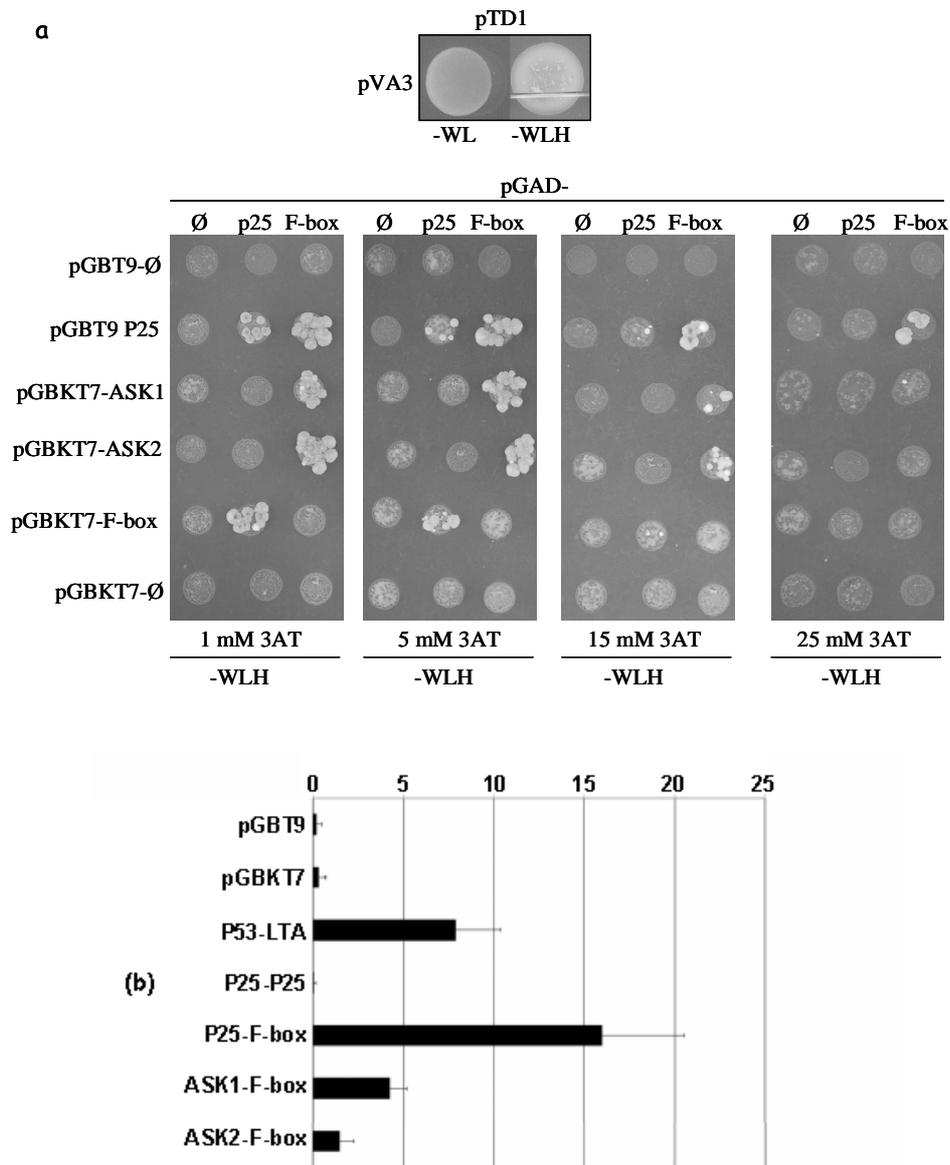
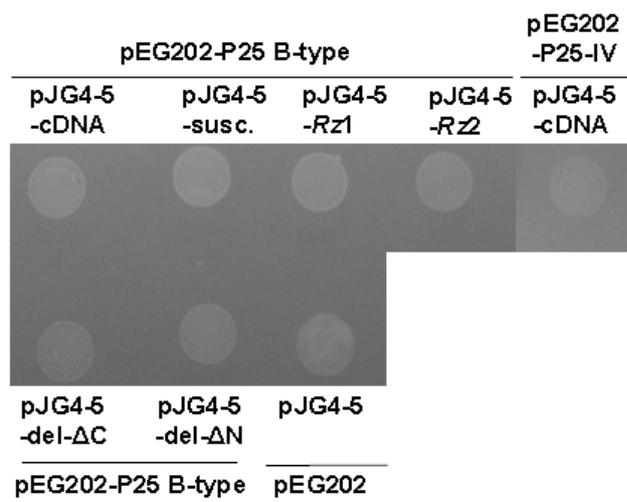
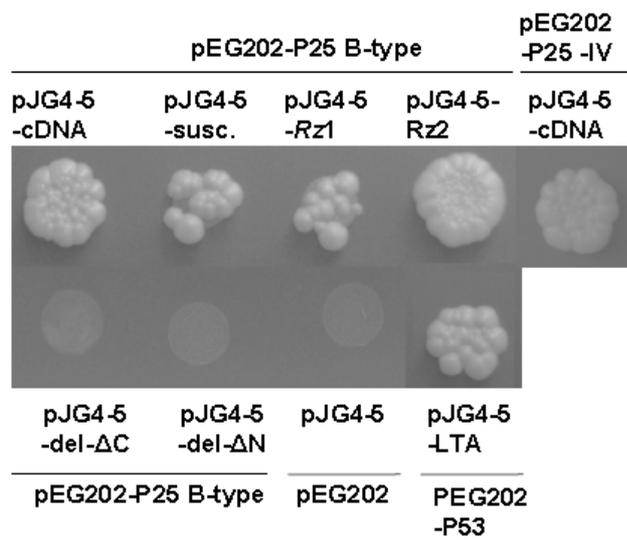


Figure 1. (a) GAL4-based yeast two-hybrid (YTH) interaction studies of beet necrotic yellow vein virus P25 (pGAD424- and pGBT9-P25), sugar beet F-box candidate (pGAD424-F-box-cDNA and pGBKT7-F-box-full-length) and *A. thaliana* ASK1 and ASK2 (pGBKT7-ASK1 and -ASK2). YTH interaction assay of the expression constructs of interest with empty vectors (pGBT9, pGBKT7 and pGAD424) to test for autoactivation. YTH was carried out in the presence of 1, 5, 15 and 25 mM 3-aminotriazole (3AT) to suppress background growth on selective media lacking amino acids tryptophane, leucine and histidine (-WLH). YTH interaction assay was controlled with P53 (pVA3) and LTA (pTD1) as positive control. (b) Quantification of β -galactosidase (β -gal) activity in Miller units of yeast diploids expressing the interaction partners grown under interaction-nonspecific conditions in liquid culture assay at 30 °C. Quantification of β -gal activity was also controlled with P53 (pVA3) and LTA (pTD1). Assays were performed in triplicate sets with 3 independent cultures for each strain.

(a)



(b)



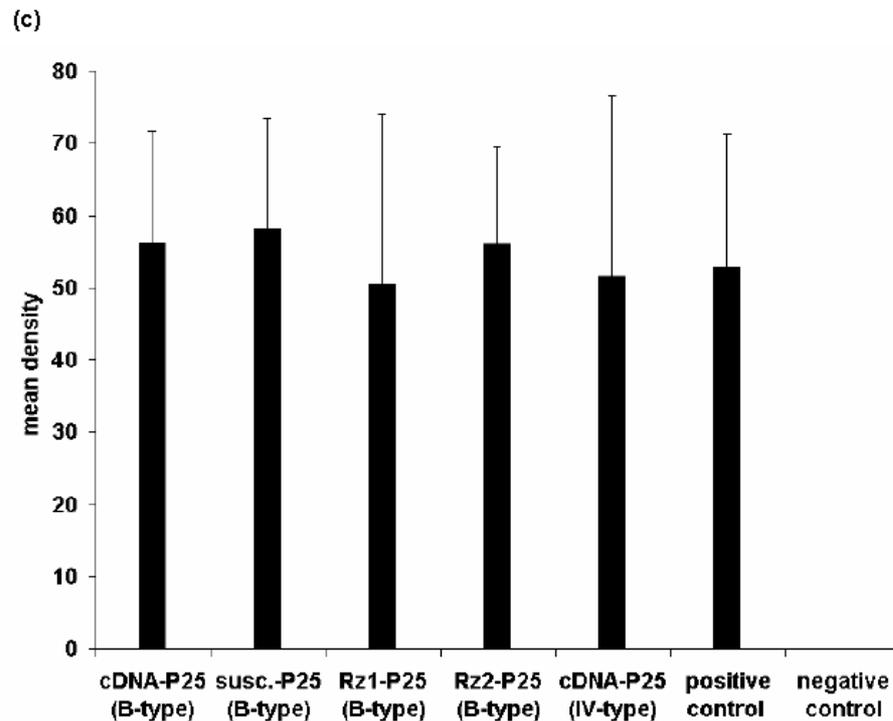


Figure 2. LexA-YTH interaction assay of BNYVV P25-B-type and Imperial Valley (-IV) origin with sugar beet F-box proteins (encoded by *Rz2*-cDNA, *Rz1*-, *Rz2*- and susceptible-full-length clones as well as *Rz2* N- and C-terminal deletion mutants). The bait and prey combinations, co-transformed into yeast, were selected on medium containing galactose and lacking -Leu, -Trp, -Ura and -His. (a) Test for transcriptional autoactivation of the -Leu reporter: pEG202 co-transformed with pJG4-5 expressing F-box variants (pJG4-5-cDNA, -susc., -*Rz1*, -*Rz2*, - Δ N, - Δ C and pJG4-5), (b) Specific interactions of P25 (pEG202-P25-B-type) with different F-box proteins (pJG4-5-cDNA, -susc., -*Rz1*, -*Rz2*, - Δ N, - Δ C), P25-IV (pEG202-P25-IV) interaction with pJG4-5-F-box-cDNA, empty vectors pJG4-5 with pEG202 and positive control SV40 LTA (pJG4-5-LTA) with P53 (pEG202-P53). (c) Relative quantification of Leu-driven GFP fluorescence in yeast cell matings expressing the same P25 and F-box variants as in (a) measured by displaying total area densities. Standard errors are displayed.

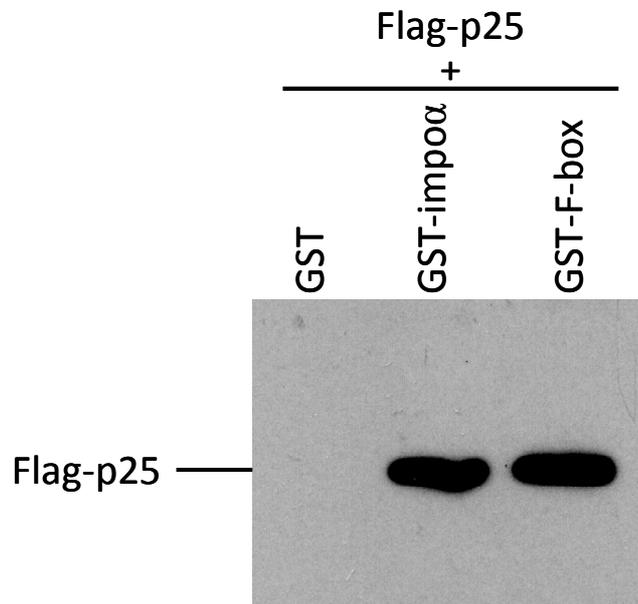


Figure 3. *In vitro* pull-down assays to confirm P25 interaction with F-box. Flag-P25 from Baculovirus-infected *Sf9* cells was incubated with GST alone, GST-importin α (Rice) and GST-F-box. GST pull-down of P25 was visualized by the detection of the viral protein using flag antibody after immunoblotting. Reactions performed with *in vitro* synthesized histidin-tagged P25 gave identical results (data not shown).

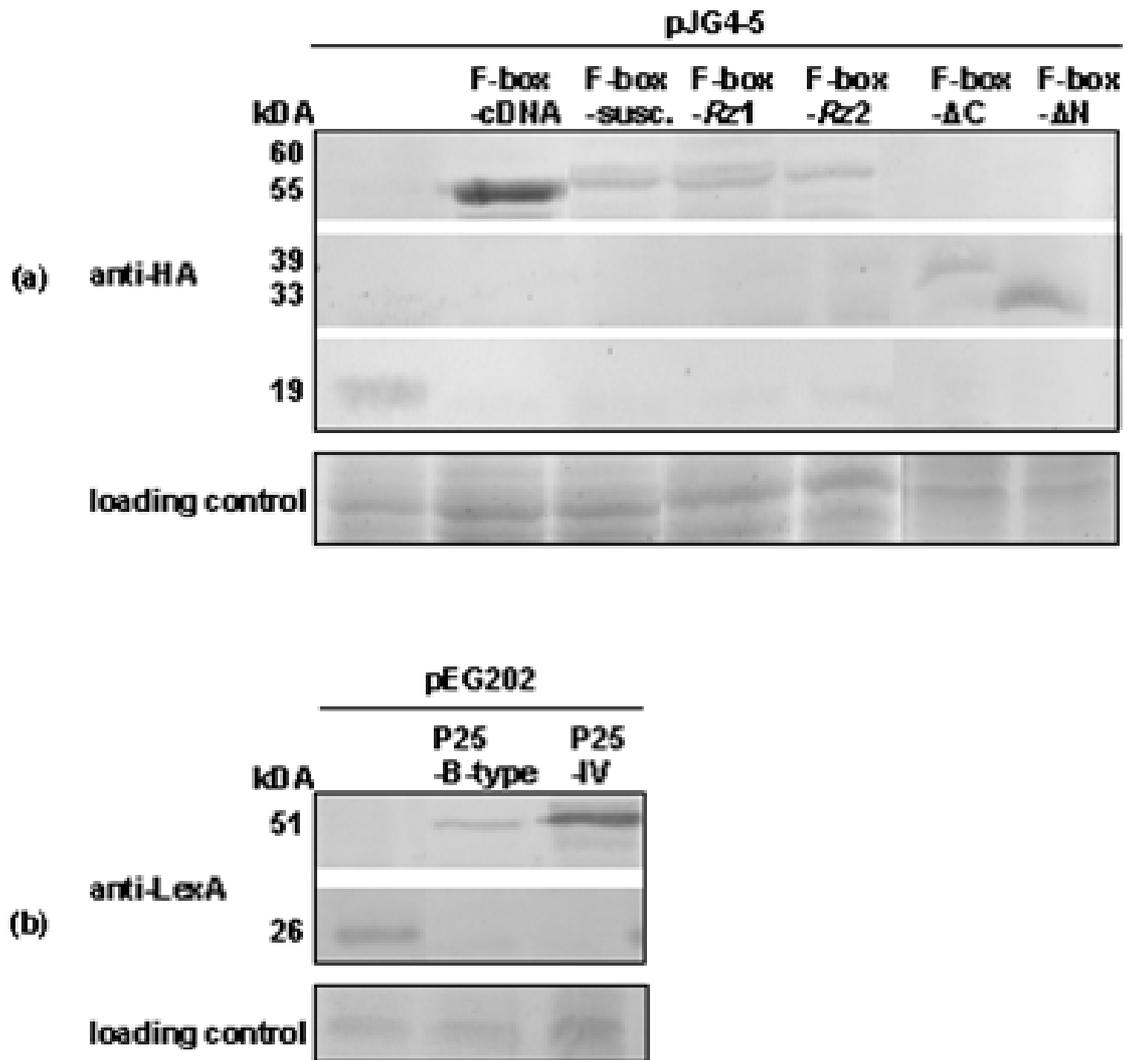


Figure 4. Immunodetection of LexA and haemagglutinin (HA) tagged proteins (anti-LexA and -HA). Equal PAGE loading was checked by staining. The molecular weights are declared in kilodalton (kDa) (a) HA immunodetection in yeast total protein extracts expressing pJG4-5-F-box-cDNA, -F-box-susc., -F-box-Rz1, -F-box-Rz2, -F-box-ΔN, -F-box-ΔC. pJG4-5 served as control. (b) LexA immunodetection in yeast total protein extracts expressing pEG202-P25-B-type, -P25-Imperial Valley (IV). pEG202 served as control.

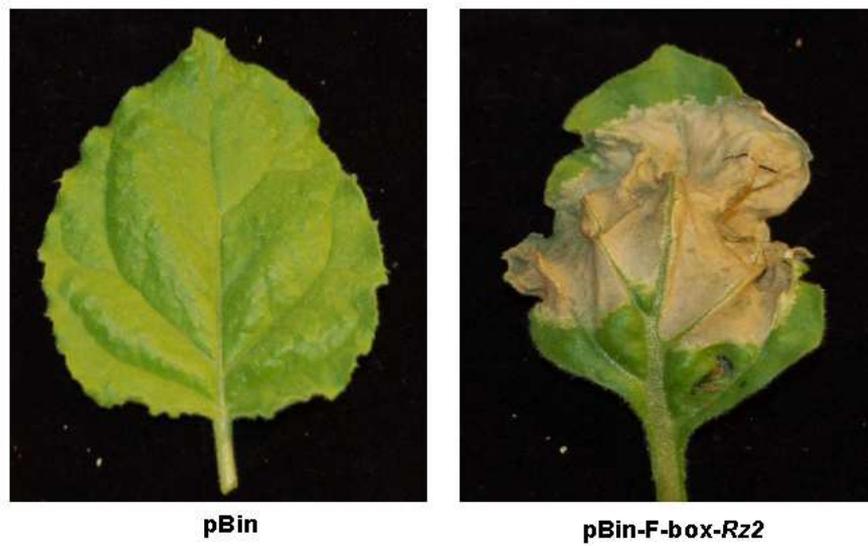


Figure 5. Host response of *N. benthamiana* leaf tissue following transient agrobacterium mediated expression of *Rz2* sugar beet F-box protein (pBin-F-box-*Rz2*) at 3 dpi. Agroinfiltration of an empty vector served as control (pBin-empty).

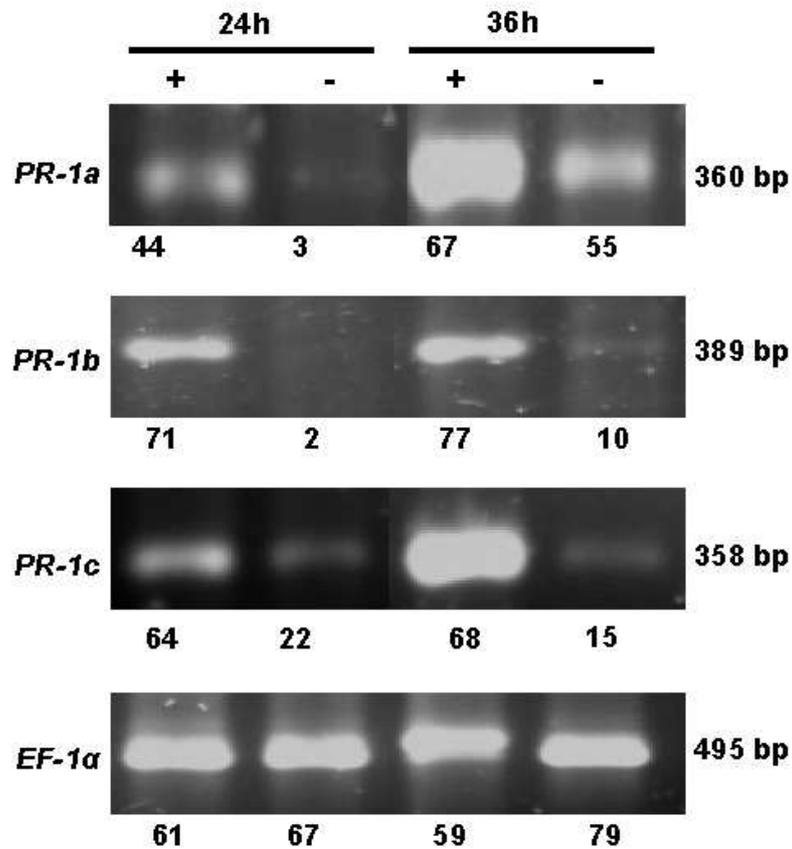


Figure 6. Induction of PR-protein gene (*PR-1a*, *PR-1b*, *PR-1c*) expression in *N. benthamiana* leaf tissue agroinfiltrated (+) with F-box-Rz2 (pBin-F-box-Rz2) and control infiltrated (-) with pBin vector was analysed by semi-quantitative RT-PCR after 24 and 36h. RT-PCR amplification of constitutively expressed EF1 α transcripts was applied as a quantitative standard. Results were independently reproduced two times. Numbers below the gels display total area densities of the different RT-PCR signals.

ii. Expériences complémentaires

Pour confirmer que la protéine candidate était effectivement une protéine à F-box intervenant dans un complexe SCF, j'ai effectué un test double hybride de levure en présence d'une protéine adaptatrice exprimée dans la levure par l'intermédiaire d'un vecteur bridge [pVT102, (Vernet *et al.*, 1987)]. L'expression concomitante de la protéine adaptatrice dans la levure permet de créer un facteur de transcription fonctionnel qui activera la synthèse du gène rapporteur (voir matériel et méthodes, **figure MM.3**). Il faut préciser que ce test, faussement appelé triple hybride, est utilisé pour démontrer l'interaction entre trois protéines [eg : (Pazhouhandeh *et al.*, 2006)]. Pour le mettre en œuvre, les levures AH109 transformées avec les trois plasmides sont sélectionnées sur milieu dépourvu de tryptophane (W), de leucine (L) et d'uracile (U) et leur croissance analysée sur milieu (SD-WLUH) dépourvu de ces trois acides aminés et d'histidine (H), supplémenté ou pas de 3-amino triazole, un compétiteur de l'histidine. La croissance de levures reflète l'activation de la transcription du gène rapporteur par un facteur de transcription chimérique reconstitué par deux ou trois protéines. J'ai mis en œuvre ce test et recherché l'existence d'un complexe fonctionnel entre F-box, Ask et Culine. Les résultats sont présentés dans la **figure II.2** et dans le **tableau II.2**. Toutes les levures transformées ont été capables de croître sur le milieu SD-WLU (non montré). Dans les conditions testées sur la **figure II.2**, seules les combinaisons F-box-Ask1/2-Culin et p25-Ask1/2-F-box sont capables de rendre les levures prototrophes vis à vis de l'histidine.

La combinaison p25-Ask1/2-F-box permet la croissance des levures. Ceci s'explique par l'interaction directe entre p25 et F-box qui ne semble pas être influencée par la présence de ASK1/2, tout comme les interactions ASK1/2 et F-box ne sont pas influencées par la présence de la protéine p25 (comparer les lignes 12 à 23 du **tableau II.3**). Dans le cas de la combinaison F-box-Ask1/2-Culin (**figure II.2** et **tableau II.2** lignes k et l), l'activation de la transcription des gènes rapporteur ne s'explique que par la formation d'un complexe ternaire entre Cull1•Ask•F-box. En effet, la protéine F-box est incapable d'interagir avec Cull1 (**tableau II.2**, lignes d et e) qui interagit avec ASK1/2 (**tableau II.2**, lignes f, g et i). La protéine F-box ne semble pas influencer l'interaction entre ASK1/2 et Cull1 (**tableau II.2**, lignes m, n et o). Par conséquent, nous avons conclu que le candidat protéine F-box-Kelch fait partie d'un complexe SCF. Nous avons recherché à quel niveau se situait

l'interaction F-box•p25 dans ce complexe, c'est à dire si la protéine p25 était une 'cible' ou un inhibiteur de la protéine F-box ou les deux.

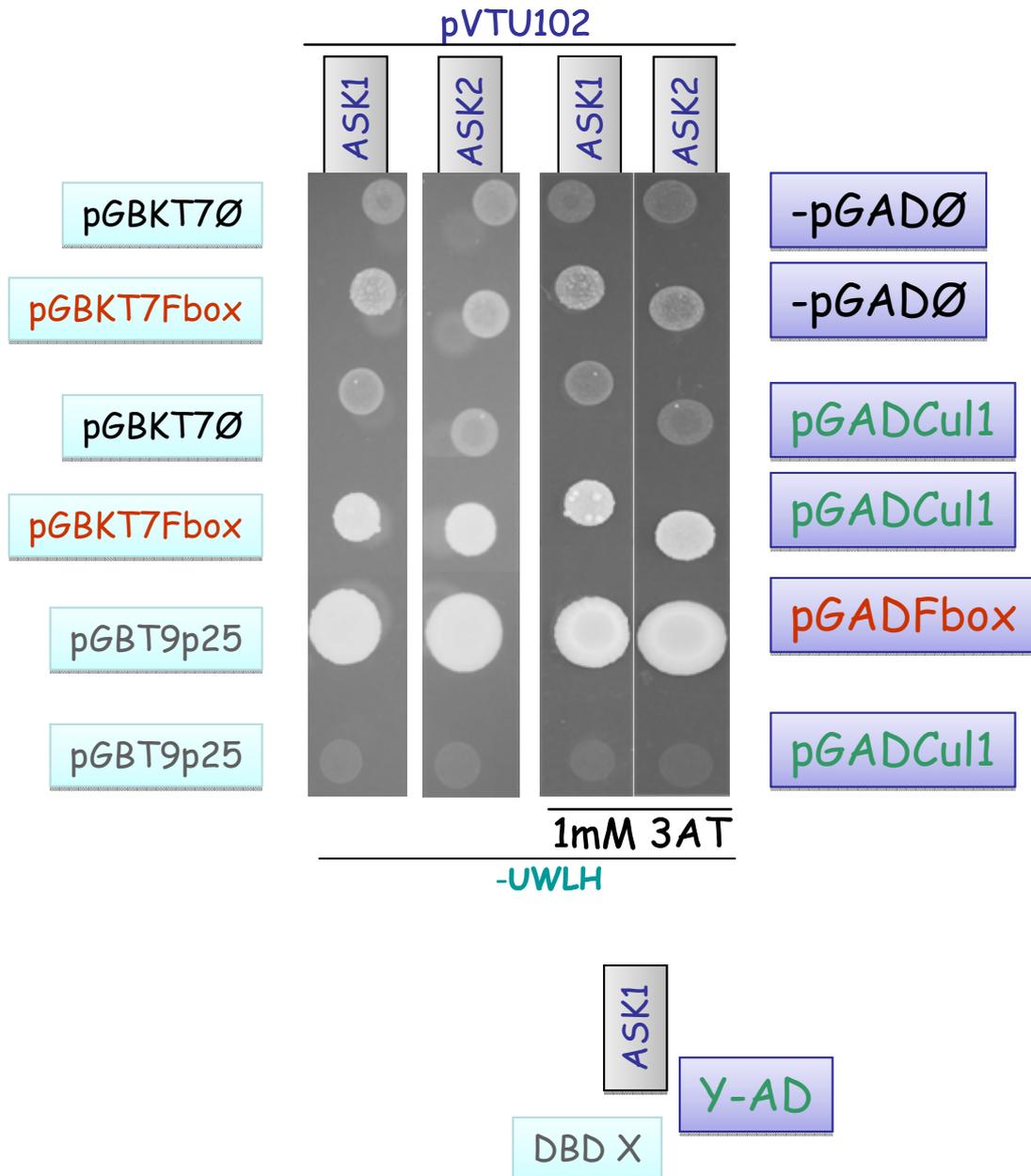


Figure II.2 : Test de double hybride de levure en présence d'une protéine adaptatrice (ASK1 ou ASK2) exprimée par l'intermédiaire d'un vecteur bridge (pVTU102). Les protéines fusionnées au domaine de fixation à l'ADN de GAL4 (BD) sont exprimées par le vecteur pGBT9/pGBKT7 ; les protéines fusionnées au domaine d'activation de la transcription de GAL4 (AD) sont exprimées par le vecteur pGAD. Les protéines ASK1 ou ASK2 sont produites par le vecteur pVTU102. CUL1 représente la protéine Culine1 ; F-box correspond au candidat n°1 F-box-Kelch. 3AT représente le compétiteur de l'histidine 3-amino triazole. -WLUH représente le milieu dépourvu de tryptophane (W), leucine (L), uracile (U) et histidine (H). Ø indique les vecteurs exprimant les domaines AD ou BD seuls. pGADCUL1 a été fourni par le laboratoire de M. P. Genschik.

Tableau II.2 : Test de double hybride de levure en présence d'une protéine adaptatrice, un composant du SCF. Ce test est réalisé dans la souche de levure AH109, la croissance de levures a été observée après quatre jours sur milieu (-WLUHA). GAL4BD indique les protéines en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN de GAL4 dans le vecteur pGBT9 ou pGBKT7. GAL4AD montre les protéines fusionnées au domaine d'activation de transcription de GAL4 dans le vecteur pGAD424 ou pGADT7. Les protéines exprimées par le vecteur bridge sont indiquées (pVTU102). Ces résultats ont été obtenus par, au moins, deux expériences indépendantes. Ø représente les vecteurs vides. +, indique une faible croissance ; ++ indique une croissance moyenne ; -, indique l'absence de croissance.

Ligne	GAL4BD	pVTU102	GAL4AD	Croissance
a	Ø	Ø	Ø	-
b	F-box	Ø	Ø	-
c	Ø	F-box	ASK2	-
d	F-box	Ø	Cul1	-
e	Cul1	Ø	F-box	-
f	ASK1	Ø	Cul1	+
g	ASK2	Ø	Cul1	+
h	Cul1	Ø	ASK1	-
i	Cul1	Ø	ASK2	+
j	Cul1	F-box	ASK1	-
k	F-box	ASK1	Cul1	+
l	F-box	ASK2	Cul1	+
m	Cul1	F-box	ASK2	++
n	ASK1	F-box	Cul1	++
o	ASK2	F-box	Cul1	++

a. Etude du complexe Ask•F-box•p25

Nous avons vérifié si la présence de la protéine p25 affecte ou non l'interaction entre la protéine F-box et les protéines ASK1/2. Le premier test réalisé dans le paragraphe précédent a montré que les protéines ASK1 ou 2 n'influencent pas le complexe p25•F-box (**figure II.2**). Avant tout, j'ai revérifié l'absence d'autoactivation de la transcription par les protéines utilisées dans cette étude (**tableau II.3, lignes 1 à 7, 32 à 34 et 39-40**) et cloné les protéines p25 et F-box dans le vecteur bridge pVTU102 dans le but de les co-exprimer en système double hybride. J'ai ainsi pu confirmer l'absence d'interaction entre la protéine p25 et les protéines ASK1/2 quel que soit le sens des combinaisons testées (**tableau II.3, lignes 8 à 11**) et l'existence d'interactions entre la protéine F-box et les protéines ASK1/2 (**tableau II.3, lignes 12 à 15**). L'expression de protéines ASK par l'intermédiaire du

vecteur Bridge n'affecte pas l'interaction entre la protéine F-box et p25 (**Figure II.2 et tableau II.3, lignes 35 à 38**). Il faut préciser que le test effectué ne permet pas de discriminer entre un effet inhibiteur qui provoquerait la mort des cellules et la survie des cellules liée à l'interaction forcée entre p25 et F-box. De la même manière, l'expression de la protéine p25 *via* le vecteur bridge n'a pas d'influence sur la formation du complexe F-box•ASK1/2 quelle que soit la combinaison (**figure II.3 et tableau II.3, lignes 16 à 23**). La protéine p25 n'interagit pas avec les protéines ASK (**tableau II.3, lignes 8 à 11, 24, 26, 28, 30**) et ne permet la formation d'un complexe fonctionnel que sous la forme GAL4BD-ASK2•F-box•GAL4AD-p25 (**tableau II.3, ligne 27**) ou GAL4BDp25•F-box•GAL4AD-ASK2 (**tableau II.3, ligne 31**). Il est remarquable de noter que si la protéine ASK1 est capable d'interagir avec la protéine F-box, elle est incapable de participer à la formation d'un complexe impliquant F-box et la protéine p25 (**tableau II.3, comparer les lignes 25 à 27 et 29 à 31**). Ces résultats semblent indiquer que la protéine p25 fait partie d'un complexe SCF impliquant la protéine F-box et la protéine ASK2 mais pas la protéine ASK1.

Les interactions décrites entre ces différents partenaires étant purement descriptives, j'ai entrepris de caractériser les forces d'interactions entre les partenaires en dosant les activités enzymatiques de β -galactosidase.

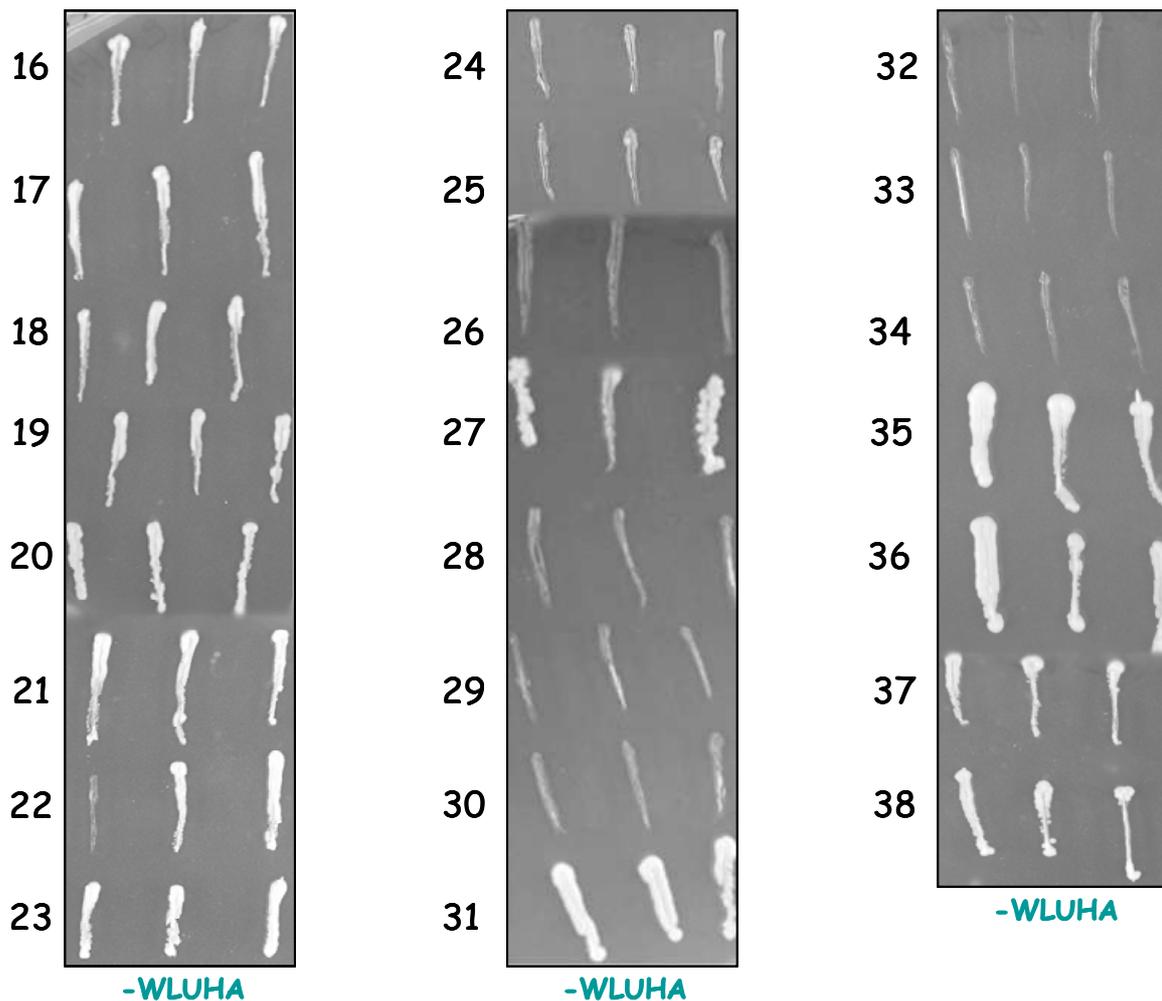


Figure II.3 : Recherche de la formation des complexes protéiques par test triple hybride de levure. Ce test est effectué dans la souche de levure AH109, la croissance de levures a été observée après quatre jours sur milieu sélectif SD-WLUHA. Les chiffres correspondent aux combinaisons indiquées dans le tableau II.3.

Tableau II.3 : Résultats des tests double hybride en présence de protéine bridge. Ces tests sont réalisés dans la souche de levure AH109, la croissance de levures a été observée après quatre jours sur milieu (-WLH) et (-WLUHA) pour le test double et triple hybride respectivement. GAL4BD indique les protéines en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN de GAL4 dans le vecteur pGBT9 ou pGBKT7. GAL4AD montre les protéines fusionnées au domaine d'activation de transcription de GAL4 dans le vecteur pGAD424 ou pGADT7. Les protéines exprimées par le vecteur bridge sont indiquées (pVTU102). Ces résultats ont été obtenus par au moins deux expériences séparées. Ø représente les vecteurs vides. +++, indique la forte croissance de levure ; ++, indique une croissance moins forte ; -, indique l'absence de croissance.

	Ligne	GAL4BD	pVTU102-U	GAL4AD	Croissance
Y2H	1	Ø	-	Ø	-
	2	ASK1	-	Ø	-
	3	ASK2	-	Ø	-
	4	F-box	-	Ø	-
	5	Ø	-	F-box	-
	6	P25	-	Ø	-
	7	Ø	-	P25	-
	8	ASK1	-	P25	-
	9	ASK2	-	P25	-
	10	P25	-	ASK1	-
	11	P25	-	ASK2	-
	12	ASK1	-	F-box	+++
	13	ASK2	-	F-box	+++
	14	F-box	-	ASK1	+++
	15	F-box	-	ASK2	+++
Y3H	16	ASK1	Ø	F-box	+++
	17	ASK1	P25	F-box	+++
	18	ASK2	Ø	F-box	+++
	19	ASK2	P25	F-box	+++
	20	F-box	Ø	ASK1	+++
	21	F-box	P25	ASK1	+++
	22	F-box	Ø	ASK2	+++
	23	F-box	P25	ASK2	+++
	24	ASK1	Ø	P25	-
	25	ASK1	F-box	P25	-
	26	ASK2	Ø	P25	-
	27	ASK2	F-box	P25	++
	28	P25	Ø	ASK1	-
	29	P25	F-box	ASK1	-
	30	P25	Ø	ASK2	-
	31	P25	F-box	ASK2	+++
	32	Ø	Ø	Ø	-
	33	F-box	Ø	Ø	-
	34	P25	Ø	Ø	-
	35	P25	ASK1	F-box	+++
	36	P25	ASK2	F-box	+++
	37	F-box	ASK1	P25	+++
	38	F-box	ASK2	P25	+++
	39	Ø	F-box	ASK2	-
	40	P25	F-box	Ø	-

b. Estimation des forces d'interactions par quantification de l'activité ONPG (O-NitroPhényl- β -D-Galactopyrnoside) dans la levure

L'activité enzymatique de β -galactosidase des levures (AH109) transformées par deux ou trois plasmides a été mesurée par quantification d'activité ONPG pour estimer la force d'interaction entre les deux, voire les trois, partenaires. L'activité β -galactosidase a été mesurée après 285 min à partir de trois à six cultures indépendantes de levures.

Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure II.4** et confirment les interactions observées dans les expériences précédentes. Nous avons pu mesurer une interaction plus forte entre la protéine F-box-Kelch et la protéine ASK1 que entre F-box-Kelch et la protéine ASK2 (respectivement 5 et 3 unités β -gal Miller). Cette interaction ne semble pas être affectée par l'expression de la protéine p25 (**figure II.4, 13 et 19**). Cette approche nous a également permis de quantifier l'interaction p25•F-box•ASK2 qui avoisine deux unités Miller (**figure II.4, 31 et 27**). En absence d'interaction, les activités enzymatiques mesurées en milieu complet sont toutes inférieures à 1 unité Miller.

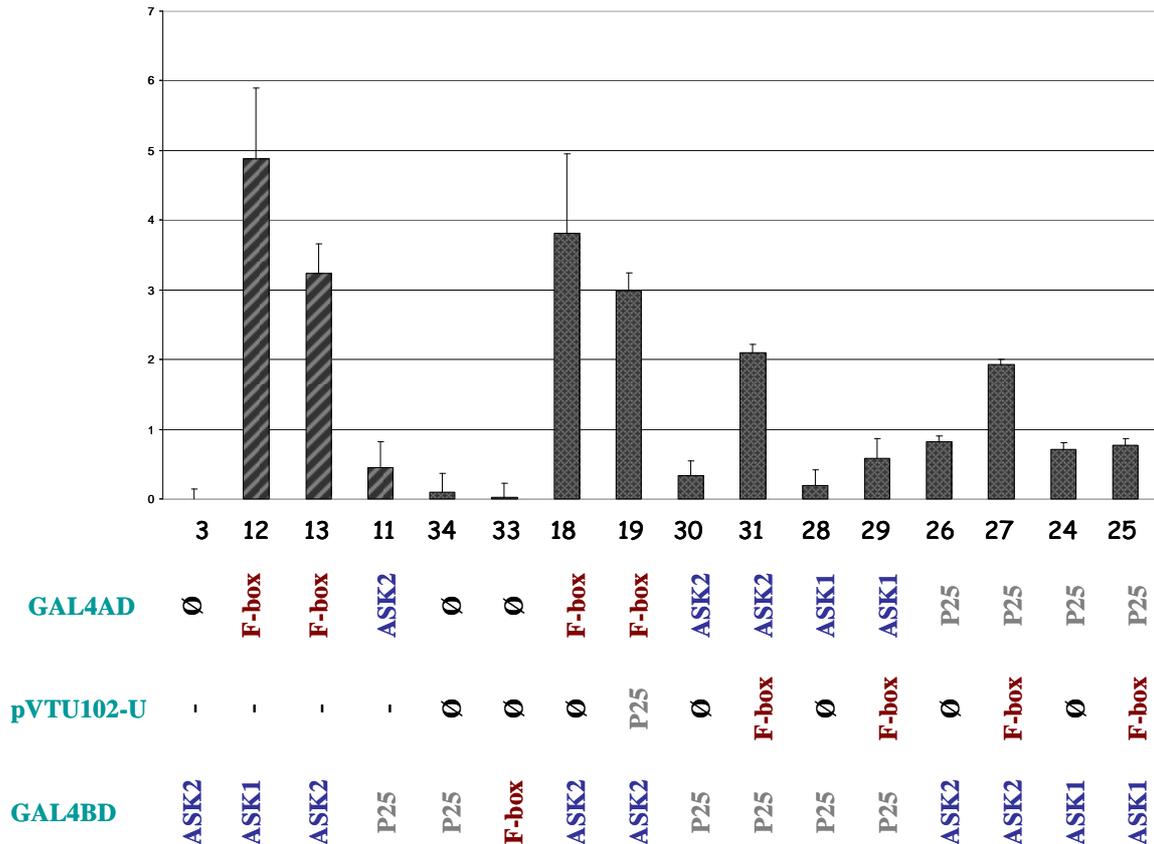


Figure II.4 : Quantification de l'activité β -galactosidase (β -gal) dans des levures transformées par deux (3, 12, 13 et 11) ou par trois vecteurs (autres combinaisons). Les cellules ont été cultivées en milieu liquide non sélectif à 30 °C. Les analyses ont été effectuées en triplicata à partir de 3 cultures indépendantes. Les écarts types sont indiqués. Les chiffres représentent les combinaisons décrites dans le tableau II.3.

c. Analyse de l'expression de la protéine F-box dans des plantes de betterave

Nous avons recherché si l'expression de la protéine F-box était constitutive ou si elle pouvait être induite par l'infection du BNYVV. Pour cela, nous avons recherché, parmi les ARN totaux extraits des feuilles et de racines de betteraves sensibles et résistantes (Rz1 et Rz2) infectées ou non infectées, la présence de l'ARN messager à l'aide d'une sonde spécifique. Les résultats sont présentés sur la **figure II.5**. L'absence de détection du mRNA dans les feuilles indique que la protéine F-box de betterave est exclusivement exprimée dans les racines où l'on détecte le mRNA par northern blot. L'expression de l'ARN semble indépendante de l'infection. Dans le cas de la plante Rz2, nous avons pu noter l'expression plus forte du mRNA de F-box qui baisse suite à l'infection virale.

L'immunodétection de la protéine p25 ou de la protéine CP à partir d'extraits de ces plantes infectées révèle des niveaux d'expression protéiques comparables (non montré).

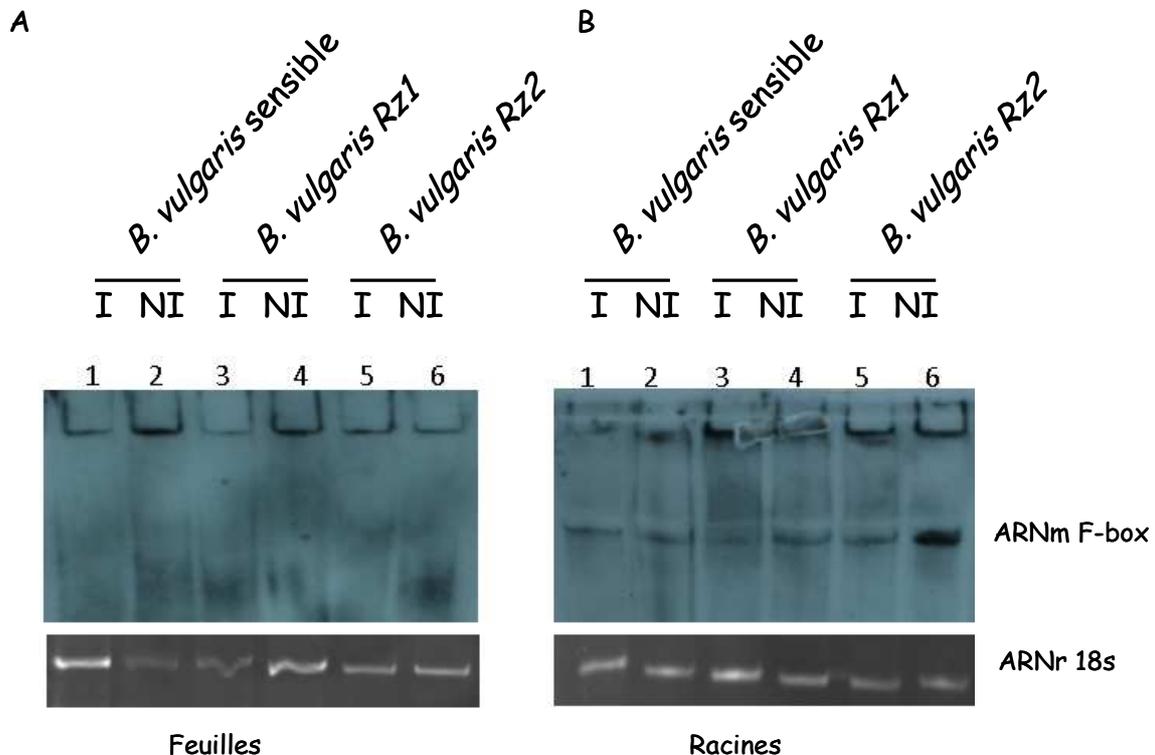


Figure II.5 : Analyse par northern blot de l'accumulation de l'ARN messager de F-box dans les betteraves sucrières résistantes *Rz1* et *Rz2* et susceptibles, infectées et non-infectées. (A) Analyses effectuées sur des ARN extraits des feuilles des plantes infectées (1, 3 et 5) et non infectées (2, 4 et 6). (B) Analyses effectuées sur des ARN extraits des racines de mêmes plantes infectées (1, 3 et 5) et non infectées (2, 4 et 6). La sonde de F-box est utilisée. La visualisation sous UV des ARNr18s permet d'estimer les quantités de charge déposées dans chaque piste. 1. Plantes susceptibles infectées. 2. Plantes Susceptibles non-infectées. 3. Plantes *Rz1* infectées 4. Plantes *Rz1* non-infectées. 5. Plantes *Rz2* infectées. 6. Plantes *Rz2* non-infectées.

d. Effet des mutations de phosphorylation de la protéine p25 sur l'interaction avec la protéine F-box

La reconnaissance des substrats par les protéines de complexes SCF est souvent régulée par phosphorylation (voir introduction). Nous avons donc décidé de rechercher l'effet des mutations de phosphorylation introduites dans la séquence de la protéine p25 sur l'interaction avec la protéine F-box. Pour cela, le test réalisé dans le chapitre I pour rechercher l'effet sur l'interaction avec l'importine α avait aussi été réalisé avec la protéine F-box et l'importine α de riz qui sert de témoin. Aucune différence d'interaction n'a pu

être observée entre les mutants de phosphorylation et la protéine F-box (*in vitro*) même dans le cas du mutant Y₅₂A qui n'est pas reconnu par l'importine α de riz (**figure II.6**). Les différences d'intensité de bandes détectées pour les mutants T₄₃D et T₁₆₄A n'ont pas été reproductibles.

Ces résultats indiquent que la reconnaissance entre la protéine p25 et sa partenaire, la protéine F-box, est indépendante de l'état de phosphorylation de la protéine p25 *in vitro*.

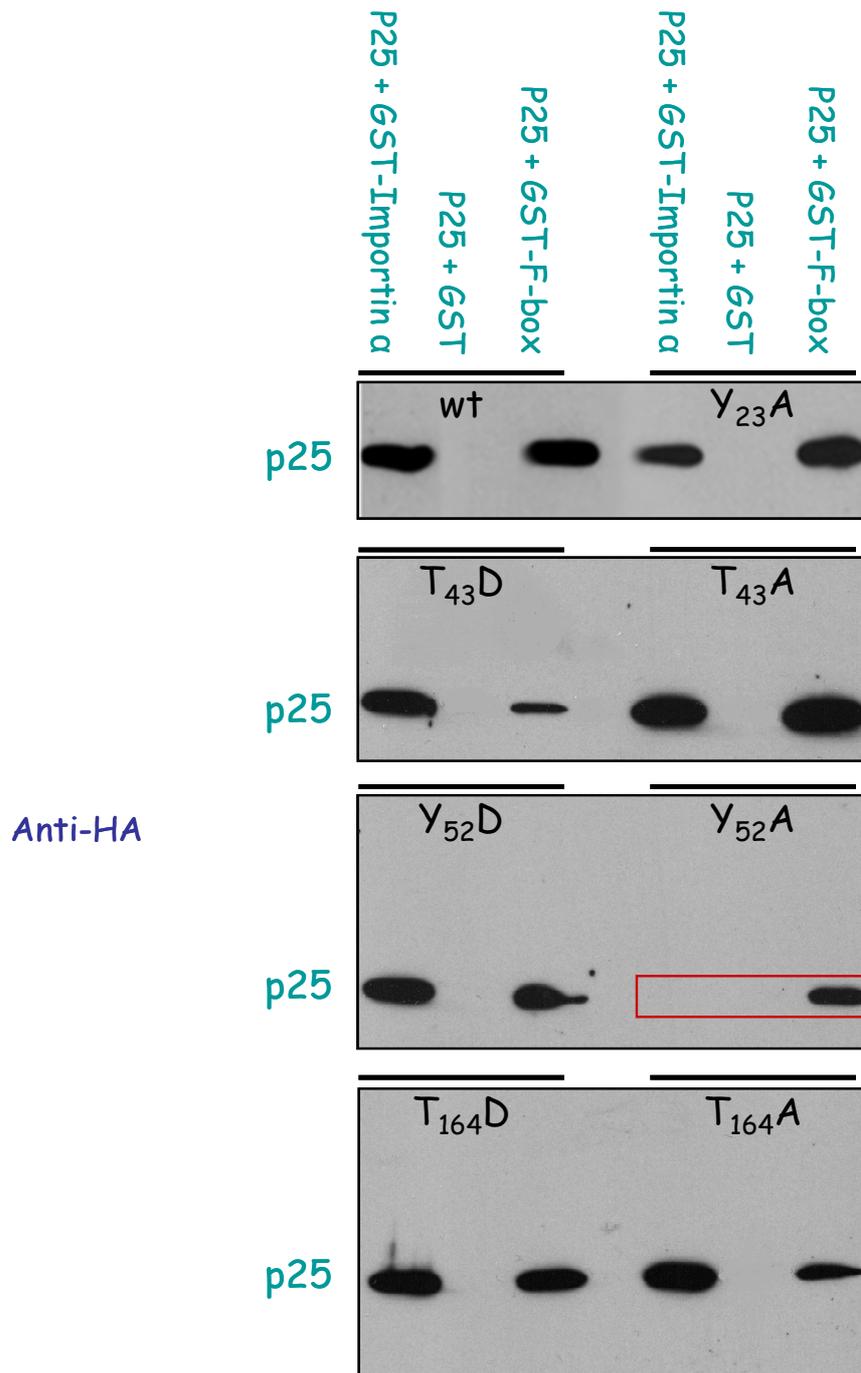


Figure II.6 : Interaction *in vitro* entre des protéines p25 sauvage (wt) ou mutées avec la protéine de fusion GST-F-box. L'interaction entre la protéine p25 ou ses mutants de phosphorylation a été vérifiée par un test de GST pull-down. Les protéines p25 sauvage ou mutées ont été produites dans le système de transcription-translation RTS100 dans un lysat d'*E. coli* et incubées avec des quantités similaires d'extraits de protéines produites en *E. coli* contenant la GST seule ou fusionnée à la protéine F-box ou à l'importine α du riz comme témoin. Après incubation et lavages, 20 μ l de chaque milieu de réaction ont été analysés en western blot et révélés par des anticorps (anti-p25 ou anti-HA).

2. Recherche des partenaires cellulaires et viraux de la protéine p25 par des approches *in vitro*

i. Approche de co-immunoprécipitation

Les partenaires interagissant ou formant un complexe avec une protéine donnée peuvent également être recherchés *in vitro* par une approche biochimique. La co-immunoprécipitation est un processus extrêmement utile car elle permet de capturer les membres d'un complexe protéique présent dans les extraits cellulaires et, par la suite, de les identifier par spectrométrie de masse. Pour résumer le principe, les complexes protéiques sont liés à un anticorps spécifique lui-même attaché à un support solide tel que la résine ou les billes magnétiques en se liant aux protéines comme la protéine G ou A. Après la capture de la protéine cible et des protéines du complexe, le support solide est lavé pour éliminer les protéines qui ne sont pas spécifiquement et faiblement associées à l'anticorps ou à la protéine ciblée par l'anticorps. Après le lavage, la/les protéine(s) spécifiquement liée(s) est/sont éluée(s) et analysée(s). L'utilisation de la spectrométrie de masse va nous permettre d'identifier ces protéines.

Dans notre étude, cette expérience a été effectuée avec des extraits bruts, afin d'obtenir une représentation globale des protéines cellulaires et d'augmenter le taux de purification. Nos expériences ont été réalisées sur un extrait protéique total de *C. quinoa* infectées par Stras12 du BNYVV complétées par des transcrits de Rep3-HAp25 ou sur un extrait de *C. quinoa* infectées par la souche Stras12 (helper) utilisées comme témoin. L'immunoprécipitation effectuée à l'aide des anticorps dirigés contre le peptide HA fixé sur une résine n'a pas permis de visualiser de différence de profil entre l'échantillon contenant la protéine HAp25 et celui de l'extrait de plante saine (**figure II.7**). Compte tenu de la spécificité de l'anticorps dirigé contre HA, nous avons suspecté que la résine fixait un grand nombre de protéines cellulaires.

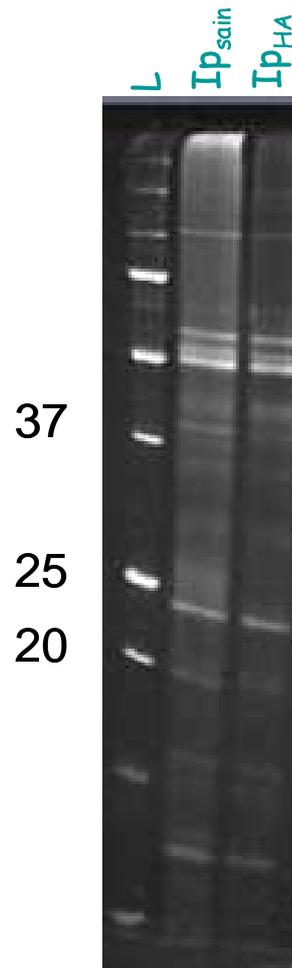


Figure II.7 : Analyse comparative par électrophorèse des protéines issues de l'immunoprécipitation réalisée à partir d'un extrait de feuilles de *C. quinoa* saines (IPsain) ou infectées par les ARN1 et 2 supplémentés par des transcrits Rep3-HA (IPHA).

Le remplacement de la résine par des billes magnétiques a permis de résoudre en partie le collage des protéines cellulaires à la matrice et de distinguer des différences de comportement entre l'échantillon contrôle et l'échantillon contenant la protéine à immunocapturer.

Ainsi, la **figure II.8** présente cette expérience et montre clairement que, si les différences ne sont pas visualisées dans les extraits "input" et "FT", il est possible de visualiser des différences entre les extraits contenant et ne contenant pas la protéine p25 étiquetée HA.

La bande de 25 kDa correspondant à la protéine p25 ainsi qu'une bande d'environ de 20 kDa et une autre d'environ de 50 kDa sont présentes dans l'éluat des extraits infectés par Stras12 et Rep3-HAp25 et absentes des extraits de plantes inoculés par Stras12.

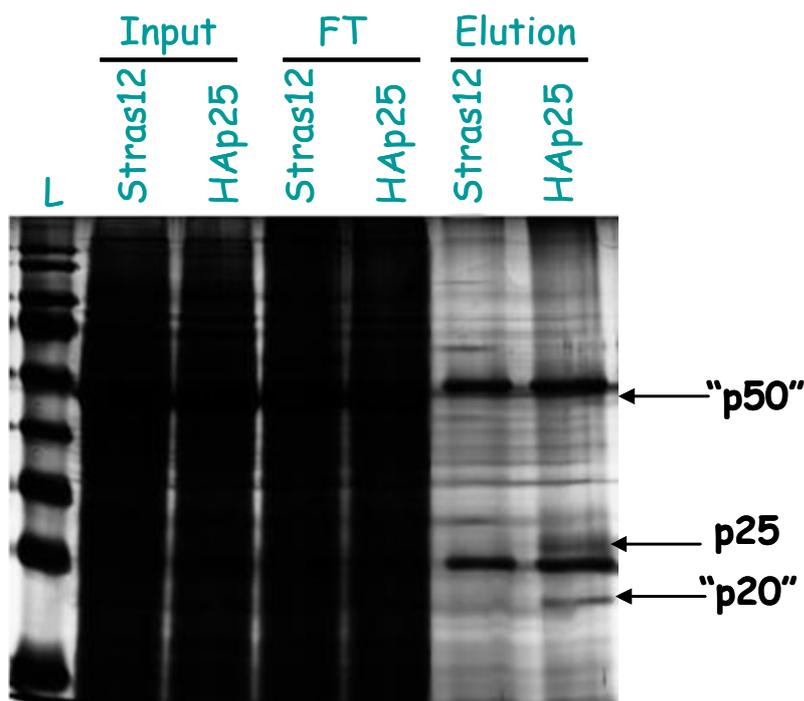


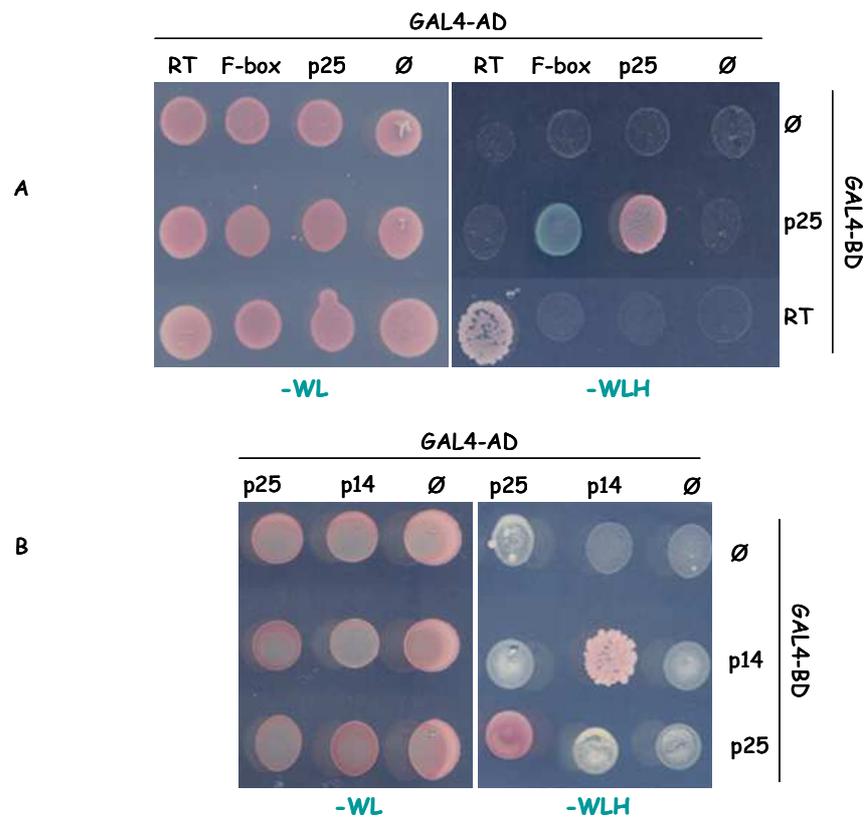
Figure II.8 : Électrophorèse (une dimension, 1D), après co-immunoprécipitation de protéines totales extraites de *C. quinoa* infectées par l'ARN1 et 2 complétés par des transcrits Rep3-HAp25 (HAp25 élution) par rapport à un extrait de *C. quinoa* infecté par les ARN1 et 2 et utilisé comme témoin (Stras12). Les bandes observées dans l'élution HAp25 ont été comparées à celles observées avec le contrôle et les bandes différentielles ont été ensuite analysées par MS-MS.

L'analyse différentielle par MS-MS a révélé la présence des protéines structurales CP et CP-RT, de la protéine non structurale p14 et de protéines cellulaires comme eEF1-alpha, un précurseur de protéine PR et une sous unité beta d'ATP synthase (**tableau II.4**).

Tableau II.4 : Partenaires viraux et cellulaires de la protéine p25 co-immunoprécipités et identifiés par analyse MS-MS.

Name of protein	Organism
CP (20k)	Beet necrotic yellow vein virus
CP-RT (Virus coat protein 75K)	Beet necrotic yellow vein virus
P25 protein	Beet necrotic yellow vein virus
ATPase subunit I	Spinacia oleracea ...
P14 (14k) same HitP14 protein	Beet necrotic yellow vein virus
elongation factor 1 alpha (50 kDa actin-binding protein) (ABP-50) several isoforms	
Pathogenesis-related protein PRMS precursor	

Aucune interaction entre la protéine p25, les protéines structurales CP/CP-RT et la protéine p14 n'a été détectée en système double hybride de levure. Toutefois, nous avons pu révéler la multimérisation de la protéine de translecture RT et celle de la protéine p14 (**figure II.9**). Un tel résultat laisse supposer que d'autres protéines, ou, peut-être, un acide nucléique pourraient intervenir dans le complexe. Dans ce cas, nous avons pu mettre en évidence l'interaction entre protéines de translecture (RT) et entre protéines p14.



ii. La protéine p25 interagit indirectement avec les particules virales du BNYVV

Compte tenu de la stœchiométrie des signaux correspondant à p25, p21 et p75 et l'absence d'interaction en double hybride de levure, nous avons suspecté que la protéine p25 interagissait au sein d'un complexe protéique contenant des particules virales. Nous avons cherché à confirmer cette hypothèse en réalisant des expériences d'immunocapture et de visualisation en microscopie électronique.

Si l'interaction entre p25 et CP/CP-RT est spécifique, alors il est possible d'immunocapturer des particules virales à l'aide d'un anticorps dirigé contre p25. L'anticorps dirigé contre p25 n'étant pas monoclonal, nous avons choisi d'utiliser une étiquette HA sur p25 et de réaliser l'immunocapture à l'aide d'anticorps anti HA en utilisant comme contrôle une protéine p25 non étiquetée. Ainsi, des *C. quinoa* ont été infectées par les ARN 1, 2 et 3 ou 1, 2 et Rep3 HAp25. Les lésions locales obtenues ont été broyées en tampon PBSx1 et incubées sur grilles de microscopie électronique préalablement "coatées" par un anti-HA ou anti-CP. Aucune particule virale n'est observée sur les grilles HA incubées en présence d'extraits non étiquetés. Par contre, l'expression de protéine HAp25 en contexte viral permet d'immunocapturer les particules virales (**figure II.10A**). L'expérience complémentaire a consisté à immunocapturer le virus et à rechercher la présence de la protéine HAp25 sur les particules virales à l'aide d'anticorps couplés aux billes d'or colloïdal qui sont détectées uniquement sur les particules virales issues de lésions exprimant HAp25 (**figure II.10B**).

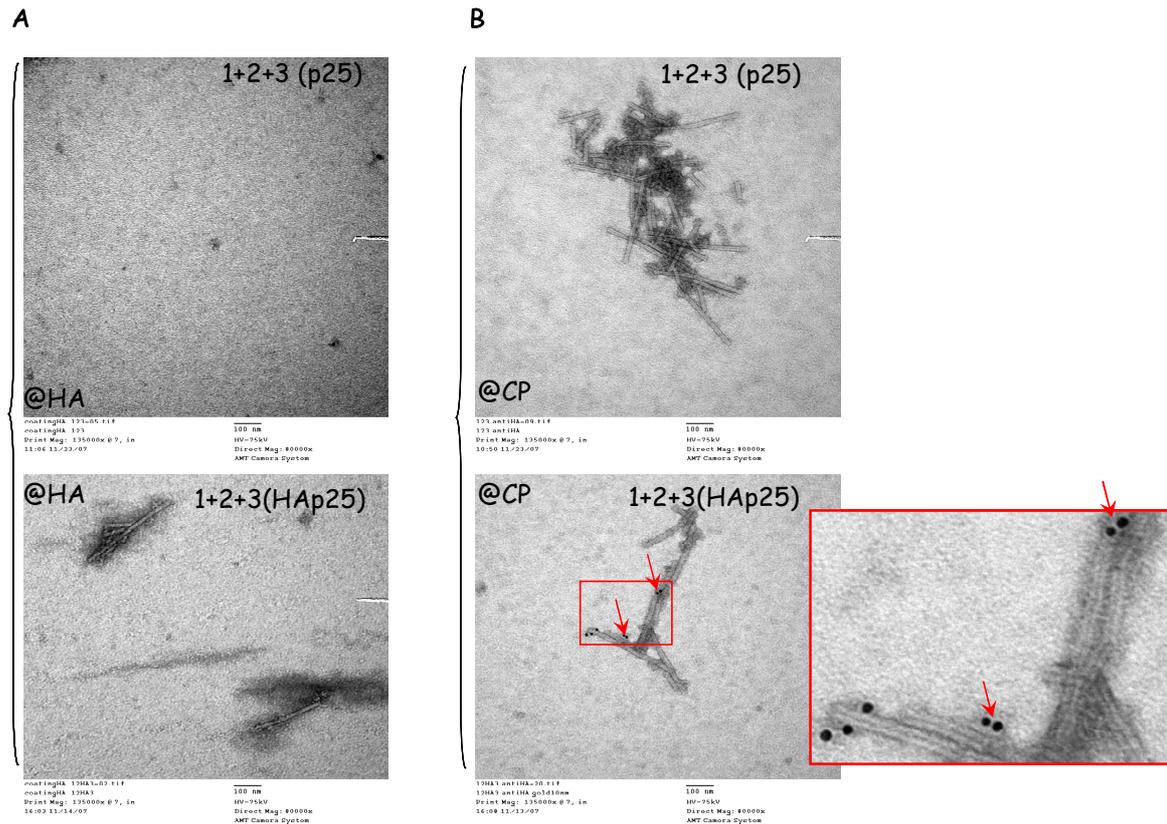


Figure II.10 : Visualisation de l'existence d'interaction entre la protéine p25 et les particules virales par une approche d'affinité. (A) L'utilisation d'anticorps HA permet l'immunocapture de particules virales uniquement si la protéine p25 est étiquetée. (B) La révélation de la protéine HAp25 est réalisée suite à l'immunocapture de particules virales (@CP). Le rectangle rouge entoure la région agrandie. Les flèches rouges indiquent les billes d'or.

IV. Conclusion

Nous avons recherché les partenaires cellulaires et viraux de la protéine p25 afin de préciser son rôle dans le cycle viral. Si deux criblages de banque d'*A. thaliana* n'ont pas permis d'identifier de partenaires, celui d'une banque d'ADNc de betterave *Rz2*, effectué à Göttingen, a permis l'identification de 27 candidats interagissant avec la protéine p25 dont une F-box protéine à domaines Kelch qui interagit fortement avec la protéine p25 *in vivo* et *in vitro* quel que soit son état de phosphorylation. Nous avons montré que la protéine F-box-Kelch était capable de former un complexe SCF mais que la présence de la protéine p25 permettait la formation d'un complexe impliquant la protéine ASK2 mais pas la protéine ASK1. Nous avons vu que les protéines F-box sont impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques. Elles sont constitutives de complexes SCF qui ciblent

des protéines substrats pour leur dégradation par le protéasome 26S, action indispensable à l'accomplissement de fonctions cellulaires (**figure II.11A**).

A ce stade de notre étude, nous ne pouvons pas exclure l'existence d'un complexe p25•F-box•Ask1 dont la demi-vie serait incompatible avec une détection dans la levure ou qui pourrait exister dans la betterave et pas avec une protéine ASK originaire d'*A. thaliana*. Nous ne pouvons que discuter de la stabilité du complexe impliquant p25•F-box•ASK2 qui pourrait conduire à une inhibition du complexe SCF en absence d'ubiquitination de la protéine p25. En effet, la protéine p25 ne renferme qu'une seule Lysine en position 57, essentielle à l'adressage nucléaire et en contexte non favorable à l'ubiquitination. Ainsi, on peut imaginer qu'un des rôles de la protéine p25 serait d'entrer en compétition avec la protéine cellulaire ciblée par la protéine F-box-Kelch pour, d'une part, empêcher sa dégradation et, d'autre part, empêcher le fonctionnement du complexe SCF faisant intervenir ASK2 (**figure II.11B**).

Il me reste à tester la capacité des protéines F-box-Kelch de plantes sensibles et *Rz1* à former un complexe p25•F-Box•ASK1/2. Les clonages des séquences des protéines candidates en vecteur bridge sont en cours et les interactions seront mesurées par dosages d'activité enzymatique. Si les interactions sont identiques, nous pourrions conclure que la reconnaissance de p25 par F-box n'est pas liée à une résistance spécifique mais pourrait au contraire favoriser l'infection. Si une interaction impliquant ASK1 est observée, nous pourrions alors envisager un rôle éventuel de la protéine F-box dans la résistance au BNYVV. L'apparition de nécroses dans les feuilles de *N. benthamiana* agroinfiltrées par la protéine F-box et l'induction de l'expression des gènes associés (PR) à la réponse hypersensible (HR) laissent supposer soit un rôle indirect de cette protéine F-box dans la résistance, soit une réaction hypersensible suite à l'expression d'une F-box racinaire dans les feuilles. L'absence de co-immunoprécipitation de la protéine F-box dans les feuilles est liée à son absence d'expression. Il serait intéressant de pouvoir réaliser cette même expérience à partir de racines infectées.

Quoiqu'il en soit, la caractérisation du mécanisme d'action de la protéine p25 au sein de ce complexe nécessite l'identification de la cible de la protéine F-box-Kelch. Nous pourrions ainsi préciser si une absence de dégradation de la cible pourrait expliquer un phénotype de résistance (**figure II.11B.1**) ou de susceptibilité à l'infection (**figure II.11B.2 et 3**).

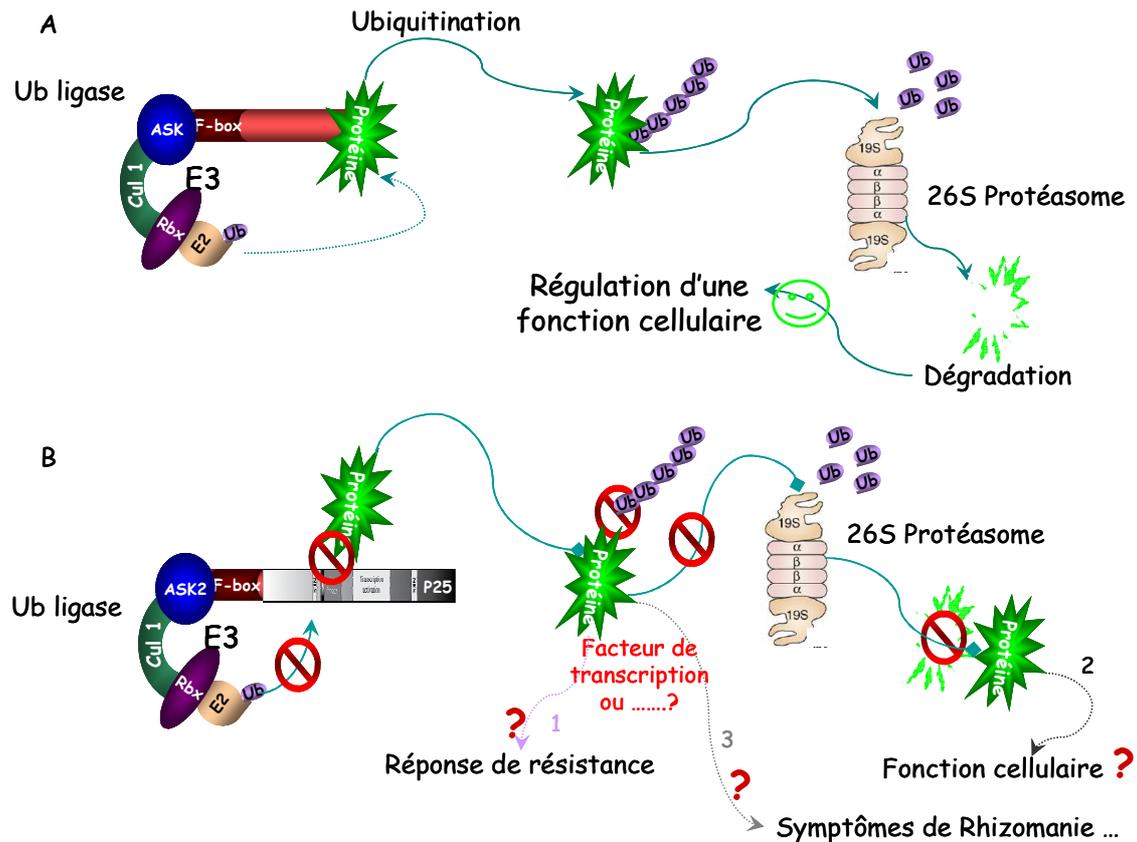


Figure II.11 : Modèle proposé pour le rôle de la protéine p25 dans le complexe SCF. (A) Représente le cas commun d'une interaction entre une protéine substrat (verte) avec une protéine F-box dans un complexe de SCF en conduisant à la dégradation du substrat ainsi qu'une régulation d'une fonction cellulaire. (B) Représente les possibilités proposées de l'implication de l'interaction entre la protéine F-box et la protéine p25 dans un complexe SCF. Cette interaction ne conduit pas à la dégradation de la protéine p25. Selon l'hypothèse de Guard, cette interaction peut induire une réponse de résistance (B.1). d95dahxrdw5ettfhvextferzzt5z9erw9">a protéine cellulaire (verte) va induire ou inhiber une fonction cellulaire (B.2). Cette protéine cellulaire pourrait être un facteur de transcription ou une protéine impliquée dans la dérégulation hormonale ou l'apparition des symptômes de rhizomanie (B.3).

Avant de réaliser une expérience de "Knock down" du gène F-box-Kelch dans la betterave (*Beta vulgaris*) par une approche de VIGS (Virus induced gene silencing), j'ai tenté d'éteindre l'expression de la phytoène desaturase (PDS) en clonant la séquence PDS de *B. vulgaris* dans le réplicon 5 de BNYVV (Schmidlin *et al.*, 2005). Si des lésions locales et une infection systémique des plantes *B. vulgaris* et *B. macrocarpa* ont été obtenues en présence des ARN1+2+3 supplémentés des transcrits de Rep5PDS ou Rep5GFP, aucun phénotype de blanchiment des feuilles ou des lésions n'a été observé. Nous ne pouvons pas encore savoir si le BNYVV est un vecteur optimal pour établir un VIGS sur l'espèce *Beta*

ou si PDS est multicopies chez la betterave. L'expérience avec la séquence F-box n'a pas encore été réalisée.

Lors de l'approche de co-immunoprécipitation à partir de feuilles de *C. quinoa* infectées, nous avons identifié d'autres partenaires cellulaires de p25, comme un précurseur de protéine PR, eEF1alpha et une ATP synthase. Notons, ici, que le facteur d'élongation de traduction eEF1 α est une composante essentielle de la machinerie de traduction qui permet l'association des aminoacyl-ARNt aux ribosomes. En général, les facteurs d'initiation de la traduction eIF4E, eIF4(iso)E, eIF4G, eIF4(iso)G sont nécessaires pour la multiplication virale (*Potyvirus* ...) [pour revue voir (Truniger and Aranda, 2009)]. Des mutations dans ces facteurs d'initiation inhibent l'interaction avec la protéine virale Vpg chez les potyvirus en conférant une résistance à l'infection virale (Robaglia and Caranta, 2006; Hebrard *et al.*, 2010; Piron *et al.*, 2010). Un grand nombre de gènes de résistance récessifs connus codent pour des facteurs d'initiation de la traduction (Truniger and Aranda, 2009). La co-immunoprécipitation d'autres protéines virales (CP, RT et P14) avec ces protéines cellulaires suppose un rôle important de ce complexe dans la régulation de traduction des protéines virales. Toutefois, la confirmation de ces interactions directes ou indirectes est indispensable pour comprendre la signification de telle interaction. Cette interaction indirecte entre la protéine p25 et la protéine CP, confirmée par microscopie électronique, et l'absence de l'interaction entre ces protéines virales et la protéine p25 dans le système de double hybride de levure, suggèrent qu'une protéine cellulaire ou une séquence ARN interviennent dans la formation d'un tel complexe. C'est le cas pour la polyprotéine Gag de HIV qui interagit spécifiquement avec la protéine eEF1 α par deux domaines MA (protéine de matrice) et NC (nucléocapside). Cette interaction nécessite l'intervention d'un ARN (Cimarelli and Luban, 1999).

L'existence d'interactions entre p25, les particules virales et la protéine p14 suppresseur de RNA silencing m'a orienté vers la recherche de facteurs cellulaires ou viraux capables d'interagir au sein d'un tel complexe. Ces études sont détaillées dans le troisième et dernier chapitre de ma thèse.

**Chapitre III : Mise en évidence de
l'interaction entre la protéine p14 et la
séquence coremin de l'ARN3 du BNYVV :
implication dans le mouvement à longue
distance**

I. Introduction

L'immunoprécipitation de la protéine p25 a permis de co-précipiter à la fois des partenaires cellulaires et des protéines virales. Cependant, aucune interaction directe entre la protéine p25 et ses partenaires viraux co-immunoprécipités n'a été mise en évidence (chapitre II). D'autres études effectuées au laboratoire ont révélé qu'une séquence de 20 nucléotides de l'ARN3 viral, appelée "coremin", est indispensable, d'une part, au mouvement viral à longue distance sur *B. macrocarpa* et, d'autre part, à la stabilisation de l'ARN3 subgénomique qui, rappelons-le, a pour origine un clivage de l'ARN3. Nous avons donc suspecté qu'une ou plusieurs protéines virales interagissent avec la séquence coremin pour permettre l'infection systémique et pour stabiliser le produit de clivage de l'ARN3. Nous avons également suspecté que l'ARN3 ou ARN3sub pouvait intervenir dans la formation d'un complexe co-immunoprécipité avec la protéine p25. J'ai donc recherché l'existence d'interactions entre la séquence coremin et les protéines codées par le BNYVV en utilisant le système du triple hybride de levure. J'ai pu montrer que la protéine p14, suppresseur de RNA silencing, reconnaissait spécifiquement cette séquence d'ARN "coremin".

Ce chapitre sera, de ce fait, consacré d'une part aux travaux effectués pour la caractérisation de la protéine p14, et, d'autre part, à ceux réalisés sur l'interaction entre la protéine p14 et la séquence coremin, en recherchant le rôle de ces deux partenaires dans l'infection virale locale (chez *C. quinoa*) et systémique (chez *B. macrocarpa* et *N. benthamiana*).

1. Mécanisme de RNA silencing

Le mécanisme du RNA silencing permet la régulation de l'expression des gènes chez la plupart des eucaryotes et intervient dans de nombreux processus biologiques incluant le développement, le maintien de l'intégrité du génome, les réponses à l'environnement et la défense contre les éléments transposables et les pathogènes, notamment les virus. Ce mécanisme fait appel à des petits ARN, "sRNA" (small RNA), qui sont divisés en deux groupes : (i) les "micro RNA" (miARN) qui dérivent d'ARN simple brin précurseurs (pre-miARN) capables de se replier en une structure tige-boucle par appariement

intramoléculaire, et (ii) les "small interfering RNA" (siARN) qui dérivent de longues molécules d'ARN double brin présentant un haut degré de complémentarité.

Le RNA silencing de l'ARN, un mécanisme antiviral, est initié par l'intervention d'une enzyme de type RNase III (Bernstein *et al.*, 2001) appelée DICER (DCL1, 2, 3 ou 4) qui reconnaît un ARN double brin provenant de différentes origines (**figure III.1**) : une molécule d'ARN dont la structure secondaire forme une tige-boucle, la forme répliquative d'un ARN génomique viral, ou des ARN double-brins produits par une ARN polymérase-ARN dépendante cellulaire. Cette reconnaissance provoque la coupure de l'ARN double brin en produisant de petits duplexes de 21 à 24 nucléotides connus sous le terme de sRNA (Hamilton and Baulcombe, 1999; Elbashir *et al.*, 2001). L'un des deux brins est sélectionné par les protéines ARGONAUTE (AGO) et incorporé dans un complexe protéique effecteur appelé RISC (pour RNA induced silencing complex) dont l'activité endonucléasique « slicer » est portée par une protéine AGO [pour revue voir (Diaz-Pendon and Ding, 2008)]. Par complémentarité de séquence avec le sRNA, ce dernier est capable de sélectionner les acides nucléiques cibles et de réguler leur activité selon divers processus qui dépendent du sRNA et de la protéine AGO. En effet, parmi les dix protéines AGO identifiées chez *A. thaliana*, seulement trois sont capables de cliver les ARN simple brin : AGO1 (Baumberger and Baulcombe, 2005), AGO4 (Qi *et al.*, 2006) et AGO7 (Montgomery *et al.*, 2008). En plus de l'activité slicer, il a été montré que les protéines ARGONAUTE peuvent aussi inhiber la traduction des ARN cibles (Brodersen *et al.*, 2008) ou bien l'activer (Vasudevan *et al.*, 2007). Le silencing peut également être transcriptionnel ; il fait intervenir la méthylation de l'ADN homologue aux sRNA, menant à l'inhibition de la transcription de l'ADN (TGS, transcriptional gene silencing) (Ekwall, 2004) (**figure III.1**).

Le signal de silencing peut être amplifié par un mécanisme de transitivity en produisant des sRNA secondaires. Ce mécanisme implique des ARN polymérases-ARN dépendantes cellulaires (RdRp). Parmi les 6 RdRp identifiées chez *Arabidopsis*, RDR6 joue un rôle dans le mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle alors que RDR2 intervient dans le mécanisme d'extinction transcriptionnelle [pour revue voir (Voinnet, 2008)].

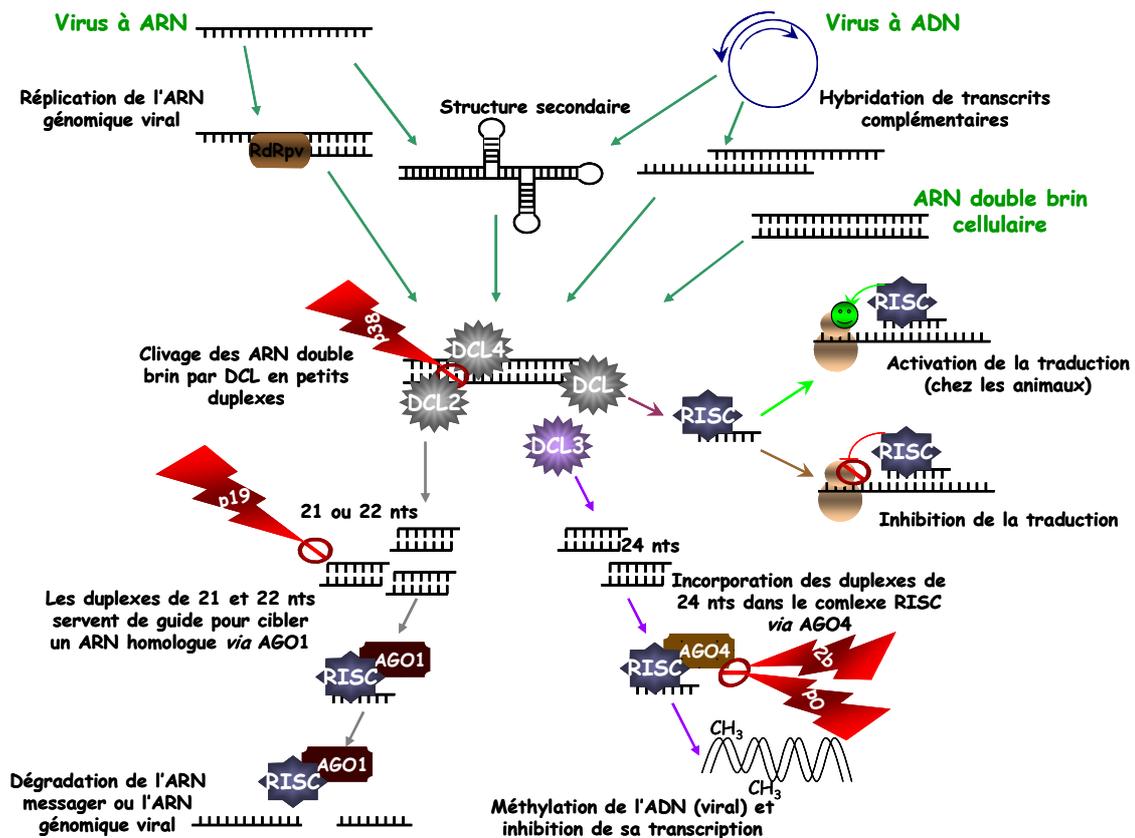


Figure III.1 : Mécanisme de l'ARN silencing : Un ARN double brin cellulaire ou produit par la réplication ou la transcription des virus à ARN ou à ADN est reconnu par une des protéines DICER (DCL). La coupure induite par des DCL4 ou DCL2 produit de petits duplexes de 21 ou 22 nts. Un des brins du petit duplexe peut s'incorporer dans le complexe RISC (RNA induced silencing complexe) *via* AGO1 (ARGONAUTE1) et cliver les ARN viraux ou messagers homologues (PTGS - Post-Transcriptional Gene Silencing). Lors d'une intervention de DCL3, les petits duplexes de 24 nts produits induisent la méthylation de l'ADN viral ou cellulaire ; ainsi elles inhibent sa transcription (TGS). En plus de ces deux effets, l'incorporation d'un ARN double brin cellulaire peut également inhiber la traduction du messenger cible ou activer sa traduction, phénomène connu jusqu'à présent chez les animaux. Des suppresseurs viraux de RNA silencing (p38, p19, 2b et p0) agissent à différents niveaux du mécanisme, et sont capables d'inhiber la dégradation des ARN viraux. RdRpv, réplicase virale ; PTGS, Post-transcriptional gene silencing ; TGS, Transcriptional gene silencing.

2. Suppression du RNA silencing

Le RNA silencing constitue un moyen de défense antivirale efficace. Cependant, les virus ont adapté des attitudes plus ou moins efficaces pour contourner ce mécanisme : ainsi, des virus codent pour des miRNA pouvant déréguler la cellule infectée à leur profit (Pfeffer *et al.*, 2004) ou alors expriment des protéines suppresseurs de RNA silencing pour empêcher

le mécanisme de cibler leur génome. Plus de 50 protéines suppresseurs de RNA silencing ont été identifiées. Ce sont des protéines multifonctionnelles impliquées dans la pathogénicité virale et qui ont été retrouvées chez la quasi totalité des genres de phytovirus (Ding and Voinnet, 2007; Diaz-Pendon and Ding, 2008).

Les données suggèrent que pratiquement tous les phytovirus codent pour au moins une protéine suppresseur de RNA silencing. Cependant, certains expriment plus d'un suppresseur, comme les *Carmo-*, *Clostero-*, *Crini-*, *Begomovirus* et *Benyvirus* (BNYVV p14 et p31). Il a été suggéré que certains virus pourraient recruter une protéine suppresseur de plante hôte pour leur propre avantage [pour revue voir (Voinnet, 2005)]. Les protéines virales suppresseur de RNA silencing connues sont variables dans leur séquence et dans leur structure. Elles agissent ainsi à différents stades dans la voie du silencing (Voinnet, 2005; Li and Ding, 2006; Burgyan, 2008). Ainsi, la protéine de capsid du TCV (*Turnip crinkle virus*), p38, inhibe l'activité de Dicer (Qu *et al.*, 2003) (**figure III.1**) ; la protéine p19 des *Tombusvirus* est capable de séquestrer les sRNA double-brin (**figure III.1**) (Baulcombe and Molnar, 2004) ; la protéine 2b d'un *Cucumovirus*, le CMV (*Cucumber mosaic virus*) inhibe l'activité catalytique d'argonaute (**figure III.1**) ; et fixe les petits ARN *in vitro*. Cette fixation joue un rôle crucial dans la suppression du RNA silencing (Zhang *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2010). La protéine P0 de *Luteovirus* est une protéine à F-box qui agit en induisant la dégradation de différentes protéines de la famille Argonaute (Baumberger *et al.*, 2007). D'autres protéines virales sont supposées interférer avec l'activité RDR (pour RNA-directed RNA polymerase) comme la protéine C2 du TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), ou avec la signalisation intercellulaire du silencing. Le développement de l'infection virale devient donc dépendant de l'équilibre entre le mécanisme de silencing et sa suppression. Ces protéines suppresseurs de RNA silencing sont divisées en trois familles : (i) des protéines suppresseur qui augmentent la multiplication virale dans les protoplastes infectés (chez les *Potyvirus*, la protéine HC-Pro et chez les *Tobamovirus*, la protéine p126) ; (ii) des protéines qui facilitent le mouvement du virus de cellule à cellule, mais non indispensables pour l'accumulation du virus dans des cellules individuelles (la protéine p25 du PVX, *Potato virus X*) ; (iii) d'autres protéines qui facilitent le mouvement viral à longue distance et/ou exacerbent les symptômes dans les tissus atteints par une infection systémique, mais ne sont pas essentielles à la réplication virale, ni au mouvement de cellule à cellule (la protéine 2b de *Cucumovirus*, la protéine p19 de *Tombusvirus*, et la protéine p38 de *Carmovirus*) (Diaz-Pendon and Ding, 2008).

3. Des suppresseurs de RNA silencing impliqués dans le mouvement à longue distance

De nombreuses protéines virales connues pour favoriser le mouvement à longue distance et/ou augmenter la sévérité de la maladie dans les tissus systémiques possèdent également une activité de suppression de RNA silencing. Il s'agit notamment de la protéine 2b du CMV, une protéine virale non structurale qui promeut le mouvement à longue distance d'une manière hôte spécifique. En effet, cette protéine virale facilite l'infection systémique grâce à son activité de suppression du RNA silencing et non par des changements structuraux du système vasculaire (Diaz-Pendon and Ding, 2008).

La protéine p19 du TBSV (*Tomato bushy stunt virus*) (Scholthof *et al.*, 1995a; Scholthof *et al.*, 1995b; Chu *et al.*, 2000) est nécessaire à la propagation virale à longue distance chez l'épinard et le poivrier. Cependant, cette protéine n'est pas nécessaire à l'infection systémique de *N. benthamiana* et *N. clevelandii* mais module les symptômes induits par le TBSV dans les feuilles systémiques. La protéine CP de nombreux virus de plantes joue un rôle essentiel dans le mouvement du virus à longue distance. Si ce rôle peut souvent être expliqué par la fonction structurale et protectrice de la protéine de capsid, il est controversé chez des phytovirus à ARN dont la protéine CP possède une activité de suppression de RNA silencing. En effet, des études ont suggéré que la protéine CP, p38 du TCV facilite le mouvement du virus à longue distance par son activité de suppression de RNA silencing indépendamment de l'encapsidation (Deleris *et al.*, 2006), ce qui n'est pas le cas de la protéine p19 du TBSV (Saito *et al.*, 1990).

La protéine de mouvement p25 du PVX codée par le premier gène de TGB agit comme suppresseur de RNA silencing. Il existe un lien direct entre la suppression de silencing et le mouvement viral, puisque tous les mutants déficients dans la fonction de suppression de silencing sont inactifs dans le mouvement de cellule à cellule. De plus, le mouvement viral des mutants est complété par un suppresseur de RNA silencing hétérologue (Bayne *et al.*, 2005).

Chez les potyvirus, la protéine suppresseur de RNA silencing HC-Pro est une protéine multifonctionnelle. Les formes mutées déficientes dans la suppression de silencing sont également déficientes dans la réplication du génome viral et dans le mouvement à longue

distance. Dans ce cas, réplication et mouvement sont dépendants de l'activité de suppression (Kasschau and Carrington, 2001).

II. Caractérisation de la protéine p14 du BNYVV, un suppresseur du RNA silencing

L'étude de la protéine p14 a été initiée au laboratoire dès 1992. Cette protéine codée par l'ARN2 du BNYVV (voire l'organisation génomique, **figure 3 de l'article de revue**) est une protéine riche en cystéine (CRP ou Cystein Rich Protein) à doigt à zinc capable de fixer les acides nucléiques *in vitro* [(Hehn, 1995), Thèse de doctorat, ULP] mais aussi de purifier la protéine p14 sur une résine chélatant le zinc. L'expression de cette protéine est importante pour l'accumulation des ARN viraux puisque des mutations introduites dans l'ORF de la protéine p14 conduisaient à une baisse de l'accumulation des ARN viraux dans des protoplastes infectés (Hehn *et al.*, 1995). Cette protéine est également un suppresseur de PTGS (**figure III.2**) (Dunoyer *et al.*, 2002).

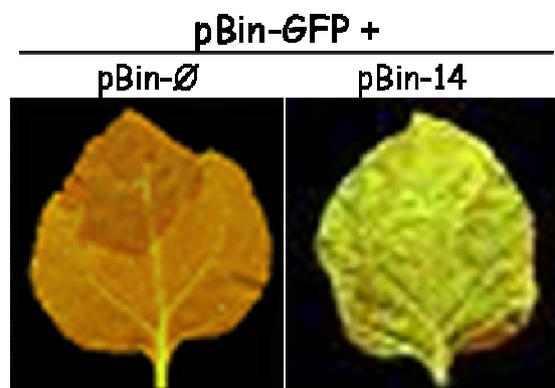


Figure III.2 : La protéine p14 est un suppresseur de PTGS : Suppression du PTGS par la protéine p14 en expression transitoire *via* co-agroinfiltration des feuilles par pBin-GFP + pBin14 ou + pBin-Ø (témoin négatif).

1. Localisation subcellulaire de la protéine p14 dans les protoplastes de cellules BY-2

Une étude de localisation subcellulaire de la protéine p14 a été initiée au laboratoire. La séquence codant pour la protéine fluorescente EGFP a été fusionnée à l'extrémité 5' ou 3' terminale du gène *p14*. Ces séquences ont ensuite été clonées dans le plasmide dérivé de

l'ARN3 du BNYVV pRep3 (Lauber *et al.*, 1998b). Ce dernier, utilisé couramment au laboratoire, constitue un vecteur viral d'expression de protéines homologues ou hétérologues en présence des ARN génomiques du BNYVV. Rappelons ici que ce vecteur qui possède uniquement les extrémités 5' et 3' non codantes indispensables à la réplication ne contient plus la partie portant la séquence coremin.

Dans un premier temps, nous avons utilisé les transcrits des constructions Rep3-p14EGF ou Rep3-EGFp14 pour infecter des plantes de *C. quinoa* en présence des transcrits des ARN1 et 2 sauvages ou de l'ARN1 sauvage et d'un ARN2 ne permettant plus l'expression de la protéine p14 [ARN2-3722 ; (Hehn *et al.*, 1995)] dénommé dans ce chapitre ARN2 Δ p14. Si les inoculations réalisées en présence de l'ARN2 sauvage ont montré que les deux protéines de fusion étaient exprimées et fluorescentes, les inoculations en présence de l'ARN2 Δ p14 ont révélé que seule la construction Rep3-EGFp14 restaure l'apparition de lésions locales chlorotiques vertes correspondant au phénotype sauvage. Cette construction fonctionnelle a donc été utilisée dans l'étude de la localisation de la protéine p14. Nous avons infecté des protoplastes de cellules BY-2 par les transcrits des ARN1 et 2 ou ARN2 Δ p14 en présence des transcrits Rep3-EGFp14. 24 heures après infection, les observations des cellules fluorescentes par microscopie confocale nous ont permis de mettre en évidence la double localisation de la protéine de fusion EGFp14 : cytoplasmique et nucléolaire (**figure III.3A**). La localisation nucléolaire est spécifique à la protéine p14 puisque la protéine EGFP se localise dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules infectées mais jamais dans le nucléole (**figure III.3B**). Nous avons également observé que la présence de la protéine p14 sauvage n'affecte pas la localisation de la protéine de fusion (**figure III.3**).

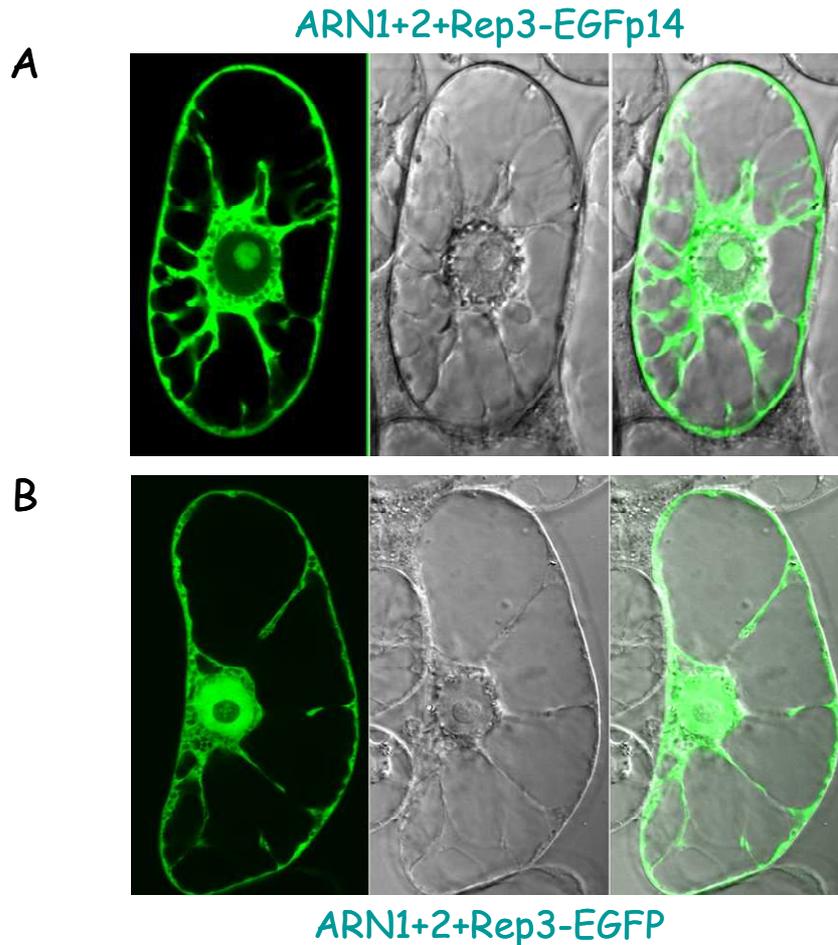


Figure III.3 : Localisation cytoplasmique et nucléolaire de la protéine p14. Des protoplastes de cellules de BY-2 ont été infectés par des transcrits viraux (ARN1+2) avec des transcrits de Rep3-EGFp14 (A) ou Rep3-EGFP (B). Les observations au microscope confocal ont été effectuées 24 h post inoculation. (A) Visualisation de la localisation nucléolaire et cytoplasmique de la protéine EGFp14 dans des protoplastes (B) La protéine EGFP libre se localise dans le cytoplasme et dans le noyau.

Cette localisation nucléolaire a été confirmée par l'utilisation de la protéine RFP (Red Fluorescent Protein) exprimée par le biais du réplicon viral dérivé de l'ARN5 du BNYVV (pRep5) (Schmidlin *et al.*, 2005), en fusion ou pas avec la protéine p14. L'infection de protoplastes par les ARN1 et 2 ou 2Δp14 en présence de transcrits du Rep5-RFp14 montre la même localisation subcellulaire, à savoir une localisation cytoplasmique et nucléolaire tout comme dans le cas de Rp3EGFp14 (**figure III.4A**). L'expression conjointe d'EGFp14 (Rep3-EGFp14) et de RFP (Rep5-RFP) dans des protoplastes infectés permet de mieux visualiser la localisation nucléolaire de p14 qui se distingue nettement du nucléoplasme marqué par la RFP (**figure III.4B superposition**). La fluorescence jaune/orangée dans le cytoplasme correspond à l'expression des deux protéines fluorescentes qui colocalisent.

Lorsque les deux protéines fluorescentes sont fusionnées à la protéine p14, les fluorescences sont colocalisées dans le cytoplasme et dans le nucléole (**figure III.4C superposition**).

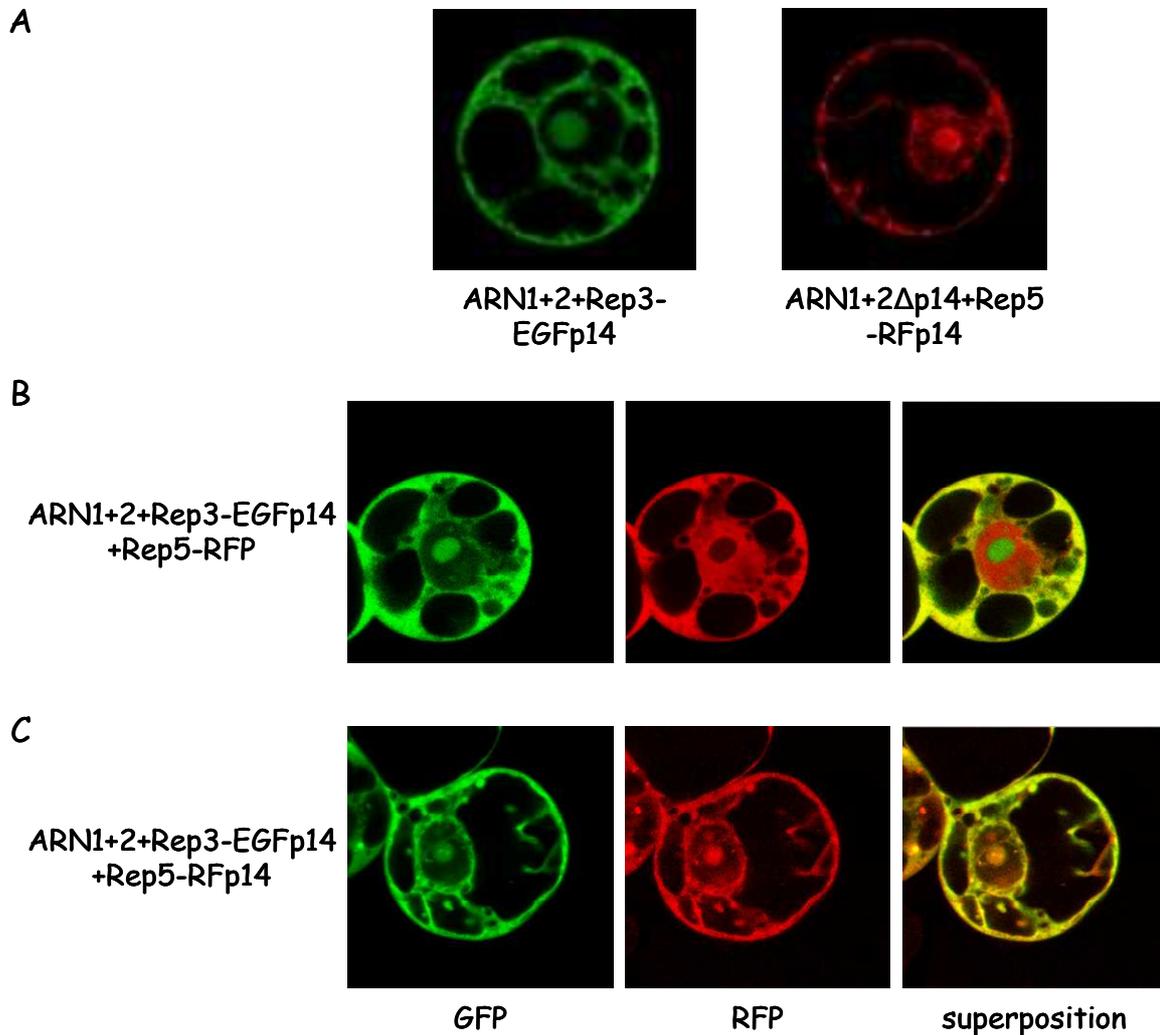


Figure III.4 : Localisation subcellulaire des protéines de fusion EGFp14 ou RFp14 et de la protéine RFP libre. Des protoplastes de BY-2 ont été infectés par les ARN viraux (ARN1+2 ou ARN1+2Δp14) en présence de différentes combinaisons de transcrits permettant l'expression de la RFP libre (Rep5-RFP), des protéines de fusion entre p14 et EGFP (Rep3-EGFp14) ou entre p14 et RFP (Rep5-RFp14). Notons que la RFp14 complète l'absence de la protéine p14 sauvage (A2) et qu'elle se localise dans le cytoplasme et le nucléole tout comme la EGFp14 (A1). En (B) la localisation nucléaire et nucléolaire entre, respectivement, la RFP libre et la EGFp14, reste bien distincte (superposition), alors que leur colocalisation est parfaite au niveau du cytoplasme (jaune orangé, superposition). En (C) la colocalisation est parfaite quelque soit le compartiment pour les deux protéines EGFp14 et RFp14.

2. Immunomarquage en microscopie électronique

Afin de confirmer sans ambiguïté la localisation nucléolaire de la protéine p14, nous l'avons immunolocalisée à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine p14 et avons visualisé sa présence en microscopie électronique sur coupes de cellules de *C. quinoa* infectées par le virus sauvage. Comme témoin négatif, nous avons utilisé des plantes saines. Les billes d'or colloïdales couplées aux anticorps secondaires sont visualisées uniquement dans le nucléole de cellules infectées. Un tel résultat confirme la localisation nucléolaire de la protéine p14 dans les cellules infectées (**figure III.5**).

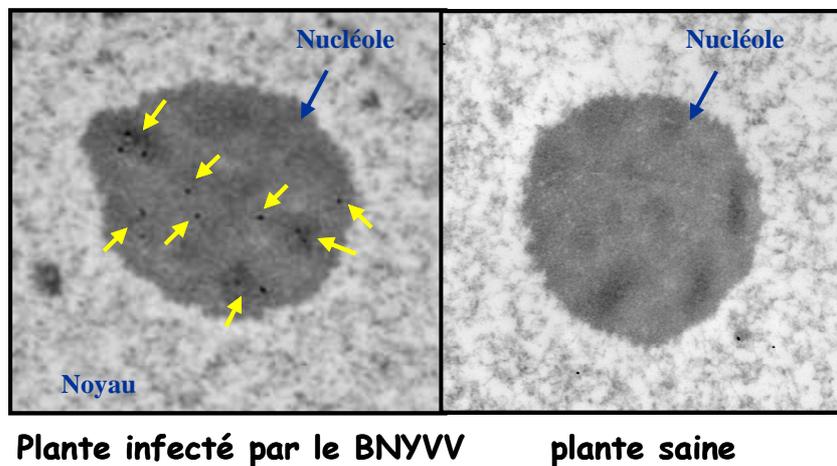


Figure III.5 : Immunodétection de la protéine p14 et observation par microscopie électronique de cellules de *C. quinoa* infectées par le BNYVV. La protéine p14 est localisée dans le nucléole des cellules infectées. La localisation de la protéine p14 est visualisée grâce aux billes d'or colloïdal couplées aux anticorps secondaires (le marquage nucléolaire est pointé par des flèches jaunes). Le témoin sain, traité à l'identique ne présente aucun marquage.

3. Identification d'un signal de localisation nucléolaire (NoLS)

La protéine p14 fusionnée ou pas à une protéine fluorescente se localise dans le nucléole des cellules infectées. Une telle localisation implique donc la reconnaissance d'un signal d'adressage nucléolaire et éventuellement un signal d'export. Nous avons effectué des mutations de délétion dans le gène codant pour la protéine p14 pour localiser la séquence responsable de cet adressage nucléolaire. Ces mutations ont été réalisées dans la construction Rep3-EGFp14 en ciblant la partie N ou C terminale de la protéine (**figure III.6A**) et les transcrits issus des clones recombinants ont été utilisés pour infecter des

protoplastes de cellules BY-2 en présence des ARN1 et 2 viraux. La localisation subcellulaire des protéines fluorescentes a été déterminée par microscopie confocale après 24 h d'infection. La protéine de fusion mutée EGFPp14 Δ N (délétée de sa partie N terminale) se localise dans le cytoplasme, dans le noyau et dans le nucléole (**figure III.6B1**) ; par contre, la protéine mutée délétée de sa partie C terminale EGFPp14 Δ C se localise dans le noyau et dans le cytoplasme mais a perdu sa localisation nucléolaire (**figure III.6B2**).

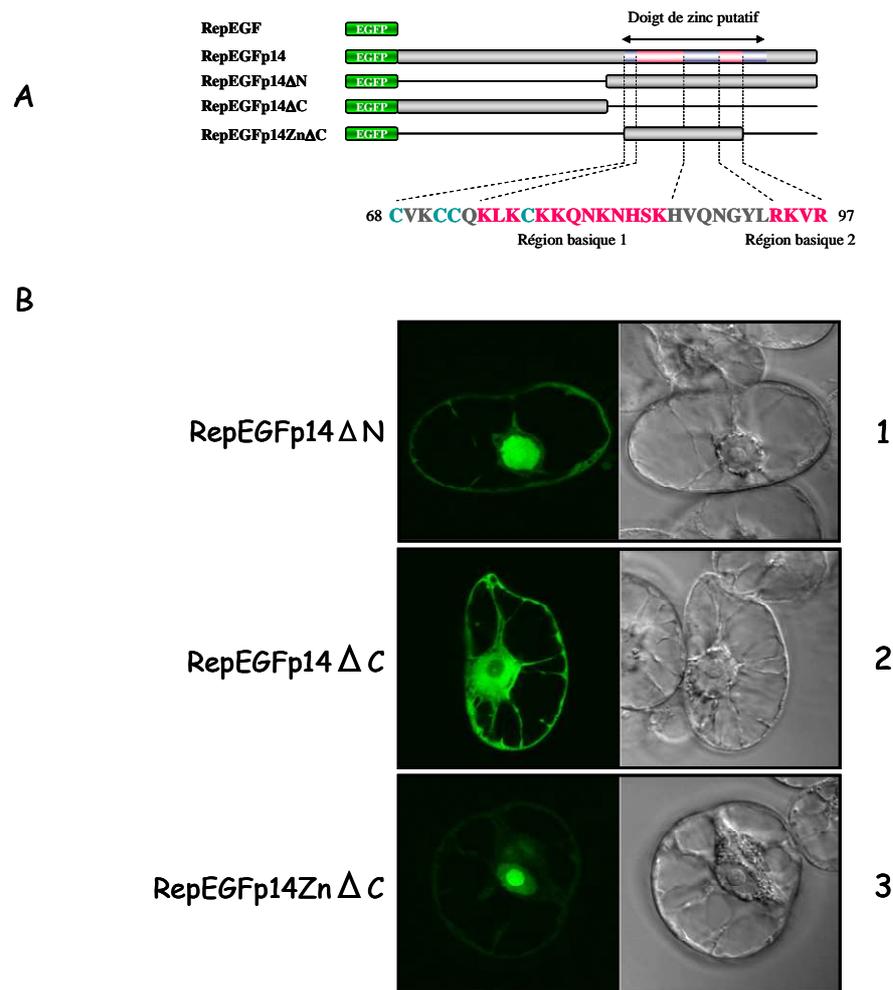


Figure III.6 : Localisation du signal de localisation nucléolaire de la protéine p14. (A) Représentation des protéines p14 sauvage ou mutée fusionnées dans leur partie N-terminale à l'EGFP. La protéine p14 sauvage contient un motif à doigt à zinc renfermant des acides aminés basiques. Les mutations de délétions sur la protéine p14 ciblent ses parties N (EGFP14 Δ N) ou C (EGFP14 Δ C) terminales ou cible les deux parties à la fois N et C terminales (EGFP14Zn Δ C). (B) La localisation subcellulaire des protéines p14 délétées, fluorescentes, a été recherchée par microscopie confocale dans des protoplastes de cellules de BY-2 infectés par des ARN1+2 du BNYVV avec des transcrits de Rep3 exprimant une des protéines de fusion mentionnées en A.

Ces résultats indiquent qu'une séquence localisée dans la partie C terminale de la protéine p14 est responsable de l'adressage nucléolaire de la protéine. Nous avons ensuite précisé la localisation à l'aide de plusieurs mutants et ainsi identifié une séquence d'acides aminés située entre les résidus 68 et 97 qui assure l'adressage nucléolaire de la protéine p14 (**figure III.6A**). Ce signal de localisation nucléolaire (NoLS) possède deux régions basiques et se situe dans la région formant le doigt à zinc de la protéine (**figure III.7**). A elle seule Rep3-EGFp14-Zn Δ C (**figure III.6A**), cette séquence est capable d'adresser l'EGFP dans le nucléole (**figure III.6B3**).

```

      8                                     54
MGMVDSLCVFVGRVITEGSESVEGVERFSIKFSEWKLFTIAVFVEYRELGEKECSLKDAGRLHF
      68 71 72   77                               105 108 109
NVCVKCCQKLKCKQNKNHSKHVQNGYLRKVRNFSILGVCGDCCESFTLADEKPHVIVDPEV*
  
```

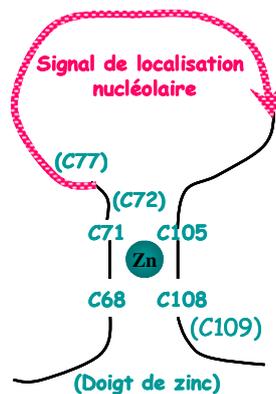


Figure III.7 : Représentation schématique de la séquence en acides aminés de la protéine p14. La séquence responsable de la localisation nucléolaire (rouge) et les cystéines présentes sur la protéine p14 (bleu) sont indiquées. Un schéma du motif doigt à zinc de la protéine p14 est également représenté.

En parallèle à ce travail, il a été montré au laboratoire que les remplacements des cystéines responsables de la formation du doigt à zinc (C68, C71, C105 et C108) par des alanines inhibent la fonction de suppression du PTGS, affectent l'accumulation de la protéine mutée et sa localisation nucléolaire. À l'inverse, les mutations de cystéines présentes à l'extérieur du doigt à zinc n'affectent aucune de ces propriétés de la protéine p14. Ces résultats suggèrent que le doigt à zinc de la protéine p14 est essentiel au maintien de sa stabilité et à son fonctionnement.

i. Mutagenèse de la séquence NoLS de la protéine p14

Pour rechercher l'effet des acides aminés basiques situés dans le motif NoLS sur la localisation de la protéine p14, nous avons remplacé les lysines et les arginines du NoLS par des alanines (doubles et triples mutations) comme indiqué dans le **tableau III.1** et sur la **figure III.8A**. Les gènes mutés ont été ensuite clonés dans le plasmide Rep3 en fusion avec la protéine EGFP.

Tableau III.1 : Synthèse des remplacements d'acides aminés basiques (K/R) par alanine (A) effectués sur la séquence NoLS de la protéine p14.

Construction	Substitution des acides aminés
p14BA1	K ₇₄ A, K ₇₆ A
p14BA2	K ₇₈ A, K ₇₉ A
p14BA3	K ₈₂ A, K ₈₆ A
p14BA4	R ₉₄ A, K ₉₅ A, R ₉₇ A

ii. Rôle des acides aminés basiques de la séquence NoLS dans l'adressage nucléolaire de la protéine p14

Pour rechercher l'incidence des remplacements effectués, des protoplastes de cellules BY-2 ont été infectés par des transcrits des ARN1 et ARN2 supplémentés des transcrits Rep3-EGFp14 mutés (**Tableau III.1**). La localisation des protéines de fusion p14 mutées a été conduite comme décrit précédemment (**figure III.8B**). Les protéines mutées EGFp14BA1 et EGFp14BA4 présentent une localisation nucléo-cytoplasmique identique à celle observée dans le cas de la EGFP libre. La protéine EGFp14BA2 se localise comme la protéine sauvage, c'est-à-dire dans le cytoplasme et dans le nucléole. Enfin, la protéine EGFp14BA3 se localise dans les trois compartiments cellulaires (cytoplasme, noyau et nucléole). Ces localisations illustrent l'importance des résidus K74, K76 et R94, K95, R97 dans l'import nucléolaire de la protéine. Notons également que les résidus K82 et K86 sont partiellement impliqués dans cet import. Par contre, le remplacement des résidus K78 et

K79 n'affecte pas l'adressage nucléolaire. Nous avons entrepris de rechercher une corrélation entre l'adressage nucléolaire et les activités de la protéine p14.

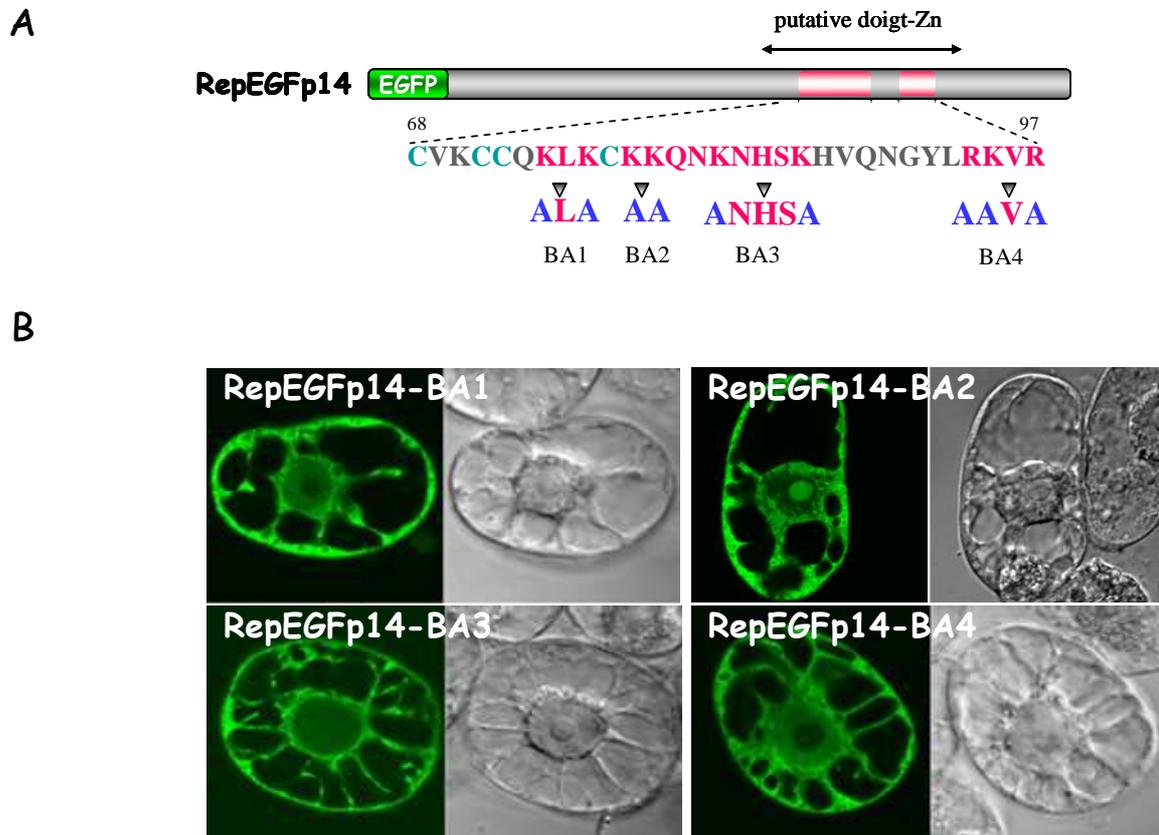


Figure III.8 : Effet des mutations du NoLS de la protéine p14 sur sa localisation subcellulaire. (A) Représentation schématique de la protéine p14, du NoLS et des remplacements d'acides aminés effectués. (B) Observation au microscope confocal des protoplastes de BY-2 (24 h post inoculation) infectés par des ARN1 et 2 du BNYVV additionnés des transcrits Rep3 recombinants permettant l'expression des protéines de fusion mutées : EGFp14BA1, -BA2, -BA3, -BA4.

4. La protéine p14 interagit avec elle même

Les motifs doigt à zinc des protéines interviennent dans des interactions protéine-protéine et/ou protéine-acides nucléiques. Nous avons recherché une éventuelle dimérisation ou multimérisation de la protéine p14, confortée par des observations préliminaires réalisées au laboratoire. En effet, l'immunodétection de la protéine p14 étiquetée avec un motif histidine (p14His), purifiée à partir d'*E. coli*, en utilisant les anticorps dirigés contre la protéine p14 ou contre le motif 6xHis révèle la présence de deux bandes qui représentent probablement une forme monomérique et une autre dimérique de la protéine p14His (figure III.9). L'utilisation des anticorps contre le motif histidine sur des extraits de

protoplastes sains ou infectés par le BNYVV ne révèle aucune bande, par contre l'utilisation des anti-p14 sur les mêmes extraits a permis de détecter deux bandes qui pourraient présenter également les formes monomériques et dimériques de la protéine p14 ainsi que d'autres bandes révélées qui pourraient représenter des complexes cellulaires et viraux renfermant la protéine p14 ou des formes multimétriques de la protéine p14 qui restent stables malgré les conditions dénaturantes (**figure III.9**). Une telle stabilité d'interaction protéine-protéine pour des CRP a déjà été décrite par P. Dunoyer (Dunoyer *et al.*, 2002). Ces observations nous ont encouragés à tester la capacité de la protéine p14 à interagir avec elle-même *in vivo*. Pour cela, nous avons choisi l'approche de double hybride de levure pour tester la dimérisation de la protéine. Nous avons donc cloné la séquence codant pour la protéine p14 en fusion avec le domaine d'activation de la transcription de GAL4 dans le vecteur pGADT7. La même séquence a été également clonée en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN de GAL4 dans le vecteur navette pGBKT7.

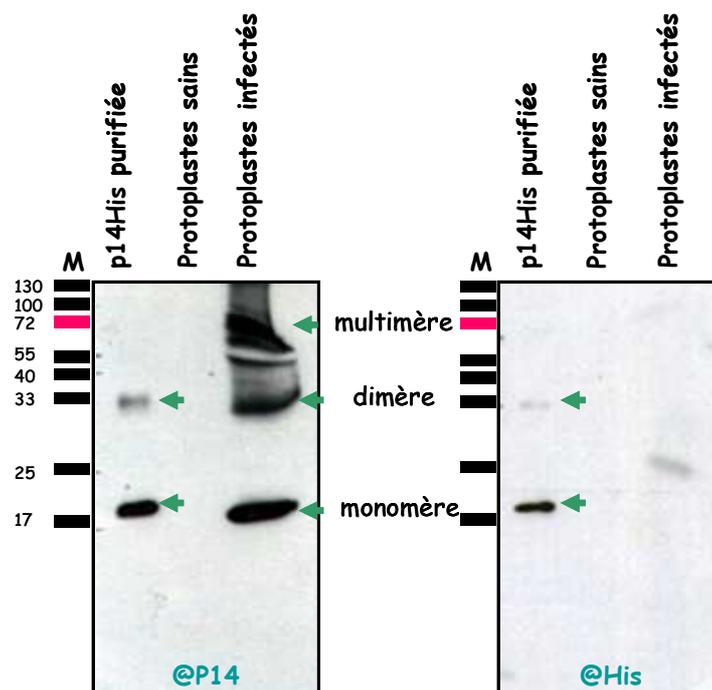


Figure III.9 : Immunodétection de la protéine p14 étiquetée avec un motif histidine, purifiée à partir de bactéries recombinantes ou de la protéine p14 extraite de protoplastes (BY-2) infectés par le BNYVV à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le motif histidine (@His) ou polyclonaux contre la protéine p14 (@p14). Les protéines révélées correspondent vraisemblablement aux monomères, dimères et multimères de la protéine p14.

i. Analyse de la multimérisation de la protéine p14 *in vivo* par système double hybride

Nous avons appliqué la méthode du double hybride décrite dans les deux premiers chapitres pour rechercher si la protéine p14 interagissait avec elle-même, et pour analyser le comportement de mutants. Pour cela, nous avons utilisé une approche de mating entre la souche HF7C transformée par le vecteur pGBKT7 vide ou exprimant la protéine de fusion BD-p14 et la souche Y187 transformée par le vecteur pGADT7 exprimant ou non la protéine de fusion AD-p14. Les levures diploïdes ont été sélectionnées sur milieu dépourvu des acides aminés tryptophane et leucine (**figure III.10A**) et leur prototrophie à l'histidine a été analysée. Seules les levures exprimant les protéines p14 fusionnées à chacun des domaines de GAL4 sont capables de croître, révélant l'existence d'interaction de la protéine p14 avec elle-même (**figure III.10A**). L'expression des protéines de fusion a été confirmée dans les levures recombinantes (**figure III.10B**).

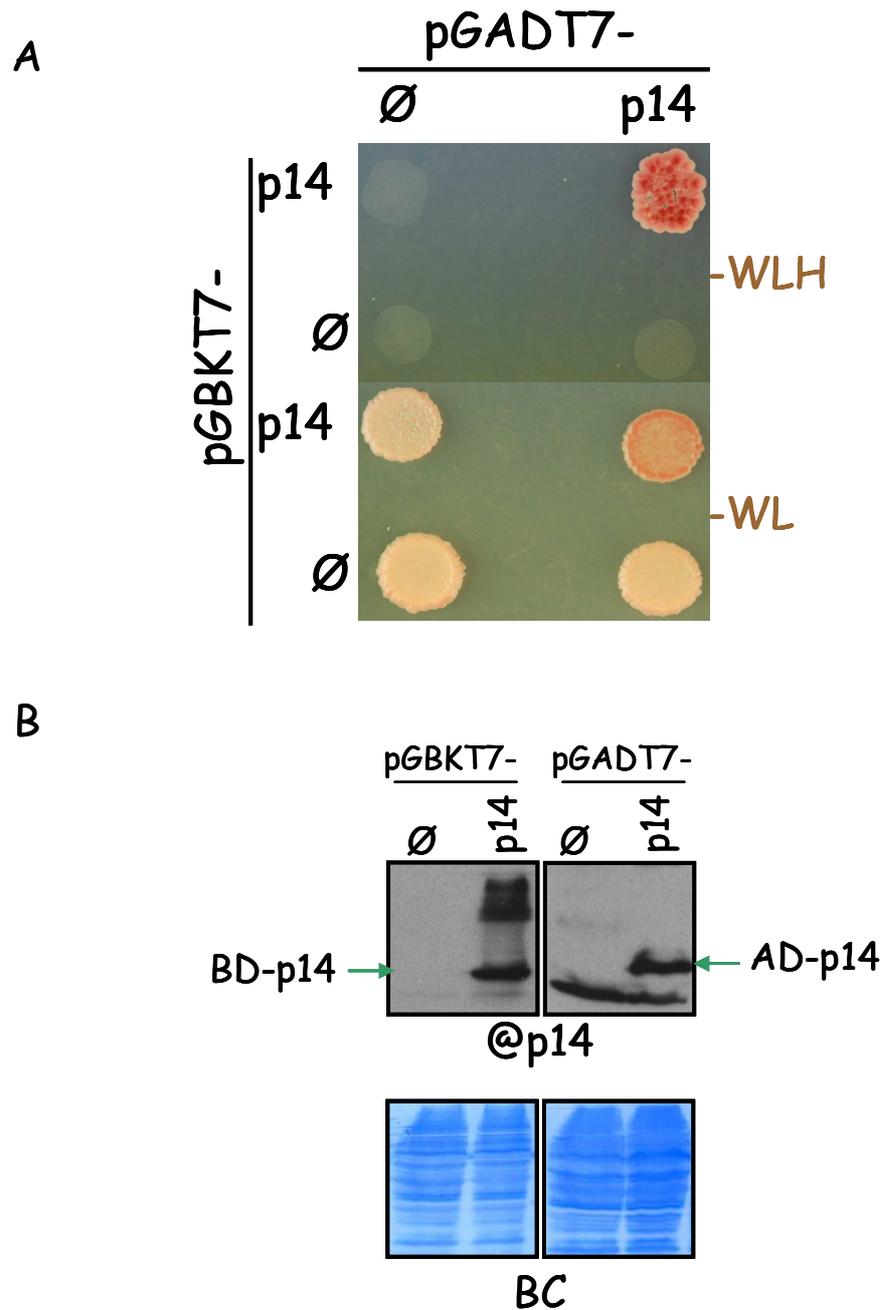


Figure III.10 : Interaction de la protéine p14 avec elle-même dans un système de double hybride de levures. (A) Les levures diploïdes sont sélectionnées par leur croissance sur un milieu ne contenant pas le tryptophane ni la leucine (-WL) et ensuite sur un autre dépourvu en histidine (SD-WLH). Le facteur de transcription GAL4 reconstitué grâce à l'interaction des protéines p14 active la transcription du gène rapporteur *His3* et rend les levures prototrophes vis-à-vis de l'histidine. (B) Immunodétection des protéines p14 par des anti-p14 à partir d'extrait de levures transformées par un des vecteurs utilisés dans ce système. BC, représente la coloration par bleu de Coomassie des protéines totales transférées sur membrane.

ii. Effet de mutations de la protéine p14 sur sa capacité de dimérisation

La même approche a été effectuée sur les mutants NoLS de la protéine p14. L'interaction entre les protéines a été recherchée par la croissance de levures sur milieu dépourvu de tryptophane, de leucine et d'histidine. La **figure III.11A** présente les résultats du test où nous avons retrouvé l'oligomérisation de la protéine p14. La mutation BA2 est la seule mutation qui n'influence pas la capacité de la protéine à multimériser avec elle-même ou avec la protéine p14 sauvage dans les deux directions testées. Toutefois, la protéine mutée p14BA3 interagit très faiblement avec la protéine p14 sauvage et avec la protéine mutée p14BA2, mais elle est incapable de former un dimère avec elle-même. Les autres protéines mutées n'interagissent ni entre elles ni avec la protéine p14 sauvage. L'immunodétection des protéines p14 dans les extraits totaux de levures a permis de révéler toutes les protéines mutées à l'exception de la protéine délétée de la séquence NoLS lorsqu'elle est exprimée par le vecteur pGBKT7 (**figure III.11B**). Par contre, cette protéine délétée est détectée par western blot effectué sur des extraits de levures transformées par le vecteur pGADT7-p14 Δ NoLS (**figure III.11B**). Mis à part la protéine BD-p14 Δ NoLS, les résultats des analyses des westerns blots nous confirment une bonne expression et stabilité de ces protéines recombinantes. Ces résultats, combinés aux résultats de localisation subcellulaire, nous permettent de corréler la localisation nucléolaire de la protéine p14 à sa capacité à interagir avec elle-même. En effet, la dimérisation ou la multimérisation de la protéine p14 semble être requise pour l'import nucléolaire de la protéine. Cette localisation semble également nécessaire pour la fonction de suppression de RNA silencing (voir plus loin).

A côté des particularités de la protéine p14 à agir comme un suppresseur du mécanisme de RNA silencing et à se localiser dans le nucléole sous la forme d'un dimère, nous avons également mis en évidence une interaction spécifique entre cette protéine et une séquence d'ARN non codante de l'ARN3 qui se comporte à son tour comme un ARN génomique viral particulier.

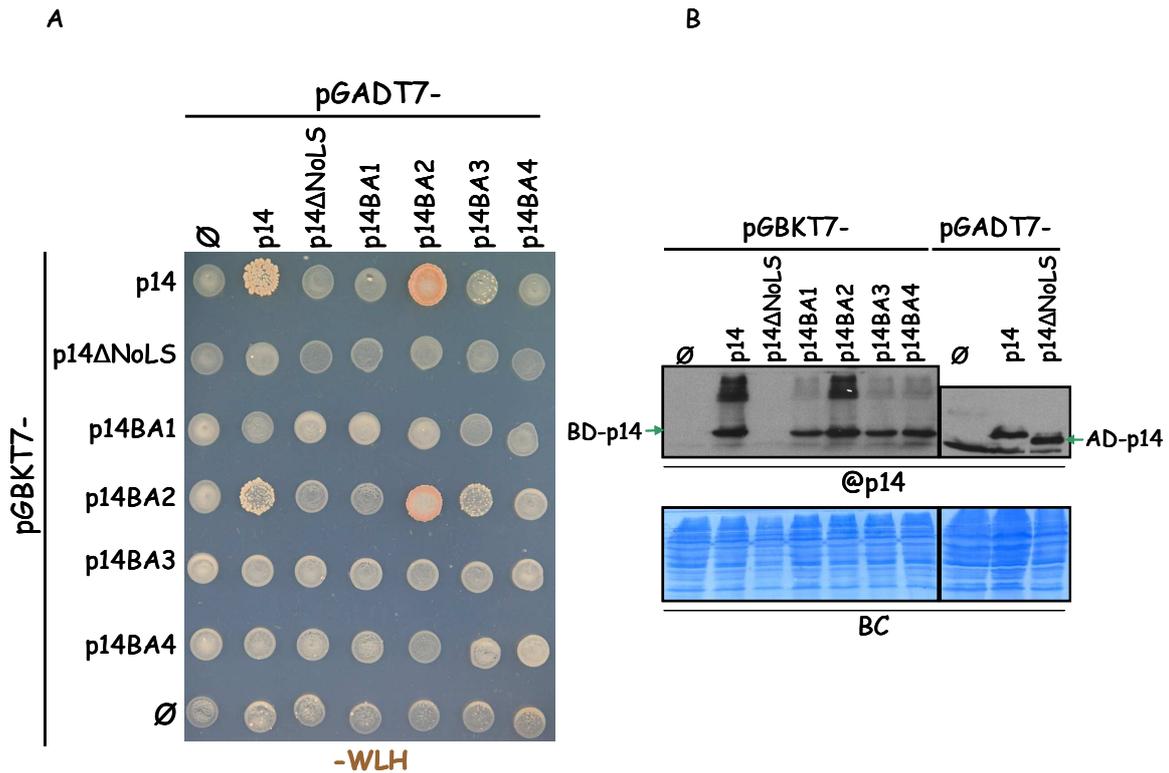


Figure III.11 : Effet des mutations du NoLS de la protéine p14 sur ses capacités d'interaction en système double hybride. (A) Les levures diploïdes sont sélectionnées pour leur prototrophie vis-à-vis de l'histidine (-WLH) induite par la formation du facteur de transcription GAL4 par l'interaction entre les deux partenaires. (B) Analyse par western blot de la présence des protéines p14 sauvages ou mutées (@p14), les protéines totales transférées sur membrane sont ainsi colorées par le bleu de coomassie (BC).

III. Particularités de l'ARN3 du BNYVV

1. Particularités

L'ARN3 du BNYVV possède trois cadres de lecture : le facteur de virulence et d'avirulence, la protéine p25, est exprimé par le premier ORF alors que les deux autres codent potentiellement pour les protéines p6,8 (N) et p4,6 (S) qui n'ont jamais été détectées *in vivo* et *in vitro* (**figure III.12B**). L'expression de la protéine N par un vecteur d'expression induit des nécroses, ce qui suggère l'absence ou la faible expression de cette protéine pendant l'infection virale (Jupin *et al.*, 1992). Par contre, la protéine S n'est probablement pas exprimée puisque l'introduction d'un codon stop prématuré n'affecte pas les symptômes ni l'infection systémique par le virus (Lauber *et al.*, 1998a). Si l'ARN3 n'est pas indispensable à la multiplication virale dans les protoplastes ou sur feuilles de *C.*

quinoa (hôte à lésions locales), il est indispensable à l'infection systémique chez *B. macrocarpa* (hôte à infection généralisée) et à l'établissement de la rhizomanie dans les infections naturelles de *B. vulgaris* [pour revue voir revue (Hleibieh *et al.*, 2007; Peltier *et al.*, 2008)].

2. La séquence coremin

Il a déjà été montré que le mouvement du BNYVV à longue distance est indépendant de la protéine p25 ou des deux autres protéines potentiellement codées par l'ARN3. Cependant, ce mouvement est dépendant de la séquence nucléotidique de l'ARN3 viral, et plus précisément de la séquence core (1003 à 1266) (Lauber *et al.*, 1998a). Nous avons effectué un test de complémentation fonctionnel entre les deux *Benyvirus* BNYVV et BSBMV (*Beet soil-borne mosaic virus*). En effet, des transcrits des ARN1 et 2 du BNYVV avec des transcrits de l'ARN3 du BSBMV ont été co-inoculés sur des plantes *Beta macrocarpa*. Nous avons montré que le BNYVV permet la réplication et l'encapsidation de l'ARN3 du BSBMV. L'ARN3 de BSBMV complète à 70 % le mouvement à longue distance du BNYVV (**figure III.12A**) (Ratti, Hleibieh *et al.*, 2009, annexé dans cette thèse). En plus des extrémités 5' et 3' structurellement comparables, l'ARN3 du BSBMV et du BNYVV partagent une séquence de 20 nts qui se retrouve dans la séquence core (1003 à 1266) de l'ARN3 du BNYVV (**figure III.12B**). Nous avons désigné cette petite séquence coremin (Ratti *et al.*, 2009) dont la séquence ribonucléotidique non-traduite est : 5'-GUCCGAAGACGUUAAACUAC-3' et localisée en position 1236 à 1255 de l'ARN3 du BNYVV et 1237 à 1256 de l'ARN3 du BSBMV. Notons, ici, que la séquence nucléotidique de l'ARN3 du BSBMV et sa protéine p29 sont plus proches de la séquence de l'ARN5 du BNYVV et de sa protéine p26 que de l'ARN3. La séquence coremin est située également dans le "promoteur" putatif de l'ARN3sub (1147-1479) du BNYVV (Balmori *et al.*, 1993).

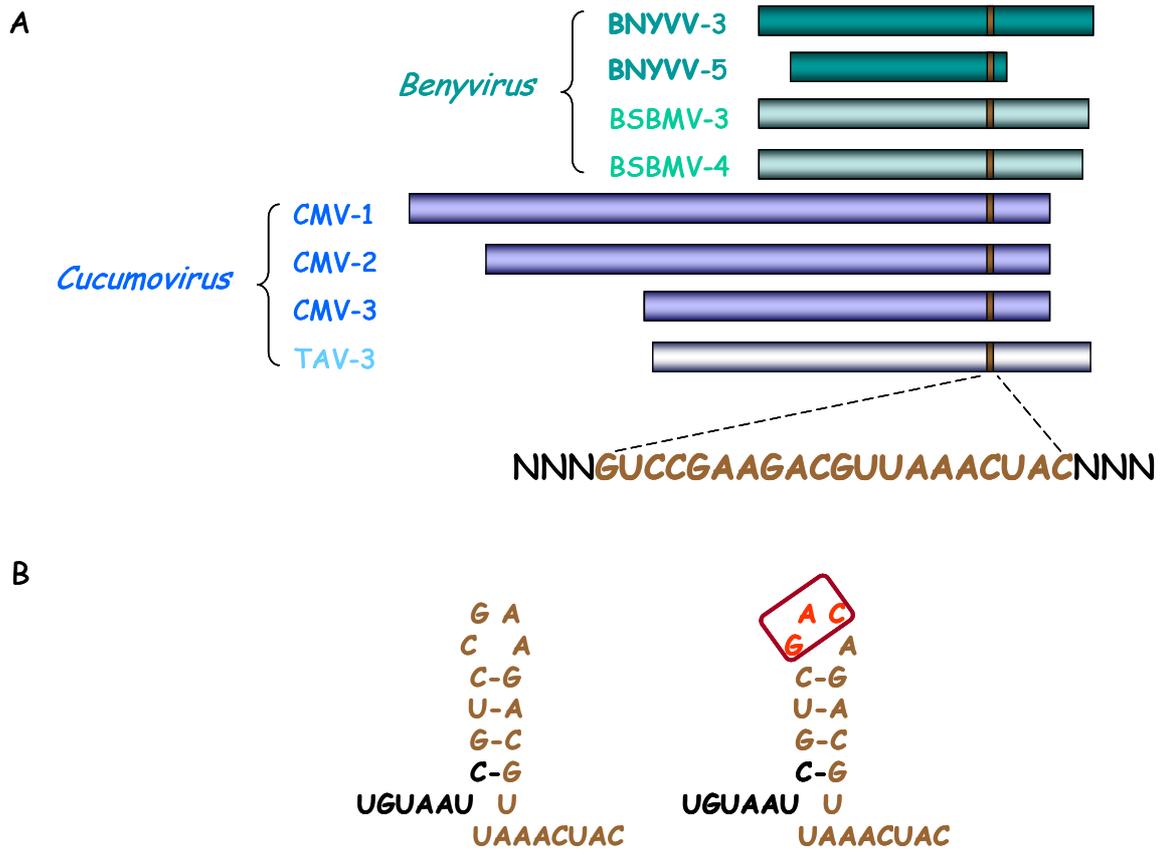


Figure III.13 : Schéma représentant la présence et la conservation de la séquence coremin sur le génome de plusieurs virus (A). (B) Représentation schématique de la structure secondaire formée par la séquence coremin (en brun), proposée par Thompson *et al.*, (2008). Les trois nucléotides remplacés dans la boucle sont indiqués en rouge.

Les études réalisées sur la séquence coremin (appelée box1 chez le CMV) ont montré son implication dans l'accumulation de l'ARN subgénomique non codant appelé ARN5. On peut noter que l'extrémité 5' de ce dernier est située deux nts en amont de la séquence coremin (de Wispelaere and Rao, 2009). De plus, Thompson *et al.*, ont proposé, par une étude structurale et des analyses bioinformatiques, l'existence d'une structure secondaire en tige boucle constituée des 12 premiers nucléotides de box1 (Thompson *et al.*, 2008) (**figure III.13B**). De plus, cette étude a montré qu'une mutation affectant la structure de la séquence coremin retarde l'infection du CMV sur *N. tabacum* et peut influencer la pathogénicité du CMV (Thompson *et al.*, 2008). Il faut souligner que les ARN viraux 1 et 2 du CMV portent deux autres motifs box1 qui peuvent compenser en *trans* l'effet de cette mutation.

Les ARN viraux sont des cibles des ribonucléases qui produisent des ARN tronqués non codants pouvant affecter positivement ou pas le cycle viral. Ce mécanisme de clivage

implique des protéines cellulaires et des facteurs viraux. Parmi les protéines virales impliquées dans un tel mécanisme, on peut citer la protéine de capsid du *Leishmaniavirus* (LRV), un virus à génome ARN double brin qui infecte le protozoaire *Leishmania*. Ce virus produit, *via* une coupure site-spécifique médiée par la protéine CP dans la région 5' non codante, un ARN tronqué de 320 nts (MacBeth and Patterson, 1995a, b). Le RCNMV (*Red clover necrotic mosaic virus*) produit également un ARN non codant de 0,4 KB appelé SRf qui représente la majorité de la séquence 3'UTR de l'ARN1 subgénomique. Ce petit ARN est le produit d'un clivage médié probablement par une protéine cellulaire. Ce mécanisme nécessite une séquence de 58 nts structurée en trois tiges boucles (Iwakawa *et al.*, 2008).

3. Importance de la séquence coremin chez le BNYVV

Dans le cas du BNYVV, l'ARN3sub n'est pas issu d'une néosynthèse d'ARN par la réplicase virale. Les travaux récents effectués au laboratoire par Claire Peltier ont montré que son extrémité 5' correspond à la position 1232 de l'ARN3, que cet ARN3sub n'est pas coiffé et peut être obtenu hors contexte viral. L'ARN3sub est le résultat d'un clivage et d'une dégradation de l'ARN3. La position 1232 est située deux nts en amont de la séquence coremin. Par une approche de mutagenèse dirigée, Claire Peltier a montré que la séquence coremin stabilise l'ARN3sub *in vivo* et est essentielle au mouvement à longue distance du BNYVV sur *B. macrocarpa*. En effet, une substitution de 3 nts dans la séquence coremin (**figure III.13B, en rouge**) est suffisante pour inhiber l'accumulation du produit de clivage et par conséquent l'infection systémique. Ces travaux ont également révélé l'influence de la séquence coremin sur la traduction de la protéine p25 [(Peltier, 2010), Thèse de doctorat, UdS ; manuscrit en préparation].

Toutes ces données associées aux résultats de l'expérience de Co-IP de la protéine p25 avec ses partenaires viraux et cellulaires (chapitre II) nous ont amenés à suspecter la formation d'un complexe entre la séquence coremin de l'ARN3 et des protéines cellulaires ou virales. Cette partie sera consacrée à la recherche des protéines interagissant avec la séquence coremin et la recherche du rôle de l'interaction dans l'infection virale.

IV. Recherche des partenaires de la séquence coremin

1. Approche *in vivo* par la technique triple hybride de levure

i. Recherche des partenaires viraux de la séquence coremin

Si l'ARN3 est totalement dégradé lorsqu'il est exprimé de manière ectopique, ce n'est pas le cas en contexte viral. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une protéine virale reconnaît spécifiquement la séquence coremin pour la stabiliser. J'ai ainsi recherché les protéines virales interagissant avec la séquence coremin en utilisant un test d'interaction dit "triple hybride" de levure. Ce test repose globalement sur le même principe que le test double hybride utilisé couramment dans les travaux de cette thèse, mais fait appel à un ARN pour joindre les deux moitiés du facteur de transcription. Dans ce test, la protéine à tester est exprimée en fusion avec le domaine d'activation de la transcription, c'est à dire *via* le vecteur pGAD et l'ARN cible est produit sous forme d'un ARN chimère produit sous contrôle d'un promoteur Pol III à partir du plasmide pIIIMS2 (Jaeger *et al.*, 2004)(voir matériel et méthodes, **Figure MM.4**). Le domaine de fixation à l'ADN est apporté par la protéine LexA qui est fusionnée à la protéine de capsid du bactériophage MS2. Cette construction LexA-CPMS2 est intégrée au génome de la levure. La protéine CP de MS2 reconnaît spécifiquement une séquence tige boucle présente sur l'ARN chimérique produit à partir du vecteur pIIIMS2.1 recombinant. Cet ARN possède en plus de la tige boucle MS2, la séquence d'ARN dont on veut tester l'interaction avec la protéine fusionnée au domaine d'activation AD. S'il y a une reconnaissance entre la protéine et la séquence ARN, un facteur de transcription chimérique reconstitué va induire l'expression de gène rapporteur (*HIS*) et permettre la croissance des levures sur un milieu sélectif. Pour réaliser ce test, nous avons cloné séparément soit la séquence coremin de 20 nts, soit deux copies de cette séquence (coremin x2) ou encore la séquence complémentaire inversée nommée nimeroc dans le vecteur pIIIMS2.1. Après la vérification par séquençage, j'ai réalisé une analyse par northern blot sur des extraits de levures transformées par le vecteur pIIIMS2.1 vide ou par une des trois constructions afin de vérifier la présence des séquences clonées. L'utilisation d'une sonde qui cible une partie du vecteur pIIIMS2.1 a permis de visualiser des bandes de tailles dépendantes de la

séquence clonée (**figure III.14A**). Dans ce système, les séquences coremin, coremin x2 ou nimeroc exprimées par le vecteur pIIIMS2.1 sont utilisées comme appât, toutes les protéines virales codées par le BNYVV sont utilisées comme proies et sont exprimées par les vecteurs pACT2, pGADT7 ou pGAD424. J'ai effectué cette expérience en utilisant une approche de mating entre deux souches de levures. La souche L40 coat de type sexuel *MATa* qui code pour la protéine de capsid du MS2 a été transformée par les vecteur pIIIMS2.1 recombinants et la souche Y187 de type sexuel *MAT α* a été transformée par l'un des vecteurs pACT (HBP, p13, p15 ou p42), pPGAD424 (p25, p26, p21 ou p75) ou pGADT7 (p14 ou p31) recombinants. Après mating, les levures diploïdes renfermant les vecteurs pIIIMS2 recombinants ont été sélectionnées (non montré) puis repiquées en quantités identiques sur un milieu sélectif dépourvu d'histidine (-ULH) et en absence ou en présence du compétiteur de l'histidine 3AT à des concentrations variant de 3 mM à 15 mM. Après trois jours de culture, les croissances sont évaluées sur ces boîtes de sélection. Dans ce test, j'ai utilisé comme contrôle positif des levures exprimant la séquence ribonucléotidique MS2-WT interagissant avec la protéine d'histone humaine HBP (hairpin-binding protein) décrit par Jaeger (Jaeger *et al.*, 2004). Parmi les neuf protéines du BNYVV testées, seule la protéine p14 (le suppresseur de silencing) est capable d'interagir avec la séquence coremin et coremin x2 (**figure III.14B**) puisque les levures sont capable de croitre sur milieu (-ULH). Cette interaction est forte puisqu'elle est retrouvée en conditions très stringentes jusqu'à 15 mM de 3AT (non montré). Cette interaction est spécifique, puisqu'aucune croissance de levures n'est observée en présence de vecteur pIIIMS2.1 vide, pIIIMS2-WT ou pIIIMS2nimeroc.

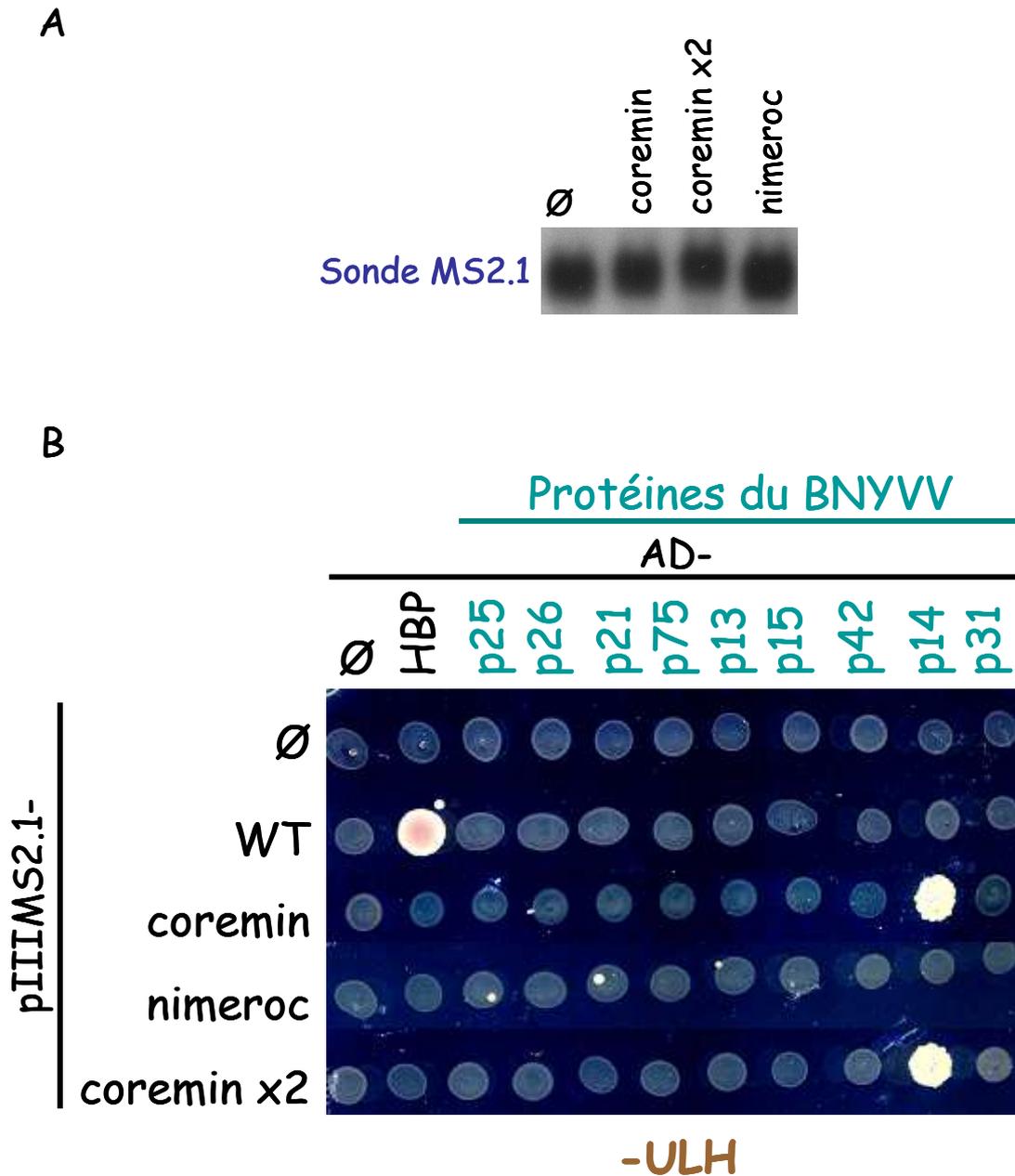


Figure III.14 : Recherche des protéines du BNYVV interagissant avec la séquence coremin. (A) Analyse par northern blot des ARN extraits de levures transformées par le vecteur pIIIMS2.1 vide ou recombinant en utilisant une sonde qui reconnaît le vecteur pIIIM2.1. Nimeroc correspond à la séquence complémentaire inversée de coremin. (B) Recherche par une technique de triple hybride de levure, par mating entre deux souche (L40 coat et Y187), des protéines virales capables d'interagir avec la séquence coremin. La séquence nimeroc, tout comme les vecteurs vides, sont utilisés comme témoins négatifs dans cette expérience. MS2-WT est la construction ribonucléotidique interagissant avec la protéine HBP. Ces deux partenaires constituent le témoin positif (Jaeger *et al.*, 2004). Les levures sont cultivées sur un milieu dépourvu d'histidine et contenant différentes concentrations de 3-amino-triazole. La croissance traduit l'interaction entre la protéine testée et la séquence d'ARN hybride.

Afin de confirmer ce résultat et estimer de manière plus fine la force de l'interaction, j'ai reproduit ce test de mating entre les levures L40 coat et Y187, transformées par les constructions pIIIMS2, et exprimant la protéine de fusion AD-p14, en présence de concentrations croissantes de 3AT allant de 10 mM à 200 mM. Les cultures ont été réalisées en présence ou pas de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranoside (X- α -gal), un substrat de l' α -galactosidase (*MEL1*), qui constitue également un gène rapporteur dans la levure (Aho *et al.*, 1997). Le clivage du substrat libère un produit qui donne une coloration bleue aux levures exprimant les partenaires interagissant. Les résultats obtenus sont présentés sur **la figure III.15**. Le dépôt de quantités variables de levures sur milieu sélectif permet de visualiser une croissance en présence d'un inoculum faible, jusqu'à 60 mM 3AT, qui reflète l'interaction spécifique entre la séquence coremin et la protéine p14. Cette interaction est environ trois fois moins forte que celle du contrôle positif. L'utilisation de X- α -gal dans le milieu permet d'évaluer qualitativement le taux d'expression de *MEL1* en fonction de l'intensité de coloration des colonies de levures.

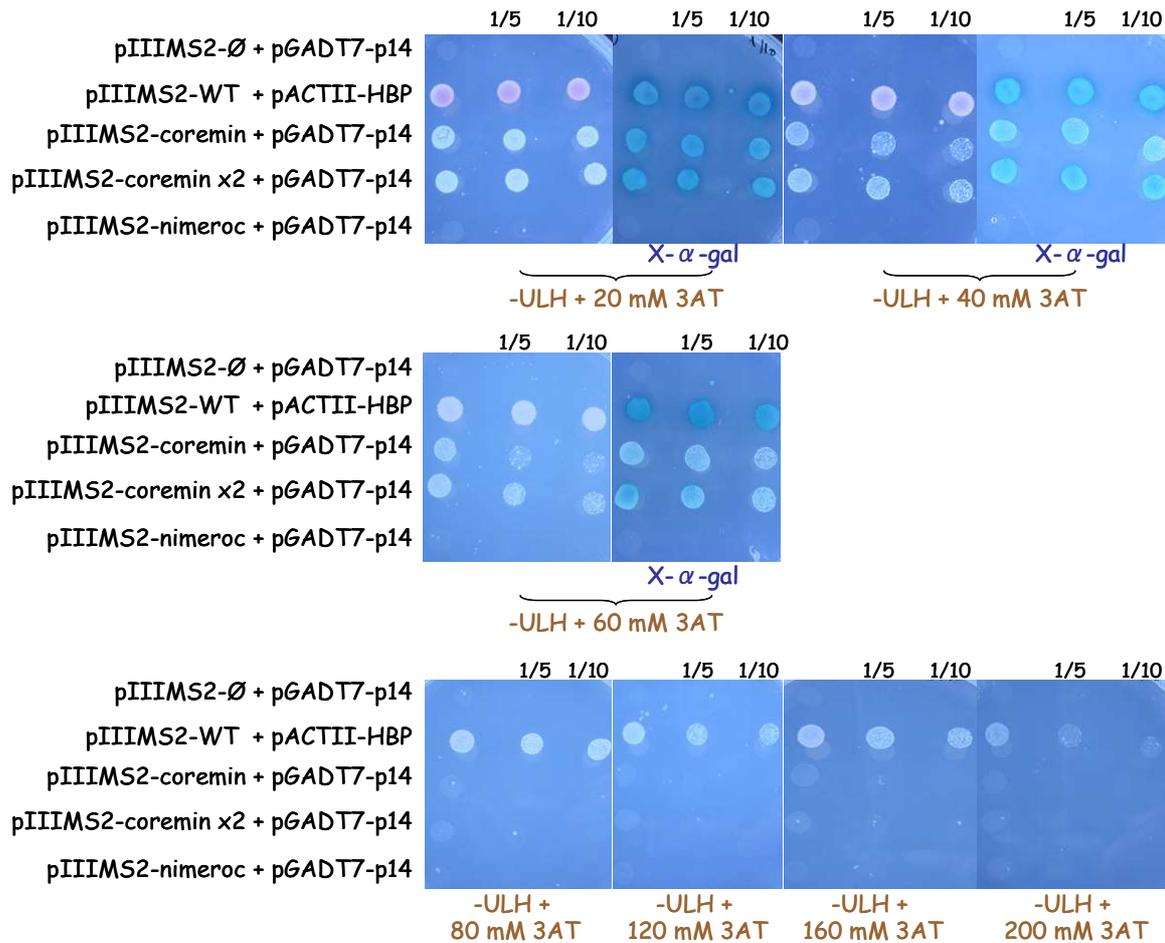


Figure III.15 : Analyse par système de triple hybride de levure de l'interaction entre la protéine p14 et la séquence coremin du BNYVV. Les levures diploïdes ont été déposées (sans ou avec dilution 1/5 ou 1/10) sur milieu dépourvu en uracile, leucine et histidine (-ULH), en présence ou en absence de X- α -gal avec des concentrations croissantes de 3 amino-triazole (3AT) (0 à 200 mM). On observe la croissance des levures jusqu'à une concentration très stringente de 60 mM en 3AT ainsi qu'une coloration bleue en présence de X- α -gal. Les témoins négatifs et positifs sont les mêmes que ceux utilisés précédemment, ainsi le témoin positif permet la croissance de levures jusqu'à 200mM de 3AT.

ii. Recherche des partenaires cellulaires de la séquence coremin

En parallèle à la recherche des partenaires viraux de la séquence coremin, j'ai réalisé un criblage d'une banque d'ADNc de betterave résistante et infectée par le BNYVV pour rechercher des protéines capables de lier la séquence coremin. La banque d'ADNc utilisée a été réalisée dans le vecteur pJG4-5 et exprimée dans la souche de levures EGY48 de signe sexuel *MAT α* . J'ai donc transformé la souche L40 coat de *MAT α* par la construction pIIIMS2.1-Coremin ; j'ai ensuite effectué un mating entre les deux souches avant de sélectionner des diploïdes sur milieu -UWH en présence de 5 mM de 3AT.

Environ 6000 colonies ont été obtenues et repiquées sur milieu -UWH en présence de 75 mM ou 100 mM 3AT, concentration qui m'ont permis de sélectionner 171 et 145 colonies respectivement. J'ai poursuivi l'étude avec les 145 colonies en réalisant une extraction de l'ADN plasmidique de levure et le sauvetage de plasmides par transformation d'*E. coli* souche KC8. 84 clones ont été obtenus et leurs plasmides séquencés. Ces plasmides ont été réintroduits dans la souche Y187 (*MAT α*) qui a été conjuguée avec la levure L40 coat exprimant l'ARN MS2-Coremin. Nous avons observé une croissance de levures sur le milieu (-UWL) dans toutes les combinaisons, même avec les vecteurs vides. En revanche, nous n'avons observé aucune croissance en présence de 3AT à 3 mM. Un tel résultat s'explique par l'incompatibilité de certaines souches double hybride avec la souche L40 coat. J'ai dû procéder à une nouvelle étude de l'interaction en utilisant une nouvelle souche de levure destinée au système triple hybride, la souche YBZ-1, qui est plus sensible que la souche L40 coat car elle exprime constitutivement la protéine LexA fusionnée à un dimère de CP du phage MS2 liés par une séquence adaptatrice (Bernstein *et al.*, 2002).

Une telle souche a été transformée par le vecteur pIIIMS2-Coremin puis par les 84 clones candidats à tester. Parmi ces candidats, seulement trois clones (dont deux identiques) ont été sélectionnés sur milieu puis testés pour leur spécificité d'interaction. Pour cela, j'ai transformé les levures YBZ-1 par les vecteurs pIIIMS2.1 vide, nimeroc et coremin ainsi que les plasmides contenant les gènes candidats de betterave, et analysé la croissance en présence de 3AT. Après quatre jours, la croissance des levures a été analysée et les résultats sont présentés sur la **figure III.16**. J'ai pu ainsi constater que les candidats étaient capables d'interagir avec la séquence coremin et nimeroc et faiblement avec la séquence d'ARN produite par le vecteur vide. Si une interaction entre les candidats et les séquences virales sens et antisens est encore visible à 20mM 3AT, aucune interaction n'est détectée avec le vecteur vide (pIIIMS2.1- \emptyset). L'analyse de la séquence de ces deux candidats révèle une homologie avec des protéines de la famille TCP (TCP9, TCP19,...) qui représente une famille de facteurs de transcription. A ce stade, nous ne pouvons pas conclure si ces protéines représentent vraiment des partenaires de la séquence virale. Des tests complémentaires doivent être effectués en recherchant l'incidence de la protéine p14 sur cette interaction. Quoiqu'il en soit, il sera intéressant de refaire un criblage de banque en transformant la souche YBZ-1 renfermant le plasmide pIIIMS2.1-coremin par l'ADN plasmidique de la banque.

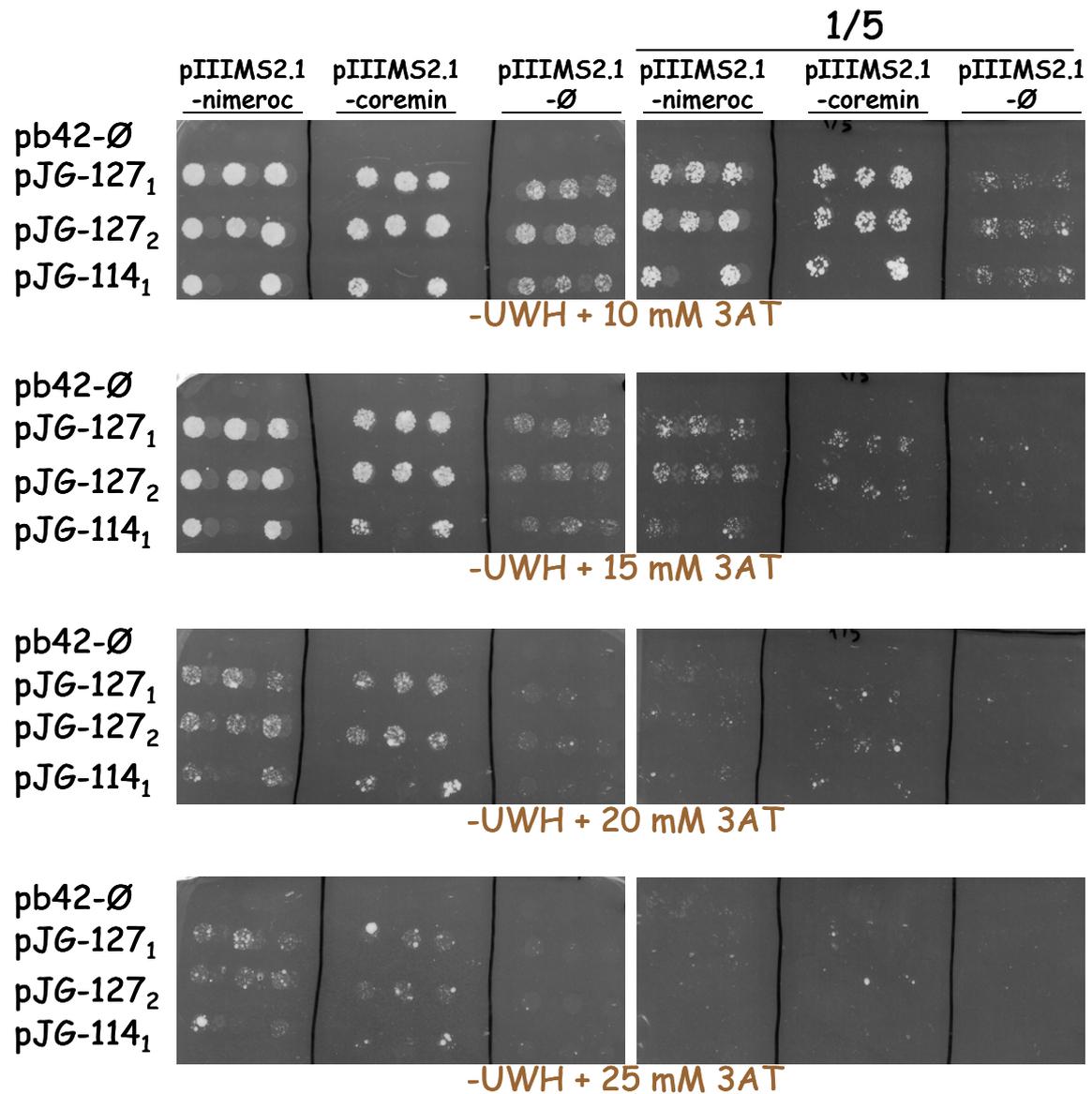


Figure III.16 : Recherche des protéines cellulaire interagissant avec la séquence coremin par un criblage de triple hybride d'une banque d'ADNc de betterave résistante et infectée. Après le criblage et le séquençage, nous avons effectué ce test afin de confirmer l'interaction entre les trois candidats obtenus 127₁, 127₂ et 114₁, dont 127₁ et 127₂ sont les mêmes. Ce test a été réalisé en co-transformant la souche de levure YBZ-1 par le vecteur pJG4-5 exprimant un de ces trois candidats ou par le vecteur vide pb42 (pb42-Ø ou pJG4-5-Ø) avec le vecteur pIIIMS2.1 vide ou exprimant la séquence coremin YEAR>1998</YEAR><TITLE>The ubiquitin system</TITLE><PAGES>425-79</PAGES><AUTHOR_ADDRESS>Unit of Biochemistry, Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.entrations croissantes de 3AT. L'interaction a été évaluée par la croissance de levures après quatre jours.

Compte tenu du comportement des levures diploïdes L40 coat-EGY48, j'ai préféré tester l'interaction entre la séquence coremin et les protéines virales dans deux souches spécialisées, la souche YBZ-1 transformée par les vecteurs pIIIMS2.1 et une souche de levure compatible en mating, la souche R40 coat de signe sexuel *MAT α* et de génotype identique à L40 coat, transformée par les vecteurs exprimant les protéines virales.

Cette analyse effectuée à l'aide de souches dédiées au triple hybride a conforté notre première analyse, car seule une interaction entre la protéine p14 et la séquence coremin est observée (**figure III.17A**). La sensibilité du test permet également de déceler une interaction non spécifique entre la protéine p14, l'ARN viral antisens (nimeroc) et l'ARN produit à partir du vecteur pIIIMS2.1-Ø. Toutefois, aucune interaction n'est observée avec le vecteur pIIIMS2-Wt. Si les levures exprimant le témoin positif utilisé précédemment ont pu croître dans ce test jusqu'à des teneurs en 3AT de 40 mM (non montré), les levures exprimant les partenaires p14 et coremin se sont multipliées en présence de 3AT jusqu'à 10 mM (**figure III.17B**) voire 15 mM 3AT dans le milieu (non montré).

En résumé, nous avons mis en évidence, en utilisant des approches de triple hybride de levure, la reconnaissance spécifique entre le suppresseur de PTGS et la séquence coremin portée par l'ARN3 du BNYVV.

Nous avons cherché si cette spécificité d'interaction entre la séquence coremin et la protéine p14 est également retrouvée *in vitro*.

2. Etude de l'interaction entre la séquence coremin et la protéine p14 *in vitro*

Les limites de l'étude de l'interaction protéine ARN par triple hybride sont liées à l'utilisation de l'ARN polymérase III pour produire le linker. En effet, la succession de quatre adénines sur le brin matrice d'ADN conduit à l'incorporation de 4 uridines qui constitue un signal d'arrêt de la transcription. Nous n'avons donc pas pu étudier des séquences d'ARN plus longues. C'est pourquoi, pour confirmer l'interaction entre la protéine p14 et la séquence d'ARN coremin, j'ai utilisé des approches biochimiques et purifié la protéine p14 à partir de bactéries recombinantes. Des bactéries de souche BL21 ont été électrotransformées par un plasmide pET contenant la séquence de la protéine p14 fusionnée à une séquence codant pour un motif 6 histidines (6His) en C terminal. Après culture, induction et extraction des protéines bactériennes, nous avons purifié notre protéine d'intérêt sur une colonne Ni-NTA, grâce à l'étiquette 6His.

En utilisant cette protéine purifiée, j'ai effectué des expériences de gel retard, UV cross-linking, northwestern (non montré) et filtration sur cellulose (non montré).

i. Approche par gel retard

Cette technique consiste à incuber l'ARN radiomarqués avec la protéine d'intérêt native purifiée ou présente dans un extrait protéique. Les complexes potentiellement formés par des partenaires d'interaction sont séparés de l'ARN non lié par migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide ou d'agarose non dénaturant.

Nous avons utilisé tout d'abord une séquence oligoribonucléotidique radiomarquée correspondant à la séquence coremin. Dans ce test, nous avons utilisé le sérum albumine bovine (BSA) et des quantités croissantes de la protéine purifiée p14His (0,5 ; 1 et 3 μ g). Les milieux réactionnels contenant les complexes potentiels ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 10 % non dénaturant. Cette approche m'a permis de confirmer que la protéine p14 interagissait avec l'ARN *in vitro*, comme le montre la formation des complexes observés en présence de la protéine p14 purifiée (**figure III.18**). Ces complexes visualisés par le retard de migration de la séquence coremin ne sont pas présents dans la piste contenant de la BSA ou la sonde seule (\emptyset). En l'absence d'un témoin constitué d'un

extrait bactérien incubé avec la sonde, nous ne pouvons pas écarter la possibilité de la présence d'une reconnaissance de coremin par une protéine bactérienne contaminante qui formerait également un complexe avec l'ARN et pourrait ainsi expliquer la présence de deux complexes dans les pistes contenant des quantités croissantes de p14.

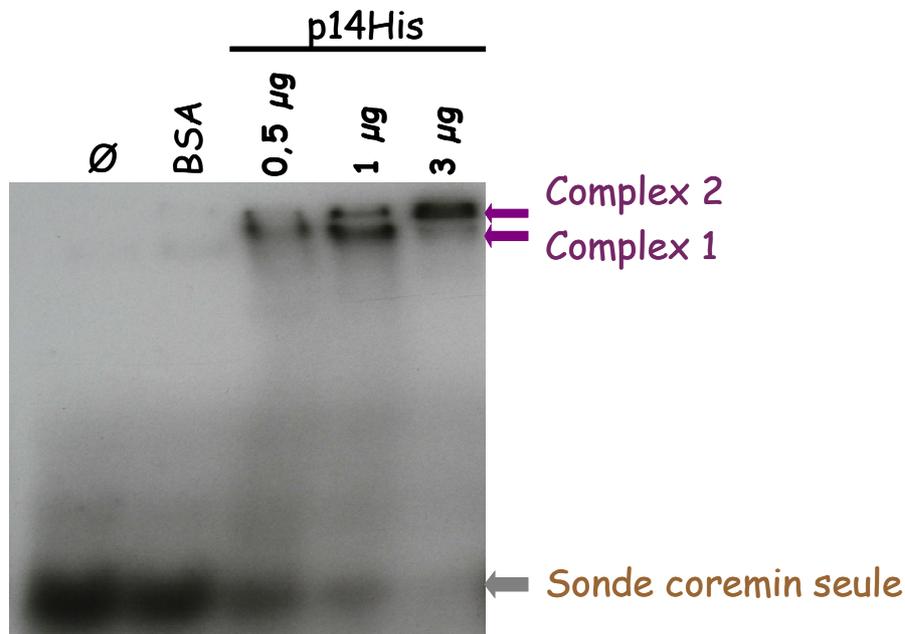


Figure III.18 : Analyse de l'interaction entre la protéine p14His et la séquence coremin, par la technique du "gel retard", sur gel de polyacrylamide natif 10 %. La sonde de coremin est incubée seule (Ø), en présence de 7,5 µg de BSA ou avec des quantités croissantes de protéine purifiée p14His (0.5, 1 et 3 µg).

J'ai reproduit cette expérience de gel retard sur gel d'agarose non dénaturant en incluant un contrôle bactérien qui a subi les mêmes étapes de purification que la protéine p14His. Trois sondes ribonucléotidiques d'environ 400 nts ont été produites par transcription *in vitro* de fragments de l'ARN3 (1141 à 1480) sens ou antisens et contenant la séquence coremin ou la séquence nimeroc. La sonde 1 correspond à la séquence de l'ARN3 renfermant la séquence coremin. La sonde 2 est la séquence reverse complémentaire de la sonde 1 et contient la séquence nimeroc. Enfin, la sonde 3 correspond à l'ARN antisens contenant la séquence coremin. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure III.19**.

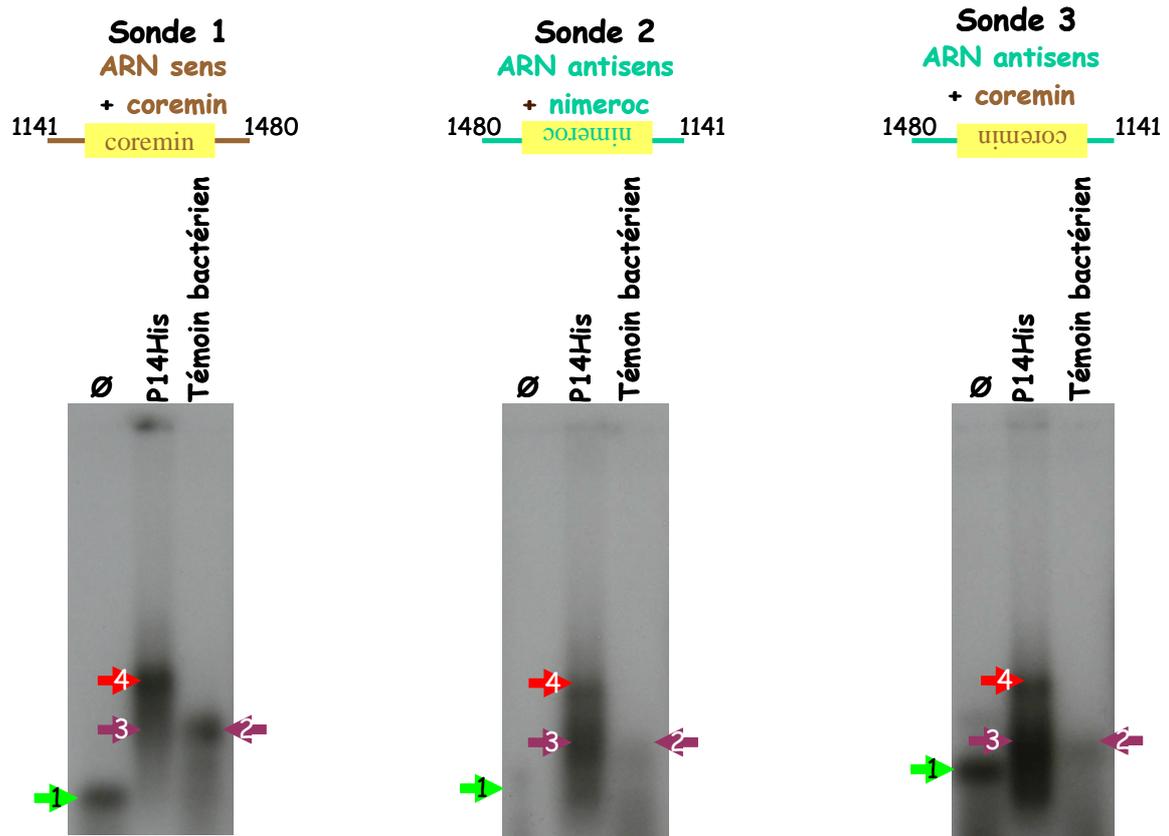


Figure III.19 : Analyse de l'interaction entre la protéine p14 et l'ARN par la méthode de "gel retard". Les sondes ribonucléotidiques utilisées sont synthétisées par transcription *in vitro* en présence de α -UTP³² à partir de clones ADNc (pBluescribe). Ces sondes correspondent à : l'ARN sens renfermant coremin (Sonde 1) ; l'ARN antisens renfermant sa séquence nimeroc (Sonde 2) ; l'ARN antisens renfermant la séquence coremin (Sonde 3). La flèche verte (1) correspond à la sonde seule. Les flèches (2) et (3) correspondent à l'interaction entre la sonde et une protéine bactérienne. La flèche n°4 correspond à l'interaction entre la protéine p14His et la sonde.

Ces trois sondes ont été incubées seules, avec la protéine p14His purifiée ou avec un extrait de protéines isolées sur résine Ni-NTA. Les milieux réactionnels ont été ensuite chargés sur un gel d'agarose 1,5 % en condition non dénaturantes.

L'incubation des sondes avec l'extrait bactérien témoin induit un retard de migration de ces sondes (**figure III.19, flèches 2**) par rapport à la sonde seule (**flèches 1**).

En présence d'extrait de protéine p14His, un premier retard de migration identique à celui obtenu avec l'extrait témoin est visualisé (**flèches 3**) mais on observe un second retard de migration (**flèches 4**) lié à la présence de la protéine p14. Ce complexe impliquant la protéine p14 semble plus intense lorsqu'une sonde renfermant la séquence coremin est utilisée. Dans le cas de la séquence d'ARN3 (sonde 1), on remarquera la présence d'un

complexe dans la poche du gel. L'utilisation d'une sonde de l'ARN3 antisens (ARN antisens + nimeroc) favorise la formation d'un complexe entre l'ARN et les protéines bactériennes, qui devient majoritaire (**flèche 3**) vis-à-vis de celui formé avec la p14His (**flèche 4**). L'utilisation de la séquence d'ARN3 complémentaire, mais qui renferme la séquence coremin (ARN antisens + coremin), restaure partiellement l'accumulation du complexe attribué à la protéine p14His.

ii. Approche par Cross-linking

Afin d'éviter le problème de la dissociation des complexes lors des expériences de gel retard (augmentation de la température lors de la migration, contraintes liées à l'électrophorèse), nous avons réalisé la fixation covalente de la sonde sur les protéines en interaction grâce à un pontage aux rayons ultraviolets (UV). En effet, ces derniers induisent des pontages covalents entre les partenaires (protéine/protéine, protéine/acide nucléique). La BSA et la protéine p14His ont été incubées avec des oligoribonucléotides marqués (coremin ou nimeroc) dans les conditions appliquées pour le gel retard. Les milieux réactionnels ont été irradiés aux UV, et séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant de 16 %. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et la radioactivité révélée par autoradiographie. Enfin, la membrane a été analysée par western blot en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine p14. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure III.20**.

Aucune liaison covalente entre la BSA et les sondes n'est observable. À l'inverse, l'utilisation d'un extrait protéique bactérien révèle la présence de protéines capables de fixer l'ARN (coremin ou nimeroc). Ces protéines sont également présentes dans l'extrait contenant la protéine p14His purifiée. Dans les extraits contenant la protéine p14His, une bande supplémentaire est visualisée et correspondrait à une protéine de 30 kDa.

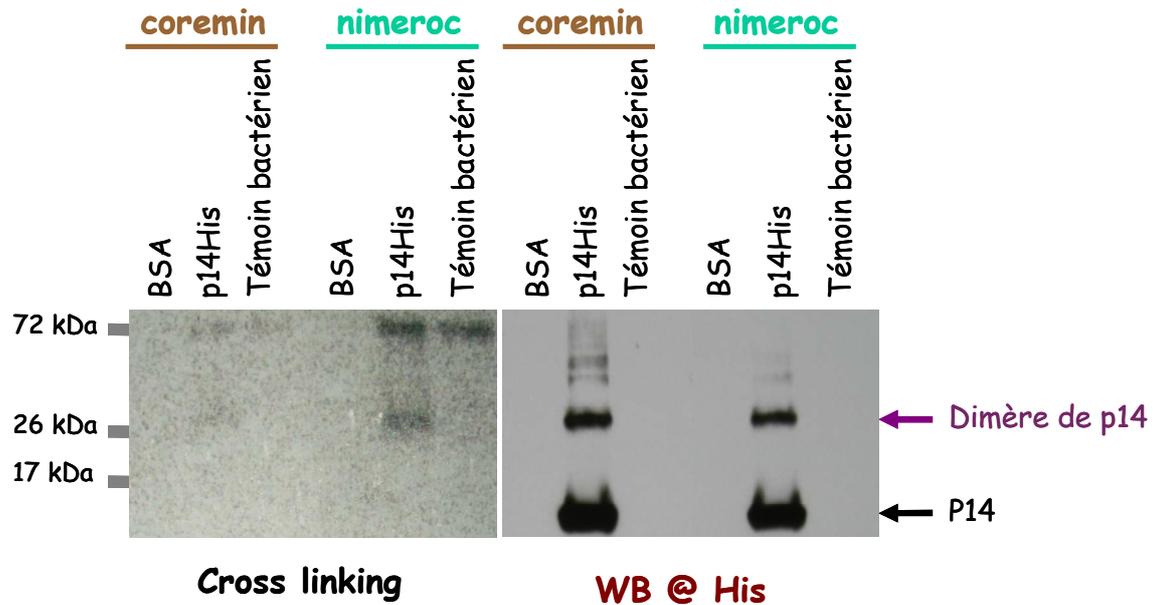


Figure III.20 : Analyse de l'interaction entre la protéine p14His et les séquences oligoribonucléotidiques coremin et nimeroc, par la méthode de "cross-linking". Nous avons utilisé la protéine BSA, un extrait bactérien purifié et une protéine p14His produite et purifiée à partir des bactéries recombinantes. La présence des complexes a été recherchée par autoradiographie de la membrane. La recherche de la protéine p14His est effectuée par western blot, en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le motif 6His. La bande d'environ 72 KDa (par autoradiographie) représente le marquage d'une protéine bactérienne fixant la sonde. La bande de 30 KDa correspond à un dimère de la protéine p14His qui fixe la sonde.
 N.B: La différence d'intensité des signaux (autoradiographie) est due à la différence d'activité spécifique des sondes.

La révélation de la présence de la protéine p14His à l'aide d'anticorps dirigés contre l'étiquette 6his a permis de révéler la présence de la protéine p14 sous forme d'un monomère et d'un dimère. Nous avons pu constater que la bande radiomarquée correspond à une interaction entre la sonde et un dimère de protéine p14. Nous avons donc conclu que l'interaction entre la protéine p14 et l'ARN nécessite la formation de dimères. Un tel résultat a pu être reproduit par des expériences de northwestern blot, mais avec un très faible marquage des dimères (non montré). Si l'interaction entre la protéine p14 et la séquence coremin est spécifique en système triple hybride de levure, une telle spécificité d'interaction semble perdue lorsque la protéine étiquetée et exprimée en système procaryotique est testée. Cette perte de spécificité pourrait s'expliquer par l'absence de modifications post traductionnelles, la présence de l'étiquette 6his ou l'absence d'un facteur cellulaire présent dans les plantes et dans la levure.

En conclusion, ces expériences effectuées *in vitro* ont confirmé l'interaction entre la protéine p14 et l'ARN, et précisé la nature de cette interaction qui requiert un dimère de protéine.

3. Effet de mutations du NoLS de la p14 sur l'interaction avec la séquence coremin

Nous avons montré *in vivo* que la protéine p14 interagit avec elle-même et que les mutations touchant la séquence responsable de l'import nucléolaire (NoLS) affectent à la fois la localisation de la protéine et sa capacité à multimériser. J'ai donc testé l'effet des modifications de la séquence NoLS sur l'interaction avec la séquence coremin en utilisant l'approche de triple hybride de levure. Pour cela, j'ai transformé la souche YBZ-1 par les constructions de pIIIMS2.1 (-Ø, -coremin, -nimeroc ou -coreminx2) et la souche R40 coat par les clones recombinants pGADT7 exprimant la protéine p14 ou ses formes mutées en fusion avec le domaine d'activation de la transcription (-Ø, -p14, -p14ΔNoLS, -p14BA1, -p14BA2, -p14BA3 ou -p14BA4). Après mating entre ces deux souches, les interactions entre les partenaires ont été visualisées par la croissance de levures sur le milieu (-ULH) en présence de 1, 3 ou 5 mM 3AT. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure III.21**. Ce test nous a permis de retrouver l'interaction entre la protéine p14 et la séquence coremin en présence de 3 mM de 3AT. Par contre, cette interaction est absente dans le cas de la séquence nimeroc quand la concentration en 3AT atteint 3mM. Parmi les mutants testés, seul p14BA2 est capable de reconnaître spécifiquement la séquence coremin. Cependant, cette interaction est plus faible que celle observée pour la protéine p14 sauvage puisque à 5 mM en 3AT, elle disparaît et seules les levures exprimant la protéine p14 sauvage et la séquence coremin sont capables de se multiplier sur milieu (-ULH). Parmi les mutants testés, seule la protéine p14BA2 interagit avec elle-même et avec la protéine sauvage (**figure III.11A**). Un tel résultat conforte donc notre hypothèse selon laquelle la protéine p14 nécessite de dimériser pour interagir avec l'ARN. Notons ici qu'en présence de 1 mM 3AT, une faible interaction est observée entre le mutant p14BA3 et la séquence coremin mais pas avec la séquence nimeroc. Ce mutant incapable d'interagir avec lui-même montrait une faible interaction avec la protéine p14 sauvage ou avec p14BA2 (**figure III.11A**). Ces résultats suggèrent également qu'il pourrait exister un lien entre la localisation nucléolaire de la protéine p14 et l'interaction avec l'ARN. En effet, seuls les

mutants capables d'interagir avec coremin se localisent dans le nucléole, fortement pour BA2 et faiblement pour BA3 (figure III.8).

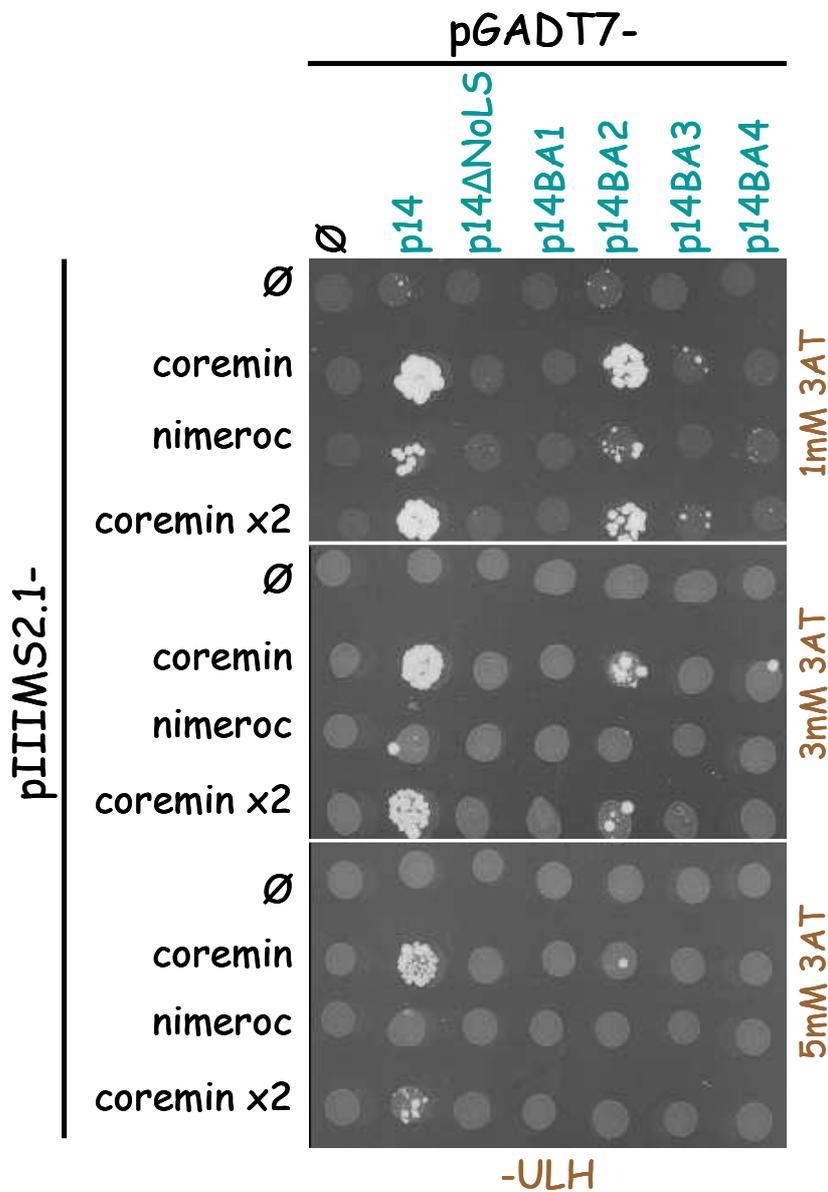


Figure III.21 : Effet des mutations de NoLS de la protéine p14 sur son interaction avec la séquence coremin *in vivo*. Un test de triple hybride par une approche de mating a été utilisé entre la souche YBZ-1 transformée par les constructions pIIIIMS2.1 et la souche R40 coat transformée par les constructions pGADT7 (exprimant la protéine p14 ou ses formes mutées). Les levures sont déposées en quantités identiques sur milieu -ULH en présence de 3AT à 1, 3 et 5 mM. Après quatre jours, la croissance des levures représente l'interaction entre les deux partenaires. La protéine mutée p14BA2 interagit avec la séquence coremin jusqu'à 3 mM de 3AT alors que la protéine p14 sauvage interagit jusqu'à 15 voire 20 mM de 3AT. Une faible interaction est observée entre la protéine mutée p14BA3 et la séquence coremin. À l'inverse de la protéine p14 sauvage ou mutée p14BA2, la protéine mutée p14BA3 ne reconnaît pas la séquence nimeroc ou le vecteur vide.

V. Est-ce que l'interaction p14-coremin est impliquée dans l'infection systémique ?

La conservation de la séquence coremin et sa petite taille nous a conduits à penser qu'elle pourrait être reconnue par le mécanisme de silencing et être la cible d'un clivage par un miRNA ou un siRNA cellulaire. Au laboratoire, les études effectuées par Claire Peltier ont montré que les plantes n'expriment ni spontanément, ni en condition de stress, des petits ARN pouvant cibler la séquence coremin sur l'ARN génomique, sa séquence complémentaire sur l'ARN antigénomique voire des séquences correspondant à un tasiRNA (trans-acting short interfering RNA).

La séquence coremin est indispensable pour le mouvement à longue distance et pour la stabilisation de l'ARN3sub, le produit de clivage et de dégradation de l'ARN3. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'interaction de cette séquence avec la protéine p14 pourrait être impliquée dans le clivage de l'ARN3 génomique, dans la stabilisation de l'ARN3 et/ou son produit de clivage et/ou dans le mouvement à longue distance. Claire Peltier a montré qu'en l'absence de protéine p14, le clivage a toujours lieu, tout comme l'accumulation de l'ARN3sub. Ainsi, la protéine p14 n'est pas impliquée dans la production de l'ARN3sub, ni dans sa stabilisation. Je me suis donc intéressé à vérifier la dernière de nos hypothèses et j'ai recherché le rôle de l'interaction dans l'infection systémique. Pour cela, j'ai infecté des plantes *B. macrocarpa* et *N. benthamiana* par des constructions virales exprimant les formes mutées de la protéine p14 et recherché l'effet de ces mutations sur le mouvement à longue distance.

Avant d'entreprendre cette étude, j'ai testé l'infectivité de mes constructions sur l'hôte à lésions locales *C. quinoa*.

1. Effet des protéines p14 mutées sur l'infection virale locale

i. Symptômes locaux sur *C. quinoa*

Les transcrits de l'ARN1 et ceux des ARN2 sauvage ou mutés dans la séquence codant de la protéine p14 ont été co-inoculés sur feuilles de *C. quinoa*. Les symptômes observés après six jours sont présentés sur la **figure III.22A**. Nous pouvons constater qu'en

l'absence de la protéine p14, le virus muté (ARN1+2 Δ P14) provoque des lésions nécrotiques à la place des lésions chlorotiques observées dans l'infection par le virus sauvage (ARN1+2), ce phénotype de nécrose est également obtenu avec le virus portant la protéine p14 mutée (ARN1+2BA4). Le phénotype des symptômes des 3 autres mutants évolue entre ceux comparables au type sauvage pour les mutants p14BA1 et -BA2 et ceux de forme annulaire avec début de nécrose centrale pour le mutant p14BA3. Ces résultats indiquent ainsi que ces constructions sont capables d'induire une infection locale sur feuilles de *C. quinoa*. L'immunodétection des protéines virales p14 et CP montre qu'en l'absence de protéine p14 (2 Δ p14 ou 2BA4) la protéine de capsid n'est pas détectée (figure III.22B).

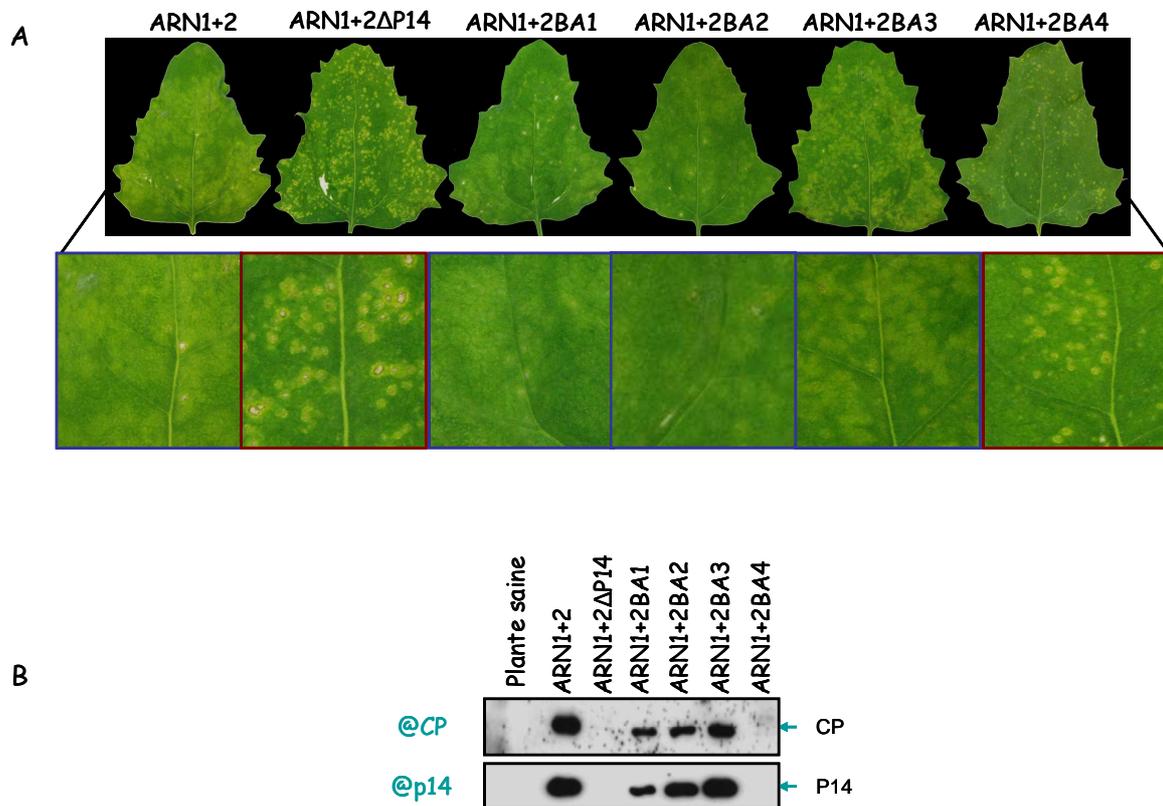


Figure III.22 : Comparaison des effets des protéines p14 mutées sur l'infection locale de feuilles de *C. quinoa*. (A) Symptômes obtenus six jours après l'inoculation par des ARN1 et ARN2 sauvage ou mutés, avec un agrandissement d'une région détaillant les lésions locales. (B) Analyse par western blot sur des lésions découpées de ces feuilles, en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine p14 et contre la protéine CP.

Si l'ensemble des mutants est capable d'induire des lésions locales sur feuilles, l'analyse des ARN viraux par northern blot révèle que la protéine p14 est nécessaire à l'accumulation des ARN viraux. En effet, en l'absence de protéine p14 (2 Δ p14 et 2BA4 **figure III.21B**) les ARN viraux ne s'accumulent pas ou très faiblement (**figure III.23A**). Les constructions exprimant des protéines p14BA1 et -BA2 sont capables de se multiplier mais avec une efficacité moindre comparée au ARN sauvages. En revanche, la mutation de la protéine p14BA3 ne semble affecter en rien la multiplication virale sur feuille de *C. quinoa* (**figure III.23A**). Il faut préciser ici que des expériences de complémentation des constructions affectées dans le gène p14 par des transcrits de Rep3p14 ou des transcrits de Rep5 exprimant un autre suppresseur de RNA silencing (Guilley *et al.*, 2009) comme la protéine p13 du BdMV (*Burdock mottle virus*, membre proposé du genre *Benyvirus*) restaurent l'accumulation des ARN viraux et de la protéine de capsid (non montré).

J'ai recherché la fonction de suppresseur de RNA silencing des mutants de p14 en me basant sur les méthodes utilisées par Guilley *et al.*, (2009) et Kozłowska-Makulska *et al.*, (2010) pour identifier les protéines suppresseur de RNA silencing. Les résultats obtenus indiquent que la protéine mutée p14BA4 perd sa fonction de suppression de silencing alors que les mutants p14BA1 et p14BA2 sont partiellement affectés dans cette fonction. Par contre, la protéine p14BA3 semble toujours capable d'exécuter pleinement sa fonction de suppresseur de RNA silencing (non montré).

Avant d'analyser l'effet des mutations p14 sur l'infection systémique, j'ai vérifié que les ARN viraux étaient toujours capables d'être encapsidés. Pour cela, j'ai procédé à un test de protection des ARN viraux encapsidés vis-à-vis de l'action des nucléases. En parallèle à l'extraction en tampon Polysomes, j'ai réalisé une extraction des ARN totaux de lésions en tampon Tris-MgCl₂, suivie d'une incubation de 30 min à 37°C, permettant la dégradation des ARN non protégés par la protéine de capsid (Jupin *et al.*, 1990; Gilmer *et al.*, 1992). Les résultats obtenus présentés sur la **figure III.23C** sont comparables à ceux de la **figure III.23A** et indiquent que tous les mutants de la protéine p14 qui permettent toujours l'expression de la protéine de capsid (CP) sont encapsidés.

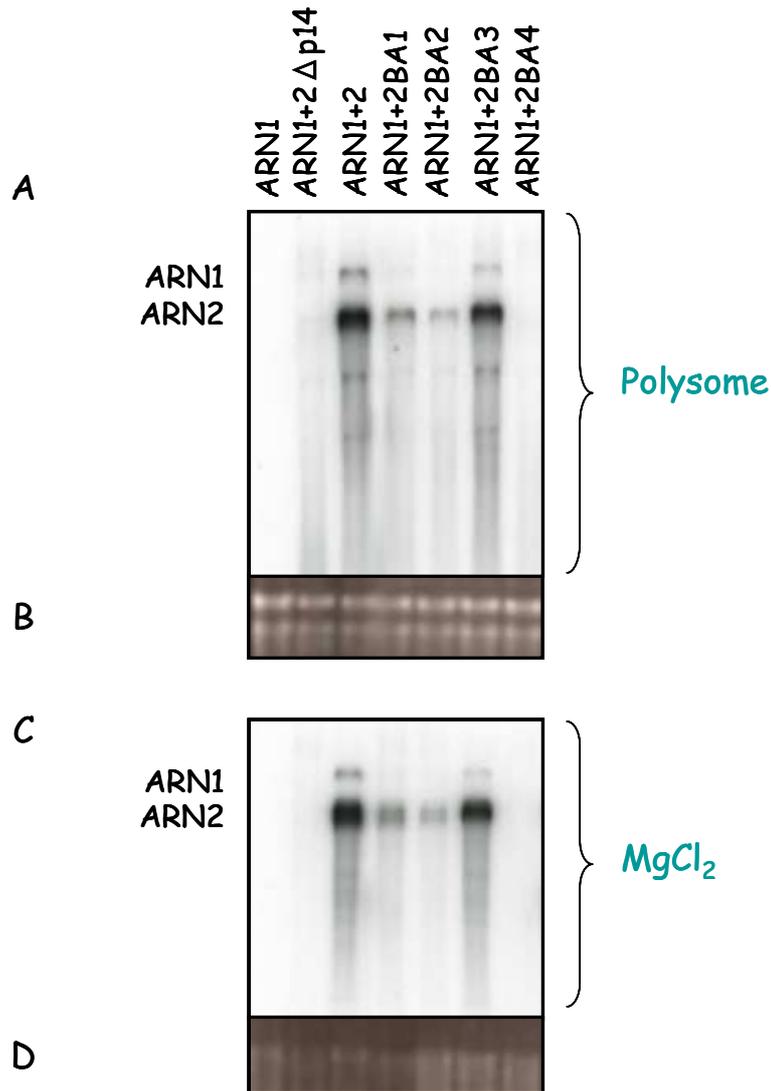


Figure III.23 : Analyse par northern blot de l'accumulation des ARN viraux portant ou non des mutations dans la séquence de la protéine p14 et un test de l'encapsidation des ARN. Les ARN totaux extraits des lésions à l'aide du tampon polysome (A) et à l'aide d'un tampon Tris-MgCl₂, suivis d'une incubation de 30 min à 37°C (C), sont analysés par northern blot. Les sondes utilisées ciblent les ARN1 et 2. L'extraction au tampon polysome reflète l'ensemble des ARN viraux alors qu'une extraction au tampon Tris-MgCl₂ ne permet de récupérer que les ARN encapsidés et protégés de l'action des nucléases. Visualisation sous UV des ARN totaux pour estimer les quantités de charge déposées dans chaque piste (B et D).

ii. Symptômes locaux sur *C. quinoa* en présence de la séquence coremin

L'ARN3 est essentiel au mouvement à longue distance sur *B. macrocarpa* (Lauber *et al.*, 1997). Avant de tester l'effet de nos mutants sur l'infection systémique en présence de la séquence coremin, nous avons recherché son effet sur l'infection locale. Pour cela, nous avons répété les expériences précédentes en présence de l'ARN3 sauvage ou de l'ARN3 muté contenant la séquence nimeroc à la place de la séquence coremin. Les résultats sont présentés sur la **figure III.24**. Comme mentionné précédemment, la co-inoculation des ARN1+2 Δ p14 avec des transcrits de Rep3-p14 complémente l'absence de la protéine p14 sur *C. quinoa* et restaure l'apparition de lésions chlorotiques vertes distinctes des lésions nécrotiques obtenues en l'absence de protéine p14 (**figure III.24**). En présence de l'ARN3 sauvage ou portant la séquence nimeroc, les ARN1 et 2 induisent l'apparition des lésions chlorotiques jaunes en raison de l'expression de la protéine p25 codée par l'ARN3. De façon surprenante, en présence de l'ARN3 sauvage, les ARN1+2 Δ p14 ne sont plus capables d'induire des lésions nécrotiques mais des lésions chlorotiques jaunes (**figure III.24**). Si l'ARN3 renfermant la séquence nimeroc est utilisé en présence des ARN1+2 Δ p14, les lésions restent nécrotiques. La seule différence entre les deux ARN 3 est la séquence de 20 nucléotides. Ces observations excluent un rôle de la protéine p25 seule dans la complémentation de phénotype chlorotique et suggèrent un rôle direct ou indirect de la séquence coremin dans la suppression de la nécrose. Un effet identique est observé dans le cas du mutant p14BA4. Dans le cas des mutants p14BA1, -BA2 et -BA3 la présence de l'ARN3 contenant la séquence coremin ou nimeroc ne semble pas avoir un effet sur les symptômes observés (**figure III.24**).

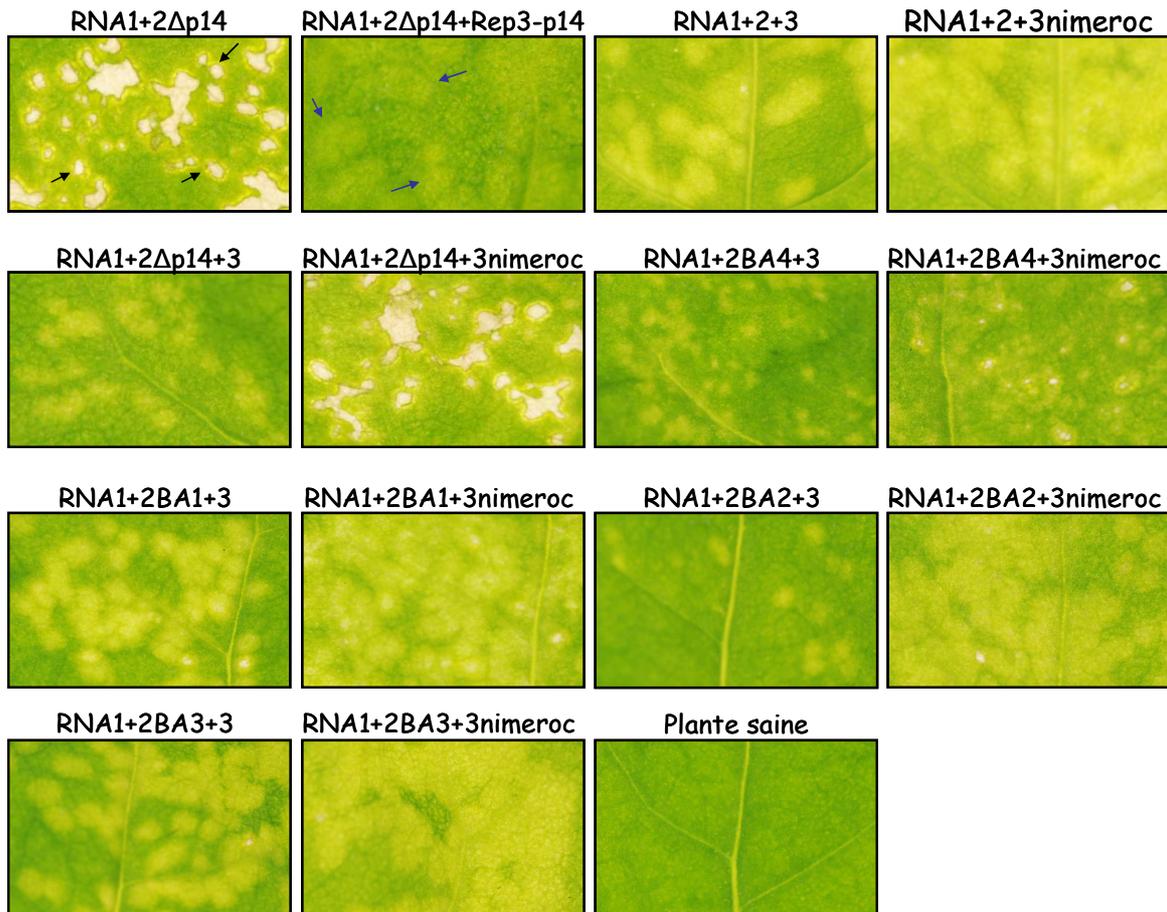


Figure III.24 : Effet de la séquence coremin ou nimeroc sur la modulation des symptômes induits par des ARN viraux portant les mutants de p14. Symptômes obtenus six jours après coinoculation sur les feuilles de *C. quinoa* par des ARN1 et ARN2 sauvage ou mutés en présence de l'ARN3 sauvage ou portant la séquence nimeroc.

L'analyse de l'accumulation des ARN viraux par northern blot a confirmé, d'une part, l'analyse effectuée par Claire Peltier, en excluant le rôle de la protéine p14 dans l'apparition de l'ARN3sub en présence de la séquence coremin intacte (**figure III.25A, piste 9**). D'autre part, cette analyse révèle que la présence de l'ARN3 sauvage avec les ARN1+2Δp14 complémente la capacité du virus muté ARN1+2Δp14 à se multiplier. Cette complémentation est partielle en présence de l'ARN3 muté (piste 10) puisque les symptômes restent nécrotiques (**figure III.24**). Une telle complémentation est clairement retrouvée en présence de l'ARN3 sauvage mais pas de l'ARN3 muté (3nimeroc) dans le cas du mutant BA2 (**figure III.25A, piste 5 et 7**). Malheureusement, je n'ai pas effectué ces analyses pour les virus mutés (ARN1+2BA1 et ARN1+2BA4). Le test d'encapsidation effectué en parallèle sur des lésions de mêmes plantes confirme la complémentation par l'ARN3 (**figure III.25C**) et nous renseigne sur un défaut d'encapsidation des

ARN1+2 Δ p14 en présence d'ARN3. Si la protéine CP est synthétisée en présence d'ARN3, son niveau d'expression est insuffisant pour garantir l'encapsidation des ARN viraux (non montré). Dans le cas des autres mutants, l'immunodétection de la protéine de capsidie montre que cette dernière est détectée dans des extraits des plantes infectées par ces virus mutés ou sauvage (**figure III.26**). Nous n'avons pas observé de variations notables d'accumulation de la protéine CP en présence ou en absence des séquences coremin et nimeroc (à l'exception de mutant BA1).

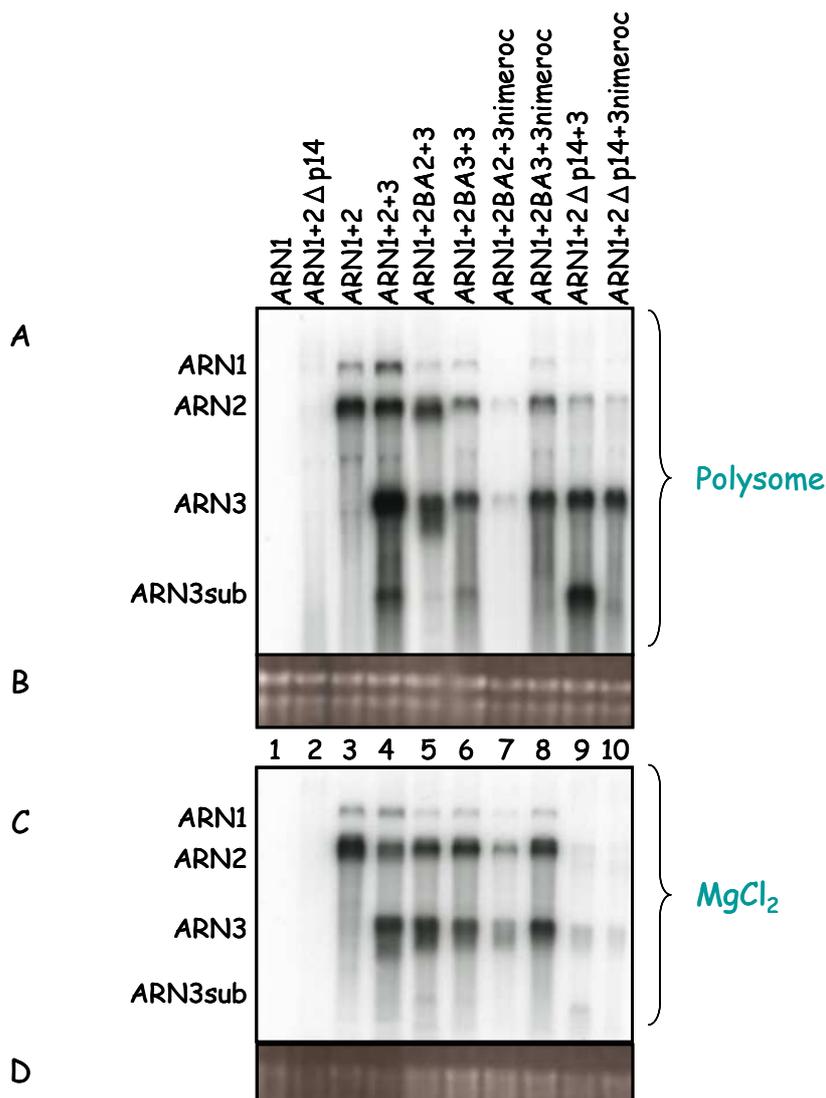


Figure III.25 : Effet de la séquence coremin sur l'accumulation et l'encapsidation des ARN viraux en présence de l'ARN2 muté. (A) Analyse par northern blot des ARN totaux extraits des lésions à l'aide du tampon polysome. (C) Les ARN totaux des lésions des mêmes feuilles inoculées, extraits par un tampon Tris-MgCl₂ suivis d'une incubation de 30 min à 37°C, sont également analysés par northern blot. Les sondes utilisées ciblent les ARN1, 2 et 3. (B et D) ARN totaux visualisés sous UV pour estimer les quantités de charge.

Le rôle de l'ARN3 et de la séquence coremin dans l'accumulation des ARN viraux est également illustré par le mutant p14BA2. En l'absence d'ARN3, ce mutant s'accumule faiblement dans les lésions locales (**figure III.23A**). L'accumulation des ARN viraux devient comparable au témoin sauvage lorsque l'ARN3 est ajouté, mais pas l'ARN3 muté (comparer les pistes 3, 5 et 7, **figure III.25A**). Il faut rappeler que la protéine p14BA2 reste capable d'interagir avec la séquence coremin et se localise dans le nucléole. De nouvelles analyses d'accumulation des ARN viraux et des protéines virales pour les mutants des ARN2-BA1 et -4 en présence de l'ARN3 sauvage et muté nous permettront peut-être de préciser le rôle de la séquence coremin et/ou de l'expression de p25 dans ce mécanisme de complémentation.

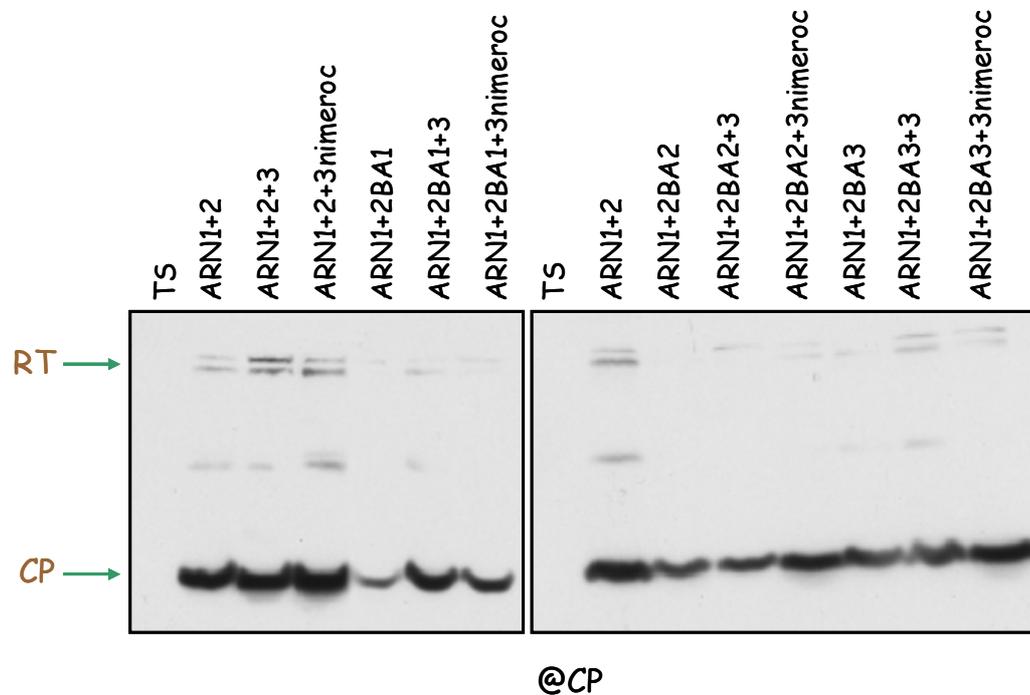


Figure III.26 : Analyse par western blot de la présence de la protéine CP lors d'une infection par des ARN viraux sauvage ou mutés. Immunodétection de la protéine CP et de la protéine RT par des anticorps dirigés contre la CP (@CP) à partir des extraits protéiques des lésions de *C. quinoa* infectées par des ARN1 et ARN2 sauvage ou mutés, en absence ou en présence de l'ARN3 sauvage ou muté.

Dans la même optique et afin de confirmer le rôle de la séquence coremin dans le contournement des lésions nécrotiques apparues en l'absence de la protéine p14, j'ai réalisé une expérience de complémentation chez *C. quinoa* avec la séquence coremin apportée par le Rep5. Les combinaisons inoculées sont les suivantes : ARN1+2, ARN1+2+3, ARN1+2 Δ p14, ARN1+2 Δ p14+3, ARN1+2 Δ p14+3nimeroc ou ARN1+2 Δ p14+3nimeroc supplémentés de transcrits de Rep5- \emptyset . En effet, le Rep5 est un vecteur dérivé de l'ARN5 du BNYVV dans lequel la phase codante pour la protéine p26 a été éliminée. Ce réplicon contient la séquence coremin dans la partie 3' UTR de l'ARN viral. Les symptômes observés après 6 jours sont résumés sur la **figure III.27**. Nous avons observé les mêmes résultats que précédemment, à savoir la disparition des lésions nécrotiques en présence d'ARN3 mais pas en présence d'ARN3 muté (3nimeroc). En présence de Rep5- \emptyset , une disparition partielle des lésions nécrotiques est observée. La présence de quelques lésions nécrotiques sur les feuilles infectées peut être due à l'absence de l'ARN Rep5 dans les lésions. Ce résultat illustre le rôle de la séquence coremin dans la complémentation phénotypique, sans pouvoir écarter un rôle de la protéine p25, mais qui pourrait opérer *via* une action de la séquence coremin.

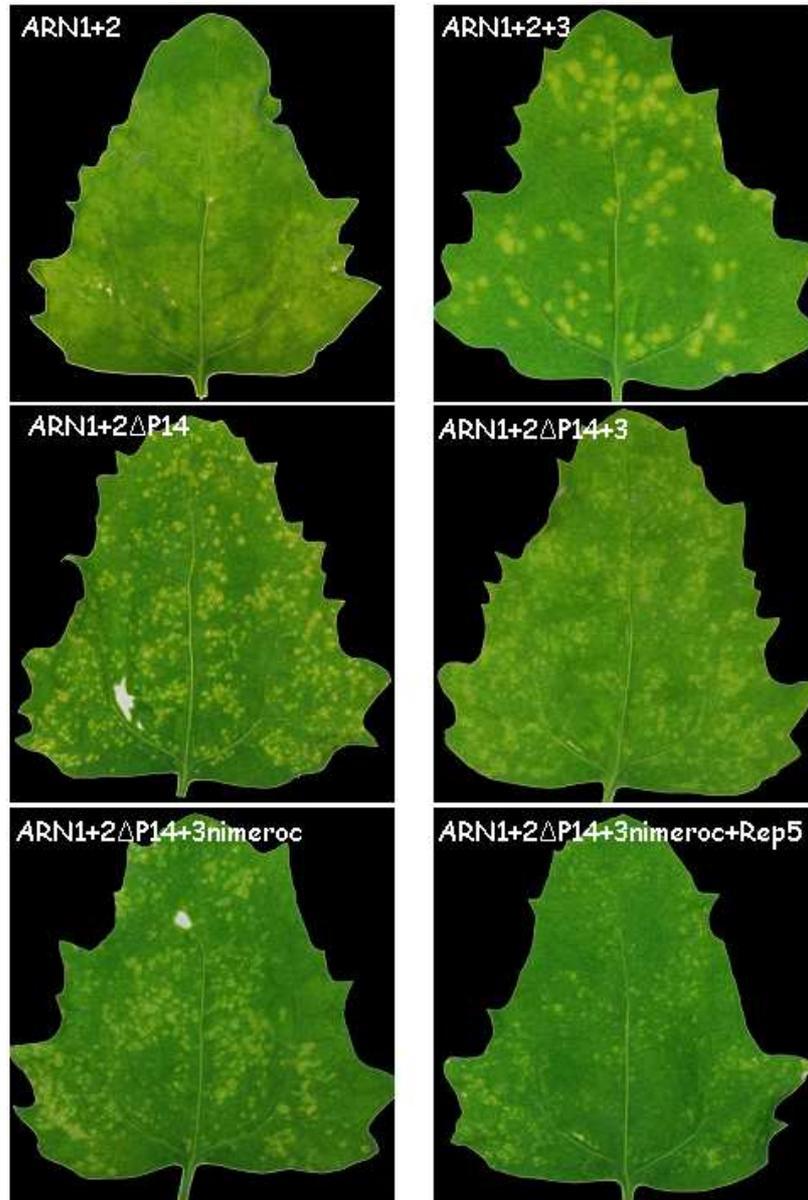


Figure III.27 : Effet de la séquence coremin ou nimeroc sur les symptômes induits par des ARN viraux en présence de l'ARN2Δp14. Symptômes obtenus sur feuilles de *C. quinoa* six jours après coinoculation par des ARN1 et ARN2 sauvage ou mutés en présence de l'ARN3 sauvage ou portant la séquence nimeroc. Des transcrit de Rep5 (contenant la séquence coremin) ont été co-inoculés également avec des ARN1+ARN2Δp14+ARN3nimeroc, dans le but d'une complémentation en *trans* par la séquence coremin.

2. Effet des protéines p14 mutées sur l'infection systémique

i. Expériences chez *B. macrocarpa*

Le BNYVV infecte de manière systémique *B. macrocarpa* s'il possède l'ARN3 (Lauber *et al.*, 1998a) et en particulier la séquence coremin [(Ratti *et al.*, 2009; Peltier, 2010), Thèse de doctorat, UdS]. Afin de tester l'effet de l'interaction entre la protéine p14 et la séquence coremin dans le mouvement systémique, nous avons recherché l'effet des mutants p14 sur ce mouvement. Pour cela, des transcrits *in vitro* des trois ARN viraux mutés ont été co-inoculés sur les feuilles de *B. macrocarpa*. Deux semaines post inoculation, les feuilles systémiques ont été analysées. L'infection systémique est visualisée facilement par la déformation et le jaunissement des feuilles (**figure III.28A2**). Si la présence de la séquence coremin est indispensable pour l'infection systémique, l'expression de la protéine p14 est également nécessaire pour cette infection systémique (**figure III.28A1**). En effet, la protéine p14 est nécessaire à la formation des lésions locales (chez *C. quinoa*) et son absence entraîne des infections restreintes, ce qui explique l'absence de l'infection systémique. De plus, son action de suppression de RNA silencing est impliquée dans la mise en place d'une infection durable, comme nous l'avons vu, puisque le remplacement de la protéine p14 par un autre suppresseur rétablit l'infection sur *C. quinoa* (Guilley *et al.*, 2009; Kozłowska-Makulska *et al.*, 2010). Cependant, l'utilisation de nos mutants nous permet de rechercher précisément si la protéine elle-même est impliquée dans ce mouvement à longue distance. Les symptômes de systémie ne sont observés que dans le cas du mutant BA3, qui, de ce fait, est capable de se déplacer à longue distance (**figure III.28A5**). Les analyses de l'accumulation des ARN viraux par northern blot effectuées sur ces plantes confirment nos résultats (**figure III.28B**). Notons ici que ces résultats ont été obtenus lors de deux expériences réalisées séparément, et incluaient trois plantes pour chaque combinaison utilisée.

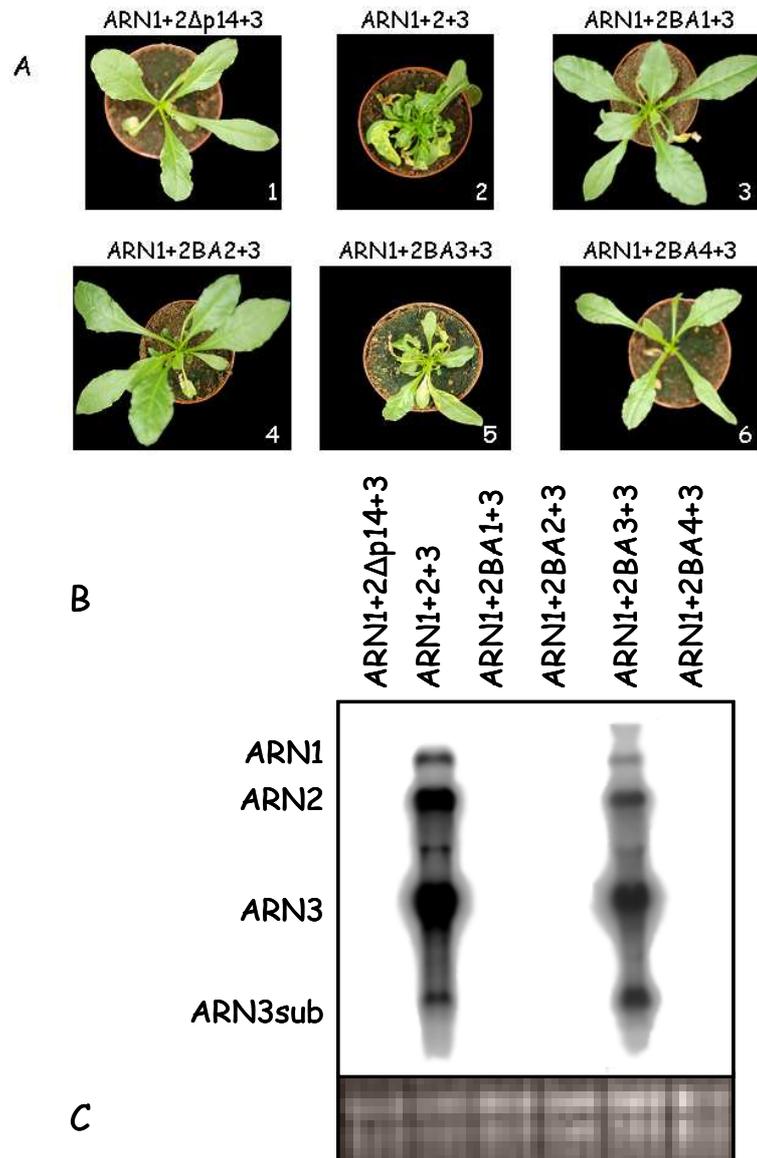


Figure III.28 : Rôle de la protéine p14 dans l'infection systémique de *B. macrocarpa*. Les plantes ont été infectées par des ARN1+ARN3 supplémentés par l'ARN2 sauvage ou l'ARN2Δp14 ou ARN2 mutés dans le NoLS de la protéine p14. (A) Visualisation des symptômes quinze jours après inoculation. (B) Analyse par northern blot de l'accumulation des ARN viraux dans les feuilles non inoculées. Les sondes utilisées ciblent les ARN1, 2 et 3. (c) La quantité d'ARN totaux déposée dans chaque piste est visualisée par coloration au BET.

Nous nous attendions à un rôle de l'interaction entre la protéine p14 et la séquence coremin mais nos résultats ne nous ont pas permis de le démontrer, puisque la forme mutée p14BA2 qui interagit toujours avec coremin, qui se localise à l'instar de p14 dans le nucléole, est incapable de mouvement à longue distance. À l'inverse, la protéine p14BA3 qui n'interagit pas ou très faiblement avec la séquence coremin assure une infection systémique. En effet, la protéine p14BA3 se localise légèrement dans le nucléole, reste capable d'interactions avec la protéine p14 sauvage et faiblement avec la séquence coremin et conserve sa fonction de suppression de RNA silencing. De plus, cette mutation n'affecte pas la stabilité de la protéine ni l'accumulation des ARN viraux. Nous ne pouvons pas exclure l'implication d'une ou de plusieurs de ces propriétés de la protéine p14BA3 (même assurées faiblement) dans l'infection systémique. Les analyses de la descendance effectuées sur l'ARN2BA3 dans les tissus systémiques n'ont révélé aucune réversion dans la séquence de p14BA3 où les mutations d'origine sont conservées.

Ainsi, les deux partenaires p14 et coremin nécessaires pour le mouvement à longue distance sur plante *B. macrocarpa* semblent intervenir de manière indépendante, suggérant l'intervention d'un autre partenaire cellulaire ou viral et pourraient impliquer la suppression du RNA silencing.

ii. Expériences chez *N. benthamiana*

Le BNYVV infecte des plantes de *N. benthamiana* et *Spinacea oleracea*, dans lesquelles il est capable de se propager systémiquement en l'absence de l'ARN3.

Plusieurs études ont montré que l'implication d'un suppresseur de silencing dans le mouvement à longue distance peut être hôte spécifique. Nous avons recherché l'effet de nos mutants p14 sur l'infection systémique sur ces deux espèces en présence ou en absence de la séquence coremin ainsi que de la séquence nimeroc. Deux semaines après inoculation, les plantes ont été photographiées (**figure III.29**) et des prélèvements ont été effectués sur les feuilles systémiques pour une analyse moléculaire. Notons ici que sur *N. benthamiana*, la présence de l'ARN3 dans l'inoculum permet l'apparition des symptômes 6 à 8 jours après l'infection contre 13 à 15 jours en présence des ARN1+2 seuls. Toutefois, il est important de préciser que la séquence coremin est nécessaire au mouvement de l'ARN3 à longue distance dans cet hôte. En effet, les vecteurs Rep3

(réplicons de l'ARN3 du BNYVV) dépourvus de la séquence coremin perdent la capacité de se déplacer à longue distance (S. Bouzoubaa, communication personnelle).

Les symptômes observés sur des plantes de *N. benthamiana* révèlent l'infection systémique de l'hôte en l'absence de l'ARN3, lorsque l'ARN2 code pour la protéine p14 sauvage ou les protéines p14BA3 et -BA1. Aucune infection systémique n'est observée avec les mutants p14BA2 et -BA4. Toutefois, de manière intéressante, l'addition d'ARN3 a une action positive sur le mouvement à longue distance du mutant p14BA2 qui n'est pas observée en présence d'ARN3 muté (3nimeroc).

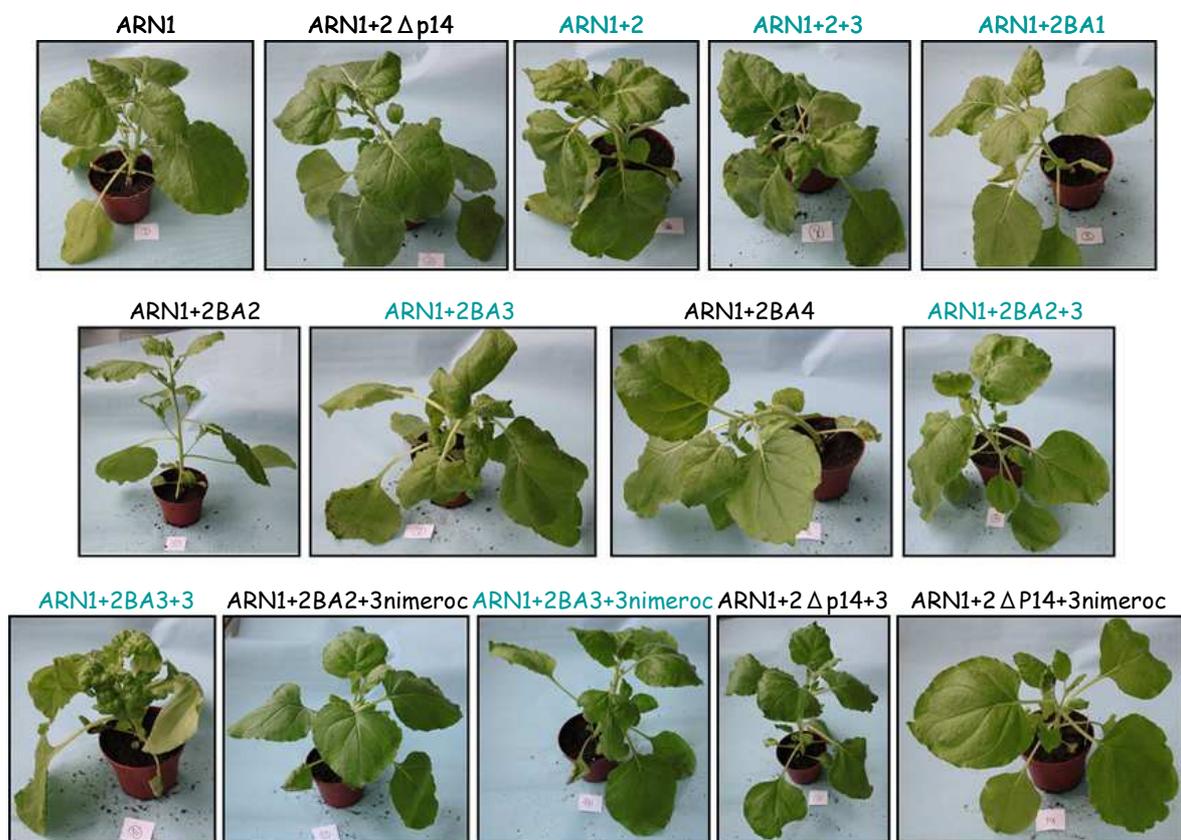


Figure III.29 : Effet des mutations de la protéine p14 et de la séquence coremin sur l'infection systémique. Phénotypes des feuilles des *N. benthamiana* observés quinze jours après inoculation par des ARN1 et ARN2 sauvage ou mutée en présence de l'ARN3 sauvage ou de l'ARN3nimeroc. L'apparition des symptômes sur des feuilles non inoculées indique que le mouvement viral à longue distance a eu lieu.

L'analyse de l'accumulation des ARN viraux confirme ces observations phénotypiques (**figure III.30A**). Les ARN viraux sont détectés par northern blot dans les plantes inoculées par les combinaisons : ARN1+2, ARN1+2+3, ARN1+2BA3, ARN1+2BA3+3, ARN1+2BA3+3nimeroc. Un signal plus faible est obtenu pour les combinaisons

ARN1+2BA1 et ARN1+2BA2+3. La présence de l'ARN3 semble augmenter le niveau d'accumulation des ARN viraux de la construction 1+2BA2, ce qui n'est pas le cas de l'ARN3nimeroc. L'interaction entre la protéine p14BA2 et la séquence coremin a un effet bénéfique dans le mouvement à longue distance qui compenserait l'action d'un facteur cellulaire de *N. benthamiana* interagissant avec la protéine p14 sauvage lors d'une infection par des ARN1+2 seuls. La protéine p14BA2 seule ne pourrait plus interagir avec ce facteur cellulaire, sauf en présence de l'ARN3 et en particulier de la séquence coremin. L'ARN3 pourrait quant à lui permettre le recrutement du facteur cellulaire nécessaire au mouvement. Avant de pouvoir écarter un rôle de la protéine p25 dans ce processus, il sera nécessaire de reproduire ces expériences à l'aide de constructions mutées au niveau du codon initiateur de p25.

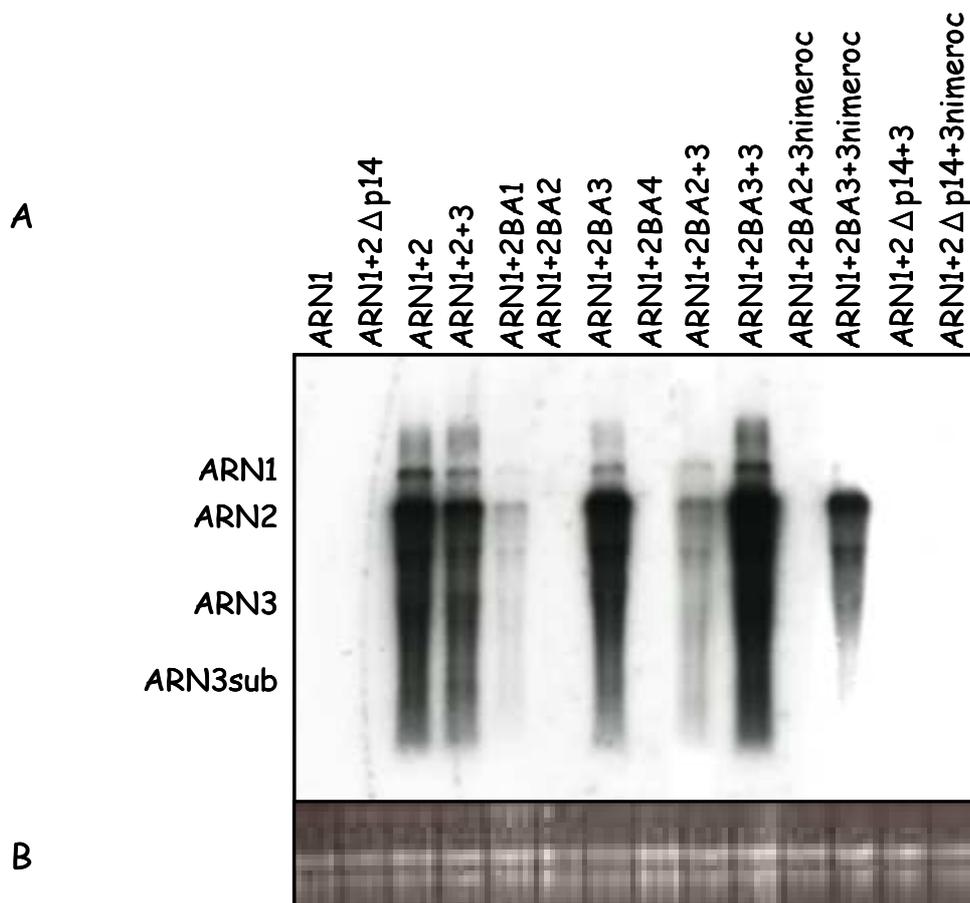


Figure III.30 : Analyse de l'accumulation des ARN viraux extraits des feuilles systémiques *N. benthamiana*. (A) Des extraits des ARN totaux des lésions récoltées à partir des feuilles deux semaines après l'inoculation ont été analysés par northern blot en utilisant les sondes qui ciblent les ARN1, 2 et 3. (B) La quantité d'ARN totaux déposée dans chaque piste est visualisée par coloration au BET sous UV.

La même expérience a été conduite sur épinards, où seuls les ARN sauvages ont produit une infection systémique sur 50% des plantes inoculées (analyse phénotypique et moléculaire). Cette faible efficacité ne nous permet pas de conclure quant à la fonction de la protéine p14 dans le mouvement à longue distance sur cette plante (non montré).

VI. Conclusion

La protéine riche en cystéine, p14 codée par l'ARN2 du BNYVV est un suppresseur de RNA silencing possédant un motif en doigt à zinc. La dimérisation de la protéine p14 est nécessaire à sa localisation nucléolaire et à la reconnaissance spécifique de la séquence de l'ARN3 du BNYVV impliquée dans le mouvement à longue distance du virus et dans la stabilisation de l'ARN3 subgénomique.

Si le mutant de p14BA2 reste capable de former des dimères et d'interagir avec la séquence coremin, il ne permet pas l'accumulation optimale des ARN viraux et le mouvement à longue distance sur *B. macrocarpa*, contrairement au mutant p14BA3 qui interagit faiblement avec la séquence et forme difficilement des hétérodimères avec la protéine sauvage mais permet l'accumulation des ARN viraux et le mouvement à longue distance du virus sur *B. macrocarpa*. Cette mutation pourrait permettre la dimérisation d'une faible fraction de protéines p14BA3 (en dessous du seuil de détection du double hybride) toujours capables d'interagir avec la séquence coremin et d'assurer le mouvement à longue distance. L'absence de la protéine p14 diminue fortement l'accumulation de l'ARN2 et faiblement l'ARN1 du BNYVV et conduit à l'apparition de lésions nécrotiques [figures III.22, -23 et 25 ; (Hehn *et al.*, 1995)]. Cet effet est complété par l'apport en *trans* de la protéine p14 par un réplicon qui restaure l'accumulation de la protéine CP et des ARN viraux. Un tel effet est également obtenu lors de l'expression de suppresseurs de RNA silencing hétérologues *via* le réplicon 5 (Guilley *et al.*, 2009; Kozłowska-Makulska *et al.*, 2010). L'accumulation des ARN viraux est donc liée à la capacité de la protéine à supprimer le RNA silencing, ce qui semble le cas pour la protéine BA3 qui n'a pas perdu sa capacité de suppresseur de PTGS.

À l'exception du virus muté codant pour la protéine p14BA4 qui se comporte comme le mutant de délétion de p14, les ARN de virus mutés dans la séquence NoLS sont encapsidés. De façon frappante, la présence de l'ARN3 sauvage en l'absence de la protéine p14 inhibe la formation des lésions nécrotiques qui deviennent chlorotiques jaunes, et

favorise l'accumulation des ARN viraux et de la protéine de capsid. Si l'expression de la protéine p25 par l'intermédiaire de l'ARN3nimeroc permet d'augmenter la teneur en ARN viraux, elle ne supprime pas l'apparition de nécroses qui disparaissent lorsque la séquence coremin est apportée par l'ARN5. Si cet effet de complémentation a déjà été observé par la présence d'une autre protéine suppresseur, nous pouvons imaginer que la séquence coremin qui complémente l'absence de la protéine p14, joue un rôle dans le recrutement d'une protéine cellulaire qui possède une action de suppresseur de RNA silencing. Cependant, une action de la protéine p25 induite par la séquence coremin n'est pas à écarter. En effet, elle est présente en grande quantité quand la séquence coremin est présente, et en faible quantité dans le cas de l'ARN3 contenant la séquence nimeroc. C'est pour cette raison que nous pensons que la complémentation partielle de la multiplication virale du mutant RNA2 Δ p14 en présence de l'ARN3 contenant la séquence nimeroc est probablement liée à l'expression modérée de la protéine p25.

Si la protéine p14 n'est pas impliquée dans le clivage de l'ARN3 ni dans sa stabilisation, la séquence coremin est indispensable, tout comme elle est nécessaire à l'infection systémique sur *B. macrocarpa*. J'ai pu montrer l'importance de la protéine p14 pour le mouvement à longue distance sans pour autant démontrer un lien direct entre p14 et son interaction avec coremin.

Sur *N. benthamiana*, l'infection systémique est possible lors d'une infection par le virus muté portant la protéine p14BA1 ou p14BA3 mais pas p14BA2. Cependant, nous avons vu que la présence de l'ARN3, et en particulier la séquence coremin, permet le mouvement systémique du virus portant la mutation p14BA2, ce qui laisse supposer que l'interaction entre la séquence coremin et la protéine p14BA2 compense une fonction portée par la protéine p14 sauvage.

Pour compléter cette étude, il sera nécessaire de reproduire l'infection par le virus portant la mutation p14BA1 en présence de l'ARN3 sauvage et 3nimeroc et de rechercher l'incidence de l'ARN3 sur l'accumulation des ARN viraux dans les feuilles systémiques.

Il a été montré que la protéine 2b du CMV interagissait avec les protéines AGO1 et AGO4 *in vivo*, se localisait dans le cytoplasme, le noyau et le nucléole des cellules infectées. Toutefois, ces propriétés ne sont pas suffisantes pour l'activité de suppression de la protéine 2b. En revanche, sa capacité à fixer les petits ARN est la propriété la plus déterminante pour sa fonction comme suppresseur de RNA silencing (Gonzalez *et al.*, 2010). Dans le cas de la protéine p14, les mutations effectuées sur les cystéines situées

dans le motif à doigt à zinc abolissent la localisation nucléolaire et l'activité de suppression. La localisation nucléolaire de la protéine p14, ainsi que sa dimérisation, ne semblent pas être les seules fonctions déterminantes de son activité de silencing. Si on revient aux supresseurs de RNA silencing en général (Diaz-Pendon and Ding, 2008), nous observons que la protéine p14 peut être classée dans deux groupes. En effet, elle peut être placée dans le groupe de la protéine HC-Pro pour son rôle dans la multiplication virale, et elle peut être classée dans le groupe de la protéine 2b pour son implication dans le mouvement à longue distance. L'étude de son expression dans des arabidopsis transgéniques permettra d'initier le mécanisme d'action de cette protéine surprenante sous bien des aspects.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans ce mémoire de thèse, j'ai présenté les résultats de l'étude des modifications post traductionnelles du facteur de pathogénicité du BNYVV : la protéine p25, les résultats de la recherche de ses partenaires cellulaires et viraux, ainsi que ceux de l'étude de l'interaction entre l'ARN3 et la protéine suppresseur de RNA silencing p14. J'ai tenté de répondre à plusieurs questions :

- La protéine p25 peut-elle être modifiée post traductionnellement ? Quelles sont ces modifications et quels sont leurs effets ?
- Quels sont les partenaires cellulaires et viraux de la protéine p25 et quels sont leurs rôles dans le cycle viral ?
- La séquence coremin de l'ARN3 a-t-elle des partenaires viraux et/ou cellulaires ? L'interaction entre la séquence coremin et son partenaire viral est-elle impliquée dans l'infection virale systémique ?

Dans la première partie de ce travail, nous avons abordé les modifications post synthétiques de la protéine p25 et plus précisément l'incidence de la phosphorylation sur les propriétés connues de la protéine p25 dans le but d'identifier un éventuel mutant dominant négatif capable de contrecarrer son effet. Cette étude, même si elle n'a pas abouti à l'identification d'un tel mutant, a cependant montré que la phosphorylation de la protéine p25 module ses propriétés biologiques. Nous n'avons pas pu identifier définitivement les sites exacts de phosphorylation. En mimant ou en inhibant la phosphorylation des sites probablement phosphorylés, j'ai pu démontrer que la dimérisation de la protéine p25 favorise sa fonction d'activation de la transcription.

La localisation nucléo-cytoplasmique de la protéine p25 sauvage suppose l'existence de régulations distinctes qui peuvent masquer la séquence NLS et exposer le NES ; dans la même cellule, d'autres types de modifications peuvent exposer le NLS et masquer le NES. Il est possible qu'une protéine puisse exister à la fois sous sa forme active et inactive dans une même cellule comme cela a déjà été montré pour le facteur de transcription NFAT1. L'activation de ce facteur nécessite la déphosphorylation de treize sérines situées dans le domaine de régulation. Cependant, ces déphosphorylations masquent la séquence NLS et exposent la séquence NES (Okamura *et al.*, 2000).

Les mutants de la protéine p25 Y₅₂A, T₅₆D, T₁₆₄A (**tableau I.4**) se localisent dans le cytoplasme et sont affectés dans leur import nucléaire. Les résidus Y52 et T56 sont situés

Conclusion et perspectives

en amont de la séquence NLS (K₅₇ à R₆₂) et le résidu T164 est situé en amont de la séquence NES (V₁₆₉ à V₁₇₈). La présence de la séquence NLS dans la partie N-terminale de la protéine p25 et l'importance de la phosphorylation de la thréonine 164 pour l'import nucléaire nous laissent supposer l'existence d'une interaction entre les parties N et C terminales de la protéine p25 (soit en *cis*, soit en *trans*). Ces mutations conduisent à l'absence de dimérisation et d'activation de la transcription. Ainsi, l'import nucléaire favoriserait la dimérisation mais n'est pas suffisant car certaines protéines p25 incapables de dimériser se localisent toujours dans le noyau. D'autres types de modifications post traductionnelles pourraient intervenir dans la dimérisation de la protéine p25, ou alors certaines mutations introduites pourraient induire un changement conformationnel de la protéine qui empêche les interactions.

Concernant la propriété d'activation de la transcription de p25, la phosphorylation des sérines 109 et 110, qui font partie intégrante du domaine d'activation (103-146), inhibe l'activité. Si ces résidus sont phosphorylés, leur déphosphorylation est nécessaire pour favoriser le recrutement de la RNA polymérase ou de ses cofacteurs. Certains changements N terminaux affectent également l'activité, ce qui renforce l'idée d'une interaction entre les extrémités N et C terminales de la protéine. La surexpression de la protéine p25 dans des cellules d'insectes infectés par un baculovirus recombinant permet d'obtenir la protéine p25 en grande quantité. Si la purification de la protéine est possible en faible quantité, la purification de la protéine pour des études cristallographiques conduit à l'obtention invariable de protéines insolubles. Quoiqu'il en soit, son étude cristallographique permettra de révéler les secrets intimement liés à sa structure tridimensionnelle et pourra faciliter les interprétations des propriétés de l'ensemble de nos mutants.

De nouvelles analyses par spectrométrie de masse sont nécessaires pour confirmer la phosphorylation des sites T43, Y52, S109-S110 et T164 et en identifier d'autres. Pour cela, des endoprotéases distinctes de la chymotrypsine devront être utilisées pour diminuer la taille du peptide C-terminal dépourvu d'acides aminés basiques. Le grand nombre de sites potentiellement phosphorylables ne m'a pas permis d'effectuer l'ensemble des combinaisons de doubles, triples, voire quadruples mutations pour étudier certains effets synergiques, antagonistes ou compensatoires résultant de phosphorylation sur ces sites. En plus de la phosphorylation, l'existence de formes de p25 N-acétylée, déamidée rend délicate l'interprétation des résultats obtenus avec des protéines étiquetées, en particulier pour les protéines étiquetées en N-terminal par l'EGFP ou l'étiquette HA. Nous pourrions

Conclusion et perspectives

rechercher l'influence de ces deux premières modifications identifiées sur les propriétés biologiques de la protéine et rechercher si elles influencent la phosphorylation et *vice versa*. D'autres types de modifications post traductionnelles comme l'*O*-GlcNAcylation seront recherchées sur p25 et devraient permettre de préciser son ou ses mécanismes de régulation. De telles informations aideront probablement à identifier un mutant dominant négatif de la protéine p25 qui pourra être utilisable par transgénèse pour lutter contre le BNYYV.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux partenaires cellulaires et viraux de la protéine p25. Un partenaire de la protéine p25, la protéine F-box-Kelch provenant de betterave résistante *Rz2*, forme un complexe SCF F-box-Kelch•ASK2•CUL1. La protéine p25 ne semble pas être la cible d'une dégradation par le protéasome 26S *via* ce complexe SCF. Il reste cependant à analyser l'effet d'une mutation ponctuelle ciblant la seule lysine (K57) de la protéine p25. Un remplacement K57R ne devrait pas perturber la localisation nucléaire de la protéine mais apporter des éléments de réponses quant à une éventuelle PTM par le système UPS. L'expression dans les feuilles de *N. benthamiana* de la protéine F-box-Kelch entraîne une mort cellulaire rapide induite qui ne permet pas de déterminer la localisation subcellulaire de cette protéine. Cette mort cellulaire rapide suggère que la protéine F-box-Kelch joue un rôle dans un mécanisme de résistance et son expression sous contrôle d'un promoteur inductible devrait permettre de retarder l'apparition de la nécrose, et ainsi nous permettre de la localiser voire co-localiser avec la protéine p25. Ceci devrait nous aider à préciser le rôle de cette interaction lors de l'infection virale.

Au cours des dernières années, les études du système ubiquitine-protéasome (UPS) ont illustré son rôle essentiel dans les interactions plante-pathogène. L'ubiquitination suivie par la dégradation des protéines semble se produire à plusieurs niveaux du mécanisme de défense des plantes (Dielen *et al.*, 2010). Des protéines virales sont bien entendu des cibles de l'UPS. On peut citer la dégradation des protéines virales de mouvement (MP) par le protéasome 26S qui semble partagé au cours des interactions plante-virus. La protéine MP 30K du TMV, tout comme la protéine MP 69K du *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV, Tymovirus), est dégradée *in vivo* par le protéasome 26S (Reichel and Beachy, 2000; Drugeon and Jupin, 2002). De même, la protéine TGBp3 du PVX (triple gene block protein 3), et la protéine MP du *Potato leafroll virus* (PLRV, Luteovirus), peuvent être également ciblées par la voie du protéasome 26S (Vogel *et al.*, 2007; Ju *et al.*, 2008). Cette dégradation commune des protéines de mouvement virales pourrait réguler la propagation

Conclusion et perspectives

virale, limiter les dommages à l'hôte tout en permettant la survie du virus. La conjugaison d'ubiquitine aux protéines de mouvement virales peut aussi refléter une voie d'activation de protéines plutôt qu'un mécanisme de défense de la plante ou encore un mécanisme de régulation de protéines en excès (Jockusch and Wiegand, 2003). Il est maintenant admis qu'un certain nombre d'agents pathogènes ont développé des systèmes spécifiques pour inhiber et/ou détourner l'UPS à leur profit en imitant des protéines de l'hôte afin de promouvoir leur propre survie. Dans la **figure CG.1**, sont présentés des exemples de l'implication des E3 ligases dans la défense contre les phytovirus et des exemples d'utilisation de l'UPS par les virus, dont certains ont déjà été cités dans l'introduction générale.

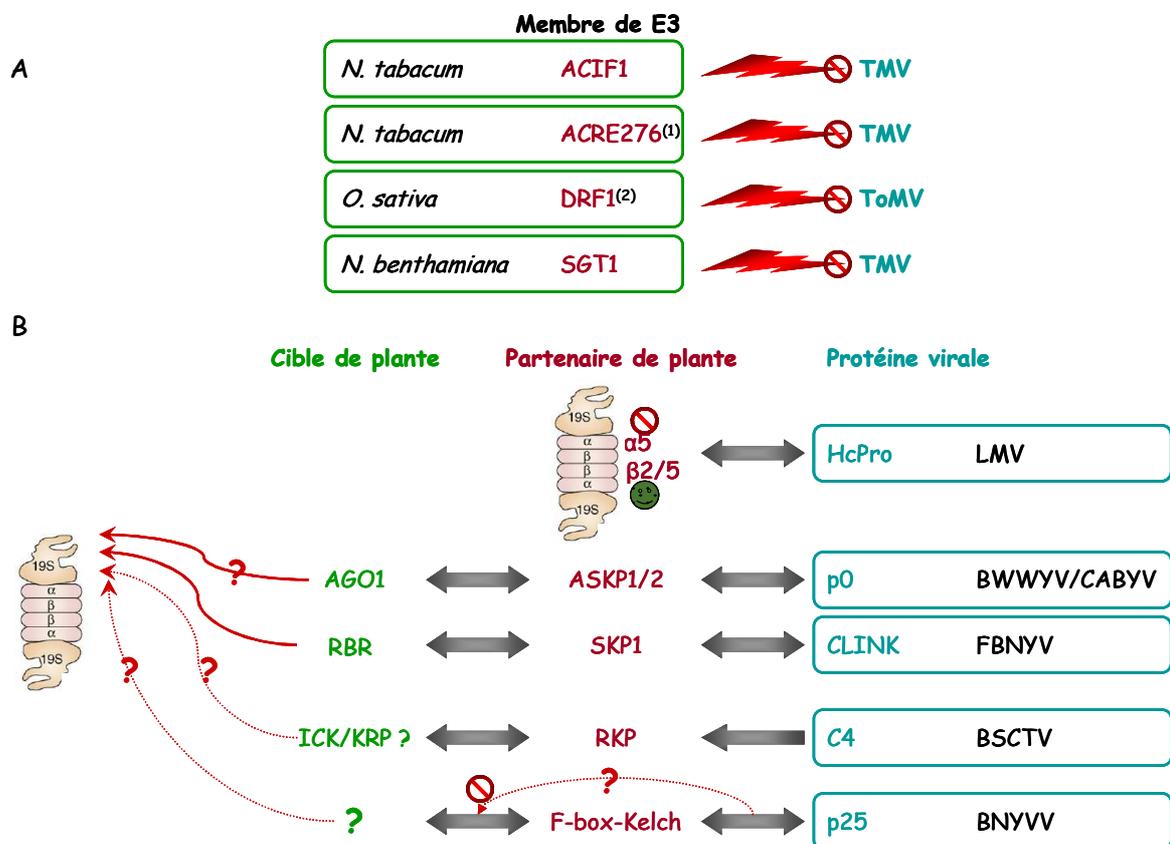


Figure CG.1 : Exemples d'interaction entre le système ubiquitine-protéasome (UPS) et les phytovirus. (A) Protéines d'E3 ligases des plantes impliquées dans les réactions de défense contre les virus. (B) Usurpation de l'UPS par des virus de plantes. (1) : (Yang *et al.*, 2006a) ; (2) : (Cao *et al.*, 2008).

La protéine HcPro du *Potato virus Y* (PVY, Potyvirus) interagit physiquement avec trois sous-unités du noyau de protéase 20S (CP du protéasome) chez *A. thaliana* : $\alpha 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$ (Jin *et al.*, 2007). *In vitro*, HC-Pro inhibe l'activité RNase et stimule légèrement les activités protéolytiques chymotrypsine et trypsine-like du protéasome 20S (Ballut *et al.*,

Conclusion et perspectives

2005). À ce jour, les rôles de telles modulations enzymatiques du protéasome ne sont pas connus, mais ils représentent des exemples pour l'exploitation des fonctions cellulaires à des fins propres du virus ou pour le ciblage des mécanismes de défense cellulaire par le virus. La protéine C4 du *Beet severe curly top virus* (BSCTV, *Geminivirus*) favorise la division cellulaire de l'hôte dans lequel la réplication virale est associée, en induisant l'expression de la protéine E3 RKP [une protéine à doigt de RING associée à KPC1 (pour Kip1 ubiquitination-promoting complex)]. La protéine RKP agit comme un régulateur du cycle cellulaire chez *Arabidopsis* en ciblant les protéines inhibitrices du cycle cellulaire ICK/KRP (Kip-related proteins ou interactors/inhibitors of Cdc2 kinases) et permet la réplication de l'ADN viral (Lai *et al.*, 2009).

Chez *B. vulgaris*, l'expression de la protéine F-box-Kelch ne semble pas être induite par l'expression de la protéine p25. Cependant, chez des *A. thaliana* exprimant constitutivement la protéine p25, l'expression des orthologues est activée d'environ trois fois par rapport aux plantes non transgéniques. Il serait intéressant de cloner le promoteur du gène F-box-Kelch en amont du rapporteur GUS pour confirmer son expression tissu spécifique et tester son activation en présence de la protéine p25. L'identification des cibles de la protéine F-box-Kelch permettra de définir plus précisément le rôle de la protéine p25 dans ce complexe. Des expériences d'extinction de l'expression des gènes candidats par VIGS permettront de clarifier les rôles de ces différents acteurs dans l'interaction BNYVV-betterave. Des analyses d'interactions tripartites Ask•Fbox•p25 en utilisant un vecteur bridge de levure exprimant les protéines F-box-Kelch de plantes sensibles et *Rz1* devraient préciser le rôle de ce complexe dans un mécanisme antiviral ou de contournement de résistance. Ces mêmes analyses devront être effectuées sur les autres partenaires de la protéine p25. Si la protéine F-box-Kelch, ou d'autres candidats, sont impliqués dans la résistance vis-à-vis du BNYVV, de tels régulateurs négatifs pourront être utilisés comme marqueurs pour sélectionner des plantes présentant la meilleure des résistances.

J'ai pu identifier des partenaires viraux (CP, RT et p14) et cellulaires (PR, eEF1alpha et ATP synthase) de la protéine p25. Ces protéines cellulaires semblent intéressantes puisqu'elles sont normalement impliquées dans des processus biologiques essentiels chez l'hôte. L'absence d'interaction directe entre la protéine p25 et ces partenaires nous a laissés penser que des protéines cellulaires ou des ARN viraux étaient impliqués dans la formation des complexes. L'implication des différents acteurs identifiés devra être confirmée. Compte tenu de l'effet d'activation de la traduction lié à la présence de la

Conclusion et perspectives

protéine p25, l'implication de la protéine eEF1alpha devra être recherchée en priorité, notamment en raison de ses multiples rôles biologiques dans des processus autres que traductionnels comme l'export nucléaire, le protéasome et l'apoptose [pour revue voir (Mateyak and Kinzy, 2010)].

La troisième partie de ma thèse a consisté à rechercher les partenaires viraux et cellulaires qui interagissent avec la séquence coremin de l'ARN3, impliquée dans le mouvement viral à longue distance chez *Beta macrocarpa*. J'ai montré qu'un dimère de la protéine p14 était nécessaire à la reconnaissance de l'ARN et en particulier de la séquence coremin. J'ai pu également montrer l'influence de la dimérisation sur la localisation nucléolaire de p14 et la capacité de la protéine p14 à supprimer le RNA silencing.

Le BNYVV est un phytovirus à ARN de polarité positive dont le cycle de multiplication se déroule dans le cytoplasme des cellules infectées. Compte tenu de l'interaction entre une séquence de l'ARN3 et une protéine virale qui est adressée au nucléole, il devient essentiel de localiser l'ARN3 dans les cellules infectées. Des expériences de localisation d'ARN *in vivo* à l'aide de séquences spécifiquement reconnues par des protéines Pumilio recombinantes sont en cours au laboratoire, en collaboration avec le laboratoire du Pr. Karl Oparka (Tilsner *et al.*, 2009). L'ARN3 et l'ARN3sub seront recherchés en contexte viral, en présence ou pas de la protéine p14. Une telle approche nous permettra peut-être de préciser le rôle de cet ARN3sub non codant.

Il a été suggéré que la protéine p14 pourrait inhiber le mouvement de signal de silencing de cellule à cellule (Zhang. *et al.*, 2005). L'apparition des lésions nécrotiques en l'absence de la protéine p14 est due à l'absence d'action de suppression de RNA silencing puisque ces lésions nécrotiques disparaissent en présence d'autres supresseurs. La complémentation phénotypique de l'absence de la protéine p14 par la séquence coremin observée dans cette étude pourrait s'expliquer par le recrutement d'un facteur cellulaire possédant une action de suppression de silencing ou bloquant le mouvement de signal de RNA silencing. Il serait intéressant de vérifier si la protéine eEF1alpha est capable de remplir une telle fonction, en d'autres termes si eEF1alpha intervient dans un mécanisme de silencing. De plus, indépendamment de la présence de l'ARN3, la protéine p14 est un supresseur de RNA silencing. Il nous reste à déterminer si la présence de la séquence coremin renforce son action de suppression ou agit de façon parallèle indépendamment de l'expression de la protéine p25.

Les facteurs de transcription appartenant à la famille TCP identifiés par le criblage de banque d'ADNc de betterave avec la séquence coremin pourraient être régulés

Conclusion et perspectives

positivement ou négativement par un ARN portant une telle séquence (ARN3 ou ARN3sub) et ceci en parallèle à la fonction portée par la protéine p25. Un rôle potentiel de ces facteurs de transcription dans des mécanismes de défense reste cependant à démontrer.

La protéine p14 et la séquence coremin présente sur l'ARN3 sont indispensables à la mise en place de l'infection systémique chez *B. macrocarpa*. Il nous reste à déterminer le lien entre mouvement à longue distance et suppression de RNA silencing. Nous devons déterminer si le mouvement est lié à l'activité de suppression du RNA silencing ou à une autre fonction, comme l'interaction avec la séquence coremin et l'adressage de l'ARN dans le nucléole. Pour cela, il sera nécessaire de rechercher l'infection systémique en l'absence de la protéine p14, mais en présence d'autres supprimeurs comme par exemple la protéine p13 du BdMV ou la protéine p0 du BWYV. Si ce mouvement a lieu, nous devons vérifier l'absence d'interaction de ces supprimeurs avec l'ARN3. Si les supprimeurs ne rétablissent pas un tel mouvement et/ou n'interagissent pas avec la séquence coremin, nous pourrions tester nos mutants de la protéine p14 en présence de ces supprimeurs et analyser l'effet sur le mouvement à longue distance sur *B. macrocarpa*. Chez *N. benthamiana*, la protéine p14 est indispensable à l'infection généralisée mais pas la séquence coremin qui favorise seulement ce mouvement.

Bien que la fixation des ARN semble être commune à la plupart des supprimeurs du RNA silencing viraux (Lakatos *et al.*, 2006; Merai *et al.*, 2006), les interactions avec les protéines de l'hôte ont été identifiées pour certains supprimeurs, et ces interactions sont impliquées dans des mécanismes alternatifs pour bloquer le RNA silencing (Bortolamiol *et al.*, 2007; Diaz-Pendon and Ding, 2008). En effet, j'ai constaté l'absence d'interaction entre la protéine p14 et la protéine AGO1 en système double hybride de levure, mais cela n'exclut pas la possibilité d'interaction avec d'autres protéines AGO. Un criblage de banque d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisé au laboratoire en utilisant la protéine p14 comme appât. Ce criblage n'a pas identifié de protéines AGO, mais une protéine de fonction inconnue impliquée dans la farnésylation. Les plantes d'*A. thaliana* mutées dans le gène codant pour ce partenaire seront comparées à des plantes exprimant la protéine p14 et testées pour leur sensibilité aux infections virales.

Nos résultats ont permis d'approfondir les connaissances des mécanismes moléculaires complexes liés aux rôles de la protéine p25 et à ceux de l'ARN3 et de la protéine p14 du BNYVV. Ces données, avec les analyses supplémentaires prévues, serviront sûrement à

Conclusion et perspectives

développer de nouvelles stratégies de lutte vis-à-vis de l'infection des plantes par le BNYYV et, probablement, vis-à-vis d'autres virus qui lui ressemblent.

Matériel et méthodes

❖ MATERIEL

I. Organismes

1. Plantes hôtes

Les plantes hôtes du BNYVV, utilisées au laboratoire, font partie principalement de la famille des Chenopodiacees. En général, ces plantes hôtes sont cultivées dans les conditions suivantes : 22 °C avec une photopériode de 16 h de lumière (20 000 lux), 8 h d'obscurité et environ 70 % d'hygrométrie.

i. *Chenopodium quinoa* : Plante hôte du BNYVV répondant à l'infection virale par l'apparition sur les feuilles inoculées de lésions locales chlorotiques vertes (ARN1 et ARN2 seuls), chlorotiques jaunes (ARN1, 2 et 3) ou nécrotiques en fonction de la composition de l'inoculum.

ii. *Tetragonia expansa* : Plante hôte du BNYVV, de la famille des Tétragoniacées, répondant à l'infection virale par l'apparition de lésions locales visibles uniquement sous UV (ARN1 et 2 seuls), ou d'aspect chlorotique jaune en présence de l'ARN3.

iii. *Beta macrocarpa* : L'infection du BNYVV chez cette plante est systémique lorsque l'ARN3 est co-inoculé en présence de l'ARN1 et 2. Les symptômes foliaires sont caractérisés par une mosaïque, un gaufrage ainsi qu'un jaunissement.

iv. *Nicotiana benthamiana* : Cette plante de la famille des Solanacées est un hôte du BNYVV permettant le mouvement systémique du virus même en absence de l'ARN3. Cette plante est facile à manipuler. En effet, ses feuilles peuvent être infiltrées par *Agrobacterium tumefaciens* permettant ainsi la transformation transitoire des tissus.

v. *Spinacea oleracea* : Cette espèce de plante développe une infection systémique après l'inoculation des ARN1 et 2 du BNYVV. La plante a été utilisée pour produire de la protéine p14 en contexte viral.

2. Cellules de tabac BY-2

La lignée cellulaire de tabac [*Nicotiana tabacum* L., souche Bright Yellow 2 (BY-2)] (Nagata *et al.*, 1992) est un outil de choix pour l'étude de la localisation subcellulaire de protéines *in vivo*. Cette lignée cellulaire est constituée de grandes cellules facilement observables en microscopie optique et la technique de transfection est parfaitement reproductible.

3. Souche virale

Au laboratoire, nous travaillons avec un isolat artificiel de BNYVV dérivé de l'isolat naturel F2. Cet isolat est issu de transcrits infectieux, synthétisés *in vitro* à partir des ADNc complets correspondant aux ARN1 et ARN2 (appelés Stras12), supplémentés ou non de transcrits correspondant aux ARN3, ARN4 (Quillet *et al.*, 1989) et ARN5 (Link *et al.*, 2005).

4. Bactéries

i. *Escherichia coli* (tableau MM.1)

Les clonages sont réalisés dans les bactéries *Escherichia coli* :

a. **MC1022** : (Casadaban and Cohen, 1980). Elle est utilisée principalement pour les clonages et l'amplification de plasmides recombinants. Elle permet la sélection des clones recombinants par la couleur des colonies en présence d'IPTG (isopropyl β -D thiogalactoside), un substrat de la β -galactosidase.

b. **DH5 α** : Cette souche permet de limiter les risques de recombinaison. Elle permet l' α -complémentation et la sélection des clones recombinants par la couleur des colonies en présence d'IPTG.

c. **XL1-Blue (Stratagene)** : Cette souche permet la sélection des clones recombinants grâce à la couleur blanc/bleu des colonies.

d. **BL21-CodonPlus-(DE3) RIL (Stratagene)** : Cette souche bactérienne dérivant d'*E. coli* (Studier *et al.*, 1990) est utilisée pour la production de protéines à partir du plasmide pET ou pGEX-2TK. Cette souche contient le gène *lacI*, exprimant le répresseur du promoteur de l'opéron lactose, mais également le gène de la T7 RNA polymérase qui est placé sous le contrôle du promoteur *lac* UV5 inductible par l'IPTG.

e. **TOP10 (Invitrogen)** : Cette souche est utilisée pour cloner, amplifier un plasmide ou exprimer une protéine recombinante. Elle est déficiente dans la biosynthèse d'arabinose. Cette souche a été utilisée pour le clonage dans le vecteur pVTU-102.

f. **KC8** : Cette souche possède les mutations d'auxotrophies pour les acides aminés leuB, trpC, et hisB qui peut être complétementée par des transformations par les plasmides codants pour ces gènes de levures (*LEU2*, *TRP1*, et *HIS3*). KC8 est utilisée après le criblage d'une banque d'ADNc par double hybride (MATCHMAKER) afin de récupérer à partir de levures co-transformées les plasmides contenant la protéine fusionnée soit au

Matériel et méthodes

domaine d'activation de la transcription, soit au domaine de fixation à l'ADN. Cette souche transformée par des plasmides de levures peut être sélectionnée sur milieu minimum M9 dépourvu de l'acide aminé adéquat (leucine, tryptophane, ou histidine).

Tableau MM.1 : Génotype des souches de bactéries d'*E. coli* utilisées lors des transformation pour les clonages, l'amplification d'ADN ou pour l'expression de protéines.

Souche de bactéries	Génotype
MC1022	<i>ara D139 Δ (ara leu) 7697 Δ (lacZ) M15 galU galK rpsL</i>
DH5α	<i>F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	<i>F- ompT hsdS(r_B- m_B-) dcm+ Tet^r E. coli gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>
TOP10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>
KC8	<i>hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisBA463, lacΔX74, strA, galU, K</i>

ii. *Agrobacterium tumefaciens*

Cette bactérie phytopathogène est responsable de la maladie appelée galle du collet. L'infection fait intervenir le plasmide Ti (Tumor inducing) qui porte, entre autres, les gènes codant pour les opines, les gènes de virulence (*vir*) responsables du transfert du T-DNA (transferred DNA) et les gènes oncogènes (*onc*) intervenant dans l'infection tumorale. Le T-DNA du plasmide peut s'intégrer au hasard dans le génome des cellules infectées grâce à la présence des bordures gauches et droites et à l'intervention des gènes *vir*.

La souche **GV3101** (Holsters *et al.*, 1980) est dérivée de la souche C58C1 dont le chromosome contient le gène de résistance à la rifampicine. La souche renferme le

plasmide Ti désarmé portant le gène de résistance à la tétracycline. Cette souche transformée par un vecteur binaire (pBin 61 ou pBin plus) est utilisée pour l'agroinfiltration des plantes de tabac. Les bactéries sont cultivées à 28°C en milieu LB supplémenté de rifampicine (100 µg/ml) et de kanamycine (50 µg/ml). Les souches d'*A. tumefaciens*, ainsi que les bactéries transformées peuvent être stockées à -80°C en présence de 15 % de glycérol.

5. Levures (*Saccharomyces cerevisiae*) (tableau MM.2)

i. **HF7c** : Souche de levure utilisée en systèmes dits de simple et double hybride, leur signe sexuel est *MATa* et leurs gènes rapporteurs sont *HIS3* et *lacZ*.

ii. **Y187** : (Harper *et al.*, 1993) Souche utilisée en système double hybride par la technique de "mating", leur signe sexuel est *MATa* et leurs gènes rapporteurs sont *lacZ* et *MEL1*.

iii. **AH109** : Cette souche de levure est conçue pour détecter les interactions protéine-protéine par les tests double et triple hybride en système GAL4. Elle contient les gènes rapporteurs *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* et *MEL1*. AH109 permet d'éliminer les faux positifs qui apparaissent pendant un screen par GAL4 double hybride.

iv. **EGY48** : EGY48 est la souche de base la plus couramment utilisée pour le screen de banques. Elle contient l'opérateur LexA en amont du gène *LEU2* pour son utilisation en tant que gène rapporteur. Cette souche est auxotrophe aux trois marqueurs de sélection histidine, uracile et tryptophane. EGY48 ne peut pas être utilisée pour le marqueur de sélection *leu2*. Cette souche contient la banque d'ADNc de betterave résistante Rz2 clonée dans le vecteur pJG4-5 qui code pour le tryptophane comme marqueur de sélection.

v. **L40 coat** : Souche utilisée en système triple hybride afin de détecter les interactions acide ribonucléotidique-protéine. Cette souche de signe sexuel *MATa* contient une copie de la protéine de capsid du virus MS2 fusionnée au domaine de fixation à l'ADN LexA.

vi. **R40 coat** : Souche également utilisée en système triple hybride afin de détecter les interactions acide ribonucléotidique-protéine. C'est la même souche que L40 coat mais de signe sexuel *MATa*. Cette souche a été utilisée pour faire le mating avec la souche L40 coat.

vii. **YBZ-1** : Cette souche dérivée de la souche L40 coat est utilisée pour diminuer les faux positifs. Cette souche de signe sexuel *MAT α* contient un dimère de la protéine de capsid du virus MS2 fusionnée au domaine de fixation à l'ADN LexA.

Tableau MM.2 : Génotype des souches de levures utilisées lors des tests de simple, double et triple hybride. Chaque gène marqueur est sous le contrôle d'une séquence GAL UASs (GAL4 upstream activating sequences) ou de l'opéron LexA et de TATA box spécifiques. His : histidine ; Leu : leucine ; Lys : lysine ; Trp : tryptophane ; Ura : uracile ; MAT : mating-type ; lacZ : fragment β du gène de la β -galactosidase permettant une α -complémentation ; MEL1 : gène endogène de levure codant pour l' α -galactosidase.

Souche de levures	Génotype	Gène rapporteur	Marqueur de transformation
HF7c	<i>MATα</i> ; <i>ura3-52, his3-200, ade2-101, lyse2-801, trp-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80</i> <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}</i> <i>HIS3, URA3::GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	<i>HIS3, lacZ</i>	trp1, leu2, cyh ^r 2
Y187	<i>MATα</i> ; <i>ura3-52, his3-200, ade2-101, trp-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	<i>lacZ, MEL1</i>	trp1, leu2
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	<i>ADE2, HIS3, lacZ</i> et <i>MEL1</i>	trp1, leu2
EGY48	<i>MATα ura3 his3 leu2::3LexAop-LEU2 trp1::hisG LYS2</i>	<i>LEU2</i>	ura3, trp1, his3
L40 coat	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3_200 trp1_1 ade2 LYS:::(LexA op)-HIS3 ura3:::(LexA-op)-lacZ, LexAMS2 coat (TRP1)</i>	<i>HIS3, lacZ</i>	ura3, trp1, leu2
R40 coat	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3_200 trp1_1 ade2 LYS:::(LexA op)-HIS3 ura3:::(LexA-op)-LacZ, LexAMS2 coat (TRP1)</i>	<i>HIS3, lacZ</i>	ura3, trp1, leu2
YBZ-1	<i>MATα, ura3-52, leu2-3,112, his3-200, trp1-1, ade2, LYS2:::(LexAop)-lacZ, LexA-MS-MS2 coat (N55K)</i>	<i>HIS3, lacZ</i>	ura3, trp1, leu2

II. Milieux de culture

Ils sont utilisés sous forme liquide ou solide. Dans ce dernier cas, 1,2 à 1,5 % d'agar sont additionnés avant autoclavage. Ils peuvent être additionnés d'antibiotiques permettant la sélection des clones recombinants (ex : Ampicilline à 100 µg/ml).

1. Milieu LB (Luria Bertani)

C'est le milieu de culture le plus couramment utilisé (Bactotryptone 1 % ; Extrait de levure 0,5 % ; NaCl 0,5 % ; pH 7,4).

2. Milieu M9

C'est un milieu de culture minimum composé d'une source de carbone, d'une source d'azote et de sels minéraux. Ce milieu est préparé en 2 étapes. La solution M9 10 X est composée de : 60 g Na₂HPO₄ ; 30 g KH₂PO₄ ; 5 g NaCl ; 10 g NH₄Cl ; H₂O qsp 1L ; pH 7,4. Le milieu de culture M9 final contient (100 ml de solution M9 10 X ; 10 ml de glucose à 20 % ; 2 ml de MgSO₄ 1 M ; 0,2 ml CaCl₂ 1 M ; 1 ml ampicilline 100 mg/ml ; les acides aminés ; H₂O qsp 1000 ml). Pour préparer des boîtes il faut ajouter 20 g de LB-agar. Ce milieu est utilisé pour sélectionner les bactéries KC8 transformées par les plasmides issus de la banque d'ADNc de betterave.

3. Milieu YPD

Le YPD (BD Biosciences Clontech) est un milieu complet permettant la croissance non sélective des levures.

4. Milieu SD

Le SD (BD Biosciences Clontech) est un milieu minimal permettant la croissance sélective des levures. Ce milieu est complété par différents mélanges d'acides aminés (Drop Out) mais toutefois dépourvu de ceux nécessaires à la sélection des transformants, aux tests d'activation de la transcription et aux tests d'interaction protéine-protéine.

i. 3-amino-triazole (Sigma-Aldrich)

C'est un inhibiteur compétitif de l'histidine permettant de quantifier de façon approximative l'affinité des partenaires. Il est dissout dans l'eau et stérilisé par filtration. Ce produit (3AT) est additionné avant de couler les boîtes à différentes concentrations.

ii. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranoside (X- α -gal)

Le X- α -gal (Clontech) est dissout dans du diméthylformamide (DMF) à une concentration de 20 mg/ml et conservé dans un tube en verre foncé à -20 °C. Il est additionné avant de couler les boîtes.

5. Milieu BY-2

C'est le milieu de culture Murashige et Skoog basal (Duchefa), complété avec la Thiamine 1 mg/l ; KH₂PO₄ 200 mg/l ; 2,4-dichlorophénoxyacétique 0,2 mg/l ; MYO-insitol 100 mg/l ; saccharose 3 % ; pH 5,8.

III. Vecteurs de clonage et d'expression

1. pGEM®-T (Promega)

Ce plasmide commercial est linéarisé par *EcoRV* au niveau de la cassette de clonage, où une thymidine est ajoutée à chaque extrémité 3'OH. Un clonage rapide est alors possible à partir d'une séquence d'ADN provenant d'un produit de PCR contenant des extrémités adénosines 3'OH ajoutées naturellement en fin de cycle par les Taq polymérases classiques. La cassette de clonage est située dans le gène *lacZ* qui code pour le peptide α de la β -galactosidase. Ce plasmide contient également une origine de réplication bactérienne, un gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de réplication du phage f1 et les séquences promotrices T7 et SP6 de part et d'autre de la cassette de clonage.

2. pCK-EGFP

D'une taille de 3508 pb, ce vecteur dérivé du pUC19 est utilisé dans les expériences de bombardement de cellules BY-2. Il possède une origine de réplication bactérienne ainsi que le gène de résistance à l'ampicilline. En amont du gène codant pour l'EGFP se trouve le promoteur 35S suivi de la séquence Ω du TMV qui est un activateur de traduction (Sleat *et al.*, 1987). La séquence de l'EGFP est délimitée en aval par le terminateur 35S. Un tel système permet la transcription *in vivo* des ARN messagers à partir de la matrice plasmidique, et ainsi de s'affranchir de la réplication virale, des erreurs de recopie et de l'apparition de formes mutées, amplifiées potentiellement lors des cycles multiples d'infection.

3. pGBT9 (Clontech®)

Ce vecteur navette de 5,5 kb a été utilisé pour mettre en évidence l'activation de la transcription des protéines virales en système simple hybride dans la levure. Il porte un gène de résistance à l'ampicilline nécessaire à sa sélection dans *E. coli* et le gène de sélection *trp1* qui rend les levures prototrophes pour le tryptophane. Les séquences codantes pour les domaines protéiques à analyser sont fusionnées au domaine de fixation aux acides nucléiques (ou GAL4BD) du gène *gal4* présent dans ce plasmide. Les protéines de fusion sont exprimées par l'intermédiaire du promoteur constitutif de l'alcool déshydrogénase (ADH). La protéine de fusion est importée dans le noyau par l'intermédiaire d'un signal de localisation nucléaire (NLS) intrinsèque au GAL4BD de la protéine GAL4.

4. pGBKT7

Le vecteur pGBKT7 exprime des protéines fusionnées au domaine GAL4BD de la protéine GAL4. Dans la levure, l'expression à haut niveau de protéines de fusion est permise par le promoteur constitutif ADH1 (alcool déshydrogénase). La transcription est arrêtée par les signaux de terminaison T7 et ADH1 (TTT7 & ADH1). pGBKT7 contient également le promoteur T7, l'épitope c-myc, et une cassette de clonage. pGBKT7 se réplique de façon autonome dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae* via les origines de répllication pUC et 2 μ respectivement. Le vecteur porte des marqueurs de sélection : le gène de résistance à la kanamycine (Kan) dans *E. coli* et le marqueur de sélection *trp1* dans la levure.

5. pGAD424 (Clontech®)

Ce vecteur navette de 6,6 kb est utilisé pour mettre en évidence les interactions protéine-protéine entre les protéines virales dans le système double hybride de levures. Il porte un gène de résistance à l'ampicilline et le gène de sélection *LEU2* rendant les levures prototrophes pour la leucine. Les séquences codantes pour les domaines protéiques sont fusionnées au domaine d'activation de la transcription (ou GAL4AD) du gène *gal4*. Les protéines de fusion sont exprimées par l'intermédiaire du promoteur constitutif de l'alcool déshydrogénase (ADH). La protéine de fusion est importée dans le noyau par l'intermédiaire du signal de localisation nucléaire (NLS) de l'Ag T de SV40 ajouté au domaine d'activation GAL4AD de la protéine GAL4.

6. pGADT7

Le vecteur pGADT7 exprime des protéines en fusion au domaine GAL4AD de la protéine GAL4. Dans la levure, l'expression des protéines de fusion est sous la dépendance du promoteur constitutif ADH1. Le signal de terminaison ADH1 est responsable de l'arrêt de la transcription. Les protéines de fusion sont localisées dans le noyau de la levure car la séquence de localisation nucléaire du SV40 a été ajoutée au domaine GAL4AD de la protéine GAL4. pGADT7 contient également le promoteur T7, un épitope HA et une cassette de clonage. Ce vecteur se réplique à partir des origines de répllication pUC et 2 μ respectivement dans *E. coli* et *S. cerevisiae*. Le gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection dans *E. coli* alors que le gène *LEU2* est un marqueur nutritionnel auxotrophique utilisé pour la sélection dans la levure.

7. pACT (pACTII)

Tout comme le plasmide pGAD424, le plasmide pACT permet l'expression d'une protéine fusionnée à la partie C-terminale du domaine d'activation de la transcription de GAL4. La synthèse de la protéine de fusion est sous le contrôle d'un promoteur et d'un terminateur ADH1.

8. pBSM (pBluescribe)

Dérivé du pUC19, il contient une origine de répllication ColE1, un gène de résistance à l'ampicilline et une cassette de clonage bordée par les promoteurs T3 et T7 située dans le gène *lacZ*, permettant une sélection blanc/bleu des colonies en présence d'X-GAL et d'IPTG. Les ADNc du BNYVV sont clonés dans ce vecteur, qui permet, après linéarisation, la transcription *in vitro* d'ARN viraux artificiels infectieux. Il faut noter que l'ADNc de l'ARN5 sous le contrôle du promoteur T7 a été cloné dans le vecteur pUC19 (Link *et al.*, 2005).

9. pB35

Ce vecteur est dérivé du plasmide pBSM (pBluescribe). Il contient en aval du promoteur de la polymérase du bactériophage T7 la séquence ADNc complète de l'ARN3 (nts 1 à 1774) suivie de 70 résidus adénines et permet de produire *in vitro* des ARN3 infectieux. Le plasmide **pRep25Nco** dérive de pB35 et possède le site unique de restriction *NcoI* placé au

niveau de la séquence d'initiation de la traduction de la protéine p25. Ce plasmide a été utilisé pour introduire dans l'ARN3 les séquences de protéines p25 modifiées.

10. pBin 61 (Voinnet *et al.*, 2000)

Ce vecteur est dérivé du pBin 19 (Bevan, 1984). Son T-DNA délimité par les bordures RB et LB contient le gène de résistance à la kanamycine, *NPT II* codant pour la néomycine phosphotransférase et une cassette de clonage flanquée du promoteur 35S et du terminateur 35S du CaMV. Ce vecteur possède une origine de répllication BHR (Broad Host Range) à large spectre d'hôte permettant à la fois la répllication dans *E. coli* et dans *A.tumefaciens*.

11. pBin plus

Le plasmide binaire pBin plus (van Engelen *et al.*, 1995) (basé sur le vecteur pBin 19), d'une taille de 12,4 kb, a été utilisé pour l'infiltration de feuilles de *N. benthamiana*. Il comporte deux origines de répllication. Le site de répllication originellement présent dans pBin 19, RK2, entraîne un taux de répllication faible. Celui-ci est augmenté d'un facteur 4 par l'ajout du site ColE1. Ce plasmide comporte également le gène *NPTII*, sous le contrôle d'un promoteur bactérien. Il contient de plus les séquences flanquantes du T-DNA (LB et RB) qui permettent, *via Agrobacterium tumefaciens*, le transfert de l'information contenue entre elles dans le génome nucléaire du matériel végétal. Entre ces séquences flanquantes, on trouve le gène *lacZ'*, permettant de réaliser la sélection blanc/bleu. Ce gène est interrompu par une cassette de clonage avec les sites *AscI* et *PacI* aux extrémités. On y trouve aussi le gène *NPTII* qui confère la résistance à la kanamycine sous le contrôle du promoteur et du terminateur NOS du gène de la nopaline synthase. Cette résistance permettra la sélection du matériel végétal transformé. Dans pBin plus, contrairement à pBin 19, l'extrémité 3' de ce gène se trouve juste à côté de la bordure gauche du T-DNA. Comme le T-DNA est transféré de droite à gauche, les plantes résistantes à la kanamycine auront vraisemblablement intégré la totalité de celui-ci.

12. pIVEX[®] 2.3 (In Vitro EXpression, Roche)

Ce vecteur, d'une taille de 3530 pb, est utilisé afin de surexprimer la protéine p25 dans un système procaryotique où la transcription et la traduction sont couplées. Ce système est nommé RTS[®] (Rapid Translation System) et commercialisé par la société Roche[®]. Ce vecteur possède l'origine de répllication d'*E. coli* ainsi que le gène de résistance à l'ampicilline. Un promoteur T7 se trouve en amont de la cassette de clonage suivi d'une

région RBS (Ribosome Binding Site) permettant la fixation des ribosomes. La cassette de clonage est délimitée en aval par le terminateur T7.

13. pGEX-2TK (Pharmacia Biotech)

Ce vecteur dérivé du pGEX-2T code pour la GST (Glutathion-S-Transferase). Il contient une cassette de clonage permettant de cloner le gène d'intérêt en fusion avec la glutathione-S-transférase (GST). La protéine fusionnée à la GST est exprimée dans *E. coli*. Ces protéines de fusion peuvent être clivées par la thrombine qui permet de séparer la GST et la protéine d'intérêt produite. La GST est sous le contrôle du promoteur *tac* qui est inductible par l'analogue du lactose isopropyl β -D thiogalactoside (IPTG). Ce vecteur contient également le gène *lacIq* qui code pour un répresseur capable de se fixer au promoteur *tac*, bloquant ainsi l'expression de la protéine fusionnée à la GST jusqu'à l'induction par l'IPTG.

pGEX-2TK est spécialement conçu pour permettre la détection directe des protéines exprimées par l'étiquetage des produits de fusion *in vitro*. Ce vecteur contient la séquence de reconnaissance pour la sous-unité catalytique de la protéine kinase AMPc-dépendante obtenue à partir du muscle cardiaque. Les protéines exprimées peuvent être directement étiquetées au moyen de la protéine kinase et [γ -P32] ATP et être facilement détectées par les techniques radiométriques ou autoradiographiques.

14. pET

Le plasmide pET (Studier *et al.*, 1990) dérivé du pBR322 est utilisé pour surexprimer la protéine d'intérêt dans *E. coli*. Il confère la résistance à l'ampicilline. Le vecteur utilisé contient la séquence codante pour la protéine p14 étiquetée de 6 His en C-terminal. La séquence de la protéine p14 est clonée en aval du promoteur du phage T7, reconnu par la T7 RNA polymérase.

15. pVTU-102 (Vernet *et al.*, 1987)

C'est un vecteur d'expression dans la levure qui contient un polylinker pour le clonage dans une cassette d'expression qui comprend le promoteur et la séquence 3' du gène ADH1. Le clonage dans ce vecteur a été réalisé en utilisant la technique de Gateway. Il peut se répliquer dans *E. coli* (sélection par la résistance contre l'ampicilline) et chez *S. cerevisiae* (sélection par complémentation d'*ura3*).

16. pEntry 221 (Invitrogen)

C'est un vecteur d'entrée qui porte la séquence d'intérêt flanquée par des sites de recombinaison *attL*.

17. pIII/MS2 (Sengupta *et al.*, 1996)

pIII/MS2-1 est un vecteur navette de levures/*E. coli* dans lequel un promoteur ARN polymérase III dirige la transcription d'un ARN contenant deux sites MS2 en tandem. Un site unique de restriction *SmaI* peut être utilisé pour insérer une séquence à tester dans le système triple hybride. Dans ce vecteur, le site *SmaI* est localisé à l'extrémité 3' de la protéine de capsid MS2. Ce plasmide est multi-copie dans la levure et porte un marqueur URA3 de levure. Chez *E. coli*, le plasmide confère une résistance à l'ampicilline.

❖ METHODES

I. Infections virales, agroinfiltration et transfection de cellules

1. Infections virales

i. Obtention d'ARN viraux du BNYVV

Chaque feuille de plantes de *C. quinoa* âgées de 6 à 8 semaines est inoculée mécaniquement par 25 µl d'une solution contenant les ARN1 et 2 du BNYVV issus de transcription *in vitro* (50 µg/ml de transcrits ; 0,5 µg/µl d'ARN total de levure ; KH₂PO₄ 50 mM ; macaloïde 0,05 %), après avoir saupoudré la feuille de célite pour créer des micro-blessures en cassant les poils épidermiques facilitant l'entrée du virus. Sept jours après inoculation, les feuilles sont récoltées et les ARN totaux sont extraits. Cette solution d'ARN totaux renfermant les ARN viraux 1 et 2 est dénommée Stras12. Les ARN1 et 2 du BNYVV étant nécessaires et suffisants pour permettre la réplication des autres ARN génomiques de ce virus, Stras12 pourra être utilisée pour l'inoculation d'autres plantes en présence ou non d'un ou de plusieurs autres ARN génomiques viraux entiers ou mutés synthétisés par transcription *in vitro*.

ii. Synthèse des ARN artificiels cappés

La transcription *in vitro* permet d'obtenir des ARN à partir de clones d'ADN. Dans le cas des clones complets d'ADNc du BNYVV, les ARN artificiels obtenus, identiques aux ARN viraux, sont biologiquement actifs. La transcription est réalisée à partir d'ADN plasmidique recombinant contenant un promoteur de bactériophage T3 ou T7 situé en amont du fragment d'ADN à transcrire. L'ADN plasmidique est au préalable digéré par une enzyme de restriction dont le site unique se trouve directement en aval du fragment d'ADN à transcrire afin de limiter la transcription à l'insert. La réaction est réalisée à 37 °C en présence de m⁷GpppG encore appelé cap ou coiffe, selon les conditions détaillées dans le **tableau MM.3**. Afin de favoriser l'incorporation de la coiffe, la concentration en GTP est limitée pendant les 30 premières minutes de réaction puis augmentée pour permettre l'allongement des ARN synthétisés. Les transcrits obtenus sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1 % natif.

Tableau MM.3 : Protocole de transcription *in vitro*.

Obtention de transcrits cappés	
ADN linéarisé 1 µg/µl	1 µl
Tampon de transcription X 5 Tris-HCl 200 mM, pH 7,5 MgCl ₂ 120 mM Spermidine 10 mM DTT 100 mM	5 µl
rATP, rCTP, rUTP 12,5 mM	1,5 µl
rGTP 0,625 mM	1,5 µl
BSA 2 mg/ml	1 µl
RNA-Guard 38 U/µl	0,7 µl
m ⁷ GpppG 15 mM	1 µl
ARN polymérase du phage T7 ou T3 50 U/µl	1 µl
H ₂ O Incubation 30 min à 37 °C	12,3 µl
rGTP 12,5 mM Incubation 2 à 4 h à 37 °C	1,5 µl

iii. Inoculation mécanique d'ARN viraux sur plantes

Pour l'inoculation mécanique de plantes *Chenopodium quinoa* âgées de 6 à 8 semaines, chaque feuille est saupoudrée de célite afin de favoriser les blessures mécaniques et de faire pénétrer les ARN viraux dans les cellules, puis frottée délicatement avec 10 à 30 µl de solution d'inoculation (10 µg de transcrits supplémentés de 5 µg d'ARN totaux de plante infectée par les ARN1 et 2 (stras 12); 10 µl de tampon phosphate de potassium (KH₂PO₄) 500 mM pH 7,5 ; 8 µl de macaloïde 0,05 % ; eau stérile qsp 100 µl) en fonction de la taille de la feuille. Après 6 à 8 jours de virose, les feuilles inoculées sont récoltées, les lésions récupérées et broyées pour en extraire soit les ARN totaux, soit les protéines totales.

2. Expression transitoire par agroinfiltration de feuilles

Pour l'expression transitoire de protéines dans les cellules de l'épiderme, les agrobactéries (*Agrobacterium tumefaciens*) sont cultivées pendant 18 h à 28 °C dans 5 ml de milieu sélectif LB liquide (bactotryptone 1 % ; extrait de levure 0,5 % ; NaCl 0,5 % ; pH 7,4), additionné de rifampicine (100 µg/ml) et d'antibiotique adéquat pour la sélection du plasmide binaire (kanamycine 50 µg/ml ou spectinomycine 100 µg/ml). Les bactéries sont centrifugées 15 min à 5000 g, et le culot est repris dans un volume de milieu d'infiltration (MgCl₂ 10 mM ; acétylsyringone 200 µM) en ajustant la DO_{600nm} à 1. Les bactéries sont incubées dans ce milieu à température ambiante pendant 3 h pour permettre l'activation du transfert. Les plantes au stade de croissance 4 feuilles sont incisées légèrement au scalpel sur la face inférieure des feuilles, puis infiltrées avec la suspension bactérienne à l'aide d'une seringue sans aiguille. Le maximum d'expression est généralement atteint au bout de 2 à 5 jours post-infiltration, où les feuilles peuvent être récoltées pour l'analyse et/ou l'observation en microscopie confocale.

3. Transfection de cellules BY-2 de tabac par biolistique

Des constructions de fusion du gène codant pour la GFP avec la protéine p25 sauvage ou mutée ont été construites dans le vecteur pCK sous le contrôle du promoteur 35S. Ces constructions ont été utilisées pour le bombardement de cellules BY-2. Six à 20 h après bombardement, les cellules transformées fluorescentes sont prélevées à l'aide d'une loupe binoculaire couplée à une lampe à vapeur de mercure HBO103W (émission/ excitation 488/505-545 nm) et observées en microscopie confocale.

i. Principe

Cette technique repose sur la capacité à introduire dans des cellules, par biolistique, de l'ADN ou de l'ARN adsorbé sur des particules de tungstène ou d'or. L'ADN utilisé doit comporter un promoteur et un terminateur de transcription eucaryotique de part et d'autre de la séquence à exprimer.

Un canon à particules permet la transformation de cellules par l'introduction de l'ADN adsorbé sur des particules de tungstène. L'appareil est constitué d'une chambre de tir dans laquelle un vide partiel est créé (0.8-0.9 bar). Les billes de tungstène sont placées sur une grille métallique dans une buse située dans la partie supérieure de la chambre de tir à 11 cm des cellules BY-2. La buse est reliée à une bouteille d'hélium par l'intermédiaire

d'une électro-vanne qui permet de libérer à travers la buse une déflagration de durée et de pression déterminées (25 ms, 7 bar). La déflagration projette les particules de tungstène sur les cellules BY-2 placées sur un filtre Whatman, déposées sur un milieu solide MS dans une boîte de pétri.

ii. Culture de cellules BY-2 de tabac

Les cellules de tabac sont maintenues en culture liquide, à 27 °C, à l'obscurité, et agitation constante (130 rpm), dans du milieu Murashige et Skoog basal (Duchefa), complété avec de la thiamine (1 mg/ml), du KH_2PO_4 (200 mg/ml), de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4 D) (0,2 mg/ml), du saccharose (3 %) (poids/volume) et du myoinositol (100 mg/ml) (milieu MS). Les cellules sont repiquées tous les 7 jours par transfert de 3 ml de culture dans 100 ml de milieu frais.

iii. Préparation des cellules pour le bombardement

5 ml de cellules de tabac BY-2 de 4 jours sont déposées stérilement sur un disque de papier filtre (\varnothing 3,5 cm) par aspiration douce. Le filtre est ensuite placé dans une boîte de pétri sur du milieu de culture BY-2 additionné de 1,5 % d'agar et 100 mM de mannitol et sorbitol nécessaire à la plasmolyse des cellules. Les boîtes sont incubées pendant 5 à 12 h à 24 °C et à l'obscurité.

iv. Précipitation de l'ADN plasmidique sur les particules de tungstène et bombardement

2 mg de billes de tungstène M17 (1 μm) sont mélangées à 1 ml d'éthanol absolu, puis vortexées en continu pendant 3 min et laissées 30 min à température ambiante. Les billes sont alors séchées 5 min sous vide et resuspendues dans 33 μl de glycérol 50 %, puis tout en vortexant, 10 μl d'ADN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 33 μl CaCl_2 2 M et 15 μl de spermidine 0,5 M sont rajoutés. Le tout est reposé 30 min à température ambiante, centrifugé 1 min à 5000 g et lavé par 150 μl d'éthanol 70 % puis par 150 μl d'éthanol absolu, avant d'être finalement repris dans 30 μl d'éthanol absolu. Les particules sont conservées à 4 °C et sont prêtes pour le bombardement. 6 μl de billes en suspension sont utilisées par tir, et 4 bombardements répartis sur 2 boîtes de pétri contenant les cellules BY-2 sont effectués pour chaque construction. Après bombardement, les filtres ainsi traités sont transférés sur

de nouvelles boîtes de pétri avec un milieu de culture BY-2 sans sorbitol, ni mannitol, puis sont mis à incuber quelques heures à 24 °C et à l'obscurité.

4. Transfection de protoplastes de tabac BY-2 par électroporation

i. Obtention de protoplastes de tabac BY-2

Des cellules âgées de 4 à 5 jours sont collectées par centrifugation de 5 min à 800 rpm. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est remis délicatement en suspension dans un volume de solution enzymatique (contenant 0,1 % de pectolyase Y23 ; 1 % de cellulase RS Onozuka, Japon) et 100 ml de solution I (0,45 M mannitol ; MES 3,6 mM, pH 5,5). Le tout est transféré dans une boîte de pétri scellée avec du parafilm et placé sous agitation à l'obscurité dans une chambre d'incubation à 30 °C pendant au moins 3 h. L'observation au microscope optique permet de suivre l'état de digestion des cellules. Le passage des structures en chapelet caractéristiques des suspensions cellulaires BY-2 à des protoplastes sphériques et individualisés indique un état de digestion suffisant. 10 ml de solution I sont ajoutés dans la boîte de pétri, puis les protoplastes sont filtrés sur un tamis d'une porosité de 100 µm afin d'éliminer les débris cellulaires. Après 2 lavages par centrifugation à 800 rpm avec la solution I, les protoplastes sont comptés sur une cellule de Malassez et leur concentration est ajoutée à $2 \cdot 10^6$ /ml avec de la solution II (MES 3,6 mM ; 0,1 mM CaCl₂ ; 0,45 M mannitol) et mis à 4 °C (Gaire *et al.*, 1999).

ii. Electroporation de protoplastes de tabac BY-2

$0,5 \cdot 10^6$ protoplastes sont électroporés en présence de transcrits synthétisés *in vitro* (10 µg de l'ARN1 et 5 µg des ARN2 et/ou 3) dans une cuvette d'électroporation dont les électrodes sont distantes de 4 mm (capacité 125 µF ; tension 180 V ; résistance 100 Ω). Ils sont ensuite additionnés de 500 µl de solution II, transvasés dans un tube 1,5 ml et conservés 30 min dans la glace. Cette solution II est alors éliminée par une centrifugation à 800 rpm pendant 2 min et les protoplastes, repris dans 1,5 ml de milieu de culture (milieu BY-2 additionné de mannitol 0,45 M), sont finalement transférés dans des boîtes de pétri de 3,5 cm de diamètre contenant de l'agarose à 1 % (SeaKem® LE agarose) dans du milieu de culture. Les protoplastes sont incubés à l'obscurité pendant 24 à 48 h à 22 °C sous lumière diffuse sans agitation.

II. Manipulation des ADN

1. Clonage classique

i. Amplification d'un fragment d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique permet l'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN de manière exponentielle grâce à l'utilisation de l'ADN polymérase thermostable de *Thermus aquaticus* (Taq). Elle nécessite l'utilisation de deux amorces oligodésoxyribonucléotidiques spécifiques de la séquence à amplifier. La réaction se déroule en 20 à 30 cycles dans un thermocycleur en programmant la répétition de 3 étapes : 30 sec de dénaturation de l'ADN à 95 °C, 30 sec pour l'hybridation des amorces avec les brins matrices à une température compatible avec la température de fusion des amorces qui est déterminée par rapport au pourcentage de GC et d'une élongation des amorces réalisée à 72 °C pendant une durée proportionnelle à la taille du fragment à amplifier (1 min par Kb) selon l'enzyme utilisée. Les amplicons obtenus sont analysés sur gel d'agarose et peuvent être introduits dans un vecteur.

ii. Digestion par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des endonucléases reconnaissant souvent des séquences palindromiques. Elles coupent les molécules d'ADN bicaténaires au niveau de séquences spécifiques, générant des fragments ayant soit des extrémités cohésives 5' ou 3' sortantes, soit des extrémités franches. Chaque enzyme de restriction présente une activité optimale dans un tampon spécifique et à une température donnée. En général, l'incubation se déroule pendant 1 à 2 h à 37 °C. Les fragments de restriction sont ensuite analysés sur gel d'agarose.

iii. Déphosphorylation d'un vecteur

La déphosphorylation empêche un vecteur linéarisé de se refermer sur lui-même lors de l'étape de ligation et favorise ainsi l'insertion du fragment d'ADN à cloner.

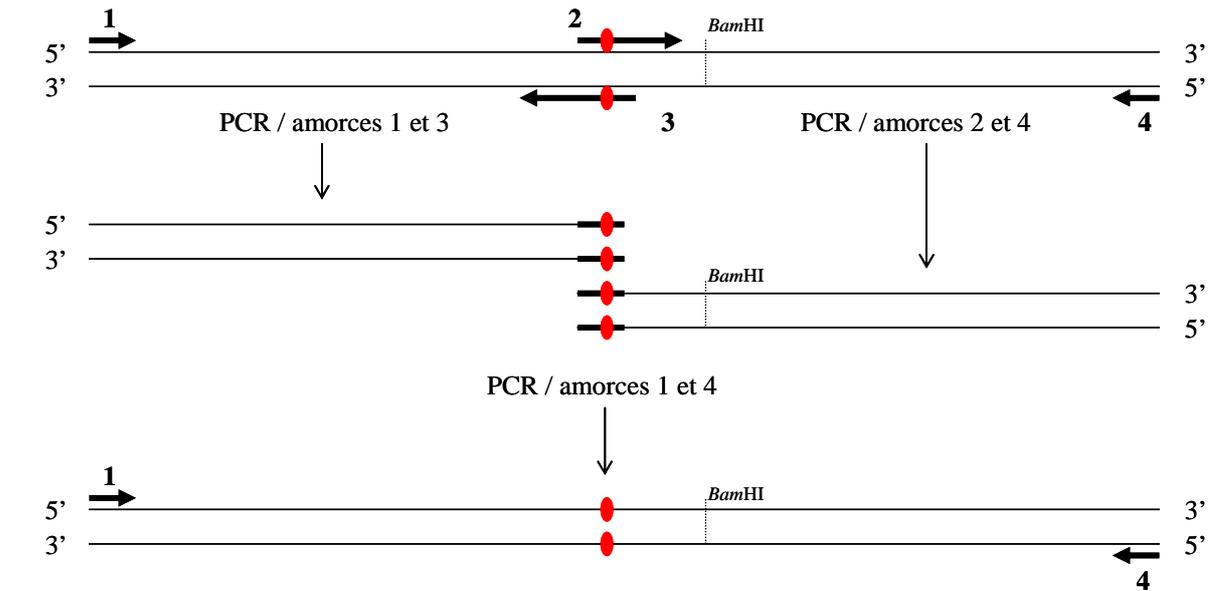
La déphosphorylation est réalisée par action de la phosphatase alcaline d'intestin de veau, qui élimine les groupements phosphates 5'-terminaux. Cette enzyme, thermostable, ne présente pas de spécificité étroite vis-à-vis d'un tampon d'incubation et peut donc être utilisée immédiatement après digestion par une enzyme de restriction. L'enzyme est ensuite éliminée par extraction phénolique.

iv. Analyse des fragments d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN obtenus par digestion enzymatique ou par amplification PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose de 1 à 2 % selon la taille des fragments à analyser. L'ADN, en solution dans le tampon de charge (Tris-HCl 2 mM pH 8 ; EDTA 10 mM ; saccharose 5 % ; bleu de bromo-phénol 0,01 %), est déposé sur le gel préparé dans du tampon TBE X 0,5 (Tris-Borate 100 mM pH 8,3 ; EDTA 2 mM). Après électrophorèse à 100 V dans le tampon TBE X 0,5, le gel est coloré au BET (0,5 µg/ml) et les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière UV.

v. Mutagenèse dirigée par "overlap extension" PCR

Cette technique a été utilisée pour effectuer des expériences de mutagenèse dirigée. Elle consiste en l'extension de fragments chevauchant par amplification PCR "overlap extension" PCR, (Ho *et al.*, 1989). Cette technique schématisée sur la **figure (MM.1)** nécessite quatre oligonucléotides amorces de 1 à 4 dont deux sont mutagènes (2 et 3) et deux étapes successives d'amplification par PCR. Les amorces 2 et 3 possèdent une partie complémentaire chevauchante contenant la mutation que l'on veut introduire. Dans la première étape, deux amplifications par PCR sont réalisées avec les couples d'amorce 1+3 et 2+4 respectivement. Les deux fragments d'ADN obtenus, qui possèdent une région commune, sont purifiés, afin d'éliminer la matrice plasmidique. Après purification les produits sont utilisés comme matrice dans la seconde étape d'amplification par PCR en présence du couple d'amorces 1+4. Le produit final, généralement digéré par deux enzymes de restriction, peut être introduit dans un vecteur digéré par ces mêmes enzymes ou des enzymes produisant des extrémités compatibles.



Amorces 1 : primer Sma25Nt, Nco25Nt ou Eco25Nt

Amorces 4 : primer Sal25Ct ou Dav25

● mutation à introduire

Figure MM.1 : Représentation schématique du protocole d'amplification utilisé pour réaliser la mutagenèse par PCR. Les primer 1, 2, 3 et 4 sont les amorces nécessaires à la mutagenèse par "overlap extension" PCR. Les oligonucléotides mutagènes sens (2) et antisens (3) sont utilisés conjointement à deux amorces terminales (Sma25Nt, Nco25Nt ou Eco25Nt, 1 et Sal25Ct ou Dav25, 4) pour produire deux fragments PCR qui sont ensuite hybridés l'un à l'autre pour servir de matrice à une seconde réaction d'amplification. Cette seconde amplification nécessite uniquement les amorces terminales (1 et 4). Le produit d'amplification est ensuite cloné dans un vecteur d'expression (pCKGFP, pGBT9, pGAD424, pRep25Nco).

vi. Ligation

La T4 ADN ligase catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3' hydroxyle et 5' phosphate des molécules d'ADN. Les fragments purifiés d'ADN peuvent être ligués dans les conditions indiquées dans le **tableau (MM.4)**.

Le milieu réactionnel est incubé 1 h à température ambiante ou une nuit à 4 °C pour optimiser le rendement de la ligation. Après extraction phénolique et précipitation à l'éthanol, les produits de ligation sont repris dans 5 à 10 µl d'eau.

Tableau MM.4 : Composition du milieu réactionnel nécessaire à la ligation.

Composants	Volume
Vecteur (50 µg/µl)	1 µl
Insert (50 µg/µl)	3 µl
Tampon de ligation rapide X 5 (Fermentas)	2 µl
T4 ADN ligase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O qsp 10 µl	4 µl

vii. Transformation bactérienne

a. Transformation par choc thermique

Les bactéries réceptrices qui vont subir une transformation doivent être compétentes afin de permettre l'introduction du plasmide. Pour cela, on utilise des techniques permettant de perforer les enveloppes bactériennes. La technique de transformation bactérienne par choc thermique consiste à placer les bactéries compétentes dans un milieu riche en calcium en contact avec l'ADN plasmidique dans la glace pendant 30 min, le mélange subit ensuite un choc thermique (chauffage à 42 °C pendant 2 min suivi d'un refroidissement brutal dans la glace). Les bactéries sont ensuite additionnées de 0,5 ml à 1 ml de LB et étalées sur milieu gélosé sélectif. Après croissance pendant une nuit à 37 °C, les colonies sont analysées.

b. Transformation par électroporation

Cette méthode de transformation très efficace est réalisée à l'aide d'un électroporateur (BioRad) dans une cuve préalablement refroidie dans la glace dont les électrodes sont distantes de 2 mm. Le contrôleur d'impulsions est réglé sur 25 µF de capacité et 2,5 kV/cm, la résistance étant ajustée à 200 Ω. 30 µl de bactéries (souche MC1022) compétentes sont décongelées dans la glace puis ajoutées à 1 µl de produits de ligation. Après passage du courant électrique, les bactéries sont additionnées de 0,5 à 1 ml de LB, incubées 30 min à 37 °C puis étalées sur milieu gélosé sélectif. Après croissance pendant une nuit à 37 °C, les colonies sont analysées.

viii. Purification et analyse des clones recombinants

a. Préparation de petites quantités d'ADN plasmidique (minipréparation)

2 ml de milieu liquide sélectif sontensemencés et incubés une nuit à 37 °C sous agitation avec une colonie recombinante. L'ADN plasmidique est extrait selon le kit Nucleospin® Plasmide QuickPure. Cette technique permet d'extraire un ADN plasmidique suffisamment pur pour être analysé par digestion enzymatique, par séquençage et servir de matrice pour la transcription *in vitro*.

b. Purification d'ADN plasmidique (maxipréparation)

100 ml de culture (milieu liquide sélectif) sontensemencés par 100 µl de préculture, et incubés une nuit à 37 °C sous agitation. L'ADN plasmidique est extrait avec le kit NucleoBond® Plasmid purification selon une technique modifiée de lyse alcaline qui repose sur une purification sur colonne de silice afin d'obtenir un ADN de qualité et en quantité suffisante.

c. Analyse de l'ADN plasmidique par séquençage automatique

L'analyse par séquençage d'ADN est basée sur la méthode de synthèse interrompue (Sanger *et al.*, 1977), méthode qui a été modifiée pour la Taq ADN polymérase (Murray, 1989) et adaptée à l'utilisation de didésoxyribonucléotides (ddNTP) couplés à des fluorochromes (Smith *et al.*, 1986). Les séquences sont obtenues par séparation électrophorétique capillaire sur un appareil ABI Prism® 3100 (Applied Biosystem).

2. Clonage GATEWAY®

La technique Gateway est une méthode de clonage universelle, rapide et hautement efficace permettant de transférer des fragments d'ADN dans des vecteurs multiples. Cette technologie utilise le système de recombinaison du phage lambda pour faciliter le transfert, entre vecteurs, de séquences d'ADN hétérologues flanquées des sites *att* modifiés. Le système est basé sur deux réactions de recombinaison. Tout d'abord, la réaction BP permet la recombinaison d'un substrat flanqué de séquences *attB* (produit de PCR flanqué des séquences *attB*) avec un vecteur donneur flanqué des séquences *attP*, ce qui génère un clone d'entrée flanqué des sites *attL*. Cette réaction est catalysée par la BP Clonase™ enzyme mix (composée d'intégrase *Int* et de facteur d'intégration *IHF*). Une fraction de

cette réaction est directement utilisée pour transformer des bactéries TOP10. La sélection se fait par deux mécanismes : le gène *ccdB* (dont le produit est toxique pour la bactérie) permet d'effectuer une sélection négative, et le gène de résistance à un antibiotique permet, lui, d'effectuer une sélection positive. Les clones positifs, vérifiés par séquençage, sont utilisés pour la seconde réaction de recombinaison : la réaction LR. Elle permet la recombinaison d'un substrat flanqué de séquence *attL* (vecteur donneur) avec un vecteur de destination flanqué des séquences *attR*. Cette réaction catalysée par la LR Clonase™ (composée d'intégrase *Int*, d'excisinase *Xis* et de facteur d'intégration *IHF*) génère le vecteur d'expression (vecteur bridge) utilisé pour transformer les levures.

L'avantage principal de cette technique est qu'une séquence d'ADN peut être clonée dans des vecteurs multiples adaptés à des systèmes aussi divers que les bactéries, les cellules de mammifères ou encore les cellules de plantes, sans passer par des étapes de digestion-ligation.

Les conditions générales de la réaction sont celles proposées par Invitrogen. Pour la réaction BP, 40-100 fmol de produit PCR, 300 ng de vecteur donneur et 1 µl de BP clonase II sont nécessaires. Le volume final est de 5 µl. Pour la réaction LR, 100-300 ng de clone d'entrée, 300 ng de vecteur de destination et 1 µl de LR clonase II sont nécessaires. Les réactions de recombinaison s'effectuent à température ambiante pendant une nuit et sont stoppées par addition de protéinase K à 0,1 µg/µl à 37 °C pendant 10 min. Tous les clones obtenus après l'étape BP sont vérifiés par séquençage.

III. Manipulation des ARN

1. Extraction et purification des ARN

i. Extraction des ARN au TRIZOL® Reagent (Invitrogen™)

Le matériel végétal est congelé et réduit en poudre dans de l'azote liquide puis 100 à 200 mg sont broyés en présence de 1 ml de trizol. Après 5 min à température ambiante, 200 µl de chloroforme sont ajoutés et le tout est vortexé et à nouveau laissé à température ambiante 2 min. Après centrifugation 15 min à 4 °C, le surnageant est prélevé, auquel est ajouté un volume d'isopropanol 100 %. La précipitation des ARN nécessite une incubation de 20 min à température ambiante, puis les ARN sont culotés par centrifugation 30 min à 4 °C, et lavés à l'éthanol 70 %. Les culots sont séchés 5 min à l'air puis repris dans 30 µl d'eau stérile. La qualité et la quantité des ARN sont analysées sur gel d'agarose et par spectrophotométrie.

ii. Extraction des ARN au tampon "polysomes"

Une à vingt lésions locales sont broyées dans 200 µl à 500 µl de tampon "polysomes" (Tris-HCl 200 mM pH 9 ; KCl 400 mM ; saccharose 200 mM ; MgCl₂ 35 mM ; EGTA 25 mM). Les échantillons sont purifiés au phénol puis au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). A la phase aqueuse sont ajoutés 2 volumes d'éthanol 100 % afin de précipiter les ARN. Après 20 min à -20 °C, les tubes sont centrifugés 10 min à 13000 rpm. Les culots sont repris dans 200 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,6, ce qui solubilise les ADN et petits ARN. Une centrifugation de 10 min à 13000 rpm est suivie d'un lavage du culot par l'éthanol 70 %. Les culots d'ARN sont repris dans 20 à 50 µl d'eau stérile.

iii. Extraction des ARN à partir de levures

Des pré-cultures de levures sont lancées le soir dans 5 ml du milieu sélectif adéquat puis incubées à 30°C sous agitation. Le lendemain matin à partir de ces pré-cultures, des levures à une densité optique (DO) A_{600nm} de 0,1-0,2 sont ensemencées dans 10 ml du même milieu et cultivées à 30 °C jusqu'à une DO A_{600nm} de 0,6-0,8, puis centrifugées à 4 °C pendant 3 min à 3000 g. Le culot est remis en suspension dans 1 ml d'eau stérile, transvasé dans un tube de 1,5 ml et centrifugé à 4 °C pendant 30 sec à 3000 g. Le culot obtenu est resuspendu dans 400 µl de tampon TES (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM EDTA ; 0,5 % SDS), 400 µl de phénol sont ensuite ajoutés puis vortexés fortement pendant 10 sec. Les tubes sont incubés à 65 °C pendant 30 à 60 min et de temps en temps vortexés brièvement suivi par une incubation dans la glace pendant 5 min. Les tubes sont centrifugés à 4 °C pendant 5 min à 13000 rpm. La phase aqueuse est ensuite transvasée dans un nouveau tube de 1,5 ml contenant 400 µl de phénol. Les tubes sont ensuite bien vortexés et incubés dans la glace pendant 5 min puis centrifugés à 4 °C pendant 5 min à 13000 rpm. La phase aqueuse est de nouveau transvasée dans un tube de 1,5 ml avec 400 µl de chloroforme, les tubes sont vortexés fortement puis centrifugés à 4 °C pendant 5 min à 13000 rpm. La phase aqueuse est ensuite transvasée dans un tube de 1,5 ml supplémentée par 40 µl de 3 M acétate de sodium pH 5,3, et 1 ml d'éthanol 100 % puis les tubes sont incubés à -20°C pendant 10 min et centrifugés à 4 °C pendant 5 min à 13000 rpm. Les ARN sont lavés à l'éthanol 70 % par centrifugation à 4 °C pendant 5 min à 13000 rpm. Les culots sont remis en suspension dans 50 µl d'eau stérile. La concentration

est déterminée par le spectromètre en mesurant la DO $A_{260\text{nm}}$ puis les ARN sont analysés par northern-blot ou conservés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

iv. Test d'encapsidation (Jupin *et al.*, 1990)

Afin de définir si un ARN est encapsidé dans une particule virale, deux extractions d'ARN sont effectuées en parallèle : une extraction au tampon polysome (décrite précédemment), et une au Tris-MgCl₂. L'extraction au Tris-MgCl₂ permet de ne conserver que les ARN encapsidés. Ainsi, trois lésions sont prélevées d'une feuille infectée et sont broyées dans 500 μl de tampon Tris-MgCl₂ (Tris 100 mM ; MgCl₂ 10 mM ; pH 7,5). Le broyat est incubé à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min afin de laisser agir les RNases présentes dans l'extrait. Des purifications au phénol puis au phénol-chloroforme sont réalisées. Le surnageant est prélevé et les ARN sont précipités avec 150 mM de NaCl et deux volumes d'éthanol 100%. Le culot obtenu est repris dans 200 μl d'acétate de sodium 3 M pH 5,6, laissé 30 min à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et vortexé. Après centrifugation 30 min à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ à 13000 rpm, le culot est lavé à l'éthanol 70 %. Les ARN peuvent ensuite être analysés par northern-blot.

2. Analyse des ARN par hybridation moléculaire

i. Analyse d'ARN de haut poids moléculaire par northern-blot

Un volume d'ARN totaux (5 μg) est resuspendu dans 4 volumes de tampon de charge dénaturant (HEPES-KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM ; formamide 50 % ; formaldéhyde 6 % ; bleu de bromophénol 0,005 % ; BET 0,001 %) et chauffés à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 min. Les ARN ainsi dénaturés sont déposés sur gel d'agarose dénaturant (agarose 1 % ; HEPES-KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM ; formaldéhyde 6 %). La migration s'effectue à 80 V dans du tampon HEPES (HEPES-KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM) jusqu'au bas du gel. Les ARN sont ensuite transférés sur membrane Hybond™ - NX (Amersham Biosciences) par capillarité dans du tampon SSC x 20 (SSC x 1 : NaCl 150 mM ; citrate de sodium 15 mM) pendant toute la nuit. Les ARN sont ensuite fixés par irradiation aux UV (254 nm, 120 $\mu\text{Joule}/\text{cm}^2$) sur la membrane dans un appareil Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene). La membrane placée dans un cylindre est pré-hybridée dans un four à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec 10 ml d'un tampon d'hybridation pour ribosonde (formamide 50 % ; SSC x 5 ; Denhardt 0,16 % ; tampon phosphate 50 mM pH 6,5 ; SDS 0,1 % ; ADN 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ARN 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou désoxyribosonde (PerfectHyb™ Plus, Sigma). La sonde est ajoutée une heure après, et l'hybridation est conduite pendant une nuit à $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Des séries de trois

lavages sont effectuées en utilisant des solutions de stringence croissante (SSC x 2 ; SDS 0,1 % puis SSC x 0,2 ; SDS 0,1 %) à une température de 65 °C. La membrane est séchée puis la radioactivité est détectée par autoradiographie ou par phosphorimaging.

ii. Synthèse d'une sonde ADN marquée au [α - 32 P] dCTP

Un amplicon obtenu après réaction PCR spécifique de la séquence à cibler est purifié et 25 ng de cet ADN sont dénaturés à 100 °C et refroidis instantanément dans la glace. Pour synthétiser la sonde, le kit Prime-a-gene® Labeling System (Promega) est utilisé : 10 μ l de tampon x 5 (Tris-HCl 250 mM pH 8 ; MgCl₂ 25 mM ; DTT 10 mM ; HEPES 1 M pH 6,6 ; random hexanucléotides) ; 2 μ l d'un mélange dATP, dGTP, dTTP (500 μ M) ; 2 μ l de BSA (10 mg/ml) ; 2,5 μ l de [α - 32 P] dCTP (3000 Ci/mmol ; 10 mCi/ml) ; 1 μ l de Klenow (DNA Polymerase I Large Fragment, 5 U/ μ l) ; eau stérile qsp 50 μ l. La réaction s'effectue pendant 1 h à température ambiante. La sonde est purifiée sur colonne Microcon® YM-30 (Millipore) et ajoutée au tampon d'hybridation de la membrane.

iii. Synthèse de sondes ribonucléiques marquées au [α - 32 P] UTP

Le plasmide contenant la séquence complémentaire à la séquence d'intérêt, sous contrôle d'un promoteur T3, T7 ou Sp6, préalablement linéarisé par digestion de restriction en aval de la séquence à transcrire, est soumis à une transcription en présence d'UTP radiomarké. La réaction se fait dans les conditions suivantes : 1 μ g d'ADN linéarisé ; 2 μ l de tampon x 10 (Tris-HCl 400 mM pH 8 ; MgCl₂ 100 mM ; DTT 100 mM ; NaCl 100 mM ; spermidine 40 mM) ; 1 μ l d'un mélange de rATP, rCTP et rGTP (12,5 mM) ; 1 μ l de rUTP (0,5 mM) ; 2 μ l de [α - 32 P] UTP (3000 Ci/mmol ; 10 μ Ci/ μ l) (Amersham Biosciences) ; 1 μ l de BSA (2 mg/ml) ; 0,5 μ l d'inhibiteur de RNase (40 U/ μ l) ; 1 μ l de RNA polymérase T3, T7 ou Sp6 (50 U/ μ l) ; eau stérile qsp 20 μ l. La réaction se fait par incubation du milieu réactionnel à 37 °C pendant 1 h 30, puis l'ADN matrice est dégradé par addition de DNase RQ 1 (1 U) (Promega) pendant 30 min à température ambiante. La sonde est alors purifiée par traitement au phénol/chloroforme, précipitée à l'éthanol 100 % en présence d'acétate d'ammonium 2 M final, et resolubilisée dans 50 μ l d'eau stérile après centrifugation de 20 min à 13000 rpm.

iv. Marquage d'oligonucléotide au [γ - 32 P] ATP

La T4 polynucléotide kinase est utilisée pour la phosphorylation des oligonucléotides en permettant le transfert du phosphate (γ -ATP) sur l'extrémité 5'-OH d'une molécule d'ADN

ou d'ARN. La réaction se fait dans les conditions suivantes : 4 pmol d'oligonucleotides sont additionnés à la solution de marquage : 2 µl de tampon PNK x 10 (Tris-HCl 500 mM pH 7,6 ; MgCl₂ 100 mM ; DTT 50 mM ; spermidine 1 mM ; EDTA 1 mM) ; 2,5 µl [γ -³²P] ATP (10 µCi/µl) ; 0,5 µl RNasine (40 U/µl) ; 1 µl PNK (10 U/µl) ; eau stérile qsp 20 µl. Le mélange est incubé à 37 °C pendant 30 min. Après un traitement au phénol/chloroforme, le surnageant est passé sur une colonne MicroSpinTM G-25 de GE Healthcare pour éliminer le [γ -³²P] ATP non incorporé. Avant son utilisation, la sonde purifiée est incubée 5 min à 65 °C.

IV. Manipulation des PROTEINES

1. Analyse des protéines par western-blot

i. Extraction des protéines totales

a. Extraction des protéines à partir de matériel végétal

Les protéines extraites par broyage de 1 à 10 mg de matériel végétal dans 150 µl d'un tampon de dissociation appelé Laemmli X 2 (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 5 % ; glycérol 20 % ; β -mercaptoéthanol 5 % ; bleu de bromophénol 0,005 %) (Laemmli, 1970) à l'aide d'un microbroyeur, sont ensuite séparées des débris par centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min, puis dénaturées par chauffage de 5 min à 95 °C.

b. Extraction des protéines à partir de cellules BY-2

Les cellules BY-2 bombardées le soir, sont observées au microscope confocal le lendemain dans la matinée puis les cellules fluorescentes sont récoltées dans le milieu BY-2 (liquide). Les protéines sont extraites par broyage de 200 à 300 µl de volume (cellules BY-2 dans le milieu) dans 200 µl du tampon Laemmli X 2. Les protéines sont séparées des débris cellulaires par centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min, puis dénaturées par chauffage de 5 min à 95 °C.

c. Extraction des protéines à partir de levures

Des cultures de levures sont lancées le soir dans 5 ml du milieu sélectif adéquat à 30 °C sous agitation. Le lendemain matin, ces cultures sont centrifugées 10 min à 5000 rpm. Le culot est remis en suspension dans 2 ml d'eau stérile, puis transvasé dans un tube de 2,2 ml et à nouveau centrifugé 5 min à 13000 rpm. Le culot obtenu est ensuite remis en

suspension dans 150 μ l de solution (NaOH 1,85 M ; β -mercaptoéthanol 7,5 %) puis supplémenté par 150 μ l de TCA 55 %. Les tubes sont ensuite incubés 10 min dans la glace puis centrifugés à 4 °C pendant 15 min à 13000 rpm. Le culot de protéines est resuspendu dans la solution [80 μ l PBS X 1 (8,76 g NaCl ; 1.86 g Na₂HPO₄ ; 0.43 g KH₂PO₄ ; pH 7.4), 80 μ l Laemmli X 2]. Les protéines sont ensuite séparées des débris cellulaires par centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min, puis dénaturées par chauffage de 5 min à 95 °C ou de 3 à 5 min à 65 °C pour la protéine p14.

ii. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Le gel constitué de deux couches successives permet de concentrer les protéines afin de mieux les séparer en fonction de leur taille. Le gel de concentration est constitué d'acrylamide 4 % ; de bisacrylamide 0,1 % ; Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1 %. La résolution du gel de séparation est définie par la concentration d'acrylamide (acrylamide 8 à 15 % ; bisacrylamide 0,2 à 0,37 % ; Tris-HCl 375 mM pH 8,8 ; SDS 0,1 %). L'ajout final de TEMED 0,05 % et de persulfate d'ammonium 0,05 % catalyse la polymérisation de l'acrylamide avec le bisacrylamide entre deux plaques de verre. La séparation des protéines est effectuée dans un tampon de migration (Tris 25 mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1 %) à 100 V pendant 2 h.

iii. Immunodétection des protéines par western-blot

Le principe de cette technique est de détecter la présence d'une protéine après transfert sur une membrane, à l'aide d'un anticorps spécifique.

Le transfert des protéines du gel de polyacrylamide sur membrane ImmobilonTM (MilliporeTM) est effectué dans un système Mini-Protean/Trans-Blot (Bio-Rad®) à 80 V pendant 1 h 30 à 4 °C dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM. La membrane est ensuite pré-incubée 30 min dans du PBS-Tween 1 % (NaCl 140 mM ; Na₂HPO₄ ; KH₂PO₄ ; Tween 1 %) additionné de lait 5 %, avant l'ajout de l'anticorps primaire à la concentration adéquate. Après une nuit sous agitation à 4 °C, la membrane est lavée 3 fois 10 min avec du PBS-Tween 1 %, puis incubée 2 h dans le tampon d'incubation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation se fait après 3 lavages de la membrane avec du PBS-Tween 1 %, par autoradiographie grâce au kit Lumi-light (Roche®).

2. Localisation *in situ* de protéines virale par microscopie confocale

i. Préparation des échantillons de cellules BY-2

Les cellules BY-2 de tabac transformées par des constructions fusionnées à la GFP sont visualisées et prélevées sous une loupe binoculaire couplée à une lampe à vapeur de mercure HBO103W (émission/excitation 488/505-545nm). Les cellules prélevées sont ensuite observées à l'aide d'un microscope confocal.

ii. Observation au microscope confocal

Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope inversé (Axiovert) appelé confocal à balayage laser Zeiss LSM 510 équipé d'un objectif à immersion à eau 63 X, d'ouverture numérique 1,2. Pour nos études, deux protéines fluorescentes ont été utilisées. Tout d'abord, la EGFP (enhanced GFP) dont le spectre d'excitation est déplacé dans le bleu par rapport à la GFP sauvage. L'excitation maximale se fait à 488 nm et l'émission maximale à 507 nm. En deuxième, la mRFP qui présente une excitation maximale à 584 nm et une émission maximale à 607 nm. Pour exciter ces protéines, nous avons utilisé les raies 488 nm des lasers argon et hélium néon, respectivement. De même, un jeu de filtres adéquats a été disposé afin de récolter la lumière émise par la EGFP (filtre dichroïque d'excitation : 488 nm ; filtre d'émission LP 505 nm) et par la mRFP (filtre dichroïque d'excitation : 543 nm ; filtre d'émission LP 560 nm). La puissance du laser est réglée de sorte à exciter suffisamment le fluorophore tout en évitant la saturation des images afin de réduire au maximum le phénomène de photoblanchiment. L'acquisition des images est réalisée à l'aide du logiciel LSM 510 de Zeiss. Les figures ont été assemblées sous Adobe Photoshop (version 7.0) et image J (version 1.44c15).

3. Localisation *in situ* de protéines virale par microscopie électronique

i. Préparation des échantillons

Des morceaux de feuilles (1 x 5 mm) de *C. quinoa* sont découpés à l'aide d'une lame de rasoir directement dans la solution fixatrice ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 150 mM pH 7,4 ; Glutaraldéhyde 3 %). Après une infiltration sous vide pendant 15 min puis une incubation de 2 h à 4 °C, le fixateur est remplacé par une autre solution fixatrice ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 150 mM pH 7,4 ; Glutaraldéhyde 3 % ; acide picrique 10 %). Les échantillons sont incubés pendant 16 h à 4 °C, puis lavés 2 fois 15 min à l'eau distillée, et 4 fois 15 min avec du

tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 150 mM pH 7,4, puis incubés pendant 2 h dans une solution $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 150 mM pH 7,4 ; OsO_4 0,1 %. Après 4 lavages à l'eau distillée de 15 min chacun, les échantillons sont fixés dans l'acétate d'uranyle 2 % pendant 16 h à 4 °C. Après 4 lavages de 10 min à l'eau distillée, les échantillons sont progressivement déshydratés par différentes incubations dans l'éthanol de plus en plus concentré : 10 min dans l'éthanol 30 %, 10 min dans l'éthanol 50 %, 10 min dans l'éthanol 70 %, puis 20 min dans l'éthanol 80 %, 20 min dans l'éthanol 90 %, et enfin 2 fois 20 min dans l'éthanol 100 %. Avant inclusion, les échantillons sont soumis à une incubation de 20 min dans l'oxyde de propylène 100 %, à une incubation de 30 min dans l'oxyde de propylène/EPON (1/1), puis à 2 incubations chacune d'1 h dans l'EPON 100 %. Une pré-inclusion est réalisée dans l'EPON 100 % (20 ml de EMBED 812 ; 16 ml de DDSA ; 8 ml de NMA ; 0,77 ml de DMP30) pendant 16 h à 20 °C, puis l'inclusion définitive est effectuée pendant 72 h à 60 °C.

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

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

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

Après une hydratation d'une minute dans l'eau distillée, les grilles sont incubées pendant 30 min dans une solution de saturation PBS-BSA 1 % (NaCl 140 mM ; KCl 2,7 mM ; NaHPO_4 1,8 mM pH 7,3 ; BSA 1 %). En parallèle, les anticorps primaires polyclonaux de lapin sont incubés pendant 1 h à 4 °C sous agitation en présence de PBS-BSA 1 % supplémenté de 50 mg/ml de poudre acétonique de *Chenopodium quinoa*. Cette étape dite "d'épuisement" permet de saturer les sites aspécifiques des anticorps et ainsi limiter la révélation des protéines cellulaires. Après centrifugation, le surnageant contenant les anticorps épuisés est récupéré et utilisé pour y incuber les grilles pendant 2 h à température ambiante (dilution finale des anticorps 1/10 000ème) sous agitation. Les anticorps en excès

sont éliminés par 4 lavages de 10 min sous agitation dans du PBS. Les grilles sont ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à des billes d'or colloïdal au 1/50ème dans du PBS-BSA 0,1 %. Enfin, les grilles sont soumises à 4 lavages de 10 min dans du PBS, puis 3 lavages de 3 min dans l'eau bidistillée avant d'être séchées à température ambiante et observées au microscope.

iii. Observation des coupes

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

4. Etude de l'activation de la transcription et tests d'interaction protéine-protéine

i. Etude de l'activation de la transcription

a. Préparation des levures

Des pré-cultures de levures sont lancées le soir dans 5 ml de milieu YPD à 30 °C sous agitation. Le lendemain matin à partir de ces pré-cultures, des levures à une DO A_{600nm} de 0,1-0,2 sontensemencées dans 50 ml du milieu YPD et cultivées à 30 °C jusqu'à une DO A_{600nm} de 0,4-0,6, puis centrifugées 3 min à 5000 g. Le culot est remis en suspension dans 2 ml d'eau stérile, transvasé dans un tube de 2,2 ml et à nouveau centrifugé 1 min à 4000 g. Le culot obtenu est ensuite lavé 3 fois avec 2 ml d'eau stérile et 2 fois avec 2 ml d'une solution de TE/LiAc x 1 (Tris 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM ; acétate de lithium 0,1 M), puis repris dans 250 μ l de solution TE/LiAc x 1.

b. Transformation des levures

L'introduction des plasmides recombinants dans les souches de levures HF7c, Y187, AH109, L40 coat, R40 coat ou YBZ-1 est effectuée selon le protocole détaillé dans le **tableau MM.5**. La sélection des levures transformées est réalisée par étalement sur milieu sélectif ne contenant pas de tryptophane (W), leucine (L) ou uracile (U) en simple transformation ou ne contenant pas les deux ou les trois acides aminés en double ou triple transformation (prototrophie apportée par les vecteurs dérivés de pGBT9, pGBKT7 pour le tryptophane ; pGAD424, pGADT7 pour la leucine et pVTU102, pIIIMS2 pour l'uracile).

Tableau MM.5 : Protocole de transformation de levures par les vecteurs dérivés de pGBT9, pGBKT7, pGADT7, pGAD424, pACT, pVTU-102 et pIII/MS2.

ADN plasmidique (0.5 mg/ml)	1 μ l
ADN de sperme de saumon soniqué et bouilli (10 mg/ml)	5 μ l
Cellules (levures)	50 μ l
PEG 40 %	350 μ l
Incubation à 30 °C pendant 30 min	
Choc thermique à 42 °C pendant 20 min	
Ajout de 700 μ l H ₂ O et mélange	
Centrifugation 1 min à 4000 g	
Reprise du culot dans 100 μ l H ₂ O stérile	
Étalement sur milieu sélectif approprié	
Incubation à 28 °C pendant 2 jours	

c. Activation de la transcription dans le système simple hybride de levure

Pour caractériser la capacité d'auto-activation de la transcription dans la levure des protéines ou de domaines de protéines fusionnés au GAL4BD, nous avons observé la croissance de levures HF7c transformées avec les plasmides pGBT9 recombinants. La croissance sur milieu gélosé SD-W permet de s'assurer de la présence du plasmide dans la souche de levure et une croissance sur milieu gélosé SD-WH permet de visualiser l'activation de la transcription du gène rapporteur *HIS3* par la protéine chimérique.

ii. Tests d'interaction protéine-protéine

a. Interaction protéine-protéine *in vivo*

▪ Système double hybride de levure

①. Principe

La méthode du double hybride (ou Yeast Two-Hybrid System (Y2H)) consiste à l'expression de deux candidats (l'appât et la proie) ensemble dans la cellule de levure. Cette technique repose sur la reconstitution d'un facteur de transcription GAL4 ou LexA fonctionnel qui va permettre l'expression *in vivo* d'un gène rapporteur. Pour étudier les interactions entre deux protéines, chacun des domaines de GAL4 (DNA-binding domain [BD] et activation domain [AD]) est fusionné à l'une des protéines d'intérêt. Si les deux

protéines interagissent, il y aura activation de la transcription du gène rapporteur placé sous le contrôle du promoteur Gal4 par l'intermédiaire de la protéine GAL4 reconstituée (figure MM.2).

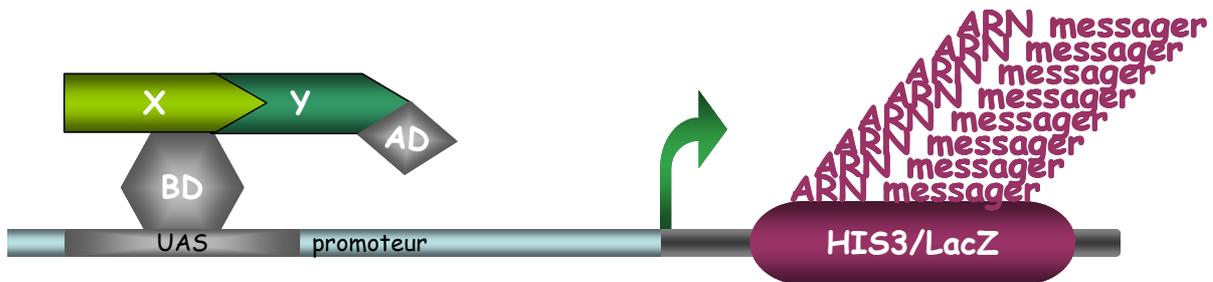


Figure MM.2 : Schéma représentant le principe de technique de double hybride de levure. Le principe repose sur la possibilité de séparer les deux domaines d'un facteur de transcription (GAL4). Le domaine de fixation à l'ADN (BD) sera en fusion avec la protéine X (appât) alors que le domaine d'activation de la transcription (AD) sera en fusion avec la protéine Y (proie). Ces deux domaines peuvent reconstituer un facteur de transcription chimérique fonctionnel lorsque la protéine appât interagit avec la protéine proie. La formation d'un tel facteur de transcription va induire l'expression de gènes rapporteurs (*HIS3* et/ou *lacZ*) en permettant la croissance de levure dans le cas du gène rapporteur *HIS3* sur milieu dépourvu d'histidine. UAS, (Upstream Activating Sequence) représente le site de fixation pour le facteur de transcription.

②. Méthode du double hybride par " yeast mating "

C'est une méthode utilisée pour introduire deux plasmides dans la même cellule hôte (Bendixen *et al.*, 1994). Le pré-requis pour ce protocole est de disposer de transformants de signe sexuel *MATa* possédant les plasmides dérivés de pGBT9 et de souches de signe sexuel *MATα* contenant les plasmides dérivés de pGAD424. La souche de signe *MATa* et la souche de signe *MATα* sont cultivées ensemble et peuvent fusionner pour former une cellule diploïde contenant les deux plasmides et ainsi exprimer les protéines de fusion. Le test d'interaction double hybride peut être ainsi mis en place par simple sélection des levures diploïdes sur milieu dépourvu de tryptophane et de leucine.

L'obtention des souches diploïdes s'effectue en plaques de 96 puits stériles. Une culture de levures est réalisée en milieu sélectif liquide et les cellules sont récupérées par centrifugation douce, lavées et reprises dans 500 µl d'eau stérile. Une fraction aliquote de 50 µl de chaque souche est inoculée dans chaque puits. La plaque est recouverte d'un couvercle stérile et incubée dans un agitateur à 30 °C et à 300 rpm pendant 6 à 18 h. Les

cellules sont récupérées par centrifugation douce, lavées à l'eau stérile puis reprises dans 50 μ l d'eau stérile et une fraction aliquote de chaque croisement (5 μ l) est déposée sur milieu gélosé SD dépourvu de tryptophane et leucine (SD-WL) et éventuellement sur milieu SD dépourvu de tryptophane, leucine et histidine (SD-WLH). La croissance sur un milieu SD-WL permet de visualiser la présence de diploïdes et donc l'efficacité du mating, tandis que celle sur SD-WLH reflète l'activation du gène rapporteur *HIS3* et donc l'interaction entre les protéines d'intérêt.

Pour l'analyse comparative des résultats, les cellules diploïdes sélectionnées sont ensuite placées en culture, en milieu SD-WL liquide, les cellules lavées et les suspensions sont ajustées à une DO A_{600nm} de 0,4. Une fraction aliquote de 5 μ l est déposée sur milieux SD-WL et SD-WLH.

- **Interaction protéine-protéine-protéine par une méthode appelée double hybride de levure en présence d'une protéine adaptatrice exprimée par l'intermédiaire d'un vecteur bridge (appelée faussement triple hybride)**

Le principe de cette méthode ne se distingue de celui du double hybride normal entre deux protéines que par la nécessité de l'expression d'une troisième protéine dans la levure. En effet, cette troisième protéine assure le pont entre les deux protéines fusionnées au domaine de fixation à l'ADN (BD) et au domaine d'activation de la transcription (AD). L'interaction de ces deux protéines de fusion avec la protéine exprimée par un vecteur bridge permet la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel et la croissance des levures sur milieu dépourvu du gène rapporteur choisi (*HIS3* ou *lacZ*) (**figure MM.3**). Nous avons adopté cette approche en utilisant la souche AH109. Cette souche a été co-transformée par les trois plasmides (pGBT9 ou pGBKT7, pVTU102, pGAD424 ou pGADT7), puis la sélection des transformants s'est fait sur milieu dépourvu de tryptophane, uracile et leucine (SD-WUL) correspondants aux vecteurs utilisés respectivement. La croissance des levures sur milieu dépourvu de tryptophane, uracile, leucine, adénine et histidine (SD-WULAH) ou (SD-WULH) indique la formation d'un complexe entre les trois protéines testées.

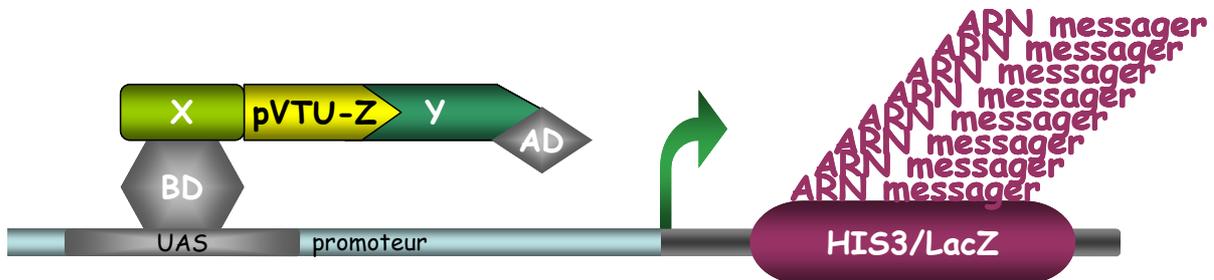


Figure MM.3 : Représentation schématique du principe de système double hybride de levure en présence d'une protéine adaptatrice exprimée par un vecteur bridge pour la recherche de l'interaction entre trois protéines. Ce système consiste en l'utilisation d'un facteur de transcription comme pour le système du double hybride normal. La formation du facteur de transcription chimérique nécessite en plus des protéines de fusion X et Y une protéine exprimée par un vecteur bridge (pVTU-Z). Cette protéine doit interagir avec les deux protéines de fusion pour que le facteur de transcription soit reconstitué et ainsi activer la transcription du gène rapporteur. UAS, Upstream Activating Sequence.

- **Test enzymatique de la β -galactosidase : substrat ONPG (O-Nitrophényl- β -D-Galactopyranoside)**

Ce test colorimétrique utilise le gène rapporteur lacZ qui code pour l'enzyme β -galactosidase d'*E. coli* qui peut-être détectée entre autres avec le substrat de l'ONPG.

Nous avons effectué ce test à partir de levures diploïdes ou de levures exprimant trois protéines pour confirmer et évaluer la force d'interaction entre les protéines.

2 ml d'une culture de 5 ml de levures saturée effectuée en milieu SD sélectif sont utilisés pourensemencer 8 ml de milieu complet (YPD). Parallèlement, une solution d'ONPG à 4 mg/ml est préparée sous agitation dans le tampon Z-buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16,1 g/l ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,5 g/l ; KCl 0,75 g/l ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,246 g/l). Après 3 à 5 h de croissance à 28 °C sous agitation (220-250 rpm) jusqu'à une DO $A_{600\text{nm}}$ de 0,5-0,8, les cellules sont sédimentées en aliquote de 1,5 ml (3 tubes pour chaque construction ou combinaison et 3 aliquotes pour chaque tube) puis lavées 2 fois par 1,5 ml de tampon Z-buffer et remises en suspension dans 300 μl de tampon Z-buffer (le facteur de dilution est de 5). Les cellules en suspension (100 μl) sont successivement congelées dans l'azote liquide et rapidement

décongelées à 37 °C. L'opération est répétée 3 fois pour maximiser la lyse des cellules. Le lysat est ensuite additionné de 700 µl de tampon Z-buffer complété de β-mercaptoéthanol (0,27 %). Au temps T₀ de l'expérience, 160 µl d'ONPG (dissout extemporanément dans le tampon Z-buffer) sont ajoutés au lysat et le mélange est incubé à 30 °C jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune. La réaction est stoppée en 2 fois par l'ajout de 0,4 ml de Na₂CO₃ 1M. Les débris cellulaires sont sédimentés 10 min à 14000 rpm et l'absorbance à 420 nm (A_{420nm}) du surnageant est mesurée. Les unités enzymatiques de la β-galactosidase (une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 µmole d'ONPG en O-nitrophénol et D-galactose par minute et par cellule) sont calculées avec la formule : $1000 \cdot DO_{420nm} / (t \cdot V \cdot DO_{600nm})$ où :

t = temps écoulé durant l'incubation (en minute) ; V = 0,1 ml X 5 ; DO_{600nm} = A_{600nm} pour 1 ml de culture

b. Interaction protéine-protéine *in vitro*

▪ Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation de complexes protéiques

Cette technique permet de purifier, à partir d'un extrait protéique des plantes, une protéine d'intérêt et ses partenaires dans le cas d'une co-immunoprécipitation. L'extrait cellulaire contenant la protéine X est incubée avec des billes de protéine G-sépharose sur lesquelles a été adsorbé un anticorps anti-X, ce qui permet la précipitation spécifique de la protéine X et de ses partenaires si X fait partie d'un complexe protéique.

Les billes de protéine G-sépharose (50 µl) sont incubées 3 h à 4 °C avec l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. Afin de réduire les liaisons non spécifiques à la protéine G-sépharose, les extraits cellulaires sont incubés pendant 1 h avec 20 µl de billes de protéine G-sépharose ("preclearing"). Après centrifugation, le surnageant est incubé pendant 3 h à 4 °C avec les billes de protéine G-sépharose couplées à l'anticorps. Après l'incubation, les billes sont lavées 5 fois avec le tampon de lyse [5 mM EDTA, 1 mM PMSF, un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases (Roche)]. Les échantillons sont repris dans 20 µl de tampon dénaturant (tampon Laemmli X 2).

①. Analyse des protéines par MS-MS

Les protéines à analyser sont déposées sur un gel de polyacrylamide comme décrit précédemment. Après la migration, le gel est fixé pendant 20 min dans une solution contenant du méthanol 45 % et de l'acide acétique 1 %. Puis les protéines sont mises à colorer toute la nuit dans un bain contenant du bleu colloïdal (méthanol 34 % ; sulfate

d'ammonium 17 % ; acide acétique 0,5 % ; bleu G250 0,1 %). Le gel est ensuite décoloré dans 4 à 5 bains successifs d'eau stérile à 50 °C. Les bandes détectées sont ensuite découpées, et les protéines sont extraites pour les analyser par MS-MS.

▪ La technique du GST-pull down

Cette technique permet de tester *in vitro* les interactions entre deux protéines grâce à une méthode spécifique de co-précipitation. Le premier partenaire est une fusion entre la Glutathion-S-transférase (ou GST) et une protéine d'intérêt exprimée dans les bactéries. Cette protéine de fusion est isolée sur billes de glutathion-sépharose 4B par affinité entre le glutathion et la GST. Le second partenaire est une protéine produite en cellules d'insecte dans le système Baculovirus ou exprimée dans un système hétérologue *in vitro*. Si la protéine de fusion GST et la protéine à tester interagissent, elles seront toutes deux retenues sur la colonne et éluées simultanément. Une aliquote de l'éluion est ensuite déposée sur gel SDS-PAGE, transférée sur membrane et analysée à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt.

La protéine Flag-p25 a été produite dans les cellules d'insecte *Sf9* avec le système Baculovirus et la protéine His-p25 clonée dans le vecteur pIVEX 2.3 a été synthétisée *in vitro* dans un lysat d'*E. coli* avec le kit RTS100 (Roche®).

Des bactéries *E. coli* BL-21(DE3) RIL ont été transformées par électroporation par le plasmide pGEX-2TK vide ou contenant l'ADNc codant pour la protéine F-box en fusion avec la GST (Glutathion-S-Transférase), et étalées sur milieu LB agar/ampicilline pendant 16 h à 37 °C. Une colonie fraîche estensemencée dans 5 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 µg/ml et du chloramphénicol à 32 µg/ml et incubée une nuit à 37 °C. Les 5 ml sont ensuite ajoutés à 50 ml de LB contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol et incubés jusqu'à une DO A_{600nm} de 0,5-0,6. La synthèse de la protéine de fusion est alors induite par 0,1 mM d'IPTG pendant 75 min à 37 °C. Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 5000 g pendant 10 min à 4 °C puis resuspendues dans 5 ml de tampon de solubilisation appelé NET (50 mM Tris-HCl pH 7.5 ; 100 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 0.5 % Nonidet P-40 ; 1 mM DTT). Les protéines sont ensuite extraites par French Press et purifiées par fixation sur 60 µl de billes de glutathion-sépharose 4B (Sigma), préalablement lavées et resuspendues dans le tampon NET. Le tout est incubé à 4 °C pendant une nuit sous faible agitation. Les billes sont lavées 3 fois dans le tampon NET et resuspendues dans 60 µl de tampon NET. 10 µl de billes sont déposées sur gel SDS-PAGE et analysées par coloration du gel au bleu de Coomassie

(50 % éthanol ; 22 % acide acétique ; 0.4 % de bleu de Coomassie R-250) pour visualiser la qualité de la purification ainsi que la quantité de protéine de fusion avec la GST produite. Puis 25 µl de billes resuspendues dans le tampon NET sont mélangées avec 10 µl de produits de traduction *in vitro* (protéine Flag-p25) et le volume est complété à 400 µl avec le tampon BB (50 mM Tris-HCl pH 7.5 ; 100 mM NaCl).

La réaction est d'abord incubée pendant 1 h à température ambiante puis la nuit à 4 °C sous légère agitation. Les billes sont lavées 3 fois dans le tampon BB puis resuspendues dans 40 µl de tampon de dissociation Laemmli x 2 (Laemmli, 1970). Les protéines sont dénaturées pendant 10 min à 95 °C puis une aliquote de 20 µl est déposée sur gel SDS-PAGE 12 %, transférée sur membrane ImmobilonTM (MilliporeTM) et les protéines sont immunodétectées à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine p25, l'étiquette histidine ou l'étiquette Flag.

iii. Tests d'interaction protéine-acide nucléique

a. Interaction protéine-acide nucléique *in vivo*

▪ Système triple hybride de levure

①. Principe

Le système RNA triple hybride est une méthode de détection d'interaction protéine-ARN. Dans cette technique, une molécule d'ARN hybride fonctionne comme un pont entre deux protéines hybrides. Une protéine hybride contient un domaine de liaison à l'ARN fusionné à un domaine de fixation à l'ADN LexA, tandis que l'autre protéine hybride contient un autre domaine de liaison à l'ARN fusionné à un domaine d'activation de la transcription. L'ARN hybride porte les sites de reconnaissance apparentés pour les deux domaines de liaison à l'ARN et lie ainsi les trois composants ensemble pour activer la transcription du gène rapporteur (*HIS3* ou *lacZ*).

Dans la version la plus couramment utilisée, une souche de levure exprimant de manière constitutive la protéine de capsid du bactériophage MS2 (CP-MS2) fusionnée au domaine de fixation à l'ADN LexA d'*E.coli* est transformée par un vecteur exprimant un ARN contenant deux structures en tige-boucle qui seront reconnues spécifiquement par la protéine CP-MS2, fusionné à la séquence d'ARN dont on veut tester l'interaction avec la protéine cible. Les RNA binding protéines (RBP) sont fusionnées au domaine d'activation de GAL4. De cette façon, s'il y a une interaction spécifique entre la séquence ribonucléotidique et la protéine, un facteur de transcription fonctionnel sera reconstitué par le complexe ternaire (LexACP-ARN-RBP-AD) permettant l'activation du gène rapporteur

HIS3 et rendant ainsi les levures capable de se multiplier sur milieu dépourvu d'histidine (**figure MM.4**). Les levures sont également cultivées sur des milieux contenant différentes concentrations de 3-amino-triazole, un inhibiteur compétitif de l'histidine afin de quantifier de façon arbitraire l'affinité des partenaires.

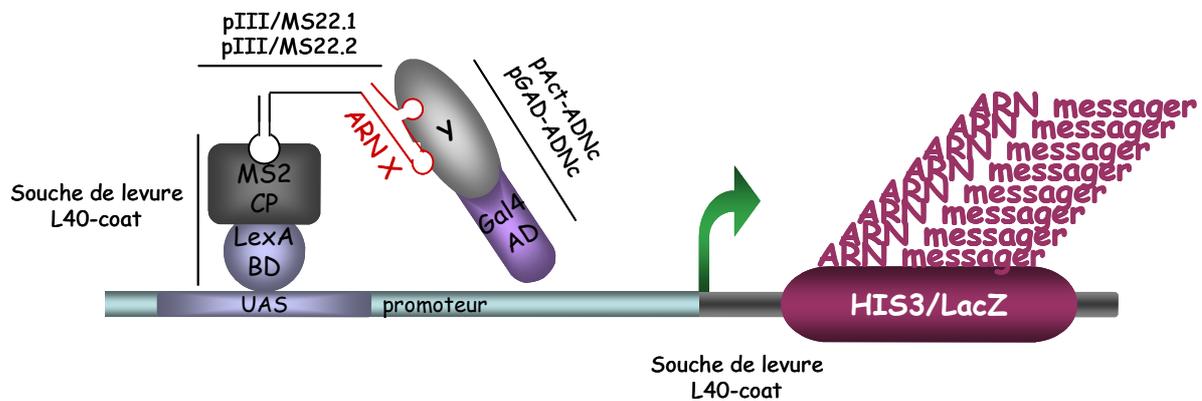


Figure MM.4 : Représentation schématique du principe de la méthode de triple hybride de levure utilisé pour rechercher l'interaction entre protéine et un acide ribonucléotidique [adapté de (Jaeger *et al.*, 2004)]. Une souche de levure (L40-coat) exprimant la protéine CP du bactériophage MS2 (CP-MS2) fusionnée au domaine de fixation à l'ADN de LexA (LexA-BD) est transformée par deux vecteurs. L'un exprime un ARN chimérique contenant deux structures tige-boucle reconnues spécifiquement par la protéine CP-MS2 et la séquence d'ARN X (en rouge, *via* le vecteur pIII/MS2) dont on veut tester l'interaction avec la protéine cible (Y) exprimée sous forme d'une protéine de fusion avec le domaine d'activation de la transcription de GAL4 (GAL4-AD) (pAct-ADNc ou pGAD-ADNc). L'interaction se traduit par la formation d'un complexe de transcription fonctionnel qui active le gène rapporteur *HIS3* ou *lacZ*.

②. Méthode du triple hybride par "yeast mating"

C'est la même méthode que celle décrite pour le test d'interaction protéine-protéine par double hybride (Bendixen *et al.*, 1994).

Une souche de levure L40 coat de signe sexuel *MATa* exprimant la protéine CP-MS2 fusionnée au domaine de fixation à l'ADN LexA est transformée par un vecteur qui exprime un ARN chimérique contenant deux structures tige-boucle reconnues spécifiquement par la protéine CP-MS2 et fusionné à la séquence de l'ARN cible coremin ou de son complément inverse nimeroc. La protéine cible dont on veut tester l'interaction avec l'ARN, est exprimée sous forme d'une protéine de fusion avec le domaine d'activation de la transcription GAL4 et utilisée pour transformer la souche Y187 ou la souche R40 coat de signe sexuel *MATa*.

Les deux souches sont cultivées ensemble afin de fusionner et former une cellule diploïde contenant les deux plasmides et ainsi exprimer l'ARN et les protéines de fusion. L'obtention des souches diploïdes s'effectue en plaques de 96 puits stériles de la même façon que pour la méthode du double hybride par "yeast mating" décrite précédemment. La croissance sur un milieu SD dépourvu d'uracile et leucine (SD-UL) permet de visualiser la présence de diploïdes et donc l'efficacité du mating et l'interaction triple hybride peut être visualisée par la croissance des levures sur milieu SD dépourvu d'uracile, leucine et histidine (SD-ULH). Afin d'estimer la force d'interaction, les levures sont cultivées sur des milieux contenant différentes concentrations de 3-amino-triazole.

③. Méthode du triple hybride par "co-transformation"

Cette méthode repose sur le même principe que pour le triple hybride par mating. Dans cette technique, nous utilisons une seule souche YBZ-1 dérivée de la souche L40 coat et exprimant la protéine CP-MS2 sous forme d'un dimère fusionné au domaine de fixation à l'ADN LexA. Ce dimère rend cette souche plus spécifique pour l'interaction en diminuant les faux positifs. La co-transformation de cette souche par les deux plasmides (pIIIMS2.1 et pGAD424, pGADT7 ou pACTII) se fait en utilisant le même protocole que pour la simple transformation.

b. Interaction protéine-acide nucléique *in vitro*

▪ Gel retard

Le principe de cette technique repose sur la différence de migration entre l'acide nucléique seul et ce même acide nucléique complexé à une protéine. Les protéines purifiées sont additionnées de 4 µg de poly(dIdC), 4 µl de tampon d'hybridation (KCl 25 mM ; HEPES 5 mM pH 6,8 ; MgCl₂ 2 mM ; EDTA 0,1 mM ; glycérol 3,8 % ; DTT 2 mM ; inhibiteur de protéases sans EDTA) qsp PBS 1 X 10 µl et incubées 10 min à 30 °C. La sonde radiomarquée (oligonucléotide) est ajoutée puis le mélange est incubé 10 min à 30 °C et déposé sur gel de polyacrylamide natif ou sur gel d'agarose. Pour faciliter le dépôt, 10 % de glycérol contenant du bleu de bromophénol sont ajoutés.

①. Sur gel de polyacrylamide natif

Le mélange réactionnel est déposé sur gel de polyacrylamide 8 % non dénaturant (Acrylamide/Bisacrylamide (37,5:1) 8 % ; glycérol 5 % ; TBE X 0,5 [Tris-Borate 100 mM pH 8,3 ; EDTA 2 mM] ; APS 25 %, TEMED 1 µl/mL), préalablement préchauffé à 100 V

pendant 1 h à 4 °C. La migration se fait à 25 V pendant 12 à 15 h à 4 °C dans du TBE 0,5 X. Le gel est ensuite fixé (méthanol 5 % ; acide acétique 10 %), séché pendant 1 h 30 et analysé par autoradiographie.

②. Sur gel d'agarose

Le mélange réactionnel est déposé sur un gel d'agarose 1,5 %, préparé dans du TBE 0,5 X et préalablement préchauffé à 100 V pendant 10 min à 4 °C. La migration se fait à 35 V pendant 4 à 7 h dans du TBE 0,5 X. Puis le gel est fixé (méthanol 5 % ; acide acétique 10 %), séché pendant 1 h 30 et analysé par autoradiographie.

▪ Northwestern

Une électrophorèse de protéines purifiées ou d'extraits protéiques est effectuée sur un gel de polyacrylamide 16 % dénaturant (SDS-PAGE). Après migration, le gel est électrotransféré sur une membrane de nitrocellulose selon le protocole décrit précédemment. La membrane est ensuite incubée dans la solution 1 (urée 6 M ; NP40 0,1 %) pendant 15 min. Une dilution progressive de la solution est effectuée jusqu'à une concentration finale en urée de 1,5 M. Puis la membrane subit 2 lavages successifs de 30 min dans la solution 2 (Tris-HCl 10 mM pH 8 ; NaCl 50 mM ; EDTA 1 mM ; Denhardt 1 X). La membrane est ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante dans la solution 2 supplémentée de 10 µl de sonde radiomarquée. Les sondes non fixées sont éliminées par 2 lavages de 30 min à température ambiante dans la solution 3 (Tris-HCl 10 mM pH 8 ; NaCl 200 mM ; EDTA 1 mM). La membrane est séchée à température ambiante et analysée par autoradiographie.

▪ Cross-linking

La solution de protéines est additionnée de 4 µg de poly(dIdC), 4 µl de tampon d'hybridation (KCl 25 mM ; HEPES 5 mM pH 6,8 ; MgCl₂ 2 mM ; EDTA 0,1 mM ; glycérol 3,8 % ; DTT 2 mM ; inhibiteur de protéases sans EDTA) qsp PBS 1 X 10 µl et incubée 10 min à 30 °C. La sonde marquée radioactivement est ajoutée et le mélange est incubé 10 min à 30 °C. Les échantillons sont ensuite exposés 2 fois aux UV pendant 30 sec à 120 µJoule/cm². Puis ils sont déposés sur un gel de polyacrylamide 16 % dénaturant (SDS-PAGE) après ajout d'un volume de Laemmli 2 X. L'électrophorèse s'effectue à 50 V pendant 3 h à 4 °C, puis le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite analysée par autoradiographie puis par immunodétection.

▪ Filtration sur membrane de nitrocellulose

L'interaction protéine-ARN peut être testée par une technique appelée filtration sur membrane de nitrocellulose. En effet, les membranes de nitrocellulose possèdent la propriété de retenir les protéines qui les traversent dans des conditions de faible force ionique mais pas les acides nucléiques. Si une séquence d'ARN (ou d'ADN) radiomarquée est capable d'interagir avec une protéine, cette dernière retiendra l'ARN et par conséquent le complexe protéine-ARN sera retenu sur la membrane de nitrocellulose après filtration.

Le mélange protéine-ARN est préparé dans les mêmes conditions que pour le gel retard à l'exception de la durée d'incubation du mélange qui est de 30 min. Le mélange est ensuite complété jusqu'à 100 µl avec du tampon d'hybridation (KCl 25 mM ; HEPES 5 mM pH 6,8 ; MgCl₂ 2 mM ; EDTA 0,1 mM ; glycérol 3,8 % ; DTT 2 mM ; inhibiteur de protéases sans EDTA) et filtré sous vide sur une membrane de nitrocellulose à 0,2 µM en utilisant une plaque de filtration. Puis 2 lavages successifs de la membrane par 100 µl de tampon d'hybridation sont effectués. La membrane est ensuite séchée à température ambiante pendant 15 min et analysée par phosphorimager et par autoradiographie.

Appendice

I. Abréviations

3AT	3-Amino-Triazole	DUB	DeUBiquitination enzyme
aa	acides aminés	EDTA	Acide Éthylène Diamine Tétracétique
Asp/D	acide Aspartique	E1	Enzyme d'activation
Glu/E	acide Glutamique	E2	Enzyme de conjugaison
AD	Activation Domain	E3	Enzyme de ligation
Adé/A	Adénine	eEF1α	eukaryotic Elongation Factor 1α
ADN/DNA	Acide Désoxyribo Nucléique	EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ADNc	ADN complémentaire	EGTA	Acide Éthylène Glycol Tétracétique
ADP	Adénosine DiPhosphate	GFP	Green Fluorescent Protein
AGO	ArGOnaute	GlcNAc	N-AcetylGlucosamine
Ala/A	Alanine	GST	Glutathion-S-Transférase
AMP	Adénosine MonoPhosphate	GUS	β-GlUcoronidaSe
APC	Anaphase-Promoting Complex	HA	Hémagglutinine A
APT	Acyl-Protein Thioesterase	HBP	Hairpin-Binding Protein
ARN/RNA	Acide RiboNucléique	HECT	Homology to E6AP C Terminus
ARNsub	ARN subgénomique	HcPro	Helper component Proteinase
ARNm	ARN messenger	HEPES	N-2 HydroxyEthyl Piperazine Acid N'-2Ethane Sulfate
ASK	Arabidopsis S-phase Kinase	HIF	Hypoxia Inducible Factor
ASK1	Arabidopsis SKP1-like	His/H	Histidine
ATP	Adénosine TriPhosphate	HPT	Histidine Phospho Transfert
BC	Bleu de Coomassie	HR	Réponse Hypersensible
BD	Binding Domain	HSP90	Heat Shock Protein 90
BET	Bromure d'ÉThidium	IPTG	IsoPropyl β-D ThioGalactoside
β-gal	β-galactosidase	LB	Luria Broth
BSA	Bovine Serum Albumine	Leu/L	Leucine
BY-2	<i>Nicotiana tabacum L. cv Bright Yellow-2</i>	Liac	Lithium Acetate
CIP	Calf Intestinal Phosphatase	LMB	LeptoMycine B
CoA	Coenzyme A	Lys/K	Lysine
Co-IP	Co-ImmunoPrécipitation	MAT	MAting-Type
CP	Protéine de Capside	MP	Protéine de Mouvement
CRP	Cystein Rich Protein	NAD	Nicotinamide Adénine Di-nucléotide
DCL	DiCer-Like protein	NAT	N-terminal AcétylTransférases
DMF	DiMéthylFormamide	NES	Nuclear Export Signal
ddNTP	2'-3'-didésoxyriboNucléotides-5'-TriPhosphate	NLS	Nuclear Localization Signal
DNase	DésoxyriboNucléase	NMT	N-MyristoylTransférase
dNTP	2'-désoxyriboNucléotides-5'-TriPhosphate	NoLS	Nucleolar Localization Signal
DTT	DiThioTréitol	NSP	Nuclear Shuttle Protein

I. Abréviations

ONPG	O-NitroPhényl-β-D-Galactopyranoside	SD	Synthetic Dropout
ORF	Open Reading Frame	SDS	DodécylSulfate de Sodium
oxPTM	PTM oxydatives	Ser/S	Sérine
PDS	Phytoene DeSaturase	siRNA	small interfering RNA
PEG	PolyÉthylène Glycol	sRNA	small RNA
pI	point Isoélectrique	SSC	Sel Sodium Citrate
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis	ssp	sous-espèce (sub-species)
PAT	Protéine S-Acyle Transférase	SUMO	Small Ubiquitin-related MODifer
pBIN	BINary plasmid	TBE	Tris Borate EDTA
PBS	Phosphate Buffered Saline	TE	Tris-HCl-EDTA
PCR	Polymerase Chain Reaction	TEMED	NNNN'-TÉtraMéthyle Éthylène Diamine
PDR	Résistance Dérivée du Pathogène	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
PNK	PolyNucléotide Kinase	tasiRNA	trans-acting short interfering RNA
PM	Poids Moléculaire	TES	Tris-HCl-EDTA-SDS
PPP	PhosphoProtéines Phosphatases	TGB	Triple Gene Block
PR	Pathogenesis-Related	TGS	Transcriptional Gene Silencing
PRMT	Protein Arginine MethylTransferase	Thr/T	Thréonine
PS/TK	Protéines Sérine/Thréonine Kinase	Tris	Tri(hydroxyméthyl)aminométhane
PTGS	Post-Transcriptional Gene Silencing	Trp/W	TryPtophane
PTK	Protéines Tyrosine Kinase	Tyr/Y	Tyrosine
PTM	Modifications Post-Traductionnelles	UAS	Upstream Activating Sequences
PTP	Protéines Tyrosine Phosphatases.	Ub	Ubiquitine
qsp	quantité suffisante pour	UBC	UB-Carrier protein
R	gène de Résistance	UBL	UBiquitine-Like
Ran	Ras-related nuclear protein	UMP	Uridine MonoPhosphate
RanGAP	Ran GTPase-Activating Protein	UDP	Uridine DiPhosphate
RBP	RNA Binding Protein	ULP	Ubiquitin-Like Proteases
RE	Réticulum Endoplasmique	UPS	Système Ubiquitine-Protéasome
RDR	RNA-Dependent RNA polymerase (Chez Arabidopsis)	Ura/U	Uracile
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	UTP	Uridine TriPhosphate
RING	Real Interesting New Gene	UTR	UnTranslated Region
RISC	Rna Induced Silencing Complex	UV	Ultra-Violet
RNase	RiboNucléase	VPg	Viral Protein genome-linked
RT	ReadThrough	VIGS	Virus-Induced Gene Silencing
SAR	Résistance Systémique Acquise	X-α-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galactopyranoside
SCF	SKP1, Cullin1/CDC53, F-box protein	X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
scFv	single chain variable Fragment	YPD	Yeast Peptone Dextrose

II. Unités de mesure

°C	degré Celsius	m	mètre
c	centi-	M	Molaire
Ci	Curie	Miller	Unité enzymatique de la β -galactosidase
Da	Dalton	min	minute
DO	Densité Optique	mol	mole
F	Farad	n-	nano-
g	gramme	nts	nucléotides
h	heure	pb	paire de bases
j	jour	pH	Potentiel Hydrogène
k-	Kilo	rpm	rotation par minute
L	Litre	sec	seconde
lx	Lux (unité de mesure d'éclairement lumineux)	U	Unité enzymatique
μ-	micro-	V	Volt
m-	milli-	Ω	ohm

III. Liste des virus cités

AbMV	<i>Abutilon Mosaic Virus</i>	LRV	<i>LeishmaniaVirus</i>
AIV	<i>Influenza A Virus</i>	MV	<i>Measles Virus</i>
BdMV	<i>Burdock Mottle Virus</i>	PBCV-1	<i>Paramecium Bursaria Chlorella Virus-1</i>
BKV	<i>BK Virus</i>	PLRV	<i>Potato LeafRoll Virus</i>
BNYVV	<i>Beet Necrotic Yellow Vein Virus</i>	PPV	<i>Plum Pox Virus</i>
BSBMV	<i>Beet Soil Borne Mosaic Virus</i>	PVA	<i>Potato Virus A</i>
BSCTV	<i>Beet Severe Curly Top Virus</i>	PVX	<i>Potato Virus X</i>
BSMV	<i>Barley Stripe Mosaic Virus</i>	PVY	<i>Potato Virus Y</i>
BWYV	<i>Beet Western Yellow Virus</i>	RCNMV	<i>Red Clover Necrotic Mosaic Virus</i>
CABYV	<i>Cucurbit Aphid-Borne Yellows Virus</i>	RSNV	<i>Rice Stripe Necrosis Virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>	SFV	<i>Semliki Forest Virus</i>
CMV	<i>Cucumber Mosaic Virus</i>	SV40	<i>Simian Virus 40</i>
CNV	<i>Cucumber Necrosis Tombusvirus</i>	TAV	<i>Tomato Aspermy Virus</i>
CPMV	<i>CowPea Mosaic Virus</i>	TBSV	<i>Tomato Bushy Stunt Virus</i>
EACMCV	<i>East African Cassava Mosaic Cameroon Virus</i>	TCV	<i>Turnip Crinkle Virus</i>
FBNYV	<i>Faba Bean Necrotic Yellow Virus</i>	TGMV	<i>Tomato Golden Mosaic Virus</i>
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>	TMV	<i>Tomato Mosaic Virus</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>	ToMV	<i>Tomato Mosaic tobamoVirus</i>
HDV	<i>Hepatitis Delta Virus</i>	TSWV	<i>Tomato Spotted Wilt Virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>	TYLCSV	<i>Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus</i>
HRV	<i>Human RhinoVirus</i>	TYMV	<i>Turnip Yellow Mosaic Virus</i>
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>	VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
LNYV	<i>Lettuce Necrotic Yellow Virus</i>	WRSV	<i>Wheat Rosette Stunt Virus</i>

Bibliographie

- Acosta-Leal, R., Fawley, M.W., and Rush, C.M.** (2008). Changes in the intrasolate genetic structure of Beet necrotic yellow vein virus populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* **376**, 60-68.
- Acosta-Leal, R., Brian, B.K., and Rush, C.M.** (2010a). Host Effect on the Genetic Diversification of Beet necrotic yellow vein virus Single-plant Populations. *Phytopathology*.
- Acosta-Leal, R., Bryan, B.K., Smith, J.T., and Rush, C.M.** (2010b). Breakdown of Host Resistance by Independent Evolutionary Lineages of Beet necrotic yellow vein virus Involves a Parallel C/U Mutation in Its p25 Gene. *Phytopathology* **100**, 127-133.
- Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E.** (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo J* **18**, 5347-5358.
- Adams, J., Kelso, R., and Cooley, L.** (2000). The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol* **10**, 17-24.
- Aho, S., Arffman, A., Pummi, T., and Uitto, J.** (1997). A novel reporter gene MEL1 for the yeast two-hybrid system. *Anal Biochem* **253**, 270-272.
- Ali, N., Halfter, U., and Chua, N.H.** (1994). Cloning and biochemical characterization of a plant protein kinase that phosphorylates serine, threonine, and tyrosine. *J Biol Chem* **269**, 31626-31629.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., and Mustelin, T.** (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711.
- Altmeyer, R.** (2004). Virus attachment and entry offer numerous targets for antiviral therapy. *Curr Pharm Des* **10**, 3701-3712.
- Ammosova, T., Berro, R., Jerebtsova, M., Jackson, A., Charles, S., Klase, Z., Southerland, W., Gordeuk, V.R., Kashanchi, F., and Nekhai, S.** (2006). Phosphorylation of HIV-1 Tat by CDK2 in HIV-1 transcription. *Retrovirology* **3**, 78.
- Andreeva, A.V., and Kutuzov, M.A.** (2008). Protozoan protein tyrosine phosphatases. *Int J Parasitol* **38**, 1279-1295.
- Andreeva, A.V., Evans, D.E., Hawes, C.R., Bennett, N., and Kutuzov, M.A.** (1998). PP7, a plant phosphatase representing a novel evolutionary branch of eukaryotic protein Ser/Thr phosphatases. *Biochem Mol Biol Int* **44**, 703-715.
- Anindya, R., Chittori, S., and Savithri, H.S.** (2005). Tyrosine 66 of Pepper vein banding virus genome-linked protein is uridylylated by RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **336**, 154-162.
- Arnason, T., and Ellison, M.J.** (1994). Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol* **14**, 7876-7883.
- Aronson, M.N., Meyer, A.D., Gyorgyey, J., Katul, L., Vetten, H.J., Gronenborn, B., and Timchenko, T.** (2000). Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *J Virol* **74**, 2967-2972.
- Aswad, D.W.** (1984). Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25. Evidence for methylation at the alpha-carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues. *J Biol Chem* **259**, 10714-10721.
- Azuma, N., Kanamaru, K., Matsushika, A., Yamashino, T., Mizuno, T., Kato, M., and Kobayashi, T.** (2007). In vitro analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: the first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2493-2502.
- Baekkeskov, S., and Kanaani, J.** (2009). Palmitoylation cycles and regulation of protein function (Review). *Mol Membr Biol* **26**, 42-54.
- 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**, 263-274.
- Ballut, L., Drucker, M., Pugniere, M., Cambon, F., Blanc, S., Roquet, F., Candresse, T., Schmid, H.P., Nicolas, P., Gall, O.L., and Badaoui, S.** (2005). HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *J Gen Virol* **86**, 2595-2603.
- Balmori, E., Gilmer, D., Richards, K., Guillely, H., and Jonard, G.** (1993). Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* **75**, 517-521.
- Bandla, M.D., Campbell, L.R., Ullman, D.E., and Sherwood, J.L.** (1998). Interaction of Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) Glycoproteins with a Thrips Midgut Protein, a Potential Cellular Receptor for TSWV. *Phytopathology* **88**, 98-104.
- Banerjee, A.K., and Barik, S.** (1992). Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology* **188**, 417-428.
- Banks, L., Pim, D., and Thomas, M.** (2003). Viruses and the 26S proteasome: hacking into destruction. *Trends Biochem Sci* **28**, 452-459.
- Barajas, D., and Nagy, P.D.** (2010). Ubiquitination of tombusvirus p33 replication protein plays a role in virus replication and binding to the host Vps23p ESCRT protein. *Virology* **397**, 358-368.
- Baratova, L.A., Fedorova, N.V., Dobrov, E.N., Lukashina, E.V., Kharlanov, A.N., Nasonov, V.V., Serebryakova, M.V., Kozlovsky, S.V., Zayakina, O.V., and Rodionova, N.P.** (2004). N-Terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface. *Eur J Biochem* **271**, 3136-3145.
- Barford, D.** (1995). Protein phosphatases. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 728-734.
- Barford, D.** (1996). Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* **21**, 407-412.
- Barr, K., Asher, M., and Lewis, B.** (1995). Resistance to *Polymyxa betae* in wild beta species. *Plant Pathology* **44**, 301-307.

- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R., and Fields, S.** (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920-924.
- Bartels, S., Besteiro, M.A., Lang, D., and Ulm, R.** (2010). Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends Plant Sci* **15**, 322-329.
- Bassham, D.C.** (2007). Plant autophagy--more than a starvation response. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 587-593.
- Bassham, D.C.** (2009). Function and regulation of macroautophagy in plants. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1397-1403.
- Batistic, O., Sorek, N., Schultke, S., Yalovsky, S., and Kudla, J.** (2008). Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 1346-1362.
- Baudry, A., Ito, S., Song, Y.H., Strait, A.A., Kiba, T., Lu, S., Henriques, R., Pruneda-Paz, J.L., Chua, N.H., Tobin, E.M., Kay, S.A., and Imaizumi, T.** (2010). F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. *Plant Cell* **22**, 606-622.
- Baulcombe, D.C., and Molnar, A.** (2004). Crystal structure of p19--a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem Sci* **29**, 279-281.
- 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 Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* **17**, 1609-1614.
- Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y., and Baulcombe, D.C.** (2005). Cell-to-cell movement of potato potyvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J* **44**, 471-482.
- Beachy, R.N.** (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 215-220.
- Beachy, R.N.** (1999). Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 659-664.
- Bedford, M.T.** (2007). Arginine methylation at a glance. *J Cell Sci* **120**, 4243-4246.
- Bedford, M.T., and Richard, S.** (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* **18**, 263-272.
- Bendahmane, A., Kohn, B.A., Dedi, C., and Baulcombe, D.C.** (1995). The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. *Plant J* **8**, 933-941.
- Bendahmane, M., Fitchen, J.H., Zhang, G., and Beachy, R.N.** (1997). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J Virol* **71**, 7942-7950.
- Bendixen, C., Gangloff, S., and Rothstein, R.** (1994). A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res* **22**, 1778-1779.
- Bercovich, B., Stancovski, I., Mayer, A., Blumenfeld, N., Laszlo, A., Schwartz, A.L., and Ciechanover, A.** (1997). Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J Biol Chem* **272**, 9002-9010.
- Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle, M., Anders, M., Dubin, M.J., Benvenuto, G., Bowler, C., Genschik, P., and Hellmann, H.** (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **47**, 591-603.
- Bernstein, D.S., Buter, N., Stumpf, C., and Wickens, M.** (2002). Analyzing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system. *Methods* **26**, 123-141.
- 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**, 363-366.
- Bevan, M.** (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **12**, 8711-8721.
- Bibby, A.C., and Litchfield, D.W.** (2005). The Multiple Personalities of the Regulatory Subunit of Protein Kinase CK2: CK2 Dependent and CK2 Independent Roles Reveal a Secret Identity for CK2beta. *Int J Biol Sci* **1**, 67-79.
- Bignon, E., Alonso, R., Arnone, M., Boigegrain, R., Brodin, R., Gueudet, C., Heaulme, M., Keane, P., Landi, M., Molimard, J.C., Olliero, D., Poncelet, M., Seban, E., Simiand, J., Soubrie, P., Pascal, M., Maffrand, J.P., and Le Fur, G.** (1999). SR146131: a new potent, orally active, and selective nonpeptide cholecystokinin subtype 1 receptor agonist. II. In vivo pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 752-761.
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R., and Simon, M.I.** (1999). Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**, 131-141.
- Boggio, R., and Chiocca, S.** (2006). Viruses and sumoylation: recent highlights. *Curr Opin Microbiol* **9**, 430-436.
- Boggio, R., Passafaro, A., and Chiocca, S.** (2007). Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J Biol Chem* **282**, 15376-15382.
- Boggio, R., Colombo, R., Hay, R.T., Draetta, G.F., and Chiocca, S.** (2004). A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol Cell* **16**, 549-561.
- Boisvert, F.M., Chenard, C.A., and Richard, S.** (2005). Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation. *Sci STKE* **2005**, re2.
- Borden, K.L., and Freemont, P.S.** (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 395-401.
- Bork, P., and Doolittle, R.F.** (1994). Drosophila kelch motif is derived from a common enzyme fold. *J Mol Biol* **236**, 1277-1282.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., and Ziegler-Graff, V.** (2007). The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* **17**, 1615-1621.

- Boulanger, M.C., Liang, C., Russell, R.S., Lin, R., Bedford, M.T., Wainberg, M.A., and Richard, S.** (2005). Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol* **79**, 124-131.
- Bradbury, A.F., and Smyth, D.G.** (1991). Peptide amidation. *Trends Biochem Sci* **16**, 112-115.
- Brand, S.R., Kobayashi, R., and Mathews, M.B.** (1997). The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* **272**, 8388-8395.
- Brindley, D.N.** (2004). Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* **92**, 900-912.
- 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**, 1185-1190.
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L.S., Hemmings, B.A., and Greenberg, M.E.** (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* **21**, 952-965.
- Bryant, M., and Ratner, L.** (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 523-527.
- Burguan, J.** (2008). Role of silencing suppressor proteins. *Methods Mol Biol* **451**, 69-79.
- Callis, J., Raasch, J.A., and Vierstra, R.D.** (1990). Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*. Structure, localization, and expression of their promoters in transgenic tobacco. *J Biol Chem* **265**, 12486-12493.
- Callis, J., Carpenter, T., Sun, C.W., and Vierstra, R.D.** (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* **139**, 921-939.
- Cao, Y., Yang, Y., Zhang, H., Li, D., Zheng, Z., and Song, F.** (2008). Overexpression of a rice defense-related F-box protein gene OsDRF1 in tobacco improves disease resistance through potentiation of defense gene expression. *Physiol Plant* **134**, 440-452.
- Capron, A., Serralbo, O., Fulop, K., Frugier, F., Parmentier, Y., Dong, A., Lecureuil, A., Guerche, P., Kondorosi, E., Scheres, B., and Genschik, P.** (2003). The *Arabidopsis* anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell* **15**, 2370-2382.
- Cardozo, T., and Pagano, M.** (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 739-751.
- Caron, C., Col, E., and Khochbin, S.** (2003). The viral control of cellular acetylation signaling. *Bioessays* **25**, 58-65.
- Carvalho, M.F., and Lazarowitz, S.G.** (2004). Interaction of the movement protein NSP and the *Arabidopsis* acetyltransferase AtNSI is necessary for Cabbage leaf curl geminivirus infection and pathogenicity. *J Virol* **78**, 11161-11171.
- Carvalho, M.F., Turgeon, R., and Lazarowitz, S.G.** (2006). The geminivirus nuclear shuttle protein NSP inhibits the activity of AtNSI, a vascular-expressed *Arabidopsis* acetyltransferase regulated with the sink-to-source transition. *Plant Physiol* **140**, 1317-1330.
- Casadaban, M.J., and Cohen, S.N.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**, 179-207.
- Castellino, F.J., Ploplis, V.A., and Zhang, L.** (2002). gamma-glutamate and beta-hydroxyaspartate in proteins. *Methods Mol Biol* **194**, 259-268.
- Castellino, F.J., Ploplis, V.A., and Zhang, L.** (2008). gamma-Glutamate and beta-hydroxyaspartate in proteins. *Methods Mol Biol* **446**, 85-94.
- Castillo, A.G., Kong, L.J., Hanley-Bowdoin, L., and Bejarano, E.R.** (2004). Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. *J Virol* **78**, 2758-2769.
- Champagne, J., Laliberte-Gagne, M.E., and Leclerc, D.** (2007). Phosphorylation of the termini of Cauliflower mosaic virus precapsid protein is important for productive infection. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 648-658.
- Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A., and Henry, Y.** (2004). *Arabidopsis* kinome: after the casting. *Funct Integr Genomics* **4**, 163-187.
- Chapdelaine, Y., Kirk, D., Karsies, A., Hohn, T., and Leclerc, D.** (2002). Mutation of capsid protein phosphorylation sites abolishes cauliflower mosaic virus infectivity. *J Virol* **76**, 11748-11752.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A.** (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576-1583.
- Cheek, S., Zhang, H., and Grishin, N.V.** (2002). Sequence and structure classification of kinases. *J Mol Biol* **320**, 855-881.
- Cheek, S., Ginalska, K., Zhang, H., and Grishin, N.V.** (2005). A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Struct Biol* **5**, 6.
- Chen, H., Tini, M., and Evans, R.M.** (2001). HATs on and beyond chromatin. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 218-224.
- Chen, H., Shen, Y., Tang, X., Yu, L., Wang, J., Guo, L., Zhang, Y., Zhang, H., Feng, S., Strickland, E., Zheng, N., and Deng, X.W.** (2006). *Arabidopsis* CULLIN4 Forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in Mediating Light Control of Development. *Plant Cell* **18**, 1991-2004.
- Cheng, X., and Hart, G.W.** (2001). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem* **276**, 10570-10575.
- Cheng, X., Cole, R.N., Zaia, J., and Hart, G.W.** (2000). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry* **39**, 11609-11620.

- Chi, Y., Huddleston, M.J., Zhang, X., Young, R.A., Annan, R.S., Carr, S.A., and Deshaies, R.J.** (2001). Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev* **15**, 1078-1092.
- Chiba, S., Miyanishi, M., Andika, I.B., Kondo, H., and Tamada, T.** (2008). Identification of amino acids of the beet necrotic yellow vein virus p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. *J Gen Virol* **89**, 1314-1323.
- Choe, H., Li, W., Wright, P.L., Vasilieva, N., Venturi, M., Huang, C.C., Grundner, C., Dorfman, T., Zwick, M.B., Wang, L., Rosenberg, E.S., Kwong, P.D., Burton, D.R., Robinson, J.E., Sodroski, J.G., and Farzan, M.** (2003). Tyrosine sulfation of human antibodies contributes to recognition of the CCR5 binding region of HIV-1 gp120. *Cell* **114**, 161-170.
- Chou, T.Y., and Hart, G.W.** (2001). O-linked N-acetylglucosamine and cancer: messages from the glycosylation of c-Myc. *Adv Exp Med Biol* **491**, 413-418.
- Chu, M., Desvoyes, B., Turina, M., Noad, R., and Scholthof, H.B.** (2000). Genetic dissection of tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology* **266**, 79-87.
- Cimarelli, A., and Luban, J.** (1999). Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J Virol* **73**, 5388-5401.
- Citovsky, V., McLean, B.G., Zupan, J.R., and Zambryski, P.** (1993). Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev* **7**, 904-910.
- Clarke, S., Vogel, J.P., Deschenes, R.J., and Stock, J.** (1988). Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4643-4647.
- Cohen, P.** (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* **4**, E127-130.
- Cohen, P.T.** (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**, 245-251.
- Coscoy, L., and Ganem, D.** (2003). PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell Biol* **13**, 7-12.
- Costagliola, S., Panneels, V., Bonomi, M., Koch, J., Many, M.C., Smits, G., and Vassart, G.** (2002). Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *Embo J* **21**, 504-513.
- Cousens, D.J., Greaves, R., Goding, C.R., and O'Hare, P.** (1989). The C-terminal 79 amino acids of the herpes simplex virus regulatory protein, Vmw65, efficiently activate transcription in yeast and mammalian cells in chimeric DNA-binding proteins. *Embo J* **8**, 2337-2342.
- Cox, G.A., Johnson, R.B., Cook, J.A., Wakulchik, M., Johnson, M.G., Villarreal, E.C., and Wang, Q.M.** (1999). Identification and characterization of human rhinovirus-14 3C protease deamidation isoform. *J Biol Chem* **274**, 13211-13216.
- Cox, M.L., and Meek, D.W.** (2010). Phosphorylation of serine 392 in p53 is a common and integral event during p53 induction by diverse stimuli. *Cell Signal* **22**, 564-571.
- Craig, A., Ewan, R., Mesmar, J., Gudipati, V., and Sadanandom, A.** (2009). E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *J Exp Bot* **60**, 1123-1132.
- Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M., and Lord, J.M.** (2000). Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* **256**, 34-41.
- Csorba, T., Loza, R., Hutvagner, G., and Burgyan, J.** (2010). Poliovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J*.
- Cummins, P.M., and O'Connor, B.** (1998). Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta* **1429**, 1-17.
- Das, T., Gupta, A.K., Sims, P.W., Gelfand, C.A., Jentoft, J.E., and Banerjee, A.K.** (1995). Role of cellular casein kinase II in the function of the phosphoprotein (P) subunit of RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem* **270**, 24100-24107.
- de Wispelaere, M., and Rao, A.L.** (2009). Production of cucumber mosaic virus RNA5 and its role in recombination. *Virology* **384**, 179-191.
- 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**, 68-71.
- Denuc, A., and Marfany, G.** (2010). SUMO and ubiquitin paths converge. *Biochem Soc Trans* **38**, 34-39.
- Deribe, Y.L., Pawson, T., and Dikic, I.** (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 666-672.
- Deshaies, R.J.** (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 435-467.
- Devaux, P., von Messling, V., Songsunthong, W., Springfield, C., and Cattaneo, R.** (2007). Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* **360**, 72-83.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- Dias, W.B., and Hart, G.W.** (2007). O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst* **3**, 766-772.
- Diaz-Pendon, J.A., and Ding, S.W.** (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **46**, 303-326.
- Dielen, A.S., Badaoui, S., Candresse, T., and German-Retana, S.** (2010). The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-peek game. *Mol Plant Pathol* **11**, 293-308.

- Dieterle, M., Thomann, A., Renou, J.P., Parmentier, Y., Cognat, V., Lemonnier, G., Muller, R., Shen, W.H., Kretsch, T., and Genschik, P. (2005). Molecular and functional characterization of Arabidopsis Cullin 3A. *Plant J* **41**, 386-399.
- Dietzgen, R.G., and Francki, R.I. (1988). Analysis of lettuce necrotic yellows virus structural proteins with monoclonal antibodies and concanavalin A. *Virology* **166**, 486-494.
- Ding, S.W., and Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-426.
- Doelling, J.H., Yan, N., Kurepa, J., Walker, J., and Vierstra, R.D. (2001). The ubiquitin-specific protease UBP14 is essential for early embryo development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **27**, 393-405.
- Dong, L., Wang, L., Zhang, Y., Deng, X., and Xue, Y. (2006). An auxin-inducible F-box protein CEGENDUO negatively regulates auxin-mediated lateral root formation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **60**, 599-615.
- Downes, B.P., Stupar, R.M., Gingerich, D.J., and Vierstra, R.D. (2003). The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J* **35**, 729-742.
- Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clement, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Gagnoux, L., Piechaczyk, M., Boquet, P., and Lemichez, E. (2002). CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* **111**, 553-564.
- Drugeon, G., and Jupin, I. (2002). Stability in vitro of the 69K movement protein of Turnip yellow mosaic virus is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. *J Gen Virol* **83**, 3187-3197.
- Duncan, J.A., and Gilman, A.G. (1998). A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J Biol Chem* **273**, 15830-15837.
- Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer, O., Voinnet, O., and Richards, K.E. (2002). Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J* **29**, 555-567.
- Edison, A.S., Espinoza, E., and Zachariah, C. (1999). Conformational ensembles: the role of neuropeptide structures in receptor binding. *J Neurosci* **19**, 6318-6326.
- Egorova, K.S., Olenkina, O.M., and Olenina, L.V. (2010). Lysine methylation of nonhistone proteins is a way to regulate their stability and function. *Biochemistry (Mosc)* **75**, 535-548.
- Ekwall, K. (2004). The RITS complex-A direct link between small RNA and heterochromatin. *Mol Cell* **13**, 304-305.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200.
- Eng, R.A., and Bossemeyer, D. (2001). The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation - targets for therapeutic intervention. *Adv Enzyme Regul* **41**, 121-149.
- Eriksson, M., Myllyharju, J., Tu, H., Hellman, M., and Kivirikko, K.I. (1999). Evidence for 4-hydroxyproline in viral proteins. Characterization of a viral prolyl 4-hydroxylase and its peptide substrates. *J Biol Chem* **274**, 22131-22134.
- Esser, C., Alberti, S., and Hohfeld, J. (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 171-188.
- Evans, M.J., Rice, C.M., and Goff, S.P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13038-13043.
- Fang, C.Y., Chen, H.Y., Wang, M., Chen, P.L., Chang, C.F., Chen, L.S., Shen, C.H., Ou, W.C., Tsai, M.D., Hsu, P.H., and Chang, D. (2010). Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS. *Virology* **402**, 164-176.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., and Weissman, A.M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* **275**, 8945-8951.
- Farras, R., Ferrando, A., Jasik, J., Kleinow, T., Okresz, L., Tiburcio, A., Salchert, K., del Pozo, C., Schell, J., and Koncz, C. (2001). SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *Embo J* **20**, 2742-2756.
- Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N.P., Gerard, C., Sodroski, J., and Choe, H. (1999). Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* **96**, 667-676.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., and (eds). (2005). *Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses*. London: Elsevier.
- Feng, X.H., Zhao, Y., Bottino, P.J., and Kung, S.D. (1993). Cloning and characterization of a novel member of protein kinase family from soybean. *Biochim Biophys Acta* **1172**, 200-204.
- Ferguson, M.A. (2000). Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10673-10675.
- Fernandez-Fernandez, M.R., Camafeita, E., Bonay, P., Mendez, E., Albar, J.P., and Garcia, J.A. (2002). The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* **277**, 135-140.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* **78**, 477-513.
- Fischer, E.H., and Krebs, E.G. (1966). Relationship of structure to function of muscle phosphorylase. *Fed Proc* **25**, 1511-1520.
- Fischer, W.H., and Spiess, J. (1987). Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutaminyl peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3628-3632.
- Flatau, G., Lemichez, E., Gauthier, M., Chardin, P., Paris, S., Fiorentini, C., and Boquet, P. (1997). Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* **387**, 729-733.
- Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275-296.

- Florentino, L.H., Santos, A.A., Fontenelle, M.R., Pinheiro, G.L., Zerbini, F.M., Baracat-Pereira, M.C., and Fontes, E.P.** (2006). A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *J Virol* **80**, 6648-6656.
- Fondong, V.N., Reddy, R.V., Lu, C., Hankoua, B., Felton, C., Czymmek, K., and Achenjang, F.** (2007). The consensus N-myristoylation motif of a geminivirus AC4 protein is required for membrane binding and pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 380-391.
- Fontes, E.P., Santos, A.A., Luz, D.F., Waclawovsky, A.J., and Chory, J.** (2004). The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes Dev* **18**, 2545-2556.
- Forbes, D.J.** (1992). Structure and function of the nuclear pore complex. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 495-527.
- Fordham-Skelton, A.P., Chilly, P., Lumberras, V., Reignoux, S., Fenton, T.R., Dahm, C.C., Pages, M., and Gatehouse, J.A.** (2002). A novel higher plant protein tyrosine phosphatase interacts with SNF1-related protein kinases via a KIS (kinase interaction sequence) domain. *Plant J* **29**, 705-715.
- Fries, L.F., Friedman, H.M., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Hammer, C.H., and Frank, M.M.** (1986). Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 is an inhibitor of the complement cascade. *J Immunol* **137**, 1636-1641.
- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M.H., and Vierstra, R.D.** (2001). Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *Embo J* **20**, 7096-7107.
- Fuchs, S.Y., Tappin, I., and Ronai, Z.** (2000). Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* **275**, 12560-12564.
- 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 U S A* **99**, 11519-11524.
- Gagneux, P., and Varki, A.** (1999). Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* **9**, 747-755.
- Gaines, P., Lamoureux, J., Marisetty, A., Chi, J., and Berliner, N.** (2008). A cascade of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases regulates the differentiation and functional activation of murine neutrophils. *Exp Hematol* **36**, 832-844.
- Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L., and Ritzenthaler, C.** (1999). Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* **264**, 25-36.
- Gallastegui, N., and Groll, M.** (2010). The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci*.
- Gao, Y., and Lenard, J.** (1995a). Cooperative binding of multimeric phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus to polymerase (L) and template: pathways of assembly. *J Virol* **69**, 7718-7723.
- Gao, Y., and Lenard, J.** (1995b). Multimerization and transcriptional activation of the phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus by casein kinase-II. *Embo J* **14**, 1240-1247.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F.** (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-956.
- Geffroy, M.C., and Hay, R.T.** (2009). An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 564-568.
- Gill, G.** (2003). Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 108-113.
- Gill, G.** (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**, 2046-2059.
- Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G.** (1992). Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* **189**, 40-47.
- Gilmer, D., Allmang, C., Ehresmann, C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., and Ehresmann, B.** (1993). The secondary structure of the 5'-noncoding region of beet necrotic yellow vein virus RNA 3: evidence for a role in viral RNA replication. *Nucleic Acids Res* **21**, 1389-1395.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205-227.
- Gonzalez, I., Martinez, L., Rakitina, D.V., Lewsey, M.G., Atencio, F.A., Llave, C., Kalinina, N.O., Carr, J.P., Palukaitis, P., and Canto, T.** (2010). Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 294-303.
- Gonzalez-Carranza, Z.H., Rompa, U., Peters, J.L., Bhatt, A.M., Wagstaff, C., Stead, A.D., and Roberts, J.A.** (2007). Hawaiian skirt: an F-box gene that regulates organ fusion and growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**, 1370-1382.
- 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.
- Gou, M., Su, N., Zheng, J., Huai, J., Wu, G., Zhao, J., He, J., Tang, D., Yang, S., and Wang, G.** (2009). An F-box gene, CPR30, functions as a negative regulator of the defense response in Arabidopsis. *Plant J* **60**, 757-770.
- Gray, W.M., Hellmann, H., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (2002). Role of the Arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. *Plant Cell* **14**, 2137-2144.
- Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H., and Estelle, M.** (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* **13**, 1678-1691.
- Griner, E.M., and Kazanietz, M.G.** (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 281-294.

- Gronke, R.S., VanDusen, W.J., Garsky, V.M., Jacobs, J.W., Sardana, M.K., Stern, A.M., and Friedman, P.A. (1989). Aspartyl beta-hydroxylase: in vitro hydroxylation of a synthetic peptide based on the structure of the first growth factor-like domain of human factor IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3609-3613.
- Guilley, H., Bortolamiol, D., Jonard, G., Bouzoubaa, S., and Ziegler-Graff, V. (2009). Rapid screening of RNA silencing suppressors by using a recombinant virus derived from beet necrotic yellow vein virus. *J Gen Virol* **90**, 2536-2541.
- Gunnery, S., and Mathews, M.B. (1998). RNA binding and modulation of PKR activity. *Methods* **15**, 189-198.
- Gupta, R., Huang, Y., Kieber, J., and Luan, S. (1998). Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from Arabidopsis. *Plant J* **16**, 581-589.
- Gutierrez-Campos, R., Torres-Acosta, J.A., Saucedo-Arias, L.J., and Gomez-Lim, M.A. (1999). The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nat Biotechnol* **17**, 1223-1226.
- Haglund, K., and Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J* **24**, 3353-3359.
- Haley, A., Hunter, T., Kiberstis, P., and Zimmermann, D. (1995). Multiple serine phosphorylation sites on the 30 kDa TMV cell-to-cell movement protein synthesized in tobacco protoplasts. *Plant J* **8**, 715-724.
- Hames, R.S., Wattam, S.L., Yamano, H., Bacchieri, R., and Fry, A.M. (2001). APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *Embo J* **20**, 7117-7127.
- 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, K.S., Ellison, M.J., Barber, K.R., Williams, R.S., Huzil, J.T., McKenna, S., Ptak, C., Glover, M., and Shaw, G.S. (2001). Structure of a conjugating enzyme-ubiquitin thiolester intermediate reveals a novel role for the ubiquitin tail. *Structure* **9**, 897-904.
- Han, L., Mason, M., Risseuw, E.P., Crosby, W.L., and Somers, D.E. (2004). Formation of an SCF(ZTL) complex is required for proper regulation of circadian timing. *Plant J* **40**, 291-301.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., and Marshall, C.J. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**, 1167-1177.
- Hanks, S.K., and Quinn, A.M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* **200**, 38-62.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**, 576-596.
- Hanna, J., and Finley, D. (2007). A proteasome for all occasions. *FEBS Lett* **581**, 2854-2861.
- Hannoush, R.N., and Sun, J. (2010). The chemical toolbox for monitoring protein fatty acylation and prenylation. *Nat Chem Biol* **6**, 498-506.
- Hao, B., Oehlmann, S., Sowa, M.E., Harper, J.W., and Pavletich, N.P. (2007). Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases. *Mol Cell* **26**, 131-143.
- Hardie, D.G. (1999). Plant protein Serine/Threonine Kinases: Classification and Functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 97-131.
- Harper, J.W., Burton, J.L., and Solomon, M.J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* **16**, 2179-2206.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hart, G.W., Housley, M.P., and Slawson, C. (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* **446**, 1017-1022.
- Hart, G.W., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D., and Kelly, W.G. (1989). Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu Rev Biochem* **58**, 841-874.
- Hartitz, M.D., Sunter, G., and Bisaro, D.M. (1999). The tomato golden mosaic virus transactivator (TrAP) is a single-stranded DNA and zinc-binding phosphoprotein with an acidic activation domain. *Virology* **263**, 1-14.
- Hasne, M.P., and Lawrence, F. (1999). Characterization of prenylated protein methyltransferase in Leishmania. *Biochem J* **342 Pt 3**, 513-518.
- Hatfield, P.M., Gosink, M.M., Carpenter, T.B., and Vierstra, R.D. (1997). The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **11**, 213-226.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**, 1-12.
- Hayashi, K., Tan, X., Zheng, N., Hatate, T., Kimura, Y., Kepinski, S., and Nozaki, H. (2008). Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5632-5637.
- Hebrard, E., Poulicard, N., Gerard, C., Traore, O., Albar, L., Fargette, D., Bessin, Y., and Vignols, F. (2010). Direct interaction between the Rice yellow mottle virus VPg and the central domain of the rice eIF(iso)4G1 factor correlates with rice susceptibility and RYMV virulence. *Mol Plant Microbe Interact*.
- Hehn, A. (1995). Les gènes 3' proximaux du RNA 2 du BNYVV : leur rôle dans la réplication et la traduction du génome viral ainsi que dans le mouvement de cellule à cellule. In *Thèse de Doctorat*. (Strasbourg: Université Louis Pasteur), pp. 211.
- Hehn, A., Fritsch, C., Richards, K.E., Guilley, H., and Jonard, G. (1997). Evidence for in vitro and in vivo autocatalytic processing of the primary translation product of beet necrotic yellow vein virus RNA 1 by a papain-like proteinase. *Arch Virol* **142**, 1051-1058.

- Hehn, A., Bouzoubaa, S., Bate, N., Twell, D., Marbach, J., Richards, K., Guilley, H., and Jonard, G.** (1995). The small cysteine-rich protein P14 of beet necrotic yellow vein virus regulates accumulation of RNA 2 in cis and coat protein in trans. *Virology* **210**, 73-81.
- Helenius, A., and Aebi, M.** (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.
- Hemsley, P.A.** (2009). Protein S-acylation in plants (Review). *Mol Membr Biol* **26**, 114-125.
- Hericourt, F., Blanc, S., Redeker, V., and Jupin, I.** (2000). Evidence for phosphorylation and ubiquitinylation of the turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase domain expressed in a baculovirus-insect cell system. *Biochem J* **349**, 417-425.
- Hermard, D.** (2006). F-box proteins: more than baits for the SCF? *Cell Div* **1**, 30.
- Hershko, A., and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
- Herskowitz, I.** (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* **329**, 219-222.
- Hicke, L.** (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 195-201.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., and Sistonen, L.** (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 45-50.
- Hleibieh, K., Peltier, C., Klein, E., Schirmer, A., Schmidlin, L., Covelli, L., Ratti, C., Legrève, A., Bragard, C., and Gilmer, D.** (2007). Étiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière. *Virologie* **11**, 409-421.
- Ho, M.S., Ou, C., Chan, Y.R., Chien, C.T., and Pi, H.** (2008). The utility F-box for protein destruction. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1977-2000.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R.** (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hochstrasser, M.** (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* **458**, 422-429.
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakakis, G., and Jentsch, S.** (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141.
- Hofius, D., Maier, A.T., Dietrich, C., Jungkunz, I., Bornke, F., Maiss, E., and Sonnewald, U.** (2007). Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for Potato virus Y infection in tobacco plants. *J Virol* **81**, 11870-11880.
- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D.I., Petersen, N.H., Mattsson, O., Jorgensen, L.B., Jones, J.D., Mundy, J., and Petersen, M.** (2009). Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in Arabidopsis. *Cell* **137**, 773-783.
- Holmberg, C.I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J.O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R.I., Eriksson, J.E., and Sistonen, L.** (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *Embo J* **20**, 3800-3810.
- Holmgren, S.K., Taylor, K.M., Bretscher, L.E., and Raines, R.T.** (1998). Code for collagen's stability deciphered. *Nature* **392**, 666-667.
- Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inze, D., Engler, G., Villarroel, R., and et al.** (1980). The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**, 212-230.
- Holt, G.D., Haltiwanger, R.S., Torres, C.R., and Hart, G.W.** (1987a). Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. *J Biol Chem* **262**, 14847-14850.
- Holt, G.D., Snow, C.M., Senior, A., Haltiwanger, R.S., Gerace, L., and Hart, G.W.** (1987b). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol* **104**, 1157-1164.
- Hu, P., Shimoji, S., and Hart, G.W.** (2010). Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. *FEBS Lett* **584**, 2526-2538.
- Huang, H., and Manton, K.G.** (2004). The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci* **9**, 1100-1117.
- Huang, H.J., Lin, Y.M., Huang, D.D., Takahashi, T., and Sugiyama, M.** (2003). Protein tyrosine phosphorylation during phytohormone-stimulated cell proliferation in Arabidopsis Hypocotyls. *Plant Cell Physiol* **44**, 770-775.
- Huang, W.H., Mai, R.T., and Lee, Y.H.** (2008). Transcription factor YY1 and its associated acetyltransferases CBP and p300 interact with hepatitis delta antigens and modulate hepatitis delta virus RNA replication. *J Virol* **82**, 7313-7324.
- Huang, Y., Staschke, K., De Francesco, R., and Tan, S.L.** (2007). Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication? *Virology* **364**, 1-9.
- Hunt, T.** (1989). Cytoplasmic anchoring proteins and the control of nuclear localization. *Cell* **59**, 949-951.
- Hunter, T.** (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
- Hunter, T.** (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* **28**, 730-738.
- Hwang, L.N., Englund, N., Das, T., Banerjee, A.K., and Pattnaik, A.K.** (1999). Optimal replication activity of vesicular stomatitis virus RNA polymerase requires phosphorylation of a residue(s) at carboxy-terminal domain II of its accessory subunit, phosphoprotein P. *J Virol* **73**, 5613-5620.
- Hwang, S.B., Park, K.J., Kim, Y.S., Sung, Y.C., and Lai, M.M.** (1997). Hepatitis C virus NS5B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization. *Virology* **227**, 439-446.
- Imaizumi, T., Schultz, T.F., Harmon, F.G., Ho, L.A., and Kay, S.A.** (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science* **309**, 293-297.
- Inglese, J., Glickman, J.F., Lorenz, W., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J.** (1992). Isoprenylation of a protein kinase. Requirement of farnesylation/alpha-carboxyl methylation for full enzymatic activity of rhodopsin kinase. *J Biol Chem* **267**, 1422-1425.

- Ito, N., Phillips, S.E., Stevens, C., Ogel, Z.B., McPherson, M.J., Keen, J.N., Yadav, K.D., and Knowles, P.F. (1991). Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase. *Nature* **350**, 87-90.
- Ivanov, K.I., Puustinen, P., Merits, A., Saarma, M., and Mäkinen, K. (2001). Phosphorylation down-regulates the RNA binding function of the coat protein of potato virus A. *J Biol Chem* **276**, 13530-13540.
- Ivanov, K.I., Puustinen, P., Gabrenaite, R., Vihinen, H., Ronnstrand, L., Valmu, L., Kalkkinen, N., and Mäkinen, K. (2003). Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell* **15**, 2124-2139.
- Iwakawa, H.O., Mizumoto, H., Nagano, H., Imoto, Y., Takigawa, K., Sarawaneeyaruk, S., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2008). A viral noncoding RNA generated by cis-element-mediated protection against 5'→3' RNA decay represses both cap-independent and cap-dependent translation. *J Virol* **82**, 10162-10174.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113-127.
- Jaeger, S., Eriani, G., and Martin, F. (2004). Results and prospects of the yeast three-hybrid system. *FEBS Lett* **556**, 7-12.
- Jakubiec, A., and Jupin, I. (2007). Regulation of positive-strand RNA virus replication: The emerging role of phosphorylation. *Virus Res.*
- Jakubiec, A., Tournier, V., Drugeon, G., Pflieger, S., Camborde, L., Vinh, J., Hericourt, F., Redeker, V., and Jupin, I. (2006). Phosphorylation of viral RNA-dependent RNA polymerase and its role in replication of a plus-strand RNA virus. *J Biol Chem* **281**, 21236-21249.
- Jans, D.A., Xiao, C.Y., and Lam, M.H. (2000). Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* **22**, 532-544.
- Jans, D.A., Ackermann, M.J., Bischoff, J.R., Beach, D.H., and Peters, R. (1991). p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins. *J Cell Biol* **115**, 1203-1212.
- Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., and Mackay, C.R. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 391-403.
- Jemc, J., and Rebay, I. (2007). The eyes absent family of phosphotyrosine phosphatases: properties and roles in developmental regulation of transcription. *Annu Rev Biochem* **76**, 513-538.
- Jenkins, C.L., Bretscher, L.E., Guzei, I.A., and Raines, R.T. (2003). Effect of 3-hydroxyproline residues on collagen stability. *J Am Chem Soc* **125**, 6422-6427.
- Jentsch, S., Seufert, W., Sommer, T., and Reins, H.A. (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* **15**, 195-198.
- Jeong, R.D., Chandra-Shekhara, A.C., Barman, S.R., Navarre, D., Klessig, D.F., Kachroo, A., and Kachroo, P. (2010). Cryptochrome 2 and phototropin 2 regulate resistance protein-mediated viral defense by negatively regulating an E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **22**, 100-110.
- Jiang, T., Zhou, X., Taghizadeh, K., Dong, M., and Dedon, P.C. (2007). N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 60-65.
- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Jin, J., Li, D., Deng, C., and Wang, T. (2007). HC-Pro protein of Potato virus Y can interact with three Arabidopsis 20S proteasome subunits in planta. *J Virol* **81**, 12881-12888.
- Jockusch, H., and Wiegand, C. (2003). Misfolded plant virus proteins: elicitors and targets of ubiquitylation. *FEBS Lett* **545**, 229-232.
- Johnson, E.S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-382.
- Johnson, L.N., and O'Reilly, M. (1996). Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 762-769.
- Johnson, L.N., and Lewis, R.J. (2001). Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* **101**, 2209-2242.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Ju, H.J., Ye, C.M., and Verchot-Lubicz, J. (2008). Mutational analysis of PVX TGBp3 links subcellular accumulation and protein turnover. *Virology* **375**, 103-117.
- Jupin, I., Guilley, H., Richards, K.E., and Jonard, G. (1992). Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *Embo J* **11**, 479-488.
- Jupin, I., Bouzoubaa, S., Richards, K., Jonard, G., and Guilley, H. (1990). Multiplication of beet necrotic yellow vein virus RNA 3 lacking a 3' poly(A) tail is accompanied by reappearance of the poly(A) tail and a novel short U-rich tract preceding it. *Virology* **178**, 281-284.
- Kachirskaia, I., Shi, X., Yamaguchi, H., Tanoue, K., Wen, H., Wang, E.W., Appella, E., and Gozani, O. (2008). Role for 53BP1 Tudor domain recognition of p53 dimethylated at lysine 382 in DNA damage signaling. *J Biol Chem* **283**, 34660-34666.
- Kaelin, W.G. (2005). Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem* **74**, 115-128.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., and Smith, A.E. (1984a). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**, 33-38.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984b). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.
- Kameyama, K., Kishi, Y., Yoshimura, M., Kanzawa, N., Sameshima, M., and Tsuchiya, T. (2000). Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* **407**, 37.
- Karger, E.M., Frolova, O.Y., Fedorova, N.V., Baratova, L.A., Ovchinnikova, T.V., Susi, P., Mäkinen, K., Ronnstrand, L., Dorokhov, Y.L., and Atabekov, J.G. (2003). Dysfunctional movement protein mutant mimicking threonine 104 phosphorylation. *J Gen Virol* **84**, 727-732.
- Karpova, O.V., Ivanov, K.I., Rodionova, N.P., Dorokhov Yu, L., and Atabekov, J.G. (1997). Nontranslatability and dissimilar behavior in plants and protoplasts of viral RNA and movement protein complexes formed in vitro. *Virology* **230**, 11-21.

- Karpova, O.V., Rodionova, N.P., Ivanov, K.I., Kozlovsky, S.V., Dorokhov, Y.L., and Atabekov, J.G. (1999). Phosphorylation of tobacco mosaic virus movement protein abolishes its translation repressing ability. *Virology* **261**, 20-24.
- Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2001). Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* **285**, 71-81.
- Katsir, L., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., and Howe, G.A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7100-7105.
- Katz, E.J., Isasa, M., and Crosas, B. (2010). A new map to understand deubiquitination. *Biochem Soc Trans* **38**, 21-28.
- Kawakami, S., Hori, K., Hosokawa, D., Okada, Y., and Watanabe, Y. (2003). Defective tobamovirus movement protein lacking wild-type phosphorylation sites can be complemented by substitutions found in revertants. *J Virol* **77**, 1452-1461.
- Kawakami, S., Padgett, H.S., Hosokawa, D., Okada, Y., Beachy, R.N., and Watanabe, Y. (1999). Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of tomato mosaic tobamovirus is essential for intracellular localization and stability in vivo. *J Virol* **73**, 6831-6840.
- Kazuhsa, K., Yoshiro, K., Masanori, Y., Nobuyuki, K., Masazumi, S., and Takahide, T. (2000). Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* **407**, 37-38.
- Kehoe, J.W., and Bertozzi, C.R. (2000). Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chem Biol* **7**, R57-61.
- Kerk, D., Templeton, G., and Moorhead, G.B. (2008). Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant Physiol* **146**, 351-367.
- Kerr, L.D., Inoue, J., Davis, N., Link, E., Baeuerle, P.A., Bose, H.R., Jr., and Verma, I.M. (1991). The rel-associated pp40 protein prevents DNA binding of Rel and NF-kappa B: relationship with I kappa B beta and regulation by phosphorylation. *Genes Dev* **5**, 1464-1476.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 159-180.
- Kim, H.S., and Delaney, T.P. (2002). Arabidopsis SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell* **14**, 1469-1482.
- Kim, S.H., Palukaitis, P., and Park, Y.I. (2002). Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex. *Embo J* **21**, 2292-2300.
- Kim, S.J., Kim, J.H., Kim, Y.G., Lim, H.S., and Oh, J.W. (2004). Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 50031-50041.
- King, R.W., Glotzer, M., and Kirschner, M.W. (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell* **7**, 1343-1357.
- Kinoshita, N., Yamano, H., Niwa, H., Yoshida, T., and Yanagida, M. (1993). Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Genes Dev* **7**, 1059-1071.
- Kipreos, E.T., and Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biol* **1**, REVIEWS3002.
- Klein, E., Link, D., Schirmer, A., Erhardt, M., and Gilmer, D. (2007). Sequence variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res* **126**, 53-61.
- Kleinow, T., Holeiter, G., Nischang, M., Stein, M., Karayavuz, M., Wege, C., and Jeske, H. (2008). Post-translational modifications of Abutilon mosaic virus movement protein (BC1) in fission yeast. *Virus Res* **131**, 86-94.
- Kleinow, T., Nischang, M., Beck, A., Kratzer, U., Tanwir, F., Preiss, W., Kepp, G., and Jeske, H. (2009). Three C-terminal phosphorylation sites in the Abutilon mosaic virus movement protein affect symptom development and viral DNA accumulation. *Virology* **390**, 89-101.
- Knockaert, M., Greengard, P., and Meijer, L. (2002). Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 417-425.
- Koenig, R. (2008). Benvirus. *Encyclopedia of virology*, (Elsevier). **Third edition**, 308-314.
- Koenig, R., Kastirr, U., Holtschulte, B., Deml, G., and Varrelmann, M. (2008). Distribution of various types and P25 subtypes of Beet necrotic yellow vein virus in Germany and other European countries. *Arch Virol* **153**, 2139-2144.
- Koenig, R., Loss, S., Specht, J., Varrelmann, M., Luddecke, P., and Deml, G. (2009). A single U/C nucleotide substitution changing alanine to valine in the beet necrotic yellow vein virus P25 protein promotes increased virus accumulation in roots of mechanically inoculated, partially resistant sugar beet seedlings. *J Gen Virol* **90**, 759-763.
- Komori, R., Amano, Y., Ogawa-Ohnishi, M., and Matsubayashi, Y. (2009). Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15067-15072.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* **19**, 1176-1179.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., and Yao, T.P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* **18**, 601-607.
- Koyuncu, O.O., and Dobner, T. (2009). Arginine methylation of human adenovirus type 5 L4 100-kilodalton protein is required for efficient virus production. *J Virol* **83**, 4778-4790.
- Kozłowska-Makulska, A., Guilley, H., Szyndel, M.S., Beuve, M., Lemaire, O., Herrbach, E., and Bouzoubaa, S. (2010). P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity. *J Gen Virol* **91**, 1082-1091.

- Kraft, E., Stone, S.L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O.S., Deng, X.W., and Callis, J.** (2005). Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**, 1597-1611.
- Krebs, E.G., and Fischer, E.H.** (1964). Phosphorylase and Related Enzymes of Glycogen Metabolism. *Vitam Horm* **22**, 399-410.
- Krishna, R.G., and Wold, F.** (1993). Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **67**, 265-298.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M.** (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* **242**, 540-547.
- Kurepa, J., and Smalle, J.A.** (2008). Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* **90**, 324-335.
- Kurepa, J., Walker, J.M., Smalle, J., Gosink, M.M., Davis, S.J., Durham, T.L., Sung, D.Y., and Vierstra, R.D.** (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem* **278**, 6862-6872.
- Laczy, B., Hill, B.G., Wang, K., Paterson, A.J., White, C.R., Xing, D., Chen, Y.F., Darley-Usmar, V., Oparil, S., and Chatham, J.C.** (2009). Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**, H13-28.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lageix, S., Catrice, O., Deragon, J.M., Gronenborn, B., Pelissier, T., and Ramirez, B.C.** (2007). The nanovirus-encoded Clink protein affects plant cell cycle regulation through interaction with the retinoblastoma-related protein. *J Virol* **81**, 4177-4185.
- Lai, J., Chen, H., Teng, K., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., Liang, L., Xia, R., Wu, Y., Guo, H., and Xie, Q.** (2009). RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. *Plant J* **57**, 905-917.
- 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 Burgyn, J.** (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *Embo J* **25**, 2768-2780.
- Lake, M.W., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V., and Schindelin, H.** (2001). Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. *Nature* **414**, 325-329.
- Lanfermeijer, F.C., Dijkhuis, J., Sturre, M.J., de Haan, P., and Hille, J.** (2003). Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-2(2) from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol Biol* **52**, 1037-1049.
- Lauber, E., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., and Gilmer, D.** (1997). Conformation of the 3'-end of beet necrotic yellow vein benevirus RNA 3 analysed by chemical and enzymatic probing and mutagenesis. *Nucleic Acids Res* **25**, 4723-4729.
- Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K.E., and Jonard, G.** (1998a). Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in Beta macrocarpa is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J Gen Virol* **79**, 385-393.
- Lauber, E., Bleykasten-Grosshans, C., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Jonard, G., Richards, K.E., and Guilley, H.** (1998b). Cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus: I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 618-625.
- Lauber, E., Janssens, L., Weyens, G., Jonard, G., Richards, K.E., Lefebvre, M., and Guilley, H.** (2001). Rapid screening for dominant negative mutations in the beet necrotic yellow vein virus triple gene block proteins P13 and P15 using a viral replicon. *Transgenic Res* **10**, 293-302.
- Lawrence, C.L., Jones, N., and Wilkinson, C.R.** (2009). Stress-Induced Phosphorylation of *S. pombe* Atf1 Abrogates Its Interaction with F Box Protein Fbh1. *Curr Biol*.
- Lawrence, D.S., and Niu, J.** (1998). Protein kinase inhibitors: the tyrosine-specific protein kinases. *Pharmacol Ther* **77**, 81-114.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., and Genschik, P.** (2006). F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 631-638.
- Lechner, E., Xie, D., Grava, S., Pigaglio, E., Planchais, S., Murray, J.A., Parmentier, Y., Mutterer, J., Dubreucq, B., Shen, W.H., and Genschik, P.** (2002). The AtRbx1 protein is part of plant SCF complexes, and its down-regulation causes severe growth and developmental defects. *J Biol Chem* **277**, 50069-50080.
- Lee, D.C., and Jia, Z.** (2009). Emerging structural insights into bacterial tyrosine kinases. *Trends Biochem Sci* **34**, 351-357.
- Lefebvre, T., Dehennaut, V., Guinez, C., Olivier, S., Drougat, L., Mir, A.M., Mortuaire, M., Vercoutter-Edouart, A.S., and Michalski, J.C.** (2010). Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 67-79.
- Lehti-Shiu, M.D., Zou, C., Hanada, K., and Shiu, S.H.** (2009). Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiol* **150**, 12-26.
- Lenard, J.** (1999). Host cell protein kinases in nonsegmented negative-strand virus (mononegavirales) infection. *Pharmacol Ther* **83**, 39-48.
- Lennefors, B.** (2006). dsRNA-mediated resistance to Beet necrotic yellow vein virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L.ssp.vulgaris). *Mol. Breeding* **18**, 313-325.

- Lerouge, P., Fichette-Laine, A.C., Chekkafi, A., Avidgor, V., and Faye, L. (1996). N-linked oligosaccharide processing is not necessary for glycoprotein secretion in plants. *Plant J* **10**, 713-719.
- Leverson, J.D., Joazeiro, C.A., Page, A.M., Huang, H., Hieter, P., and Hunter, T. (2000). The APC11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. *Mol Biol Cell* **11**, 2315-2325.
- Li, F., and Ding, S.W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* **60**, 503-531.
- Li, S. (2005). Src kinases as targets for B cell acute lymphoblastic leukaemia therapy. *Expert Opin Ther Targets* **9**, 329-341.
- Li, X., Oghi, K.A., Zhang, J., Krones, A., Bush, K.T., Glass, C.K., Nigam, S.K., Aggarwal, A.K., Maas, R., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (2003). Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* **426**, 247-254.
- Li, Y., Gazdoui, S., Pan, Z.Q., and Fuchs, S.Y. (2004a). Stability of homologue of Slimb F-box protein is regulated by availability of its substrate. *J Biol Chem* **279**, 11074-11080.
- Li, Y.J., Stallcup, M.R., and Lai, M.M. (2004b). Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication. *J Virol* **78**, 13325-13334.
- Li, Z., Barajas, D., Panavas, T., Herbst, D.A., and Nagy, P.D. (2008). Cdc34p ubiquitin-conjugating enzyme is a component of the tombusvirus replicase complex and ubiquitinates p33 replication protein. *J Virol* **82**, 6911-6926.
- Link, D., Schmidlin, L., Schirmer, A., Klein, E., Erhardt, M., Geldreich, A., Lemaire, and Gilmer, D. (2005). Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *J Gen Virol* **86**, 2115-2125.
- Lis, H., and Sharon, N. (1993). Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* **218**, 1-27.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., and Dinesh-Kumar, S.P. (2002a). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* **30**, 415-429.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.W., and Dinesh-Kumar, S.P. (2002b). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1483-1496.
- Lobo, S., Greentree, W.K., Linder, M.E., and Deschenes, R.J. (2002). Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 41268-41273.
- Lohrmann, J., and Harter, K. (2002). Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol* **128**, 363-369.
- Lois, L.M. (2010). Diversity of the SUMOylation machinery in plants. *Biochem Soc Trans* **38**, 60-64.
- Lou, Y.C., Huang, Y.C., Pan, Y.R., Chen, C., and Liao, Y.D. (2006). Roles of N-terminal pyroglutamate in maintaining structural integrity and pKa values of catalytic histidine residues in bullfrog ribonuclease 3. *J Mol Biol* **355**, 409-421.
- Lowenson, J.D., and Clarke, S. (1991). Spontaneous degradation and enzymatic repair of aspartyl and asparaginyl residues in aging red cell proteins analyzed by computer simulation. *Gerontology* **37**, 128-151.
- Lozano, I., and Morales, F. (2009). Molecular characterisation of Rice stripe necrosis virus as a new species of the genus Benyvirus. *European Journal of Plant Pathology* **124**, 673-680.
- Luan, S. (2003). Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 63-92.
- Luo, J., Li, M., Tang, Y., Laszkowska, M., Roeder, G.R., and Gu, W. (2004). Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *PNAS* **101**, 2259-2264.
- MacBeth, K.J., and Patterson, J.L. (1995a). Single-site cleavage in the 5'-untranslated region of Leishmanivirus RNA is mediated by the viral capsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8994-8998.
- MacBeth, K.J., and Patterson, J.L. (1995b). The short transcript of Leishmania RNA virus is generated by RNA cleavage. *J Virol* **69**, 3458-3464.
- Macek, B., Gnad, F., Soufi, B., Kumar, C., Olsen, J.V., Mijakovic, I., and Mann, M. (2008). Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* **7**, 299-307.
- Mahajan, R., Gerace, L., and Melchior, F. (1998). Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol* **140**, 259-270.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97-107.
- Manchado, E., Eguren, M., and Malumbres, M. (2010). The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochem Soc Trans* **38**, 65-71.
- Mann, M., and Jensen, O.N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**, 255-261.
- Mannerlof, M., Lennerfors, B.L., and Tenning, P. (1996). Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. *Euphytica* **90**, 293-299.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **27**, 514-520.
- Marchal, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Urban-Grimal, D. (1998). A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol Cell Biol* **18**, 314-321.
- Mariano, A.C., Andrade, M.O., Santos, A.A., Carolino, S.M., Oliveira, M.L., Baracat-Pereira, M.C., Brommonshenkel, S.H., and Fontes, E.P. (2004). Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology* **318**, 24-31.

- Marrocco, K., Lecureuil, A., Nicolas, P., and Guerche, P.** (2003). The Arabidopsis SKP1-like genes present a spectrum of expression profiles. *Plant Mol Biol* **52**, 715-727.
- Martinez-Izquierdo, J., and Hohn, T.** (1987). Cauliflower mosaic virus coat protein is phosphorylated in vitro by a virion-associated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1824-1828.
- Mateyak, M.K., and Kinzy, T.G.** (2010). eEF1A: thinking outside the ribosome. *J Biol Chem* **285**, 21209-21213.
- Matsuoka, K., Bassham, D.C., Raikhel, N.V., and Nakamura, K.** (1995). Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol* **130**, 1307-1318.
- Matsushita, Y., Hanazawa, K., Yoshioka, K., Oguchi, T., Kawakami, S., Watanabe, Y., Nishiguchi, M., and Nyunoya, H.** (2000). In vitro phosphorylation of the movement protein of tomato mosaic tobamovirus by a cellular kinase. *J Gen Virol* **81**, 2095-2102.
- Matthias, P., Yoshida, M., and Khochbin, S.** (2008). HDAC6 a new cellular stress surveillance factor. *Cell Cycle* **7**, 7-10.
- Matunis, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G.** (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**, 1457-1470.
- Maurer-Stroh, S., and Eisenhaber, F.** (2004). Myristoylation of viral and bacterial proteins. *Trends Microbiol* **12**, 178-185.
- Maurer-Stroh, S., and Eisenhaber, F.** (2005). Refinement and prediction of protein prenylation motifs. *Genome Biol* **6**, R55.
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., and Eisenhaber, F.** (2002). N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol* **317**, 541-557.
- Mazzucotelli, E., Belloni, S., Marone, D., De Leonardis, A., Guerra, D., Di Fonzo, N., Cattivelli, L., and Mastrangelo, A.** (2006). The e3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation. *Curr Genomics* **7**, 509-522.
- McClellan, A.J., Tam, S., Kaganovich, D., and Frydman, J.** (2005). Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol* **7**, 736-741.
- McGarry, R.C., Barron, Y.D., Carvalho, M.F., Hill, J.E., Gold, D., Cheung, E., Kraus, W.L., and Lazarowitz, S.G.** (2003). A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell* **15**, 1605-1618.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D.** (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* **80**, 5747-5756.
- Merkle, T.** (2001). Nuclear import and export of proteins in plants: a tool for the regulation of signalling. *Planta* **213**, 499-517.
- Merkle, T., Leclerc, D., Marshallsay, C., and Nagy, F.** (1996). A plant in vitro system for the nuclear import of proteins. *Plant J* **10**, 1177-1186.
- Miura, K., and Hasegawa, P.M.** (2010). Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. *Trends Cell Biol* **20**, 223-232.
- Miura, K., Jin, J.B., and Hasegawa, P.M.** (2007). Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 495-502.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., and Shinozaki, K.** (1997). Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol* **15**, 15-19.
- Modena, N.A., Zelada, A.M., Conte, F., and Mentaberry, A.** (2008). Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of Potato virus X by a *Nicotiana tabacum* CK2-like activity. *Virus Res* **137**, 16-23.
- Mohr, I.** (2006). Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res* **119**, 89-99.
- Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H., and Nasmyth, K.** (1991). The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SW15. *Cell* **66**, 743-758.
- 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**, 128-141.
- Moon, J., Parry, G., and Estelle, M.** (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* **16**, 3181-3195.
- Moore, K.L.** (2003). The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *J Biol Chem* **278**, 24243-24246.
- Moorhead, G.B., De Wever, V., Templeton, G., and Kerk, D.** (2009). Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J* **417**, 401-409.
- Morris, J.R., and Solomon, E.** (2004). BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* **13**, 807-817.
- Mowen, K.A., and David, M.** (2001). Analysis of protein arginine methylation and protein arginine-methyltransferase activity. *Sci STKE* **2001**, pl1.
- Mowen, K.A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B.T., Shuai, K., Herschman, H.R., and David, M.** (2001). Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell* **104**, 731-741.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H.L., Goldsmith, E.J., and Orth, K.** (2006). *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**, 1211-1214.
- Mukherji, M.** (2005). Phosphoproteomics in analyzing signaling pathways. *Expert Rev Proteomics* **2**, 117-128.

- Mukhopadhyay, D., and Dasso, M.** (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci* **32**, 286-295.
- Muller, S., Ledl, A., and Schmidt, D.** (2004). SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* **23**, 1998-2008.
- Mundy, J., and Schneitz, K.** (2002). Protein phosphorylation in and around signal transduction. *Trends Plant Sci* **7**, 54-55.
- Muratani, M., and Tansey, W.P.** (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 192-201.
- Murray, V.** (1989). Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **17**, 8889.
- Murtas, G., Reeves, P.H., Fu, Y.F., Bancroft, I., Dean, C., and Coupland, G.** (2003). A nuclear protease required for flowering-time regulation in Arabidopsis reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates. *Plant Cell* **15**, 2308-2319.
- Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S.** (1992). Tobacco BY-2 cell line as the "Hela" cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology* **132**, 1-30.
- Naidu, R.A., Ingle, C.J., Deom, C.M., and Sherwood, J.L.** (2004). The two envelope membrane glycoproteins of Tomato spotted wilt virus show differences in lectin-binding properties and sensitivities to glycosidases. *Virology* **319**, 107-117.
- Najjar, I., and Fagard, R.** (2010). STAT1 and pathogens, not a friendly relationship. *Biochimie* **92**, 425-444.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y.** (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 458-467.
- Narayanan, A., and Jacobson, M.P.** (2009). Computational studies of protein regulation by post-translational phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol*.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A., and Bartel, B.** (2000). FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in Arabidopsis. *Cell* **101**, 331-340.
- Neumann, M., Afonina, E., Ceccherini-Silberstein, F., Schlicht, S., Erfle, V., Pavlakis, G.N., and Brack-Werner, R.** (2001). Nucleocytoplasmic transport in human astrocytes: decreased nuclear uptake of the HIV Rev shuttle protein. *J Cell Sci* **114**, 1717-1729.
- Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R.T., Katagiri, F., and Dangl, J.L.** (2000). Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* **101**, 353-363.
- Nishimura, M.T., and Dangl, J.L.** (2010). Arabidopsis and the plant immune system. *Plant J* **61**, 1053-1066.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G.** (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* **15**, 661-675.
- Ohi, M.D., Vander Kooi, C.W., Rosenberg, J.A., Chazin, W.J., and Gould, K.L.** (2003). Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol* **10**, 250-255.
- Okamura, H., Aramburu, J., Garcia-Rodriguez, C., Viola, J.P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P.G., and Rao, A.** (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* **6**, 539-550.
- Olsen, H.B., and Kaarsholm, N.C.** (2000). Structural effects of protein lipidation as revealed by LysB29-myristoyl, des(B30) insulin. *Biochemistry* **39**, 11893-11900.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M.** (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648.
- Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O., and Hartweck, L.M.** (2010). O-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 49-56.
- Orlowski, M., and Wilk, S.** (2003). Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* **415**, 1-5.
- Ozcan, S., Andrali, S.S., and Cantrell, J.E.** (2010). Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 353-364.
- Panavas, T., Serviène, E., Brasher, J., and Nagy, P.D.** (2005). Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7326-7331.
- Park, S.W., Vepachedu, R., Owens, R.A., and Vivanco, J.M.** (2004). The N-glycosidase activity of the ribosome-inactivating protein ME1 targets single-stranded regions of nucleic acids independent of sequence or structural motifs. *J Biol Chem* **279**, 34165-34174.
- Partridge, J., Shannon, L., Gumpf, D., and Colbaugh, P.** (1974). Glycoprotein in the capsid of plant viruses as possible determinant of seed transmissibility. *Nature* **247**, 391-392.
- Passmore, L.A., and Barford, D.** (2004). Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* **379**, 513-525.
- Pathak, H.B., Arnold, J.J., Wiegand, P.N., Hargittai, M.R., and Cameron, C.E.** (2007). Picornavirus genome replication: assembly and organization of the VPg uridylylation ribonucleoprotein (initiation) complex. *J Biol Chem* **282**, 16202-16213.
- Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M., and Daly, R.J.** (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* **418**, 475-489.
- Pattnaik, A.K., Hwang, L., Li, T., Englund, N., Mathur, M., Das, T., and Banerjee, A.K.** (1997). Phosphorylation within the amino-terminal acidic domain I of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is required for transcription but not for replication. *J Virol* **71**, 8167-8175.

- Paul, A.V., van Boom, J.H., Filippov, D., and Wimmer, E.** (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**, 280-284.
- Paul, A.V., Rieder, E., Kim, D.W., van Boom, J.H., and Wimmer, E.** (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* **74**, 10359-10370.
- Pawson, T., and Scott, J.D.** (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**, 2075-2080.
- Pawson, T., and Scott, J.D.** (2005). Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* **30**, 286-290.
- 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**, 1994-1999.
- Peart, J.R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D.C., Schauser, L., Jaggard, D.A., Xiao, S., Coleman, M.J., Dow, M., Jones, J.D., Shirasu, K., and Baulcombe, D.C.** (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10865-10869.
- Peltier, C.** (2010). Etude du rôle de la protéine p25 et des séquences non codantes de l'ARN-3 du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave dans la pathogénicité virale. In *Thèse de Doctorat*. (Strasbourg: Uds), pp. 201.
- Peltier, C., Hleibieh, K., Thiel, H., Klein, E., Bragard, C., and Gilmer, D.** (2008). Molecular Biology of the Beet necrotic yellow vein virus. *Plant Viruses* **2**, 14-24.
- Peltier, C., Schmidlin, L., Klein, E., Tacconnat, L., Prinsen, E., Erhardt, M., Heintz, D., Weyens, G., Lefebvre, M., Renou, J.P., and Gilmer, D.** (2010). Expression of the Beet necrotic yellow vein virus p25 protein induces hormonal changes and a root branching phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Res.*
- Pereira-Leal, J.B., Hume, A.N., and Seabra, M.C.** (2001). Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. *FEBS Lett* **498**, 197-200.
- Peters, J.M.** (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-656.
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K.E., Jonard, G., and Ziegler-Graff, V.** (2002). P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* **76**, 6815-6824.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, 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**, 734-736.
- Pickart, C.M.** (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-533.
- Pickart, C.M., and Fushman, D.** (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 610-616.
- Pierrat, O.A., Mikitova, V., Bush, M.S., Browning, K.S., and Doonan, J.H.** (2007). Control of protein translation by phosphorylation of the mRNA 5'-cap-binding complex. *Biochem Soc Trans* **35**, 1634-1637.
- Pike, A.C., Rellos, P., Niesen, F.H., Turnbull, A., Oliver, A.W., Parker, S.A., Turk, B.E., Pearl, L.H., and Knapp, S.** (2008). Activation segment dimerization: a mechanism for kinase autophosphorylation of non-consensus sites. *Embo J* **27**, 704-714.
- Piron, F., Nicolai, M., Minoia, S., Piednoir, E., Moretti, A., Salgues, A., Zamir, D., Caranta, C., and Bendahmane, A.** (2010). An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS One* **5**, e11313.
- Podell, S., and Gribskov, M.** (2004). Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC Genomics* **5**, 37.
- Polevoda, B., and Sherman, F.** (2002). The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol* **3**, reviews0006.
- Polevoda, B., and Sherman, F.** (2003). N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol* **325**, 595-622.
- Pollini, C.P., Masia, A., and Giunchedi, L.** (1990). Free indole-3-acetic acid in sugar-beet root of rhizomania-susceptible and moderately resistant cultivars. *Phytopath. Medit.* **29**, 191-195.
- Popov, K.M., Kedishvili, N.Y., Zhao, Y., Shimomura, Y., Crabb, D.W., and Harris, R.A.** (1993). Primary structure of pyruvate dehydrogenase kinase establishes a new family of eukaryotic protein kinases. *J Biol Chem* **268**, 26602-26606.
- Porat, R., Lu, P., and O'Neill, S.D.** (1998). *Arabidopsis* SKP1, a homologue of a cell cycle regulator gene, is predominantly expressed in meristematic cells. *Planta* **204**, 345-351.
- Prag, S., and Adams, J.C.** (2003). Molecular phylogeny of the kelch-repeat superfamily reveals an expansion of BTB/kelch proteins in animals. *BMC Bioinformatics* **4**, 42.
- Prins, M., Lohuis, D., Schots, A., and Goldbach, R.** (2005). Phage display-selected single-chain antibodies confer high levels of resistance against Tomato spotted wilt virus. *J Gen Virol* **86**, 2107-2113.
- Przywiecki, C.T., Stagers, J.E., Ramjit, H.G., Musson, D.G., Stern, A.M., Bennett, C.D., and Friedman, P.A.** (1987). Occurrence of beta-hydroxylated asparagine residues in non-vitamin K-dependent proteins containing epidermal growth factor-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7856-7860.
- Puustinen, P., and Makinen, K.** (2004). Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J Biol Chem* **279**, 38103-38110.
- 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**, 1008-1012.
- 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.

- Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G., and Richards, K. (1989). In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* **172**, 293-301.
- Rajala, R.V. (2005). How does the biological function of N-myristoylation differ from that of N-palmitoylation? *IUBMB Life* **57**, 597-598.
- Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G., and Somerville, S. (2005). Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol* **138**, 1027-1036.
- Rape, M., and Jentsch, S. (2004). Productive RUPTure: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 209-213.
- Ratti, C., Hleibieh, K., Bianchi, L., Schirmer, A., Autonell, C.R., and Gilmer, D. (2009). Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in *Beta macrocarpa*. *Virology* **385**, 392-399.
- Reichel, C., and Beachy, R.N. (2000). Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J Virol* **74**, 3330-3337.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., and Maule, A.J. (1999). New Advances in Understanding the Molecular Biology of Plant/Potyvirus Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 367-376.
- Rhee, Y., Gurel, F., Gafni, Y., Dingwall, C., and Citovsky, V. (2000). A genetic system for detection of protein nuclear import and export. *Nat Biotechnol* **18**, 433-437.
- Ribet, D., and Cossart, P. (2010). Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. *FEBS Lett* **584**, 2748-2758.
- Rigden, D.J. (2008). The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *Biochem J* **409**, 333-348.
- Risseuw, E.P., Daskalchuk, T.E., Banks, T.W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D.E., and Crosby, W.L. (2003). Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. *Plant J* **34**, 753-767.
- Rivers, J., McDonald, L., Edwards, I.J., and Beynon, R.J. (2008). Asparagine deamidation and the role of higher order protein structure. *J Proteome Res* **7**, 921-927.
- Robaglia, C., and Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci* **11**, 40-45.
- Robinson, A.B., and Robinson, L.R. (1991). Distribution of glutamine and asparagine residues and their near neighbors in peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8880-8884.
- Robinson, N.E., and Robinson, A.B. (2001). Molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 944-949.
- Robinson, N.E., Robinson, A.B., and Merrifield, R.B. (2001). Mass spectrometric evaluation of synthetic peptides as primary structure models for peptide and protein deamidation. *J Pept Res* **57**, 483-493.
- Rodriguez, M.C., Petersen, M., and Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 621-649.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-242.
- Roth, A.F., Feng, Y., Chen, L., and Davis, N.G. (2002). The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *J Cell Biol* **159**, 23-28.
- Roth, S., Stein, D., and Nusslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* **59**, 1189-1202.
- Rudd, P.M., Wormald, M.R., and Dwek, R.A. (2004). Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. *Trends Biotechnol* **22**, 524-530.
- Rush, C.M. (2003). Ecology and epidemiology of benyviruses and plasmodiophorid vectors. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 567-592.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., and Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**, 563-564.
- Saito, T., Yamanaka, K., and Okada, Y. (1990). Long-distance movement and viral assembly of tobacco mosaic virus mutants. *Virology* **176**, 329-336.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Santner, A., and Estelle, M. (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J* **61**, 1029-1040.
- Saracco, S.A., Miller, M.J., Kurepa, J., and Vierstra, R.D. (2007). Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol* **145**, 119-134.
- Sarnovsky, R., Rea, J., Makowski, M., Hertle, R., Kelly, C., Antignani, A., Pastrana, D.V., and Fitzgerald, D.J. (2009). Proteolytic cleavage of a C-terminal prosequence, leading to autoprocessing at the N Terminus, activates leucine aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **284**, 10243-10253.
- Saurin, A.T., Brownlow, N., and Parker, P.J. (2009). Protein kinase C epsilon in cell division: control of abscission. *Cell Cycle* **8**, 549-555.
- Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J.M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**, 81-83.
- Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., Bragard, C., Gilmer, D., and Lemaire, O. (2005). Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J Gen Virol* **86**, 2897-2911.
- Schlesinger, M.J., and Bond, U. (1987). Ubiquitin genes. *Oxf Surv Eukaryot Genes* **4**, 77-91.

- Schlesinger, M.J., Veit, M., and Schmidt, M.F.G.** (1993). Palmitoylation of cellular and viral proteins. "Lipid Modifications of Proteins", ed. M.J. Schlesinger, Boca Raton: CRC Press, 2-19.
- Schlossmann, J., and Desch, M.** (2009). cGK substrates. *Handb Exp Pharmacol* **191**, 163-193.
- Schmidlin, L., Link, D., Mutterer, J., Guilley, H., and Gilmer, D.** (2005). Use of a Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *J Gen Virol* **86**, 463-467.
- Schmidt, G., Sehr, P., Wilm, M., Selzer, J., Mann, M., and Aktories, K.** (1997). Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* **387**, 725-729.
- Schmidt, M.F.** (1982). Acylation of viral spike glycoproteins: a feature of enveloped RNA viruses. *Virology* **116**, 327-338.
- Schmidt, M.F., and Schlesinger, M.J.** (1979). Fatty acid binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein: a new type of post-translational modification of the viral glycoprotein. *Cell* **17**, 813-819.
- Schnell, J.D., and Hicke, L.** (2003). Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **278**, 35857-35860.
- Scholten, O.E., and Lange, W.** (2000). Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: a review. *Euphytica* **112**, 219-231.
- Scholten, O.E., Paul, H., Peters, D., Van Lent, J.W., and Goldbach, R.W.** (1994). In situ localisation of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. *Arch Virol* **136**, 349-361.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B., and Jackson, A.O.** (1995a). Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell* **7**, 1157-1172.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B., Kikkert, M., and Jackson, A.O.** (1995b). 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**, 425-438.
- Schoneich, C.** (2000). Mechanisms of metal-catalyzed oxidation of histidine to 2-oxo-histidine in peptides and proteins. *J Pharm Biomed Anal* **21**, 1093-1097.
- Schrammeijer, B., Risseuw, E., Pansegrau, W., Regensburg-Tuink, T.J., Crosby, W.L., and Hooykaas, P.J.** (2001). Interaction of the virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein. *Curr Biol* **11**, 258-262.
- Schwager, K.M., Calderon-Villalobos, L.I., Dohmann, E.M., Willige, B.C., Knierer, S., Nill, C., and Schwechheimer, C.** (2007). Characterization of the VIER F-BOX PROTEINE genes from *Arabidopsis* reveals their importance for plant growth and development. *Plant Cell* **19**, 1163-1178.
- Schwessinger, B., and Zipfel, C.** (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 389-395.
- Sebti, S.M.** (2005). Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy. *Cancer Cell* **7**, 297-300.
- Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.M., and Pawson, T.** (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 473-483.
- Selvarajah, J., and Moumen, A.** (2010). Role of ubiquitination in the DNA damage response: proteomic analysis to identify new DNA-damage-induced ubiquitinated proteins. *Biochem Soc Trans* **38**, 87-91.
- Sengupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., and Wickens, M.** (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8496-8501.
- Seol, J.H., Feldman, R.M., Zachariae, W., Shevchenko, A., Correll, C.C., Lyapina, S., Chi, Y., Galova, M., Claypool, J., Sandmeyer, S., Nasmyth, K., and Deshaies, R.J.** (1999). Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev* **13**, 1614-1626.
- Shahinian, S., and Silviu, J.R.** (1995). Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry* **34**, 3813-3822.
- Shan, L., Thara, V.K., Martin, G.B., Zhou, J.M., and Tang, X.** (2000). The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell* **12**, 2323-2338.
- Shapka, N., Stork, J., and Nagy, P.D.** (2005). Phosphorylation of the p33 replication protein of Cucumber necrosis tomosvirus adjacent to the RNA binding site affects viral RNA replication. *Virology* **343**, 65-78.
- Shen, W.H., Parmentier, Y., Hellmann, H., Lechner, E., Dong, A., Masson, J., Granier, F., Lepiniec, L., Estelle, M., and Genschik, P.** (2002). Null mutation of AtCUL1 causes arrest in early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell* **13**, 1916-1928.
- Shi, C.S., and Kehrl, J.H.** (2003). Tumor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase-related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). *J Biol Chem* **278**, 15429-15434.
- Shi, F., Perez, E., Wang, T., Peitz, B., and Lapolt, P.S.** (2005). Stage- and cell-specific expression of soluble guanylyl cyclase alpha and beta subunits, cGMP-dependent protein kinase I alpha and beta, and cyclic nucleotide-gated channel subunit 1 in the rat testis. *J Androl* **26**, 258-263.
- Shiraishi, T., Misumi, S., Takama, M., Takahashi, I., and Shoji, S.** (2001). Myristoylation of human immunodeficiency virus type 1 gag protein is required for efficient env protein transportation to the surface of cells. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 1201-1205.
- Shirako, Y., Suzuki, N., and French, R.C.** (2000). Similarity and divergence among viruses in the genus Furovirus. *Virology* **270**, 201-207.
- Shiu, S.H., and Bleecker, A.B.** (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10763-10768.

- Slawson, C., and Hart, G.W.** (2003). Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 631-636.
- Sleat, D.E., Gallie, D.R., Jefferson, R.A., Bevan, M.W., Turner, P.C., and Wilson, T.M.** (1987). Characterisation of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation in vitro. *Gene* **60**, 217-225.
- Smalle, J., and Vierstra, R.D.** (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 555-590.
- Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A., and Dougherty, W.G.** (1994). Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* **6**, 1441-1453.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., and Hood, L.E.** (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., and Waterhouse, P.M.** (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319-320.
- Sokolova, M., Pruffer, D., Tacke, E., and Rohde, W.** (1997). The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett* **400**, 201-205.
- Somers, D.E., Kim, W.Y., and Geng, R.** (2004). The F-box protein ZEITLUPE confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell* **16**, 769-782.
- Soosaar, J.L., Burch-Smith, T.M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat Rev Microbiol* **3**, 789-798.
- Sorek, N., Poraty, L., Sternberg, H., Bar, E., Lewinsohn, E., and Yalovsky, S.** (2007). Activation status-coupled transient S acylation determines membrane partitioning of a plant Rho-related GTPase. *Mol Cell Biol* **27**, 2144-2154.
- Soufi, B., Gnad, F., Jensen, P.R., Petranovic, D., Mann, M., Mijakovic, I., and Macek, B.** (2008). The Ser/Thr/Tyr phosphoproteome of *Lactococcus lactis* IL1403 reveals multiply phosphorylated proteins. *Proteomics* **8**, 3486-3493.
- Spickett, C.M., and Pitt, A.R.** (2010). Protein oxidation: role in signalling and detection by mass spectrometry. *Amino Acids*.
- Springael, J.Y., Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., and Andre, B.** (1999). NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J Cell Sci* **112** (Pt 9), 1375-1383.
- Stadtman, E.R., Moskovitz, J., and Levine, R.L.** (2003). Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal* **5**, 577-582.
- Starczynowski, D.T., Reynolds, J.G., and Gilmore, T.D.** (2005). Mutations of tumor necrosis factor alpha-responsive serine residues within the C-terminal transactivation domain of human transcription factor REL enhance its in vitro transforming ability. *Oncogene* **24**, 7355-7368.
- Starheim, K.K., Gromyko, D., Velde, R., Varhaug, J.E., and Arnesen, T.** (2009a). Composition and biological significance of the human Nalpha-terminal acetyltransferases. *BMC Proc* **3 Suppl 6**, S3.
- Starheim, K.K., Gromyko, D., Evjenth, R., Rynningen, A., Varhaug, J.E., Lillehaug, J.R., and Arnesen, T.** (2009b). Knockdown of human N alpha-terminal acetyltransferase complex C leads to p53-dependent apoptosis and aberrant human Arl8b localization. *Mol Cell Biol* **29**, 3569-3581.
- Stauber, R.H., Afonina, E., Gulnik, S., Erickson, J., and Pavlakis, G.N.** (1998). Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells. *Virology* **251**, 38-48.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N.** (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215.
- Stock, J.** (1999). Signal transduction: Gyating protein kinases. *Curr Biol* **9**, R364-367.
- Stone, J.M., and Walker, J.C.** (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol* **108**, 451-457.
- Stone, S.L., Hauksdottir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E., and Callis, J.** (2005). Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**, 13-30.
- Stork, J., Panaviene, Z., and Nagy, P.D.** (2005). Inhibition of in vitro RNA binding and replicase activity by phosphorylation of the p33 replication protein of Cucumber necrosis tomosvirus. *Virology* **343**, 79-92.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
- Stulemeijer, I.J., and Joosten, M.H.** (2008). Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. *Mol Plant Pathol* **9**, 545-560.
- Stulke, J.** (2010). More than just activity control: phosphorylation may control all aspects of a protein's properties. *Mol Microbiol* **77**, 273-275.
- Sullivan, J.A., Shirasu, K., and Deng, X.W.** (2003). The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat Rev Genet* **4**, 948-958.
- Sullivan, M.L., and Vierstra, R.D.** (1991). Cloning of a 16-kDa ubiquitin carrier protein from wheat and *Arabidopsis thaliana*. Identification of functional domains by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem* **266**, 23878-23885.
- Sun, L., and Chen, Z.J.** (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 119-126.
- Sun, W., and Gong, Z.X.** (1988). In vitro studies on the nucleocapsid-associated RNA polymerase of wheat rosette stunt virus. *Intervirology* **29**, 154-161.

- Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., and White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73-77.
- Sun, Y., Zhou, X., and Ma, H. (2007). Genome-wide Analysis of Kelch Repeat-containing F-box Family. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 940-952.
- Swanson, R.V., Alex, L.A., and Simon, M.I. (1994). Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci* **19**, 485-490.
- Swulius, M.T., and Waxham, M.N. (2008). Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2637-2657.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., and Van den Ackerveken, G. (2001). Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* **26**, 523-534.
- Takahashi, N., Kuroda, H., Kuromori, T., Hirayama, T., Seki, M., Shinozaki, K., Shimada, H., and Matsui, M. (2004). Expression and interaction analysis of Arabidopsis Skp1-related genes. *Plant Cell Physiol* **45**, 83-91.
- Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T., and Saito, M. (1999). RNA 3 Deletion Mutants of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Do Not Cause Rhizomania Disease in Sugar Beets. *Phytopathology* **89**, 1000-1006.
- Tan, L., Leykam, J.F., and Kieliszewski, M.J. (2003). Glycosylation motifs that direct arabinogalactan addition to arabinogalactan-proteins. *Plant Physiol* **132**, 1362-1369.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., and Zheng, N. (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 640-645.
- Tanaka, T., Saha, S.K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M.B., Yamazaki, T., Ono, A.M., Kainosho, M., Inouye, M., and Ikura, M. (1998). NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* **396**, 88-92.
- Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Ozkan, E., Hakala, K., Deisenhofer, J., and Yu, H. (2001). APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell* **12**, 3839-3851.
- Taylor, S.S., Radzio-Andzelm, E., and Hunter, T. (1995). How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *Faseb J* **9**, 1255-1266.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.L., and Sheen, J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 392-400.
- Thara, V.K., Seilaniantz, A.R., Deng, Y., Dong, Y., Yang, Y., Tang, X., and Zhou, J.M. (2004). Tobacco genes induced by the bacterial effector protein AvrPto. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 1139-1145.
- Thatcher, L.F., Anderson, J.P., and Singh, K.B. (2005). Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis? *Functional Plant Biology* **32**, 1-19.
- Thelen, J.J., Muszynski, M.G., Miernyk, J.A., and Randall, D.D. (1998). Molecular analysis of two pyruvate dehydrogenase kinases from maize. *J Biol Chem* **273**, 26618-26623.
- Thiel, H., and Varrelmann, M. (2009). Identification of Beet necrotic yellow vein virus P25 pathogenicity factor-interacting sugar beet proteins that represent putative virus targets or components of plant resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 999-1010.
- Thomann, A., Brukhin, V., Dieterle, M., Gheyeselink, J., Vantard, M., Grossniklaus, U., and Genschik, P. (2005). Arabidopsis CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *Plant J* **43**, 437-448.
- Thompson, J.R., Buratti, E., de Wispelaere, M., and Tepfer, M. (2008). Structural and functional characterization of the 5' region of subgenomic RNA5 of cucumber mosaic virus. *J Gen Virol* **89**, 1729-1738.
- Thomson, T.M., and Guerra-Rebollo, M. (2010). Ubiquitin and SUMO signalling in DNA repair. *Biochem Soc Trans* **38**, 116-131.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* **19**, 94-102.
- Tilsner, J., Linnik, O., Christensen, N.M., Bell, K., Roberts, I.M., Lacomme, C., and Oparka, K.J. (2009). Live-cell imaging of viral RNA genomes using a Pumilio-based reporter. *Plant J* **57**, 758-770.
- Tonks, N.K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 833-846.
- Tonks, N.K., Charbonneau, H., Diltz, C.D., Fischer, E.H., and Walsh, K.A. (1988). Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* **27**, 8695-8701.
- Tootle, T.L., Silver, S.J., Davies, E.L., Newman, V., Latek, R.R., Mills, I.A., Selengut, J.D., Parlikar, B.E., and Rebay, I. (2003). The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature* **426**, 299-302.
- Torii, K.U., Stoop-Myer, C.D., Okamoto, H., Coleman, J.E., Matsui, M., and Deng, X.W. (1999). The RING finger motif of photomorphogenic repressor COP1 specifically interacts with the RING-H2 motif of a novel Arabidopsis protein. *J Biol Chem* **274**, 27674-27681.
- Torrance, L., and Mayo, M.A. (1997). Proposed re-classification of furoviruses. *Arch. Virol.* **142**, 435-439.
- Tregear, J.W., Jouannic, S., Schwebel-Dugué, N., and Kreis, M. (1996). An unusual protein kinase displaying characteristics of both the serine/threonine and tyrosine families is encoded by the Arabidopsis thaliana gene ATN1 117, 95-105.
- Truniger, V., and Aranda, M.A. (2009). Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res* **75**, 119-159.
- Trutnyeva, K., Bachmaier, R., and Waigmann, E. (2005). Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus movement protein. *Virology* **332**, 563-577.

- Tzfira, T., Vaidya, M., and Citovsky, V.** (2004). Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Nature* **431**, 87-92.
- Uchida, K.** (2003). Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids* **25**, 249-257.
- Vaandrager, A.B., Hogema, B.M., and de Jonge, H.R.** (2005). Molecular properties and biological functions of cGMP-dependent protein kinase II. *Front Biosci* **10**, 2150-2164.
- van den Burg, H.A., Tsitsigiannis, D.I., Rowland, O., Lo, J., Rallapalli, G., Maclean, D., Takken, F.L., and Jones, J.D.** (2008). The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defense responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. *Plant Cell* **20**, 697-719.
- Van der Biezen, E.A., and Jones, J.D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**, 454-456.
- van Engelen, F.A., Molthoff, J.W., Conner, A.J., Nap, J.P., Pereira, A., and Stiekema, W.J.** (1995). pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Res* **4**, 288-290.
- Van Etten, J.L., Gurnon, J.R., Yanai-Balser, G.M., Dunigan, D.D., and Graves, M.V.** (2010). Chlorella viruses encode most, if not all, of the machinery to glycosylate their glycoproteins independent of the endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 152-159.
- VanDemark, A.P., and Hill, C.P.** (2002). Structural basis of ubiquitylation. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 822-830.
- Varughese, K.I.** (2002). Molecular recognition of bacterial phosphorelay proteins. *Curr Opin Microbiol* **5**, 142-148.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A.** (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**, 1931-1934.
- Vernet, T., Dignard, D., and Thomas, D.Y.** (1987). A family of yeast expression vectors containing the phage $\phi 1$ intergenic region. *Gene* **52**, 225-233.
- Vetter, G.** (2003). Caractérisation du mécanisme de transport nucleo-cytoplasmique de la protéine P25 et mise en évidence d'interactions entre les protéines de mouvement du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave. In *Thèse de Doctorat*. (Strasbourg: Louis Pasteur), pp. 147.
- Vetter, G., Hily, J.M., Klein, E., Schmidlin, L., Haas, M., Merkle, T., and Gilmer, D.** (2004). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol* **85**, 2459-2469.
- Vidali, G., Gershey, E.L., and Allfrey, V.G.** (1968). Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones. *J Biol Chem* **243**, 6361-6366.
- Vierstra, R.D.** (1996). Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Mol Biol* **32**, 275-302.
- Vierstra, R.D.** (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* **8**, 135-142.
- Vierstra, R.D.** (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 385-397.
- Vlassara, H., and Palace, M.R.** (2002). Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med* **251**, 87-101.
- Vogel, F., Hofius, D., and Sonnewald, U.** (2007). Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic *Arabidopsis*. *Traffic* **8**, 1205-1214.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W.** (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015-1068.
- Voinnet, O.** (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* **6**, 206-220.
- Voinnet, O.** (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci* **13**, 317-328.
- 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., 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.
- Wagmann, E., Ueki, S., Trtneyeva, K., and Citovsky, V.** (2004). The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit. Rev. Plant Sci* **23**, 195-250.
- Wagmann, E., Chen, M.H., Bachmaier, R., Ghoshroy, S., and Citovsky, V.** (2000). Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *Embo J* **19**, 4875-4884.
- Walsh, G., and Jefferis, R.** (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol* **24**, 1241-1252.
- Wang, C., Risteli, M., Heikkinen, J., Hussa, A.K., Uitto, L., and Myllylä, R.** (2002). Identification of amino acids important for the catalytic activity of the collagen glucosyltransferase associated with the multifunctional lysyl hydroxylase 3 (LH3). *J Biol Chem* **277**, 18568-18573.
- Wang, C.T., and Barklis, E.** (1993). Assembly, processing, and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 gag mutants. *J Virol* **67**, 4264-4273.
- Wang, F., Zumbun, E.E., Huang, J., Si, H., Makaroun, L., and Friedman, H.M.** (2010). Herpes simplex virus type 2 glycoprotein E is required for efficient virus spread from epithelial cells to neurons and for targeting viral proteins from the neuron cell body into axons. *Virology*.
- Wang, H., Hao, L., Shung, C.Y., Sunter, G., and Bisaro, D.M.** (2003). Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* **15**, 3020-3032.
- Watanabe, Y., Ogawa, T., and Okada, Y.** (1992). In vivo phosphorylation of the 30-kDa protein of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett* **313**, 181-184.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., and Wang, M.B.** (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13959-13964.
- Waterhouse, P.M., Smith, N.A., and Wang, M.B.** (1999). Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci* **4**, 452-457.

- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., and Lough, T.** (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-842.
- Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P., and Hellmann, H.** (2005). Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiol* **137**, 83-93.
- Wei, N., Serino, G., and Deng, X.W.** (2008). The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci* **33**, 592-600.
- Weintraub, S.J., and Manson, S.R.** (2004). Asparagine deamidation: a regulatory hourglass. *Mech Ageing Dev* **125**, 255-257.
- Welchman, R.L., Gordon, C., and Mayer, R.J.** (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 599-609.
- West, C.M., Van Der Wel, H., Sassi, S., and Gaucher, E.A.** (2004). Cytoplasmic glycosylation of protein-hydroxyproline and its relationship to other glycosylation pathways. *Biochim Biophys Acta* **1673**, 29-44.
- Whiteside, S.T., and Goodbourn, S.** (1993). Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcription factor activity by subcellular localisation. *J Cell Sci* **104 (Pt 4)**, 949-955.
- Whitham, S., McCormick, S., and Baker, B.** (1996). The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8776-8781.
- Wiborg, J., O'Shea, C., and Skriver, K.** (2008). Biochemical function of typical and variant Arabidopsis thaliana U-box E3 ubiquitin-protein ligases. *Biochem J* **413**, 447-457.
- Wing, S.S.** (2003). Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 590-605.
- Wirbelauer, C., Sutterluty, H., Blondel, M., Gstaiger, M., Peter, M., Reymond, F., and Krek, W.** (2000). The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cull1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cull1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *Embo J* **19**, 5362-5375.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., and Mann, M.** (2008). Nepsilon-formylation of lysine is a widespread post-translational modification of nuclear proteins occurring at residues involved in regulation of chromatin function. *Nucleic Acids Res* **36**, 570-577.
- Wright, H.T.** (1991). Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **26**, 1-52.
- Xiao, C.Y., Hubner, S., and Jans, D.A.** (1997). SV40 large tumor antigen nuclear import is regulated by the double-stranded DNA-dependent protein kinase site (serine 120) flanking the nuclear localization sequence. *J Biol Chem* **272**, 22191-22198.
- Xie, B.T., Ye, Y.J., and Gong, Z.X.** (2003). The phosphorylation of NS protein of wheat rosette stunt virus. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **35**, 518-521.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., and Chua, N.H.** (2000). Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* **14**, 3024-3036.
- Xie, Q., Guo, H.S., Dallman, G., Fang, S., Weissman, A.M., and Chua, N.H.** (2002). SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals. *Nature* **419**, 167-170.
- Xu, G., Ma, H., Nei, M., and Kong, H.** (2009a). Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 835-840.
- Xu, P., and Peng, J.** (2006). Dissecting the ubiquitin pathway by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 1940-1947.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J.** (2009b). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133-145.
- Xu, Q., Fu, H.H., Gupta, R., and Luan, S.** (1998). Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 849-857.
- Xue, F., and Cooley, L.** (1993). kelch encodes a component of intercellular bridges in Drosophila egg chambers. *Cell* **72**, 681-693.
- Yahara, T., Ooi, K., Oshita, S., Ishii, I., and Ikegami, M.** (1998). Molecular evolution of a host-range gene in geminiviruses infecting asexual populations of Eupatorium makinoi. *Genes Genet Syst* **73**, 137-141.
- Yamauchi, M., Noyes, C., Kuboki, Y., and Mechanic, G.L.** (1982). Collagen structural microheterogeneity and a possible role for glycosylated hydroxylysine in type I collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7684-7688.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., and Xie, D.** (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *Plant Cell* **21**, 2220-2236.
- Yang, C.W., Gonzalez-Lamothe, R., Ewan, R.A., Rowland, O., Yoshioka, H., Shenton, M., Ye, H., O'Donnell, E., Jones, J.D., and Sadanandom, A.** (2006a). The E3 ubiquitin ligase activity of arabidopsis PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog ACRE276 are required for cell death and defense. *Plant Cell* **18**, 1084-1098.
- Yang, J., Aittomaki, S., Pesu, M., Carter, K., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Kieff, E., and Silvennoinen, O.** (2002). Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II. *Embo J* **21**, 4950-4958.
- Yang, P., Fu, H., Walker, J., Papa, C.M., Smalle, J., Ju, Y.M., and Vierstra, R.D.** (2004). Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *J Biol Chem* **279**, 6401-6413.

- Yang, S., Yates, P.R., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., and Sharrocks, A.D.** (1997). The regulation of TCF transcription factors by MAP kinase cascades. *Biochem Soc Trans* **25**, 153S.
- Yang, W.H., Kim, J.E., Nam, H.W., Ju, J.W., Kim, H.S., Kim, Y.S., and Cho, J.W.** (2006b). Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol* **8**, 1074-1083.
- Yang, X.J.** (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* **26**, 1076-1087.
- Yang, X.J., and Seto, E.** (2008). Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell* **31**, 449-461.
- Yasuhara, M., Mitsui, S., Hirano, H., Takanebe, R., Tokioka, Y., Ihara, N., Komatsu, A., Seki, M., Shinozaki, K., and Kiyosue, T.** (2004). Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in Arabidopsis. *J Exp Bot* **55**, 2015-2027.
- Yeh, E.T., Gong, L., and Kamitani, T.** (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* **248**, 1-14.
- Zeng, L.R., Vega-Sanchez, M.E., Zhu, T., and Wang, G.L.** (2006). Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res* **16**, 413-426.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J.** (2000). Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **290**, 1761-1765.
- Zhang, F., Robbins, D.J., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J.** (1993). Crystallization and preliminary X-ray studies of extracellular signal-regulated kinase-2/MAP kinase with an incorporated His-tag. *J Mol Biol* **233**, 550-552.
- Zhang, S., and Klessig, D.F.** (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci* **6**, 520-527.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., and Chua, N.H.** (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* **20**, 3255-3268.
- Zhang, L., Wang, Z., Wang, X., Li, D., Han, C., Zhai, Y., and Yu, J.** (2005). Two virus-encoded RNA silencing suppressors, P14 of Beet necrotic yellow vein virus and S6 of Rice black streak dwarf virus. *Chinese Science Bulletin* **50**, 305-310.
- 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**, 203-217.
- Zheng, J., Yang, X., Harrell, J.M., Ryzhikov, S., Shim, E.H., Lykke-Andersen, K., Wei, N., Sun, H., Kobayashi, R., and Zhang, H.** (2002). CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell* **10**, 1519-1526.
- Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W., and Dixit, V.M.** (2004). Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* **427**, 167-171.

Annexes

I. Article de revue « Molecular Biology of the *Beet necrotic yellow vein virus*»

Claire Peltier, Kamal Hleibieh, Heike Thiel, Elodie Klein, Claude Bragard, David Gilmer

Plant Viruses **2**, 14-24, 2008 *Global Science Books*

Molecular Biology of the *Beet necrotic yellow vein virus*

Claire Peltier¹ • Kamal Hleibieh¹ • Heike Thiel² • Elodie Klein¹ •
Claude Bragard³ • David Gilmer^{1*}

¹ Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, laboratoire propre du CNRS (UPR 2357) conventionné avec l'Université Louis Pasteur (Strasbourg 1),
12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

² University of Goettingen, Department of Crop Sciences, Plant Virology, Grisebachstrasse 6, D-37077 Goettingen, Germany

³ Unité de Phytopathologie, Université Catholique de Louvain-La-Neuve, Croix du Sud 2bte3, B1348, Louvain-La-Neuve, Belgium

Corresponding author: * david.gilmer@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

ABSTRACT

Beet necrotic yellow vein virus is the etiological agent of one of the most devastating sugar beet viral diseases: rhizomania. This review describes the molecular biology of the rhizomania disease, the functions of the BNYVV encoded proteins, the consequences of their expression as well as the biology of the BNYVV vector, *Polymyxa betae*. Root proliferation is an important part of the well-known characteristics of the viral infection that leads to yield and sugar losses. The extensive use of sugar beet cultivars displaying partial resistance or tolerance against virus infection allows containment of sugar yields. However, such extensive uses also permit viruliferous vector to be amplified and therefore the appearance of resistance breaking isolates. We review as well the defence strategies that may be used against rhizomania.

Keywords: *Benyvirus*, rhizomania, *Polymyxa betae*, pathogenicity, ICTVdB Virus Code: 00.088.0.01.001.

Abbreviations: BNYVV, *Beet necrotic yellow vein virus*; CP, coat protein; ORF, open reading frame; RB, resistance breaking; TGB, Triple Gene Block

CONTENTS

INTRODUCTION	1
RHIZOMANIA DISEASE	2
Symptoms	2
Histological and biochemical properties of rhizomania diseased plants	2
BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS	2
Taxonomy	2
Host range	3
Structure	3
Genomic organization	3
Genomic functions	3
p25	4
RNA-3 potentially encodes two other proteins	4
A particular function for RNA-3	5
Sequence variations	5
PATHOGENICITY	5
The <i>Polymyxa betae</i> vector	6
<i>P. betae</i> cycle	6
Vector detection	7
Virus-vector interactions	7
Genetic resistance strategies used against rhizomania disease	7
CONCLUSIONS	8
ACKNOWLEDGEMENTS	8
REFERENCES	8

INTRODUCTION

Sugar beet rhizomania possesses the potential to lower the sugar contents in the roots of susceptible sugar beet cultivars up to 20%. However, sugar companies report yield losses of 50 to 70% during sugar purification (Richard-Molard 1985). Rhizomania was first reported during the fifties in Italy (Canova 1959). Nowadays the disease is present in almost every sugar beet growing area in the world. The etiological agent was discovered by Tamada and Baba in 1973 who demonstrated that rhizomania was induced by the

phytovirus named *Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV (Tamada and Baba 1973). Such pathogen classified among the alphavirus-like supergroup is assigned to the genus *Benyvirus* (ICTVdB, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>). BNYVV is transmitted by the soil-borne obligate parasite *P. betae* Keskin (Keskin 1964), a protist initially classified in the fungus kingdom. *P. betae* is able to form spores that are extremely resistant to biodegradation, drought and pesticides treatment, that allow viruliferous spores to rest for more than two decades in the infested soils. Breeding efforts were carried out in order to maintain the

sugar production yields, resulting in the development of sugar beet hybrids partially resistant to BNYVV systemic infection. Such crops are commonly used for commercial production. Their intensive uses among the infested soils applied a positive selection pressure that raised RB isolates. Interestingly, emerging viral species possess sequence variation particularly within RNA-3; the viral component that encodes the pathogenicity determinant p25, involved in root proliferation (Tamada *et al.* 1999).

Actual molecular studies of the rhizomania syndrome tend to reveal the resistance mechanism mediated by the *Rz* resistance gene products as well as the virus induced processes, leading to the root proliferation, particularly by the study of the RNA-3-encoded p25 protein. However, the identification of other *P. betae*-transmitted viruses associated with the rhizomania syndrome rise new questions about the disease etiology. As an example, *Beet b lack s corch virus* has been shown to induce rhizomania-like symptoms (Weiland *et al.* 2007).

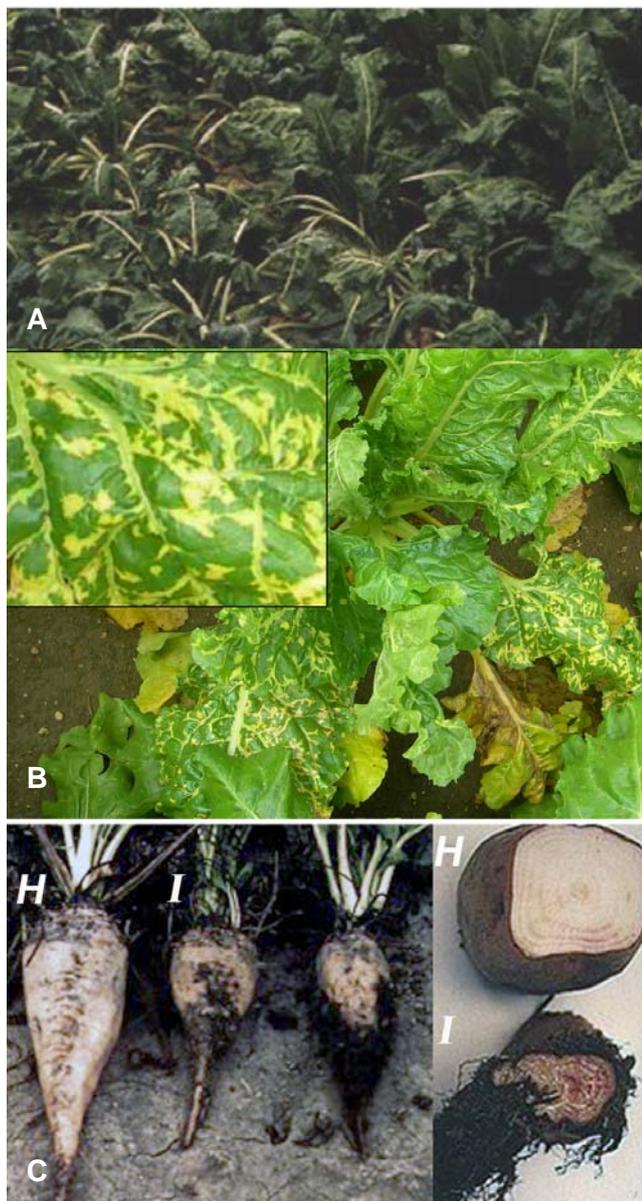


Fig. 1 Symptoms of sugar beet rhizomania. (A) During warm period, water deficiencies induced by rhizomania disease provokes plant wilt. (B) Foliar symptoms are rather rare and correspond to plant systemic infection. Vein yellowing and yellow chlorotic spots are induced by the expression of the RNA-3-encoded p25 protein. (C) Typical root symptoms: infected taproot (I) are shorter, wine glass shaped and display characteristic necrosis and root proliferation compared to healthy plant (H). (Photos a and c: INRA-Colmar, b: Institut Technique de la Betterave, Paris).

RHIZOMANIA DISEASE

Symptoms

The Rhizomania syndrome refers to root madness (Rhizo: root; Mania: madness). Infected sugar beets display more or less a dwarfism that reduces the taproot size, which harbours necrosis (Fig. 1C). Infection shapes a wine-glass-like taproot and induces rootlet proliferations that become necrotic, abundant and fragile. These root symptoms reduced water uptake that provoke leaf fading (Fig. 1A). Sometimes, when the infection becomes systemic, vein yellowing, necrosis and foliar local lesions appear (Fig. 1B). Beet necrotic yellow vein virus was named according to these systemic symptoms.

Histological and biochemical properties of rhizomania diseased plants

Histological sections performed on infected taproot suggested that the infection and/or the necrosis of lateral roots induce the reprogramming of the pericycle cells to meristematic cells, which might cause the synthesis of new rootlets (Pollini and Giunchedi 1989). Moreover, viral sequences could also induce a modulation of the cellular messenger and protein expression profiles leading to root morphogenesis. Thus, root proliferation favors the viral replication and transmission. Indeed, rootlet cells are the targets of BNYVV vector, the parasite *P. betae*.

The plant hormone auxin plays a major role in plant development and particularly on root morphogenesis. Indol-3-acetic acid assays performed onto susceptible and tolerant sugar beet varieties revealed auxin level three times higher in infected plants (Pollini *et al.* 1990). Interestingly, tolerant crops possess lower auxin contents than susceptible plants. One of the questions that still need an answer is to determine if auxin variations are the initiator or the consequence of the cellular disorders induced by BNYVV infection. Comparisons of the root transcriptome of healthy beets with rhizomania infected beets lead to the identification of auxin, cell cycle, defence signalling and ubiquitin-related regulated genes (Schmidlin *et al.* 2008).

BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS

Taxonomy

BNYVV possesses a multipartite linear positive-sense single-stranded RNA genome that consists of four to five RNAs possessing 5' cap and polyadenylated 3' ends. BNYVV belongs to the supergroup of alphavirus-like and is the type species of the *Benyvirus* genus, which contains as well the *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV, ICTVdB: 00.088.0.01.002) (Lee *et al.* 2001). BNYVV and BSBMV are rod-shaped, share a similar genomic organization (Lee *et al.* 2001), host range, and are transmitted by the protist vector *Polymyxa betae*. However, BSBMV has only been detected within North America. BSBMV and BNYVV are closely related but are distinct viruses since *Rz* resistant genes have no effect on BSBMV accumulation (Wisler *et al.* 2003) and no cross reaction with coat protein antisera, nor cross protection have been described. Recent studies demonstrated that BNYVV RNA-1 and -2 were able to amplify BSBMV RNA-3 and -4, but only in the absence of BNYVV small RNAs (Claudio Ratti and David Gilmer, unpublished). Both viruses could compete for similar host factors. Such hypothesis will be tested as soon as full-length infectious clones of BSBMV RNA-1 and -2 will be available.

Tentative members within *Benyviruses* are *Burdock mottle virus* (BdMV, ICTVdB: 00.088.0.01.004) (Rush 2003) and *Rice stripe necrosis virus* (RSNV, ICTVdB: 00.088.0.01.003) (Morales *et al.* 1999; Van Regenmortel *et al.* 2000; Fauquet *et al.* 2005).

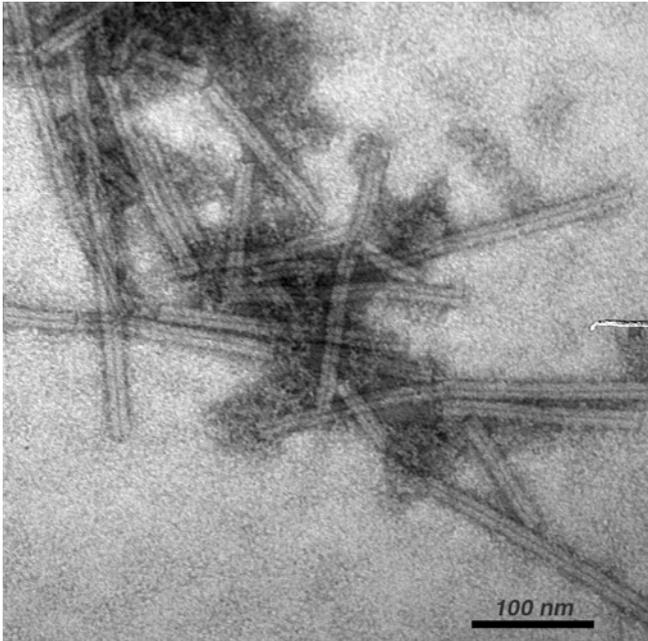


Fig. 2 Immunocaptured BNYVV particles observed by electron microscopy. (Photo M. Erhardt, IBMP).

Host range

BNYVV infects plants within *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* and *Tetragoniaceae* families. Systemic infection occurs naturally onto *Beta vulgaris* (sugar beet) and *Beta macrocarpa*. *Nicotiana benthamiana* and *Spinacia oleracea* are systemically infected even in the absence of RNA-3 and -4. On experimental hosts, BNYVV is propagated onto *Chenopodium quinoa* or *Tetragonia expansa* that respond to the infection by chlorotic or necrotic local lesions, depending on the inoculum composition (Tamada *et al.* 1989; Koenig *et al.* 1991; Jupin *et al.* 1992).

Structure

Viral particles display a right-handed helical symmetry (**Fig. 2**) with a 2.6 nm pitch, 49 capsid protein subunits per repetition of 4 turns, with each subunit interacting with 4 nucleotides (Steven *et al.* 1981). The particles are not enveloped and have a diameter of 20 nm with lengths proportional to the sizes of the encapsidated RNAs, i.e., 390, 265,

105, 89 and 80 nm (Putz 1977; Tamada *et al.* 1989). Coat proteins constitute about 95% of the particle weight. The minor coat protein, a CP amber readthrough gene product (CP-RT) is present at one extremity of particles and participates both to the morphogenesis (Schmitt *et al.* 1992; Haerberle *et al.* 1994) and to the transmission of the virions (Tamada *et al.* 1996).

Genomic organization

BNYVV has a segmented RNA genome composed of 4 to 5 genomic components (Tamada 1999). All components possess a 5' Cap (m⁷GpppG) and a 3' polyA tail. Sequencing together with the full-length infectious clones (Quillet *et al.* 1989; Link *et al.* 2005) permitted to decipher the viral genomic organization and the main functions of virally encoded proteins (**Fig. 3**).

RNA-1 is involved in the replication of viral RNAs (Gilmer *et al.* 1992a) and RNA-2 is necessary for encapsidation, cell-to-cell movement and RNA silencing suppression (RNA-2), as proven by protoplast and mechanical infection of leaves. RNA-1 and -2 are necessary and sufficient for the infection following leaf mechanical inoculations where small components are dispensable and, if they are present, can undergo deletion or disappear (Bouzoubaa *et al.* 1991). In natural infection, however, these small components are required. Indeed, RNA-3 allows the viral amplification in sugar beet roots and its expression influences symptoms (Tamada *et al.* 1989; Jupin *et al.* 1992), whereas RNA-4 is involved in viral transmission (Tamada and Abe 1989). Moreover, RNA-4-encoded p31 is described as a root specific silencing suppressor (Rahim *et al.* 2007). Therefore, BNYVV is a unique virus as it behaves as a bipartite virus when rub inoculated or as a tetra or pentapartite virus in natural infection. Such a property has been utilized to obtain viral expression vectors, named replicons, and derived from RNA-3 and RNA-5 (Schmidlin *et al.* 2005). Such replicons allow the expression of various sequences within infected tissues (Schmidlin *et al.* 2005).

Genomic functions

RNA-1 is 6746 nts long (without polyA) and harbours only one open reading frame (ORF). It encodes a 237 kDa polypeptide (Bouzoubaa *et al.* 1987) that contains consensus methyl-transferase (MTR), helicase (HEL), papain-like protease (PRO) and polymerase (POL). Autoproteolysis of p237 between the domains PRO and POL leads to two proteins: p150 and p66, which contain respectively the MTR, HEL, PRO and the POL motifs (Hehn *et al.* 1997). This

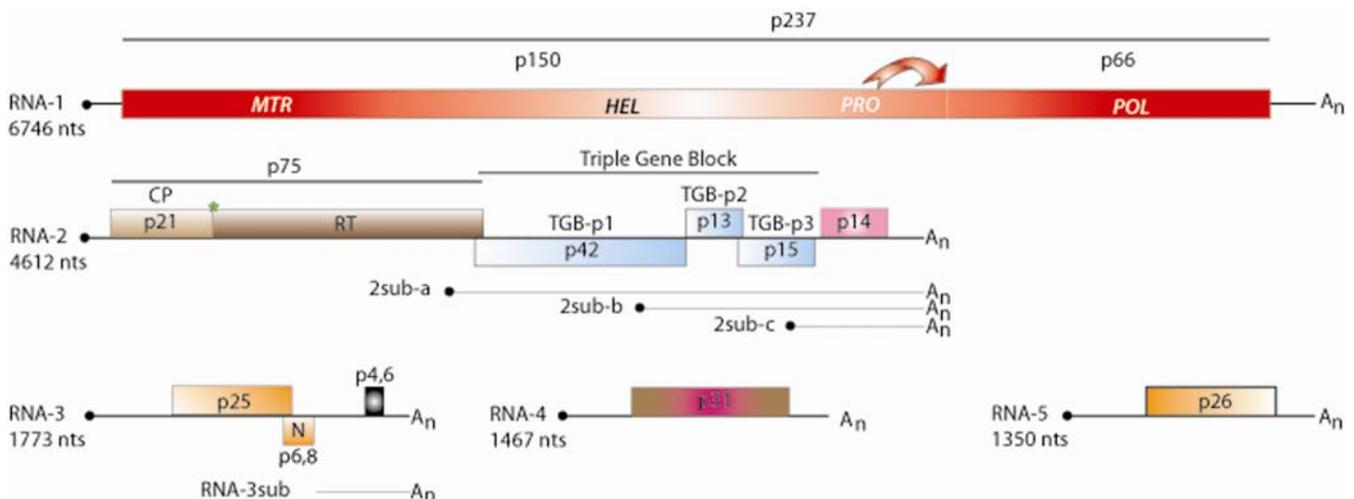


Fig. 3 BNYVV genomic organization. The sizes of the five genomic RNAs are presented. Black dot represents Cap structure and A_n, the polyadenylated sequence. Squares correspond to ORF. Arrow designates the *cis* proteolysis of the RNA-1-encoded p237 polyprotein leading to the p150 and the p66 proteins. MTR, Methyltransferase domain; HEL, Helicase domain; PRO, Protease domain; POL, Polymerase domain. Star denotes the CP amber readthrough mechanism leading to the expression of minor CP-RT protein.

proteolytic cleavage of the replicase protein is the significant feature of the *Benyviruses*. However, the stoichiometry of replication complex is not known.

RNA-2 is 4612 nts long and encodes for six proteins.

The first cistron drives the synthesis the 21 kDa major capsid protein, CP. In about 10% of the translation events, CP amber stop codon is suppressed and the resulting read-through leads to the synthesis of the 75 kDa minor coat protein, CP-RT (Niesbach-Klosgen *et al.* 1990; Haeberle *et al.* 1994). CP-RT is needed for the viral transmission (Tamada *et al.* 1996) and for the transient anchoring of the viral particles around mitochondria (Erhardt *et al.* 2001; Valentin *et al.* 2005). These latter studies suggest that the viral genome packaging occurs around mitochondria.

Following the structural protein encoding ORFs, a cluster of three genes, partially overlapping, known as "triple gene block" (TGB) ensures the viral cell-to-cell movement. TGB clusters are also found on other plant viral species, including *Pomo*-, *Peclu*-, *Potex*-, *Carla*- and *Hordeivirus* (Morozov and Solovjev 2003). For BNYVV, these three proteins are encoded by subgenomic RNA-2sub-a for TGB-p1 (42 kDa) and RNA-2sub-b for TGB-p2 (13 kDa) and TGB-p3 (15 kDa) (Gilmer *et al.* 1992a). TGB-p1 protein contains a helicase domain and is able to bind nucleic acids *in vitro* (Bleykasten *et al.* 1996).

Complementation studies of TGB-p1 protein with a virally expressed GFP::TGB-p1 fusion protein permitted to localize TGB-p1 in plasmodesmata only in the presence of the TGB-p2 and -p3 proteins (Erhardt *et al.* 2000). Moreover, TGB-p2 and -p3 are detected within plasmodesmata only when all the TGB proteins are expressed in the same cell (Erhardt *et al.* 2005).

ORF VI product encodes for a cystein-rich protein of 14 kDa. P14 is expressed from RNA-2sub-c. This protein is involved in the regulation of the virus replication (Gilmer *et al.* 1992a), enhances the expression of CP protein (Hehn *et al.* 1995) and acts as a weak silencing suppressor (Dunoyer *et al.* 2002).

RNA-3 is 1773 nts long and is involved in viral pathogenicity. Its presence exacerbates root and foliar symptoms (Tamada *et al.* 1989; Jupin *et al.* 1992). This RNA is also necessary for the long distance movement of the virus (Laufer *et al.* 1998) and is responsible for the rhizomania phenotype on *Beta vulgaris* (Tamada *et al.* 1989; Koenig *et al.* 1991).

p25

The p25 protein is expressed from RNA-3 and modulates foliar (Jupin *et al.* 1992) and root symptoms (Tamada *et al.* 1999). No sequence homology is found with known proteins, except with BNYVV RNA-5-encoded p26, which only shares the Fx₃FRGPGN_xL motif with p25 (Fig. 4).

Nucleo-cytoplasmic localization of p25 has been shown (Haeberle and Stussi-Garaud 1995). Its nuclear addressing involves the N-terminal ⁵⁷KRIRFR₆₂ NLS (Vetter *et al.* 2004). Moreover, a nuclear export sequence (NES), ¹⁶⁹VYMVCLVNTV₁₇₈, has been found in the C-terminal part of the protein. Hence, such two sequences allow p25 to shuttle between the two compartments by the way of importin alpha and exportin 1, independantly of other viral factors (Vetter *et al.* 2004). Foliar symptom variations observed with p25 mutants suggest a partial correlation between p25 function and its subcellular localization (Vetter *et al.* 2004). If all of the p25 functions are not yet unraveled, the protein displays some common properties with transcription activators (nuclear localization, Zinc-finger-domain, acidic domain). Indeed, in yeast, its fusion to GAL4BD or LexA allows a weak transcription activation of reporter genes (Klein *et al.* 2007), as it has been reported previously for NAC transcription factor (Xie *et al.* 2000). The domain responsible for such transcription activation has been mapped between amino acid residues 103 and 160 (Klein *et al.* 2007). P25 is able to form multimers as well, only if full-length proteins are maintained (Klein *et al.* 2007). Post-translational modifications of p25 have been evidenced by its electrophoretic mobility (Niesbach-Klosgen *et al.* 1990; Klein *et al.* 2007) and its immunodetection after two dimensional gel electrophoresis reveals different isoforms that mainly differ by their isoelectric point corresponding to phosphate group addition (unpublished). Aspartic acid and alanine scanning mutagenesis of predicted phosphorylation sites revealed the importance of such phosphorylation for the multimerization, nuclear import as well as the transcription activation. Only mass spectrometry analyses will permit the exact identification of such phosphorylation events on the p25 sequence.

RNA-3 potentially encodes two other proteins

BNYVV RNA-3 as well as BSBMV RNA-3 encode potentially for two other proteins. The N-gene could allow the

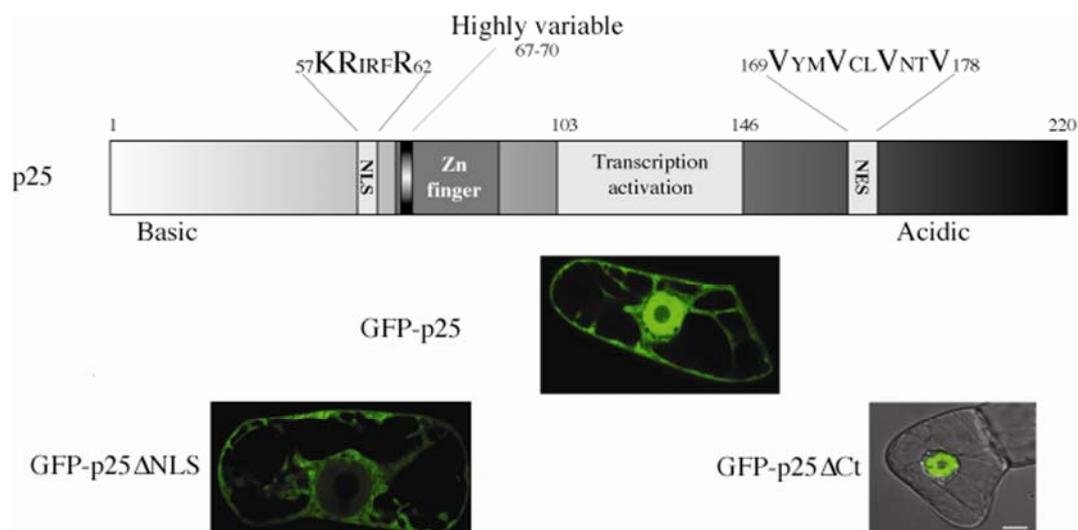


Fig. 4 Characteristics of the RNA-3-encoded p25: Line drawing representation of the p25 protein and of its known functional domains. (Top) The basic N-terminal domain contains a nuclear localization signal (NLS, ⁵⁷KRIRFR₆₂), the highly variable 'Tetrad' sequence (67-70) and a Zinc finger domain. The acidic C-terminal part of the protein encompasses a domain responsible for the transcription activation (103-146) and the nuclear export sequence (NES, ¹⁶⁹VYMVCLVNTV₁₇₈). (Center) Transient expression of a GFP-p25 fusion leads to the localization of the protein in the nucleus and in the cytoplasm of the cell, whereas removal of the NLS (GFP-p25ΔNLS, bottom left) prevents the nuclear addressing of the fusion protein. Deletion of the C-terminal domain that contains the NES motif leads to the accumulation of the fusion protein in the nucleus (GFP-p25ΔCt, bottom right).

synthesis of a 6.8 kDa protein that has been found expressed only from RNA-3 truncated forms, fused or not with p25 ORF (Jupin *et al.* 1992). In such situations, expression of the protein induces severe necrosis on *T. expansa* and *C. quinoa* leaves (Jupin *et al.* 1992). Fused to GFP protein, p6.8 is localized to cortical reticulum even in the absence of viral infection (David Gilmer, unpublished). However, its expression has never been detected under natural conditions, leading to the hypothesis that this ORF is cryptic. The last ORF encodes potentially for a 4.6 kDa polypeptide (p4.6). Such protein could be expressed from the so-called RNA-3 subgenomic species (RNA-3 sub) that corresponds to the last 550 nts of the RNA (Balmori *et al.* 1993). The functions of this short RNA and its encoded peptide, if it is expressed, are still unknown.

A particular function for RNA-3

BNYVV RNA-3 has been used to map 5' and 3' *cis* acting elements required for its replication and encapsidation and for the characterization of their secondary structure in solution (Jupin *et al.* 1990; Gilmer *et al.* 1992b, 1993; Lauber *et al.* 1997, 1999). However, such RNA possesses another function, which seems independent of its expression. Onto *B. macrocarpa*, RNA-3 is absolutely required for systemic spread of the virus. The RNA-3 sequence required for such systemic movement was located between nts 1033 and 1257 (Lauber *et al.* 1998). Curiously, complementation of BNYVV Stras12 strain, which contains only RNA-1 and -2, with BSBMV RNA-3 allows systemic movement of the viral particles (Claudio Ratti and David Gilmer, unpublished). A common sequence of 20 nts is found between both RNA species. Complementary experiments will allow deciphering the exact mechanism that permits the long distance movement.

RNA-4 is 1467 nts long and encodes for a 31 kDa protein (p31), which is essential for the efficient transmission of the virus by *P. betae* (Tamada and Abe 1989; Rahim *et al.* 2007). RNA-4-encoded protein could act in synergy with the minor p75 coat protein. P31 modulate foliar symptoms, and has been recently described as a root specific silencing suppressor (Rahim *et al.* 2007).

RNA-5 is present only within particular isolates (see below) and is 1350 nts long. It encodes a 26 kDa protein (p26), which induces severe rhizomania symptoms, reducing sugar yields (Heijbroek *et al.* 1999). Full-length infectious cDNA clone allowed the analysis of RNA-5 expression upon viral pathogenesis and the obtention of a new viral expression vector (Link *et al.* 2005; Schmidlin *et al.* 2005). Viral expression of p26 induces severe necrosis onto *C. quinoa* leaves. P26 protein is localized in the nucleus and in the cytoplasm of infected cells. Moreover, when p26 is fused to GAL4DB or LexA, the fusion proteins are able to strongly activate the transcription in yeast (Link *et al.* 2005).

Sequence variations

Restriction fragment length polymorphism, single-strand conformation polymorphism, sequence analyses and the presence or the absence of a fifth RNA in viral isolates permitted to classify BNYVV in different groups that are serologically identical (Kruse *et al.* 1994; Koenig *et al.* 1995). The distinction between A and B-type is possible by the characterization of amino acid residues variations of the RNA-2-encoded CP in position 62, 103 and 172 (**Table 1**). Eight variable residues within RNA-5-encoded p26 permit the distinction between European (P-type) or Asian (J-type) RNA-5 (**Table 1**). European P-type RNA-5s have a shorter 5'UTR and their coding region is four codons longer than J-type RNA-5s (**Table 1**). Such composition and size differences do not interfere on the known properties of p26 (Link *et al.* 2005): both proteins induce similar foliar symptoms, localize in the nucleus and in the cytoplasm and are able to activate the transcription in yeast (Link *et al.* 2005) (David Gilmer, unpublished). It should be noted here that

Table 1 Sequence variation within BNYVV RNA-2 encoded structural protein CP and RNA-3 and -5 encoded pathogenicity factors p25 and p26, respectively. Δ, deletion; * and ** refer to the presence of P-type or J-type respectively. (adapted from Schirmer *et al.* 2005)

CP ¹										
Position	62	103	172							
B-type	S	N	F							
A-type	T	S	L							
p25 'Tetrad' ¹										
Position	67	68	69	70						
A-type	A	C	H	G						
A-type	A	F	H	G						
A-type	A	F	H	R						
B-type	A	H	H	R						
A-type	A	H	H	G						
A-type	A	L	H	G	*					
A-type	A	Y	F	G						
B-type	A	Y	H	R						
A/B-type	A	Y	H	G	**	C. Bragard, unpublished				
A-type	A	Y	P	R	A. Schirmer, unpublished					
A-type	A	Y	R	V	**					
A-type	S	Y	H	G	*					
A-type	T	Y	H	G	*	(Ward <i>et al.</i> 2007)				
A-type	V	C	H	G						
A-type	V	L	H	G						
p26 ¹										
Position	30	69	77	103	142	146	149	174	200	227-229
P-type	N	L	D	G	R	F	G	S	A	NNN
J-type	H	F	Δ	D	C	H	R	N	S	Δ

¹ Amino acid sequence variation within the coat protein that permit the distinction between A- or B-type of BNYVV.

² Amino acid sequence variation observed within the hypervariable Tetrad sequence of the BNYVV p25 protein. Some of those sequence variations are specific to A or B-type strains.

³ Differences observed between Asian (J-type) and P-type p26 proteins.

RNA-5-containing isolates could harbour an A or B-type RNA-2 (Miyamishi *et al.* 1999; Koenig and Lennefors 2000; Schirmer *et al.* 2005). A-type viruses are found in European countries, Iran, USA, China and Japan. B-type is particularly present in France, Germany, Switzerland, Sweden as well as in China and Japan (Miyamishi *et al.* 1999; Suarez *et al.* 1999; Lennefors *et al.* 2000; Sohi and Maleki 2004). RNA-5 containing isolates were discovered in Japan (Tamada *et al.* 1989; Kiguchi *et al.* 1996), France (Koenig *et al.* 1997), China (Dawei *et al.* 1999), Kazakhstan (Koenig and Lennefors 2000) and in England (Harju *et al.* 2002; Ward *et al.* 2007). Phylogenetic studies were performed on RNA-3 (Schirmer *et al.* 2005). Characterisation of RNA-3-encoded p25 sequences permitted the identification of a highly variable sequence motif between position 67 and 70 named 'tetrad' (**Table 1**) (Schirmer *et al.* 2005). Recently, new tetrad motifs have been found (Ward *et al.* 2007) (Audrey Schirmer, unpublished). RNA viruses endorse strong mutation rates that allow them to adapt rapidly to various situations (Domingo 2000), keeping their genetic robustness and their infectivity even in the presence of mutations (Drake and Holland 1999). Analysis of selective pressure on p25 sequences revealed that 'tetrad' sequence as well as amino acid residue 198 were submitted to high positive selection pressures (Schirmer *et al.* 2005) similar to those described for animal viruses bypassing mammalian immunity system (Fares *et al.* 2001). Such a positive selection could explain the adaptation of BNYVV to resistance genes (Schirmer *et al.* 2005) and has recently been validated for the tetrad motif (Acosta-Leal *et al.* 2008).

PATHOGENICITY

Root alterations occur similarly when A- or B-type viruses set the infection; however, isolates that contain RNA-5 are more aggressive, particularly onto resistant crops, accumulate at higher concentration and induce severe rhizomania

symptoms (Heijbroek *et al.* 1999). Such a pathogenicity was retrieved onto host plants with artificial isolates (Link *et al.* 2005). However, the presence of RNA-5 is not sufficient to explain the increased virulence of some isolates as RB occurred in the U.S., where RNA-5 is absent (Liu *et al.* 2005). Molecular analyses of RB isolates revealed the presence of amino acid variation within the p25 tetrad sequence (Acosta-Leal and Rush 2007; Liu and Lewellen 2007) as well as amino acid residue 135 (Acosta-Leal and Rush 2007). Using artificial isolates that mimics such changes, virologists will be able to conclude if tetrad motif by itself is sufficient or requires another viral partner (e.g. encoded by RNA-1 or -2) to overcome *Rz* effect. Some preliminary experiments performed onto p25 revealed the importance of the tetrad motif upon the protein properties. Changing a B-type p25 tetrad sequence by one of the identified motifs drastically modifies the foliar symptoms, transcription activation and multimerization properties of p25 (Klein *et al.* 2007). Klein *et al.* suggested that p25 could behave as an avirulence gene product that could modify host responses. Chiba *et al.* (2008) recently demonstrated that p25 is indeed an *Avr* protein in *B. vulgaris*.

The *Polymyxa betae* vector

Besides BNYVV, three other viruses are also linked with rhizomania, namely the *Beet soil-borne virus* (BSBMV), the *Beet soil-borne virus* (BSBV) and the *Beet virus Q* (BVQ) (Meunier *et al.* 2003). All these viruses are transmitted to beet by the vector *P. betae* Keskin, an obligate parasite that develops in the epidermal and cortical root cells. The *Polymyxa* genus is represented by two economically very significant species: *P. graminis* Ledingham is specific to cereals (rice, wheat, barley) and *P. betae* to the *Chenopodiaceae* (*Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea*, *Atriplex patula*, *Chenopodium bonus-henricus*, *C. hybridum* and *C. polyspermum*) and species like *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae* and *Portulacaceae* (Abe and Tamada 1986; Barr 1988; Legrève *et al.* 2000; Legrève *et al.* 2005). Recent molecular studies of the characterization of the ITS (internal transcribed spacers) regions of the ribosomal DNA support species separation (Legrève *et al.* 2002). *P. betae* is ubiquitous. Its distribution covers all beet-growing areas (Rush 2003). *P. betae* belongs to the *Plasmodiophoridae*, a monophyletic group including ten genera. For a long time ranked among the lower fungi, it is now classified as a protist (Archibald and Keeling 2004). The host range of *P. betae*, long considered to be narrow, now appears to be wider. *P. betae* was

recently detected by RT-PCR in the roots of some species of *Brassicaceae*, *Papaveraceae*, *P. oaceae* and *Urticaceae* (Anne Legrève, unpublished). Although only a low level of infection was detected in these species, it could facilitate viral recombination or help to maintain the viral load in the vector.

P. betae cycle

The viruses transmitted by *Polymyxa* spp. are internalised by the vector (Chen *et al.* 1991; Rysanek *et al.* 1992; Campbell 1996; Verchot-Lubicz *et al.* 2007). The biological cycle of the viral diseases they transmit thus depends on the vectors life cycle (Fig. 5). This vectors great capacity for survival explains, firstly, the recurrence of viral diseases in contaminated fields and, secondly, their dissemination either through the soil adhering to agricultural machinery and produce or via drainage and irrigation water. In the absence of host plant radicles, *P. betae* survives in the soil in the form of sporosores (which may be viruliferous). Sporosores are spore clusters of 5 to 7 µm in diameter with a very thick, strong wall that can live for many years in the soil (Adams 1990; Maraitte 1991). In the presence of host plants, resting spore germination releases biflagellated zoospores 4-5 µm in size which move through the free water in the soil before encysting on a root hair or epidermal cell of a host plant root. In order to penetrate the cell, a dagger-like structure called "Stachel (sting)" is formed in the encysted zoospore (Keskin and Fuchs 1969) and a sticky tube develops between the cyst and the plant cell wall. The Stachel, which is injected into the host cell through the tube, pierces the cell wall and the plasma membrane and allows the zoospore content to be transferred into the cytoplasm of the host cell (Barr 1988). Cruciform nuclear divisions indicative of mitosis lead to the formation of a multinucleate plasmodium surrounded by a thin membrane. In the sporangial phase this plasmodium develops into a multi-lobed zoosporangium enclosed by a thin wall within which the secondary zoospores are formed. The latter are released outside the root, or sometimes into the deeper root cells, by small plasmodial cells, which dissolve a hole in the cell wall (Barr 1988). In the sporogenic phase non-cruciform nuclear divisions are observed, with the formation of synaptonemal complexes characteristic of meiosis (Braselton 1988). The plasmodium divides into mononucleate cells by forming membrane layers within the cytoplasm. A four to five-layer wall is then deposited between the cells, with adjacent spores remaining connected by bonds between the two outermost layers

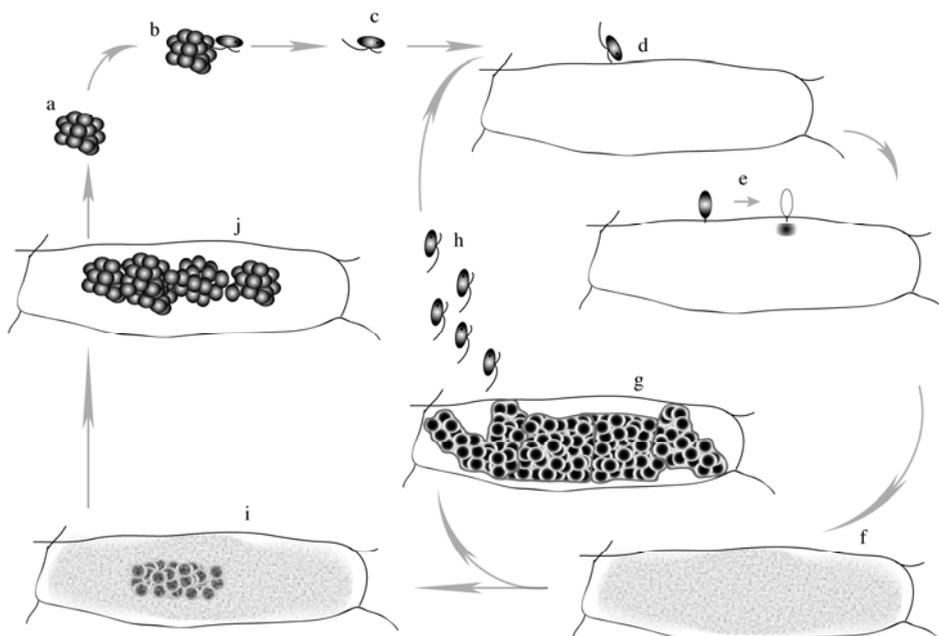


Fig. 5 Drawing of the *Polymyxa* spp. life cycles and its developing states. (a) sporosore; (b) germinating zoospore; (c), swimming zoospore to a (d) cortical or epidermal cell; (e) the zoospore encyst on the cell and injects its contents through the cell wall and the cellular membrane via the "satchel"; (f), developing plasmodium that will tend to a zoosporangium (g) that will issue either (h) the secondary zoospores able to infect new cells or (i) to the sporogenous plasmodium (j) leading to new sporosores. Such sporosores will be further released in soil after root decomposition.

(Chen *et al.* 1998). The sporosores formed remain in the root debris and are released into the soil by root decomposition. Within this life cycle the moments of cell fusion and karyogamy have not yet been pinpointed. Observation of double size quadriflagellate zoospores (Ledingham 1939) suggests fusion of two zoospores, but the moment of nuclear fusion is not known. The determinants for development of the various phases are likewise unknown (Braselton 1995). However, the host and the degree of root colonisation appear to be significant (Legrève *et al.* 1998). Three conditions are essential for root infection by this parasite: (1) presence of a host plant; (2) presence of free water in the soil to promote germination and facilitate zoospore access to the roots, and (3) a sufficiently high temperature between 10 and 30°C, ideally between 20 and 25°C according to the origin of the strains (Legrève *et al.* 1998 ; Webb *et al.* 2000). Hot, wet springs are therefore propitious to early infections, as are light, sandy, well-drained soils as these heat up faster than heavy organic soils with high retention capacity (Webb *et al.* 2000). The soil pH and calcium content also affect vector activity. Spore germination and root infection by zoospores are affected by acid pH conditions (Abe and Tamada 1987). They are promoted in neutral or alkaline pH soils, especially if the calcium and magnesium levels are greater than 350 and 20 mg/100 g of soil respectively (Goffart and Maraité 1991). Managed liming and practices for regulating soil pH and calcium levels would probably result in better control of rhizomania.

Vector detection

Plant infection by *P. betae* is not apparent from any particular symptoms. Until the early 1990s this parasite was detected in roots by observing the roots under the microscope following colouring with Lactophenol Cotton Blue. This fairly laborious method was initially used to study the vectors ecological requirements and the soil infectious potential levels by the most probable number technique, growing trap crops on soil dilutions (Tuitert 1990). Molecular techniques (DNA probes, PCR, nested PCR, ELISA) have greatly facilitated rapid detection of *P. betae* in roots and even in soil (Mutasa *et al.* 1996; Kingsnorth *et al.* 2003; Ward *et al.* 2005). Multiplex RT-PCR enables the presence of *P. betae*, BNYVV, BSBV and BVQ to be revealed in a single test using a root RNA extract (Meunier *et al.* 2003).

Virus-vector interactions

Modes of virus acquisition and transmission by plasmodiophorids have been described (Rochon *et al.* 2004). These viruses survive in the spores in a form that has not yet been clarified. However, accumulated RNA and movement proteins of *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) and capsid proteins of *Wheat spindle streak virus* (WSSMV) within the resting spores of the vector, *P. graminis*, probably denote the presence of ribonucleoprotein complexes (Driskel *et al.* 2004). In the case of BNYVV, both the sporosores and the plasmodia of *P. betae* are labelled using antibodies against the viral capsid protein (Doucet 2006). Structural and non-structural proteins have been detected in *P. betae* spores and zoospores. These results suggest that this vector could also be a BNYVV host (Verchot-Lubicz *et al.* 2007).

When transmitted by the viruliferous zoospores, the virus is present in particle form. Virus transmission by plasmodiophorids was for many years regarded as a passive mechanism, which occurred during mixing of plant cell cytoplasts and the protozoan, prior to membrane formation (Campbell 1996). However, recent research has revealed the special role played by some viral proteins in the process of transmission by the vector. The BNYVV capsid protein readthrough (RT) domain plays an important part in the transmission process, since deletions in the C-terminal portion of this domain are correlated to loss of virus transmission. Substituting the four KTER amino acids located in position 553 to 556 of the RT domain by the ATAR motif completely blocks transmission (Tamada *et al.* 1996). A comparative analysis of the viral genomes transmitted by plasmodiophorids, which do not have the same genomic organisation, has identified the presence of two complementary transmembrane domains in the RT domains of the capsid protein of *Beny-*, *Furo-* and *Pomovirus* and in the P2 proteins of *Bymovirus* (Adams *et al.* 2001). Deletion or substitution of the second domain also blocks transmission by the vector. The molecular model is not yet detailed, but the transmembrane helical sequences may perhaps determine a particular structure facilitating membrane invagination and virus movement through the membrane of the vector (Adams *et al.* 2001). Although the molecular mechanism of the interaction is far from fully explained, the involvement of protein p31, coded by RNA-4, is strongly suspected. Two independent studies of comparative transmission of wild or mutated viruses in the coding sequence for protein p31 have in fact shown a big decrease in protein p31 mutant transmission (Rahim *et al.* 2007) (Anne Legrève, pers. comm.). In addition to its role in transmission, protein p31 is also thought to play a part both in inducing symptoms in *Nicotiana benthamiana* and in suppressing RNA silencing in roots, without affecting viral RNA accumulation (Rahim *et al.* 2007).

Genetic resistance strategies used against rhizomania disease

One of the major goals of the sugar beet industry is to stabilize the sugar yields. Due to the large area covered by rhizomania infested fields, calculated to span *approx.* 610,000 ha in 2000 (Richard-Molard and Carriolle 2001), a qualitative and quantitative high yielding sugar beet production is only given by growth of resistant cultivars. Since the first attempts in achieving rhizomania resistant breeding material, resistance sources were found in germplasms or wild type *B. vulgaris* ssp. *maritima*, which all confer phenotypes of quantitative resistance (**Table 2**). Involvement of additional minor genes for the expression of the rhizomania resistance trait is most likely (Biancardi *et al.* 2002). Nowadays, hybrid varieties (**Table 2**) that do not or poorly develop symptoms, display reduced virus content have replaced susceptible varieties.

The first selection of partial resistant BNYVV sugar beet genotypes started at the end of the seventies. Sugar beets characterized by reduced virus symptoms, increased white sugar content and increased processing quality were subsequently selected (De Biaggi 1987; Lewellen *et al.* 1987). Although these sugar beet genotypes were also in-

Table 2 Characteristics of the *Rz* resistance genes and transgenic sequences (underlined) used in sugar beet crops. All *Rz* genes are located on Chr. III; PDR: pathogen-derived resistance.

Hybrid variety	Origin	Resistance gene	Nature	Resistance level
Holly	<i>B. vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i> (California)	<i>Rz1</i>	Dominant	Low < good depending on inoculum
WB42	<i>B. vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i> (Denmark)	<i>Rz2</i>	Dominant	<i>Rz2</i> > <i>Rz1</i>
WB41	<i>B. vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i> (Denmark)	<i>Rz3</i>	Partially dominant Allelic to <i>Rz2</i> ?	Variable
R36	<i>B. vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i>	<i>Rz4</i>	Allelic to other <i>Rz</i> ?	Partial resistance
4D6834	<i>B. vulgaris</i>	<i>Movement protein</i>	PDR	Excellent
G018	<i>B. vulgaris</i>	<i>Replicase</i>	PDR/PTGS	Excellent
-	<i>B. vulgaris</i>	<i>CP</i>	PDR	Good

fectured with BNYVV, the symptoms were less pronounced and plants displayed a better performance in field trials (Bürcky 1987). In 1983, the US-American Holly Sugar Company identified the "Holly" resistance representing the first described BNYVV resistance source (Lewellen *et al.* 1987; Biancardi *et al.* 2002). 'Holly' carries the resistance gene *Rz*, which was renamed *Rz1* (Scholten *et al.* 1999). Holly does not show rhizomania symptoms, but allows the virus to replicate as shown by the viral titer contents in such varieties (Scholten and Lange 2000). 'Rizor' was the first diploid hybrid partially resistant to rhizomania (Richard-Molard 1985; De Biaggi 1987). In the eighties, further resistance sources were identified in Danish tests of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.) Arcang wild-beet germplasms leading to WB41 and WB42 sources (Table 2) representing *Rz3* and *Rz2* resistance genes, respectively (Lewellen *et al.* 1987; Whitney 1989). Greenhouse tests performed applying severe infestation conditions have revealed the better performance of *Rz2* versus *Rz1* resistance genes suggesting a different origin of both genes (Scholten *et al.* 1999). However, these genes are present within ChrIII at a distance range of 20 cM (Scholten *et al.* 1994; Scholten *et al.* 1999) to 35 cM (Amiri *et al.* 2003). *Rz3* resistance gene (Table 2) has been also mapped on ChrIII at about 5 cM from *Rz1*, suggesting that *Rz2* and *Rz3* might be allelic (Gidner *et al.* 2005). Recently, the use of the hybrid line R36 permitted the identification of a new QTL named *Rz4* (Table 2), which confers partial resistance to BNYVV infection (Grimmer *et al.* 2007). *Rz1* or *Rz2* carrying cultivars reduce viral titer up to 6.10⁴ fold when compared to susceptible lines (Acosta-Leal *et al.* 2008). However, their systematic use might favor genetic drift of viral population that seems to accumulate nucleotide variation twice rapidly, leading to high probability for the emergence of RB isolates (Acosta-Leal *et al.* 2008).

Growing of BNYVV resistant sugar beet cultivars is generally accepted as the only strategy to keep sugar beet cultivation in infested fields profitable. Reports about increased aggressiveness of BNYVV P-type (France) and appearance of new BNYVV A-types (USA: Imperial Valley, California and Minnesota) have been published (Liu *et al.* 2005; Liu and Lewellen 2007). These interesting studies show the viral overcome of *Rz1* carrying cultivars in the field and measure increased BNYVV levels in hair-roots of *Rz1* plants in greenhouse resistance tests.

Artificially generated resistance represents an alternative to the natural resistance (Table 2). The transgenic expression of virus-derived sequences that form double-stranded RNA (dsRNA) has been obtained and lead to BNYVV resistance (Lennfors *et al.* 2008). Expression of dsRNA induces RNA silencing (Baulcombe 2004, 2005; Filipowicz *et al.* 2005), an innate defense mechanism against invasive nucleic acids that leads to the sequence specific degradation of RNA. High levels of resistance to rhizomania were obtained in sugar beets expressing a 0.4 kb inverted repeat construct based on a partial BNYVV replicase gene derived sequence (Table 2) (Lennfors *et al.* 2008).

Transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein (Scholten and Lange 2000), or a mutated form of one of the tree movement protein TGB-p3 (Lauber *et al.* 2001) or the sequence derived from RNA-1 (Lennfors *et al.* 2006) both generate higher protection levels than *Rz1*.

CONCLUSIONS

BNYVV RNA-3 and in particular the p25 protein constitutes the rhizomania disease keystones. New emerging isolates tend to bypass resistance genes by the modification of the p25 gene sequence. Sequence variations within p25 combined with the post-translational modifications make the study of this protein rather difficult. Further studies will aim to characterize the major functions of p25 protein and the cellular genes involved in the root proliferation and the parasitic infection. Thereby, such studies will be performed within and out viral context. The characterization of the

p25-deregulated cellular functions should allow the identification of cellular markers that in term could help breeders for the selection of resistant crops. Before the extensive use of such new resistant varieties, prophylactic treatments are used to limit the infection. Indeed, the presence of *P. betae* in soils, crop transportation and scattering of soil by the mean of farming activities are the main factors that ensure the persistence and the spread of the virus. Even with some adapted crop rotations, the presence of highly resistant viruliferous vector spores prevents any reduction of the infection. Soil fumigation with methyl bromide reduces inoculum intensity but the Montreal protocol prevents its use as it depletes the ozone layer. Crop selection and the use of new tolerant varieties having many resistant genes (i.e. for the virus and the vector) and also the use of efficient pathogen-derived resistance may represent the most powerful alternative to grow sugar beet and maintain sugar yields.

ACKNOWLEDGEMENTS

C.P. and K.H. contributed equally to this review. C.P was supported by SESVanderHave under a CIFRE program, K.H. was supported by a Franco-Syrian grant. The authors thank reviewers and Prof. Dr. Mark Varrelmann for their critical reading and comments.

REFERENCES

- Abe H, Tamada T (1986) Association of *Beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Polymyxa betae* keskin strains in rhizomania infested soils of sugar beet in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **52**, 235-247
- Abe H, Tamada T (1987) A test tube culture system for multiplication of *Polymyxa betae* and *Beet necrotic yellow vein virus* in rootlets of sugar beet. In: *Proceedings of the Sugar Beet Research Association, Date and location of meeting*, Japan, pp 34-38
- Acosta-Leal R, Fawley MW, Rush CM (2008) Changes in the intrasolate genetic structure of beet necrotic yellow vein virus populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* **376**, 60-68
- Acosta-Leal R, Rush CM (2007) Mutations associated with resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and their allelic discrimination using taqman technology. *Phytopathology* **97**, 325-330
- Adams MJ (1990) Epidemiology of fungally-transmitted viruses. *Soil Use and Management* **6**, 184-189
- Adams MJ, Antoniw JF, Mullins JG (2001) Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane regions of virus-encoded proteins. *Archives of Virology* **146**, 1139-1153
- Amiri R, Moghaddam M, Mesbah M, Sadeghian SY, Ghannadha MR, Izadpanah K (2003) The inheritance of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*, accession wb42: statistical comparisons with holly-1-4. *Euphytica* **132**, 363-373
- Archibald JM, Keeling PJ (2004) Actin and ubiquitin protein sequences support a cercozoan/foraminiferan ancestry for the plasmodiophorid plant pathogens. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **51**, 113-118
- Balmori E, Gilmer D, Richards K, Guilley H, Jonard G (1993) Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* **75**, 517-521
- Barr DJS (1988) Zoospore plant parasites as fungal vectors of viruses: Taxonomy and life cycles of species involved. In: Cooper JI, Asher MJ (Eds) *Developments in Applied Biology II Viruses with Fungal Vectors*, Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, pp 123-137
- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363
- Baulcombe D (2005) RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 290-293
- Biancardi E, Lewellen RT, Biaggi MD, Erichsen AW, Stevanato P (2002) The origin of rhizomania resistance in sugarbeet. *Euphytica* **127**, 383-397
- Bouzoubaa S, Niesbach-Klosgen U, Jupin I, Guilley H, Richards K, Jonard G (1991) Shortened forms of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 and -4: Internal deletions and a subgenomic RNA. *Journal of General Virology* **72**, 259-266
- Bouzoubaa S, Quillet L, Guilley H, Jonard G, Richards K (1987) Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-1. *Journal of General Virology* **68**, 615-626
- Braselton JP (1988) Karyology and systematics of plasmodiophoromycetes. In: Cooper JI, Asher MJ (Eds) *Developments in Applied Biology II Viruses with Fungal Vectors*, Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, pp 139-152
- Braselton JP (1995) Current status of the plasmodiophorids. *Critical Review in Microbiology* **21**, 263-275
- Bürcky K (1987) BNYVV-resistenz indizierende merkmale und deren mögliche nützung zur selektion rizomaniatoleranter zuckerrüben. In: Interna-

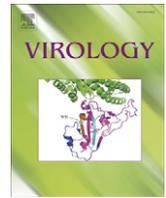
- tional Institute for Beet Research (IIBR) (Ed) *Proceedings of the 50th Congress of the IIRB, date and location of meeting*. IIRB, Brussels, pp 3-7
- Campbell RN** (1996) Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 87-108
- Canova A** (1959) On the pathology of sugarbeet. *Informatore Fitopatologico* **9**, 390-396
- Chen JP, Swaby AG, Adams MJ, Ruan YL** (1991) Barley mild mosaic-virus inside its fungal vector, *Polymyxa graminis*. *Annals of Applied Biology* **118**, 615-621
- Chen JP, Wang ZQ, Hong J, Collier CR, Adams MJ** (1998) Ultrastructural studies of resting spore development in *Polymyxa graminis*. *Mycological Research* **102**, 687-691
- Dawei L, Jialin Y, Chenggui H, Tao L, Shucui Q, Koenig R, Yi L** (1999) Detection and nucleotide analysis of RNA5 of beet necrotic yellow vein virus isolated in China. *Chinese Journal of Biotechnology* **15**, 253-257
- De Biaggi M** (1987) Méthodes de sélection, un cas concret. In: International Institute for Beet Research (IIBR) (Ed) *Proceedings of the 50th Congress of the IIRB, date of meeting*. IIRB, Brussels, pp 157-163
- Domingo E** (2000) Viruses at the edge of adaptation. *Virology* **270**, 251-253
- Drake JW, Holland J** (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 13910-13913
- Driskel BA, Doss P, Littlefield LJ, Walker NR, Verchot-Lubicz J** (2004) Soilborne wheat mosaic virus movement protein and RNA and wheat spindle streak mosaic virus coat protein accumulate inside resting spores of their vector, *Polymyxa graminis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 739-748
- Dunoyer P, Pfeffer S, Fritsch C, Hemmer O, Voinnet O, Richards KE** (2002) Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by *Peanut clump virus*. *The Plant Journal* **29**, 555-567
- Erhardt M, Dunoyer P, Guilley H, Richards K, Jonard G, Bouzoubaa S** (2001) Beet necrotic yellow vein virus particles localize to mitochondria during infection. *Virology* **286**, 256-262
- Erhardt M, Morant M, Ritzenthaler C, Stussi-Garaud C, Guilley H, Richards K, Jonard G, Bouzoubaa S, Gilmer D** (2000) P42 movement protein of *Beet necrotic yellow vein virus* is targeted by the movement proteins p13 and p15 to punctate bodies associated with plasmodesmata. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 520-528
- Erhardt M, Vetter G, Gilmer D, Bouzoubaa S, Richards K, Jonard G, Guilley H** (2005) Subcellular localization of the triple gene block movement proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* by electron microscopy. *Virology* **340**, 155-166
- Fares MA, Moya A, Escarmis C, Baranowski E, Domingo E, Barrio E** (2001) Evidence for positive selection in the capsid protein-coding region of the Foot-and-mouth disease virus (FMDV) subjected to experimental passage regimens. *Molecular Biology and Evolution* **18**, 10-21
- Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS** (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 331-341
- Gidner S, Lennefors BL, Nilsson NO, Bensefelt J, Johansson E, Gyllenspetz U, Kraft T** (2005) QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* **48**, 279-285
- Gilmer D, Allmang C, Ehresmann C, Guilley H, Richards K, Jonard G, Ehresmann B** (1993) The secondary structure of the 5'-noncoding region of beet necrotic yellow vein virus RNA 3: Evidence for a role in viral RNA replication. *Nucleic Acids Research* **21**, 1389-1395
- Gilmer D, Bouzoubaa S, Hehn A, Guilley H, Richards K, Jonard G** (1992a) Efficient cell-to-cell movement of *Beet necrotic yellow vein virus* requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* **189**, 40-47
- Gilmer D, Richards K, Jonard G, Guilley H** (1992b) Cis-active sequences near the 5'-termini of beet necrotic yellow vein virus RNAs 3 and 4. *Virology* **190**, 55-67
- Goffart JP, Maraite H** (1991) Soil and agronomic factors affecting the inoculum potential of *Polymyxa betae* keskin in Belgium. *Parasitica* **47**, 165-192
- Grimmer M, Trybush S, Hanley S, Francis S, Karp A, Asher M** (2007) An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus*. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 1151-1160
- Haerberle AM, Stussi-Garaud C** (1995) In situ localization of the non-structural protein p25 encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Journal of General Virology* **76**, 643-650
- Haerberle AM, Stussi-Garaud C, Schmitt C, Garaud JC, Richards KE, Guilley H, Jonard G** (1994) Detection by immunogold labelling of p75 readthrough protein near an extremity of beet necrotic yellow vein virus particles. *Archives of Virology* **134**, 195-203
- Harju VA, Mumford RA, Bockley A, Boonham N, Clover GRG, Weekes R, Henry CM** (2002) Occurrence in the united kingdom of beet necrotic yellow vein virus isolates which contain RNA 5. *Plant Pathology* **X**, 811
- Hehn A, Bouzoubaa S, Bate N, Twell D, Marbach J, Richards K, Guilley H, Jonard G** (1995) The small cysteine-rich protein p14 of *Beet necrotic yellow vein virus* regulates accumulation of RNA 2 in cis and coat protein in trans. *Virology* **210**, 73-81
- Hehn A, Fritsch C, Richards KE, Guilley H, Jonard G** (1997) Evidence for *in vitro* and *in vivo* autocatalytic processing of the primary translation product of beet necrotic yellow vein virus RNA 1 by a papain-like proteinase. *Archives of Virology* **142**, 1051-1058
- Heijbroek W, Musters PMS, Schoone AHL** (1999) Variation in pathogenicity and multiplication of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in relation to the resistance of sugarbeet cultivars. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 397-405
- Jupin I, Guilley H, Richards KE, Jonard G** (1992) Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *The EMBO Journal* **11**, 479-488
- Jupin I, Richards K, Jonard G, Guilley H, Pleij CW** (1990) Mapping sequences required for productive replication of beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Virology* **178**, 273-280
- Keskin B** (1964) *Polymyxa betae* n.Sp., a parasite in the roots of *Beta vulgaris* tournefort, particularly during the early growth of the sugar beet. *Archiv für Mikrobiologie* **19**, 348-374
- Keskin B, Fuchs WH** (1969) The process of infection by *Polymyxa betae*. *Archiv für Mikrobiologie* **68**, 218-226
- Kiguchi T, Saito M, Tamada T** (1996) Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* and the identity of a deletion mutant. *Journal of General Virology* **77**, 575-580
- Kingsnorth CS, Asher MJC, Keane GJP, Chwarszczynska DM, Luterbacher MC, Mutasa-Gottgens ES** (2003) Development of a recombinant antibody ELISA test for the detection of *Polymyxa betae* and its use in resistance screening. *Plant Pathology* **52**, 673-680
- Klein E, Link D, Schirmer A, Erhardt M, Gilmer D** (2007) Sequence variation within beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Research* **126**, 53-61
- Koenig R, Haerberle AM, Commandeur U** (1997) Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugar-beet growing area in Europe. *Archives of Virology* **142**, 1499-1504
- Koenig R, Jarausch W, Li Y, Commandeur U, Burgermeister W, Gehrke M, Luddecke P** (1991) Effect of recombinant *Beet necrotic yellow vein virus* with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *Journal of General Virology* **72**, 2243-2246
- Koenig R, Lennefors BL** (2000) Molecular analyses of european A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Archives of Virology* **145**, 1561-1570
- Koenig R, Luddecke P, Haerberle AM** (1995) Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology* **76**, 2051-2055
- Kruse M, Koenig R, Hoffmann A, Kaufmann A, Commandeur U, Solovyev AG, Savenkov I, Burgermeister W** (1994) Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Virology* **75**, 1835-1842
- Lauber E, Guilley H, Richards K, Jonard G, Gilmer D** (1997) Conformation of the 3'-end of beet necrotic yellow vein virus RNA 3 analysed by chemical and enzymatic probing and mutagenesis. *Nucleic Acids Research* **25**, 4723-4729
- Lauber E, Guilley H, Tamada T, Richards KE, Jonard G** (1998) Vascular movement of *beet necrotic yellow vein virus* in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *Journal of General Virology* **79**, 385-393
- Lauber E, Janssens L, Weyens G, Jonard G, Richards KE, Lefebvre M, Guilley H** (2001) Rapid screening for dominant negative mutations in the beet necrotic yellow vein virus triple gene block proteins p13 and p15 using a viral replicon. *Transgenic Research* **10**, 293-302
- Lauber E, Jonard G, Guilley H, Gilmer D** (1999) Effects of structural modifications upon the accumulation *in planta* of replicons derived from beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Archives of Virology* **144**, 1201-1208
- Ledingham GA** (1939) Studies of *Polymyxa graminis*, n. Gen. N. Sp., a plasmodiophoraceous root parasite of wheat. *Canadian Journal of Research* **17**, 38-51
- Lee L, Telford EB, Batten JS, Scholthof KB, Rush CM** (2001) Complete nucleotide sequence and genome organization of *Beet s oilborne mosaic virus*, a proposed member of the genus *Benyvirus*. *Archives of Virology* **146**, 2443-2453
- Legrève A, Delfosse P, Maraite H** (2002) Phylogenetic analysis of polymyxa species based on nuclear 5.8s and internal transcribed spacers ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* **106**, 138-147
- Legrève A, Delfosse P, Vanpee B, Goffin A, Maraite H** (1998) Differences in temperature requirements between *Polymyxa* sp. of Indian origin and *Polymyxa graminis* and *Polymyxa betae* from temperate areas. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 195-205
- Legrève A, Schmitz JF, Bragard C, Maraite H** (2005) The role of climate and alternative hosts in the epidemiology of rhizomania. In: Rush CM (Ed) *International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, date and location of meeting*. American Society of Sugar Beet Technologists, Bologna, Italy, pp 125-128
- Legrève A, Vanpee B, Delfosse P, Maraite H** (2000) Host range of tropical

- and sub-tropical isolates of *Polymyxa graminis*. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 379-389
- Lennefors BL, Lindsten K, Koenig R** (2000) First record of A and B type *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets in Sweden. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 199-201
- Lennefors BL, Savenkov EI, Bensefelt J, Wremerth-Weich E, Roggen P, Tuvesson S, Valkonen JP, Gielen J** (2006) DsRNA-mediated resistance to beet necrotic yellow vein virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*). *Molecular Breeding* **18**, 313-325
- Lennefors BL, van Roggen PM, Yndgaard F, Savenkov EI, Valkonen JP** (2008) Efficient dsRNA-mediated transgenic resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets is not affected by other soilborne and aphid-transmitted viruses. *Transgenic Research* **17**, 219-228
- Lewellen RT, Skoyen IO, Erichsen AW** (1987) Breeding sugar beet for resistance to rhizomania: Evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance. In: International Institute for Beet Research (IIBR) (Ed) *Proceedings of the 50th Congress of the IIBR, date of meeting*, IIBR, Brussels, pp 139-156
- Link D, Schmidlin L, Schirmer A, Klein E, Erhardt M, Geldreich A, Lemaire, Gilmer D** (2005) Functional characterization of the beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: Evidence for structural pathogenicity determinants. *Journal of General Virology* **86**, 2115-2125
- Liu H-Y, Lewellen RT** (2007) Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* in the United States. *Plant Disease* **91**, 847-851
- Liu HY, Sears JL, Lewellen RT** (2005) Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. *Plant Disease* **89**, 464-468
- Maraite H** (1991) Transmission of viruses by soil fungi. In: Beemster ABR, Bollen GH, Gerlagh M, Ryuissen MA, Schippers B, Tempels A (Eds) *Developments in Agricultural and Managed-Forest Ecology: Biotic Interactions and Soil-Borne Diseases*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, NL, pp 67-82
- Meunier A, Schmit JF, Stas A, Kutluk N, Bragard C** (2003) Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soilborne virus*, and *Beet virus Q* and their vector *Polymyxa betae* keskin on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 2356-2360
- Miyamishi M, Kusume T, Saito M, Tamada T** (1999) Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA 5. *Archives of Virology* **144**, 879-892
- Morozov SY, Solov'yev AG** (2003) Triple gene block: Modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology* **84**, 1351-1366
- Mutasa ES, Chwarszczynska DM, Asher MJ** (1996) Single-tube, nested PCR for the diagnosis of *Polymyxa betae* infection in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. *Phytopathology* **86**, 493-497
- Niesbach-Klosgen U, Guilley H, Jonard G, Richards K** (1990) Immunodetection *in vivo* of beet necrotic yellow vein virus-encoded proteins. *Virology* **178**, 52-61
- Pollini CP, Giunchedi L** (1989) Comparative histopathology of sugar beets that are susceptible and partially resistant to rhizomania. *Phytopath. Medit.* **28**, 16-21
- Pollini CP, Masia A, Giunchedi L** (1990) Free indole-3-acetic acid in sugar-beet root of rhizomania-susceptible and moderately resistant cultivars. *Phytopath. Medit.* **29**, 191-195
- Putz C** (1977) Composition and structure of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Virology* **35**, 397-401
- Quillet L, Guilley H, Jonard G, Richards K** (1989) *In vitro* synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* **172**, 293-301
- Rahim MD, Andika IB, Han C, Kondo H, Tamada T** (2007) RNA4-encoded p31 of *Beet necrotic yellow vein virus* is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *Journal of General Virology* **88**, 1611-1619
- Richard-Molard M** (1985) Rhizomania: A world-wide danger to sugar beet. *Span* **28**, 92-94
- Richard-Molard M, Carriolle M** (2001) Biotic and abiotic stress and genetic improvement in France. In: International Institute for Beet Research (IIBR) (Ed) *Proceedings of the 6th Congress of the IIBR, date and location of meeting*, IIBR, Brussels, pp 153-158
- Rochon D-A, Kakani K, Robbins M, Reade R** (2004) Molecular aspects of plant virus transmission by ophioidium and plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 211-241
- Rush CM** (2003) Ecology and epidemiology of *Benyviruses* and plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 567-592
- Rysanek P, Stocky G, Haeberle AM, Putz C** (1992) Immunogold labelling of beet necrotic yellow vein virus particles inside its fungal vector, *Polymyxa betae* k. *Agronomie* **12**, 651-659
- Schirmer A, Link D, Cognat V, Moury B, Beuve M, Meunier A, Bragard C, Gilmer D, Lemaire O** (2005) Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *Journal of General Virology* **86**, 2897-2911
- Schmidlin L, Link D, Mutterer J, Guilley H, Gilmer D** (2005) Use of a beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *Journal of General Virology* **86**, 463-467
- Schmitt C, Balmori E, Jonard G, Richards KE, Guilley H** (1992) *In vitro* mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA 2: Evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**, 5715-5719
- Scholten OE, Bock TSMD, Klein-Lankhorst RM, Lange W** (1999) Inheritance of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus* in *Beta vulgaris* conferred by a second gene for resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 740-746
- Scholten OE, Lange W** (2000) Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. *Euphytica* **112**, 219-231
- Scholten OE, Paul H, Peters D, Van Lent JW, Goldbach RW** (1994) *In situ* localisation of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in rootlets of susceptible and resistant beet plants. *Archives of Virology* **136**, 349-361
- Sohi H, Maleki M** (2004) Evidence for presence of types A and B of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Iran. *Virus Genes* **29**, 353-358
- Steven A, Trus B, Putz C, Wurtz M** (1981) The molecular organization of *Beet necrotic yellow vein virus*. *Virology* **113**, 428-438
- Suarez MB, Grondona I, Garcia-Benavides P, Monte E, Garcia-Acha I** (1999) Characterization of beet necrotic yellow vein furovirus from Spanish sugar beets. *International Microbiology* **2**, 87-92
- Tamada T** (1999) *Benyviruses*. In: Webster R, Granoff A (Eds) *Encyclopedia of Virology* (2nd Edn), Academic Press, New York, N.Y., pp 154-160
- Tamada T, Abe H** (1989) Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology* **70**, 3391-3398
- Tamada T, Baba T** (1973) *Beet necrotic yellow vein virus* from rhizomania-affected sugar beet in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 325-332
- Tamada T, Schmitt C, Saito M, Guilley H, Richards K, Jonard G** (1996) High resolution analysis of the readthrough domain of beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: A KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology* **77**, 1359-1367
- Tamada T, Shirako Y, Abe H, Saito M, Kigushi T, Harada T** (1989) Production and pathogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different numbers of RNA components. *Journal of General Virology* **70**, 3399-3409
- Tamada T, Uchino H, Kusume T, Saito M** (1999) RNA 3 deletion mutants of *Beet necrotic yellow vein virus* do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* **89**, 1000-1006
- Tuiter G** (1990) Assessment of the inoculum potential of *Polymyxa betae* and *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in soil using the most probable number method. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **96**, 331-341
- Valentin C, Dunoyer P, Vetter G, Schalk C, Dietrich A, Bouzoubaa S** (2005) Molecular basis for mitochondrial localization of viral particles during beet necrotic yellow vein virus infection. *Journal of Virology* **79**, 9991-10002
- Verchot-Lubicz J, Rush C, Payton M, Colberg T** (2007) *Beet necrotic yellow vein virus* accumulates inside resting spores and zoospores of its vector *Polymyxa betae* BNYVV infects *P. betae*. *Virology Journal* **4**, 37
- Vetter G, Hily JM, Klein E, Schmidlin L, Haas M, Merkle T, Gilmer D** (2004) Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *Journal of General Virology* **85**, 2459-2469
- Ward E, Kanyuka K, Motteram J, Korniyukhin D, Adams MJ** (2005) The use of conventional and quantitative real-time PCR assays for *Polymyxa graminis* to examine host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. *New Phytologist* **165**, 875-885
- Ward L, Koenig R, Budge G, Garrido C, McGrath C, Stubbleby H, Boonham N** (2007) Occurrence of two different types of RNA-5-containing *Beet necrotic yellow vein virus* in the UK. *Archives of Virology* **152**, 59-73
- Webb CR, Gilligan CA, Asher MJC** (2000) Modelling the effect of temperature on the development of *Polymyxa betae*. *Plant Pathology* **49**, 600-607
- Weiland JJ, Van Winckle D, Edwards MC, Larson RL, Shelver WL, Freeman TP, Liu H-Y** (2007) Characterization of a US isolate of *Beet black scorch virus*. *Phytopathology* **97**, 1245-1254
- Whitney ED** (1989) Identification, distribution, and testing for resistance to rhizomania in *Beta maritima*. *Plant Disease* **73**, 287-290
- Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Wasson JW, Liu HY, Wintermantel WM** (2003) Interactions between *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet soilborne mosaic virus* in sugar beet. *Plant Disease* **87**, 1170-1175
- Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH** (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and Development* **14**, 3024-3036

- II. Article** « *Beet soil-borne mosaic virus* RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in *Beta macrocarpa* »

Claudio Ratti, Kamal Hleibieh, Laura Bianchi, Audrey Schirmer, Concepcion Rubies Autonell, David Gilmer

Virology **385**, 392-399.



Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in *Beta macrocarpa*

Claudio Ratti^a, Kamal Hleibieh^b, Laura Bianchi^a, Audrey Schirmer^b,
Concepcion Rubies Autonell^a, David Gilmer^{b,*}

^a DISTA-Plant pathology, University of Bologna, Viale G. Fanin, 40-40127 Bologna, Italy

^b Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Integrative virology, Laboratoire propre du CNRS conventionné avec l'Université Louis Pasteur (Strasbourg 1), 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 September 2008
Returned to author for revision
18 November 2008
Accepted 6 December 2008
Available online 13 January 2009

Keywords:

Benyvirus
Structural motifs
Trans-replication
Trans-encapsidation
Competition
Long distance movement

ABSTRACT

Beet soil-borne mosaic virus (BSBMV) and *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) belong to the *Benyvirus* genus. BSBMV has been reported only in the United States, while BNYVV has a worldwide distribution. Both viruses are vectored by *Polymyxa betae* and possess similar host ranges, particle number and morphology. BNYVV and BSBMV are not serologically related but they have similar genomic organizations. Field isolates usually consist of four RNA species but some BNYVV isolates contain a fifth RNA. RNAs 1 and 2 are essential for infection and replication while RNAs 3 and 4 play important roles in plant and vector interactions, respectively. Nucleotide and amino acid analyses revealed that BSBMV and BNYVV are sufficiently different to be classified as two species. Complementary base changes found within the BSBMV RNA-3 5' UTR made it resemble to BNYVV 5' RNA-3 structure whereas the 3' UTRs of both species were more conserved. cDNA clones were obtained, and allowed complete copies of BSBMV RNA-3 to be trans-replicated, trans-encapsidated by the BNYVV viral machinery. Long-distance movement was observed indicating that BSBMV RNA-3 could substitute BNYVV RNA-3 for systemic spread, even though the p29 encoded by BSBMV RNA-3 is much closer to the RNA-5-encoded p26 than to BNYVV RNA-3-encoded p25. Competition occurred when BSBMV RNA-3-derived replicons were used together with BNYVV-derived RNA-3 but not when the RNA-5-derived component was used. Exploitation of the similarities and divergences between BSBMV and BNYVV should lead to a better understanding of molecular interactions between *Benyviruses* and their hosts.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Beet soil-borne mosaic virus (BSBMV) is one of the member of the *Benyvirus* genus together with *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), the causal agent of rhizomania disease, and two other tentative members: *Burdock mottle virus* (BdMV) and *Rice stripe necrosis virus* (RSNV) (Koenig and Lesemann, 2005). In nature, BSBMV and BNYVV are vectored by the protozoa *Polymyxa betae* and have similar host ranges, particle number and morphology. BSBMV was first identified in Texas in 1988 as a sugar beet virus morphologically similar but serologically distinct from BNYVV (Heidel et al., 1997). BSBMV is widely distributed only in the United States and, up to date, has not been reported in other countries. Symptomatic beet plants infected by BSBMV show slight leaf distortion, faint general mottling and light yellow vein banding, which can progress to broad chlorotic areas, associated with the veins. Roots of sugar beets, exhibiting foliar symptoms of BSBMV, are often asymptomatic (Heidel et al., 1997).

The BSBMV genome has been described by Lee et al. (2001) and consists of four capped and polyadenylated RNAs (Lee et al., 2001). RNA-1 is 6683 nucleotides (nts) long and contains a single long ORF encoding a 239 kDa polypeptide that shares amino acid homology with known viral RNA-dependent RNA polymerases (RdRp) and helicases. BSBMV RNA-2 is 4615 nts long and contains six ORFs. The 21 kDa viral capsid protein (CP) ORF is located at the 5'-terminus followed by a leaky UAG stop codon, whose suppression leads to the expression of the 74 kDa readthrough translation product. The next three BSBMV RNA-2 ORFs have motifs typical of triple gene block proteins (TGB) that are required for virus movement and have predicted masses of 42 kDa, 13 kDa, and 15 kDa, respectively. The sixth 14K ORF is similar to the cysteine-rich protein of BNYVV, which regulates RNA-2 and CP accumulation (Hehn et al., 1995; Lee et al., 2001). The 1720 nts BSBMV RNA-3 encodes the 29 kDa ORF that shares 23% amino acid sequence identity with the 25 kDa ORF of BNYVV RNA-3. Lee et al. (2001) described a single putative ORF on the 1203 nts BSBMV RNA-4 with a predicted mass (13 kDa) considerably smaller than the BNYVV 31 kDa RNA-4 product. Thus, sequence analyses of BSBMV RNAs reveal an overall similar genomic organization to that of BNYVV although there are sufficient molecular

* Corresponding author. Fax: +33 388614442/+33 826701099.
E-mail address: david.gilmer@ibmp-ulp.u-strasbg.fr (D. Gilmer).

differences to separate BSMBV and BNYVV in two different species (Lee et al., 2001).

BNYVV was first described in Italy (Canova, 1959) and has since been reported in many other European sugar beet growing areas, as well as in Asia and the United States (Schirmer et al., 2005). Its genome consists of four to five plus-sense RNAs (Tamada, 1999). Within BNYVV isolates, the sequence identity is more than 99%, suggesting a highly conserved genome (Koenig and Lennefors, 2000; Schirmer et al.,

2005). However, some BNYVV types contain a fifth RNA. These isolates are known to be responsible for severe rhizomania symptoms even in resistant varieties (Heijbroek et al., 1999).

Studies of interaction between BNYVV and BSMBV infecting the same beet plant, through mechanical inoculation, showed a high degree of reciprocal cross-protection, a phenomenon that usually occurs between virus strains, suggesting a close relation between the two species (Mahmood and Rush, 1999). However, the absence of

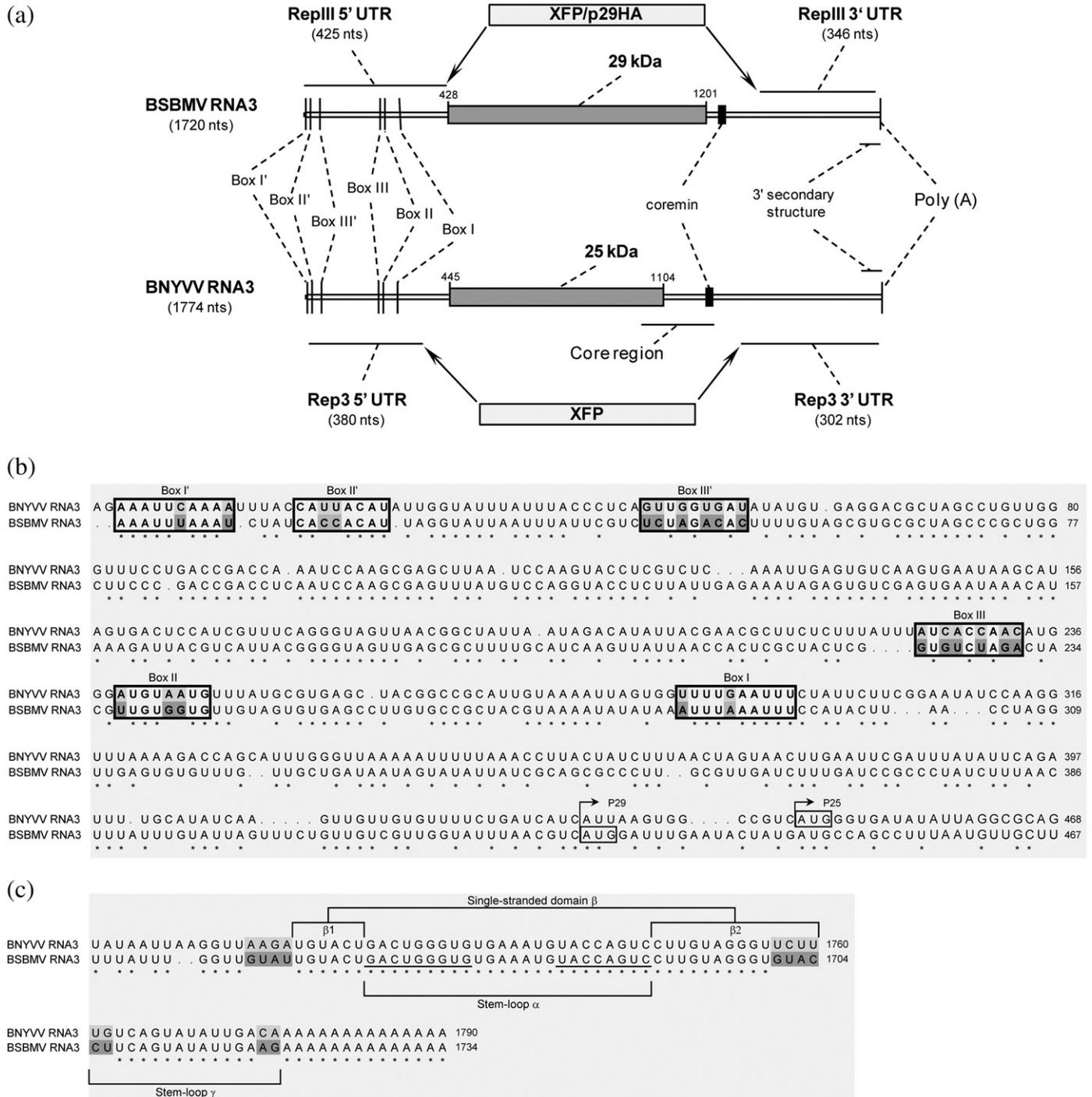


Fig. 1. Schematic representation of the BSBMV and BNYVV RNA-3 and derivatives used (a) and alignment of the 5'(b) and 3'(c)-untranslated terminal regions (UTR) of BNYVV RNA-3 (accession number M36894) and BSBMV RNA-3 (accession number NC_003507). (a) The viral RNA-3s are represented with their coding sequences (shaded squares) and the conserved 20 nts sequence coremin (black box). The UTRs sequences kept for replicons are indicated. (b) The sequences within Box I, II, and III and their complementary sequences Box I', II', and III' are highlighted and in bold lettering. The AUG start codons of BNYVV RNA-3-encoded p25 and BSBMV RNA-3-encoded p29 are boxed and designated by an arrowed box. Nucleotides AG (positions 1 and 2 on M36894 sequence) belong to the cloning vector and not to the viral sequence. Asterisks are used to indicate conserved nucleotides. (c) Conserved 3'-UTR structures α , β and γ proposed for BNYVV RNAs (Lauber et al., 1997) are indicated. Compensatory base variations are indicated by light gray and dark gray shadowing in the BNYVV and the BSBMV sequences, respectively.

immunological cross-reaction between the two viruses, and the susceptibility to BSBMV of plants resistant to BNYVV (Lee et al., 2001; Wisler et al., 2003) indicated that the two viruses are distinct. On the molecular level, sequence alignments have already been performed (Lee et al., 2001). Lower nucleotide sequence identities are found between the 5′ untranslated terminal regions (UTR) of their RNA-3 and RNA-4 (58% and 66%) even if the benyvirus RNA-1 and -2 share more than 80% and 67% sequence identity within their 5′ and 3′ UTRs respectively. 3′ UTRs are better conserved with more than 67% identities (Lee et al., 2001). Analysis of the last 68 residues of the 3′ non-coding region of BSBMV RNAs revealed the conserved UTR structures α , β and γ , proposed for BNYVV RNAs (Laubert et al., 1997).

In our study, complete copies of the BSBMV genomic RNA-3 were obtained and used in recombination experiments. We demonstrate the capability of the BNYVV viral machinery to replicate, encapsidate and spread BSBMV RNA-3 *in planta*. The ability of BSBMV RNA-3 to promote vascular movement of BNYVV was tested onto *Beta macrocarpa*. Finally, a BSBMV RNA-3 based replicon was used for the expression of green (GFP) and red (RFP) fluorescent protein as well as a BSBMV RNA-3-encoded p29 protein fused to a hemagglutinin (HA) tag. These BSBMV replicons, used together with BNYVV RNA-3 and -5 replicons (Schmidlin et al., 2005), revealed specific competition for RNA-3 amplification.

Results

BSBMV and BNYVV present similar structural motifs within 5′ UTR of their RNA-3s

Previous studies demonstrated the role of the first 380 and the last 70 nts of BNYVV RNA-3 for its amplification (Jupin et al., 1990). Secondary structure characterization of the BNYVV RNA-3 5′ UTR in solution revealed short sequences named Box I, II and III that could base-pair to 5′ proximal Box I′, II′ and III′ sequences. These complementary sequences were required for replication (Gilmer et al., 1993; Gilmer et al., 1992b). Sequence alignments between BSBMV and BNYVV 5′ UTRs revealed similar conserved inverted repeat motifs in BSBMV 5′ UTR, where compensatory substitutions maintained base pairing (Figs. 1a and b). Indeed, within Box I′, C to U transition and A to U transversion were accompanied by U to A and G to A base substitutions in Box I. Within Box II′, UU to CC transitions were likewise compensated by AA to GG transitions in Box II. The A to U transversion at the 5′ extremity of Box II was not compensated and in Box III′, six substitutions (i.e. three transitions and three transversions) were found. Compensatory changes were found within Box III.

BSBMV and BNYVV 3′ UTRs share strong sequence and structure similarities

The RNA-3 3′ UTR displayed a strong sequence conservation, which was also found among all BSBMV and BNYVV 3′ extremities. Comparison with BNYVV 3′ secondary structure, which has been previously established by chemical and enzymatic probing (Laubert et al., 1997), revealed that BSBMV RNA-3 3′ UTR maintained base pairing that allow the formation of stem-loop α and γ , with only CA-AG to GU-CU compensatory changes within stem-loop γ (Fig. 1c). Within the single-stranded β domain, a proposed base pairing between the BNYVV sequence ¹⁷¹¹AAGA¹⁷¹⁴ and ¹⁷⁵⁵UCUU¹⁷⁵⁸ was suggested (Laubert et al., 1997). Sequence complementarities between β_1 ¹⁶⁵⁷GUAU¹⁶⁶⁰ and β_2 ¹⁷⁰¹GUAC¹⁷⁰⁴ motifs in BSBMV RNA-3 reinforced this latter hypothesis (Fig. 1c).

BSBMV RNA-3 cDNA clones are infectious in a BNYVV context

The strong structural similarities in BSBMV and BNYVV RNA-3 UTRs led us to investigate the possible amplification of BSBMV RNA-3 by BNYVV replication machinery. To perform such analysis, we obtained

full-length BSBMV RNA-3 cDNA clones. Clones were 1720 bp in length excluding polyA and only 4 nts substitutions were detected, when the sequence was compared with the published BSBMV RNA-3 sequence (Lee et al., 2001). One substitution was found in the 5′ UTR (G³³⁵A) and three in the p29 coding sequence (T⁸⁰⁸A, A⁸⁸⁷G and T¹⁰⁰⁰C) leading, respectively, to D¹²⁷E, N¹⁵⁴D and a silent mutation.

In vitro transcripts produced from plasmid pUC31 were rub-inoculated together with BNYVV RNA-1 and -2 (named Stras12) helper strain transcripts (Quillet et al., 1989) onto host plant leaves. Typical chlorotic spots appeared 7 days post inoculation (dpi) for the Stras12 helper strain but, when BSBMV transcripts were added, severe necrotic spots appeared (data not shown). These symptoms were identical to those obtained when the RNA-5-encoded p26 was expressed (Link et al., 2005). Identical amounts of *C. quinoa* local lesions were collected and both total RNAs and encapsidated viral RNAs were extracted using Trizol reagent and Protocol TM (Jupin et al., 1990) respectively. The appearance of local lesions indicated effective replication and cell-to-cell movement of the viral RNA-1 and -2, whereas distinct symptoms, as compared to Stras12 helper strain, indicate the effective replication and expression of BSBMV RNA-3-encoded protein. This was confirmed by viral RNA detection using BNYVV RNA-1 and -2 specific riboprobes. BSBMV RNA-3 progeny was indeed detected within all inoculated plants (data not shown), indicating the efficient amplification of BSBMV RNA-3 by BNYVV replication complex. Moreover, BSBMV RNA-3 was retrieved after TM extraction protocol, followed by incubation of 30 min at 37 °C. Virus purification (Tamada et al., 1989), confirmed the encapsidation of BSBMV RNA-3 by the BNYVV capsid protein (Fig. 2).

BSBMV RNA-3 supports long-distance movement of BNYVV RNA-1, -2 in B. macrocarpa

In *B. macrocarpa*, BNYVV long distance movement is dependent on the presence of RNA-3 and involves a nucleotide sequence named “core” (Laubert et al., 1998b). Sequence comparisons of BNYVV and BSBMV RNA-3 lead to the identification of a stretch of 22 conserved nts present within the core sequence. We decided to determine if BSBMV RNA-3 could replace BNYVV for long distance movement. To test for such a complementation, ten day-old seedlings were inoculated with Stras12 helper strain supplemented either with BNYVV or BSBMV RNA-3 *in vitro* transcripts. Plants were also inoculated with total RNA extracted from BSBMV infected *C. quinoa* leaves. BSBMV inoculum was free of other beet soil-borne viruses such as BNYVV, *Beet soil-borne virus* or *Beet virus Q* as no signal was obtained after multiplex RT-PCR analyses (Meunier et al., 2003) (data not shown). Except for Stras12, all inoculated leaves showed yellow

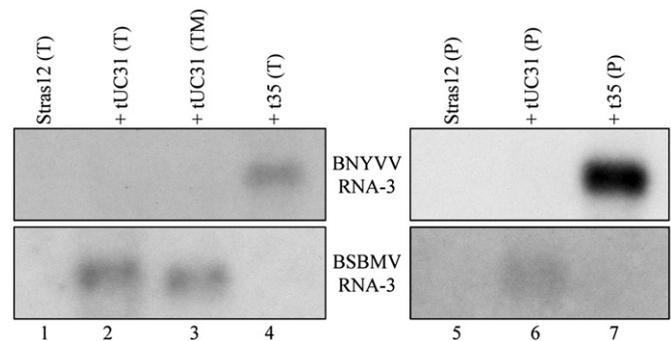


Fig. 2. Northern blot analysis for the presence of encapsidated viral RNA-3s within *C. quinoa* lesions produced 7 dpi by Stras12 helper strain alone (lanes 1 and 5) or supplemented with transcripts of BSBMV RNA-3 (tUC31; lanes 2, 3 and 6) or BNYVV RNA-3 (t35; in lanes 4 and 7). Total RNA (T), RNA extracted using TM protocol (TM) or viral RNA extracted from purified virus (P) were detected using riboprobe complementary to BNYVV RNA-3 (upper panel) or with a randomly primed PCR product specific to BSBMV RNA-3 (lower panel).

symptoms within 5–7 dpi (Table 1). Yellow mosaic symptoms began to appear on systemic leaves 10–14 dpi for Stras12 supplemented with BNYVV RNA-3 and for BSBMV isolate (Table 1). More than 70% of the plants inoculated with Stras12 supplemented with BSBMV RNA-3 presented systemic symptoms 15–22 dpi (Table 1), whereas no symptoms nor viral RNA was detected 40 dpi in the Stras12 inoculated plants (data not shown). At later times, leaf curling and severe dwarf symptoms were also observed for all the systemically infected plants. Therefore although with a 20% lower efficiency (Table 1), BSBMV RNA-3 was able to replace BNYVV RNA-3 to ensure systemic virus spread, (Table 1).

Foreign sequences are successfully expressed by a BSBMV RNA-3 based replicon but competition occurs between different RNA-3 derived species

As performed previously with BNYVV, we constructed a BSBMV expression vector based on RNA-3. For this purpose, pUC31 clone served to produce the pRepIII replicon that contained minimal 5' and 3' UTRs (Fig. 1a). Using specific restriction sites, GFP, RFP and p29-HA sequences were introduced into pRepIII and served as templates for the *in vitro* RNA synthesis of tRepIII-GFP, tRepIII-RFP and tRepIII-P29HA transcripts respectively. These transcripts were inoculated together with Stras12 helper strain onto *C. quinoa* leaves. Green chlorotic local lesions were observed 7 dpi when plants were inoculated with Stras12 isolate alone or in combination with tRepIII-GFP or tRepIII-RFP (Table 2). All lesions from leaves, inoculated in the presence of Stras12 supplemented with RepIII-RFP or RepIII-GFP, contained RFP and GFP proteins (Figs. 3a–d). Necrotic lesions appeared on leaves inoculated with Stras12 supplemented with tRepIII-P29HA. p29HA was detected in all cases (not shown). The necrotic symptoms, produced in the presence of HA-tagged p29, were identical to those obtained when full-length BSBMV t31 transcripts were used (not shown).

Previous analyses revealed competition between BNYVV RNA-3 and RNA-3-derived replicons (Lauber et al., 1999). Therefore, RepIII species were inoculated together with BNYVV full-length RNA-3 or Rep3 in the presence of the BNYVV helper strain supplemented or not with Rep5-GFP (Schmidlin et al., 2005). Depending on the inoculum, typical green chlorotic (CS, Table 2), yellow (YS, Table 2) and necrotic (NS, Table 2) local lesions appeared 7 dpi on leaves.

As yellow symptoms are indicative of the expression of RNA-3-encoded p25 (Jupin et al., 1992) and necrotic lesions indicate the presence of full-length BSBMV (this study), the co-inoculation of RepIII-RFP with either BNYVV RNA-3 or BSBMV RNA-3 lead to the appearance of either yellow or necrotic symptoms, respectively, and the absence of any fluorescence within the lesions (Table 2, Fig. 3e). This suggested competition between full-length RNA-3s and replicon molecules, as already observed in a previous study (Lauber et al., 1999). On the contrary, the addition of Rep5-GFP in this latter combination gave rise to green fluorescence in the yellow local lesions (Fig. 3f), indicating that there was no competition between RNA-5 and RNA-3s. This non-competitive effect of Rep5-GFP with RNA-3 was also

Table 1

Kinetics of appearance of *B. macrocarpa* local and systemic symptoms after the inoculation of BNYVV Stras12 helper strain supplemented with BNYVV RNA-3 transcripts (t35) or BSBMV RNA-3 transcripts (tUC31) compared to wild type BSBMV infection

Inoculum	Symptoms (dpi)		Efficiency of systemic movement (%)
	Local	Systemic	
Stras12	5–7	–	0
Stras12 + t35	5–7	10–14	≥90
Stras12 + tUC31	5–7	15–22	≥70
BSBMV isolate	5–7	10–14	≥90

The efficiency of viral systemic spread corresponds to the average of systemically infected plants versus total inoculated plants. dpi, days post inoculation; –, no virus detection.

Table 2

Summary of the competitive properties of RNA-3 derived RNA as assessed by fluorescence detection and phenotypic characterization

Inoculum (Stras12 supplemented with:)	Fluorescence	Effect
tRepIII-RFP + t35	Nd	Competition: RepIII inhibition, YS
tRepIII-RFP + tUC31	Nd	Competition: RepIII inhibition, NS
tRepIII-RFP + t35 + Rep5-GFP	GFP	Competition: RepIII inhibition, YS
tRepIII-RFP + tRep3 + tRep5-GFP	GFP	Competition: RepIII inhibition, CS
tRepIII-RFP + tRep5-GFP	RFP + GFP	No competition, CS
tRepIII-GFP + tRepIII + tRep3-RFP	Nd	Competition: RepIII-GFP and Rep3-RFP inhibition, CS
tRepIII-GFP + tRep3-RFP	GFP and RFP	Fluorescence sector-like segregation, CS
tRepIII-GFP + tRepIII-RFP	GFP and GFP	Fluorescence torus segregation, CS

C. quinoa local lesions appeared 7 days after the inoculation of the RNA-1 and -2 containing BNYVV helper strain supplemented with BSBMV (tRepIII or tUC31) and/or BNYVV (tRep3, tRep5 or t35) derived RNAs that express green fluorescent (GFP), red fluorescent (RFP) or viral proteins (t35 and tUC31). Rep3 and RepIII correspond to empty viral vectors. Nd, not detected; NS, necrotic spots; YS, yellow spots; CS, chlorotic spots.

true for RepIII-RFP, as all local lesions obtained were positive for both fluorescent proteins (Figs. 3g, h). The presence of both RepIII-GFP and Rep3-RFP in the inoculum led to the appearance of CS lesions, that displayed both green and red fluorescence without overlapping, giving a sector-like fluorescent phenotype (Table 2; Figs. 3i–k). A distinct phenotype appeared when both RepIII-RFP and RepIII-GFP were present in the inoculum. Chlorotic lesions fluoresced in red in the center but this was surrounded by a green fluorescent ring leading to a GFP-torus shaped pattern (Table 2; Figs. 3l–n).

The RNA content within individual local lesions was analyzed by northern blot using specific riboprobes complementary to RNA-1 and -2 (Fig. 4, upper panel), to BNYVV RNA-3 and -5 and BSBMV RNA-3 derived molecules (Fig. 4, middle and lower panel respectively). The overall analysis of northern blot pattern established that no significant inoculum effects upon the BNYVV RNA-1 and -2 accumulations occurred except for lane 7 where lower amounts of RNA were harvested (Fig. 4, upper panel). RepIII amplification within BNYVV context did not interfere with the accumulation of BNYVV RNA 1 and 2, as similar amount of RNAs were detected among total RNA extracts (Fig. 4, e.g. compare lanes 1, 2 and 8). The detection of RepIII-RFP (Fig. 4, lane 2) and RepIII-GFP (Fig. 4, lane 8) confirmed that the fluorescence observed within local lesions was due to replication-competent RepIII RNAs. RepIII-GFP accumulated more than RepIII-RFP (Fig. 4, compare lanes 2 and 8). BSBMV RNA-3, BNYVV RNA-3 as well as Rep5-GFP were detected within the viral progeny whenever the corresponding transcripts were present in the inoculums (Fig. 4, lanes 3 to 7). No RepIII was detected in the presence of full-length RNA-3s (Fig. 4, lanes 3, 4 and 6) or when Rep3 was present (Fig. 4, lane 7). Similarly, BSBMV RepIII inhibited the accumulation of BNYVV Rep3-RFP (Fig. 4, lane 11). Within fluorescent sectoral lesions, both Rep3-RFP and RepIII-GFP RNAs were detected (Fig. 4, lane 9). Finally, RNA content analyses of torus shaped lesions that display both a red and a green fluorescence, revealed the presence of Rep-III species that could not be distinguished by their size (Fig. 4, lane 10).

Discussion

Structural 5' and 3' UTR conservation allow BSBMV replication and encapsidation

Complementation between RNA segments from two RNA viruses with divided genomes is considered to be one of the major criteria for the classification of virus species (Van Regenmortel et al., 1997). In the case of the tripartite RNA genus *Cucumovirus*, RNA-1 and 2, which encode methyltransferase, helicase and polymerase proteins, can be

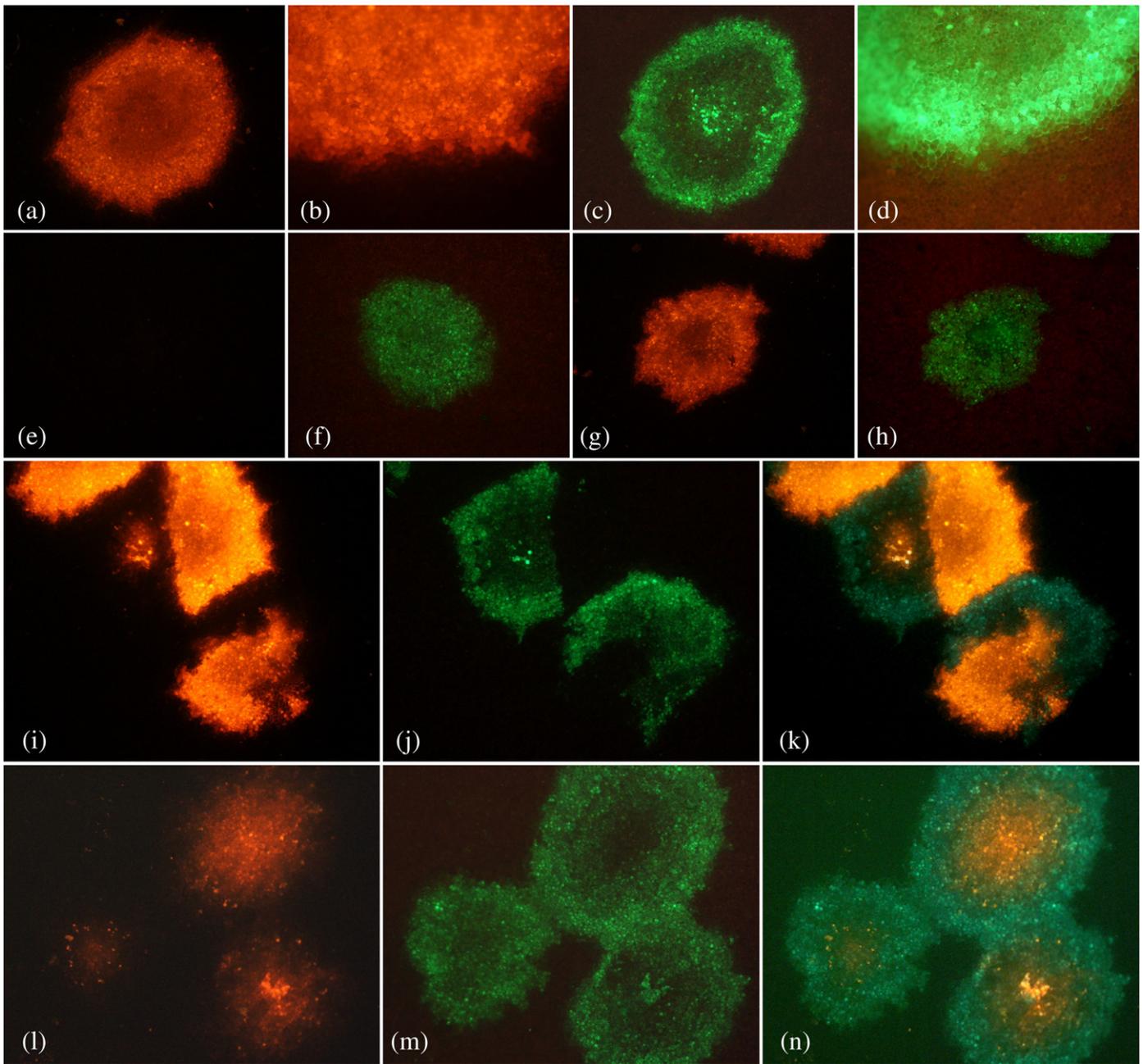


Fig. 3. Fluorescent expression profiles obtained 7 dpi of Stras12 helper strain supplemented with replicon vectors derived from BSBMV or BNYVV RNA-3. Expression of RFP (a, b) and GFP (c, d) from BSBMV RepIII observed within local lesions. When t35 transcripts were coinoculated with RepIII-RFP and Rep5-GFP, RFP expression was not detected (e) whereas GFP expression occurred (f). RFP and GFP-derived expression from RepIII-RFP and Rep5-GFP were detected within the same lesions (g, h). When the RNA-3 derived replicons were co-inoculated, more than 90% of the lesions displayed a segregated expression profile where RFP was expressed in one part of the lesion (i, k) and GFP in the other part (j, k), otherwise lesions displayed only one kind of fluorescence. When RepIII-RFP was mixed with RepIII-GFP, lesions fluoresced in red in the central part (l, n) and in green in the periphery (m, n). Image merging permitted visualization of the entire local lesion (k, n). Pictures were acquired with a Nikon E800 microscope equipped with a Nikon DXM1200 camera using different wavelength filters: RFP expression pattern (a, b, e, g, i and l), GFP expression pattern (c, d, f, h, j and m) and merged images (k, n).

exchanged only within the same species *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato aspermy virus* (TAV) and *Peanut stunt virus* (Habili and Francki, 1974; Hu et al., 1998; Palukaitis et al., 1992; Rao and Francki, 1981). However, RNA-3, which codes for the movement and the capsid protein, can be exchanged between different species (Habili and Francki, 1974; Salanki et al., 1997).

Sequence comparison between BSBMV component and BNYVV genome revealed highly conserved essential genes on RNA-1 and -2 (Lee et al., 2001), whereas lower conservation was observed among short sized components. Moreover, the 3' UTR sequences of the four BSBMV RNAs were highly conserved and comparable to the sequence of BNYVV RNAs. We thus suspected a conserved viral RNA selection

and replication mechanism for both viruses. We focused our attention on RNA-3, as both 5' and 3' BNYVV RNA-3 UTRs have been previously characterized by structural probing (Gilmer et al., 1993; Lauber et al., 1997). The 3'-UTR of both RNA-3 species presented highly conserved sequences with compensatory mutations validating the secondary structure (Fig. 1c). Interestingly, this analysis permitted to confirm the existence of the postulated interaction between BNYVV RNA-3¹⁷¹¹AAGA¹⁷¹⁴ and ¹⁷⁵⁵UCUU¹⁷⁵⁸ (Fig. 1, c-light gray), as compensatory sequences ¹⁶⁵⁷GUAU¹⁶⁶⁰ and ¹⁷⁰¹GUAC¹⁷⁰⁴ were found in BSBMV. Within the BSBMV RNA-3 5' UTR, inverted repeat sequences (named Boxes, Fig. 1b) containing compensatory base variations were identified. Such boxes maintain base pairing and participate in

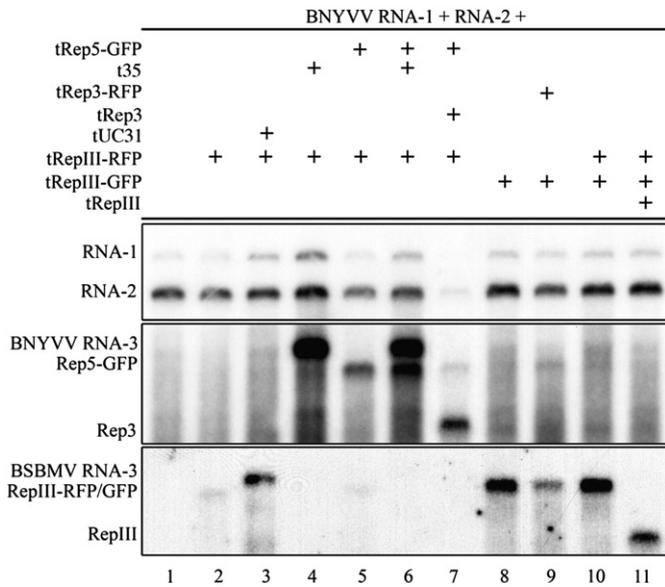


Fig. 4. Comparison of viral RNA contents within local lesions obtained 7 dpi on *C. quinoa* leaves. The inoculum compositions are presented at the top of the figure. The positions of the RNA species are indicated to the left. The membrane was probed with riboprobes complementary to BNYVV RNA-1, -2, -3 and -5 (upper and middle panel) or with a randomly primed PCR product specific to BSBMV RNA-3 (lower panel).

BNYVV RNA-3 replication and encapsidation recognition (Gilmer et al., 1992b, 1993). These analyses allowed us to conclude that the BSBMV RNA-3 UTR secondary structures were highly similar to the BNYVV RNA-3 UTRs. Due to the conserved BSBMV and BNYVV RNA-1 RdRp by-products (Gilmer et al., 1992a), we postulated that the BNYVV replication complex could amplify BSBMV RNA-3. Detection of BSBMV RNA-3 progeny, after the inoculation of BSBMV RNA-3 transcripts together with BNYVV helper strain, demonstrated that, indeed, BNYVV RdRp could replicate BSBMV RNA-3. Moreover, BSBMV RNA-3 was also encapsidated by BNYVV capsid proteins, as it was protected during the TM extraction and virus purification processes. Both the recovery of BSBMV RNA-3 from viral preparations and the systemic spread of BNYVV supplemented by BSBMV RNA-3 confirmed its *trans* encapsidation by BNYVV CP, as BNYVV long distance movement requires viral particles (Quillet et al., 1989). However, we cannot rule out the possible formation of a stable ribonucleoprotein complex that could allow long distance spread and RNA protection. Previous work with *Potato-mop top virus*, lacking its RNA-2 component demonstrated that long distance spread of vRNA occurred via ribonucleoprotein complexes (Savenkov et al., 2003).

The symptoms induced by BSBMV RNA-3, together with Stras12 helper strain on *C. quinoa* leaves are more similar to the necrotic local lesions caused by BNYVV RNA-5 p26 than to severe chlorotic local lesions or yellow spot symptoms induced by BNYVV RNA-3 encoded p25. As previously reported, BSBMV p29 share 23% of amino acid sequence identity with BNYVV p25 (Lee et al., 2001) but the identity increases to 43% when compared with sequence of BNYVV RNA-5 p26. This may explain the similar symptoms induced by p29 and p26, but further studies are necessary to investigate the functional properties of BSBMV p29 and compare them with those previously described for p26 (Link et al., 2005).

Long distance complementation: BSBMV RNA-3 can substitute BNYVV RNA-3 species

BNYVV RNA-3 is essential for the vascular movement on *B. macrocarpa* (Table 1). When tested on this host, BSBMV RNA-3 complemented viral systemic spread (Table 1). Up to now, the essential determinant for such vascular movement has been assigned

to a BNYVV RNA-3 core sequence excluding any RNA-3 gene product (Laubert et al., 1998b). Therefore, we hypothesized that a similar core motif sequence is present in BSBMV RNA-3 and allows BNYVV systemic spread. Alignment of full-length RNA-3 sequences revealed nucleotide identity of 61% and a 20 nts sequence (5'-GUCCGAAGAC-GUUAACUAC-3'), conserved between both RNAs (positions 1236–1255 and 1237–1256 for BNYVV and BSBMV RNA-3 respectively), which will refer to as 'coremin' (Fig. 1a). The coremin sequence is present in BNYVV RNA-5, BSBMV RNA-4 as well as in other viral species belonging to the genus *Cucumovirus*. Interestingly, such a sequence is present within the 5' leader of CMV and TAV ORF-less subgenomic RNA-5 species (Blanchard et al., 1997; Shi et al., 1997; Thompson et al., 2008) and it is also present within the 5' leader of BNYVV RNA-3sub (Balmori et al., 1993). This may highlight its important role in plant–virus interactions and possibly for the systemic spread of the virus. Indeed, systemic infection was highly efficient for BNYVV (RNA-1 to -3) or BSBMV (RNA-1 to -4) but was delayed for Stras12 supplemented with BSBMV RNA-3. Such a difference could be linked to the presence of two motifs within BSBMV (RNA-3 and -4) and the high accumulation of BNYVV RNA-3 that could compensate the lack of a second coremin. BNYVV isolates, that contain a fifth RNA, possess a second coremin that could also explain their enhanced pathogenicity in sugar beet (Büttner and Bürcky, 1990). One cannot, of course, rule out a possible implication of other genomic RNA structural motifs present *in cis* (Miller and White, 2006) or *in trans* on RNA-1 and/or RNA-2 that could favor long distance movement.

BSBMV RNA-3 can be used as an expression vector but compete with BNYVV RNA-3

Previous reports presented the use of BNYVV RNA-3 and -5 derived replicons as expression vectors (Bleykasten-Grosshans et al., 1997; Schmidlin et al., 2005). Our BSBMV RNA-3 clone was used to produce the new viral vector RepIII that served to successfully express GFP and RFP reporter genes (Fig. 3). Co-expression of proteins using two RNA-3-derived replicons generally leads to the competitive loss of one of the RNA-3 molecules within a local lesion (Laubert et al., 1999) except when both replicon-encoded sequences are required for an efficient viral replication (Laubert et al., 1998a). Consequently, successful protein co-expression requires RNA-3 and -5 derived molecules (Schmidlin et al., 2005). Co-inoculation of BSBMV and BNYVV-derived replicons together with Stras12, revealed strong competition between the RNA-3's but not with RNA-5. This situation suggests a close relation between the replication promoters of the two RNA-3 species but not with RNA-5, even though the BSBMV RNA-3-encoded p29 protein is much more similar to the RNA-5-p26 protein than to the BNYVV RNA-3-p25 protein.

RNA-3 competition was manifested either by exclusive replication and consequent selection of the BNYVV parental type RNA-3 component leading to the loss of BSBMV RNAs (e.g. BNYVV t35 or Rep3 excluded BSBMV tUC31 and rep-III), or by the replication of one or the other RNA-3-derived replicons, leading to a random selection of the RNA and sectorial expansion of the viral species. The lack of selective pressure between BNYVV and BSBMV RNA-3-replicons in the latter situation suggests the presence of *cis* element within BSBMV and BNYVV RNA-3 that may favor recognition and/or replication as described for other viruses (Miller and White, 2006). Both molecules were replicated when RepIII-GFP and RepIII-RFP were mixed together. However, the expression of RFP was lowered (Fig. 3, compare a and l) and it was preferentially expressed at late infection (i.e. in the lesion center) whereas GFP was expressed in the entire lesion (Fig. 2m). Such a situation could be explained by the replication of both RepIII vectors at early stages of infection and the subsequent selection of the RepIII-GFP RNA component. Such a selection could be due to RNA structures more compatible for the replication of the GFP containing rep-III

vector than the RFP one containing sequence. Indeed, sequences present between the 5' and 3' UTRs have been shown to facilitate or interfere with Rep3 accumulation *in planta* (Laubert et al., 1999). However, we cannot rule out occurrence of recombination events that could lead to nonreplicative chimeric RNAs.

Synergic and antagonistic effects of mixed viral infections have been reported. Competition in BNYVV/BSBMV mixed infections has been described in sugar beet (Wisler et al., 2003), showing that a BNYVV infection reduces BSBMV accumulation in both susceptible and resistant cultivars. In this report, the authors mentioned possible competition for a cellular factor that would be necessary for the formation of the replication complexes. Our analyses are not sufficient to investigate this hypothesis. However, we have found that the BNYVV replication complex is able to replicate BSBMV RNA-3, but such replication does not occur in the presence of BNYVV RNA-3. Thus, if BSBMV RNA-3 is necessary to fulfill the viral replication cycle, one would expect a decrease of the BSBMV viral contents in a mixed infection. Such a hypothesis can be drawn for the other RNA species as well and explain the preferred fitness of BNYVV in plants. In the same study, a preferential accumulation of BSBMV was described in one case (Wisler et al., 2003). In such an unfavorable situation, recombination between viral species would then be possible and lead to new yet undescribed virus genotypes.

More experiments will be then needed to determine the function and the domains involved in vascular movement of the viruses, thus exploiting similarities and divergences between BSBMV and BNYVV to better investigate their molecular interactions.

Materials and methods

Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of BSBMV RNA-3

Total RNA was extracted from infected sugar beet roots grown on BSBMV infected soil, kindly supplied by Marc Richard-Molard (ITB, Paris), using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA-3 cDNA was synthesized by ImProm-II Reverse Transcriptase system (Promega, Madison, CA) using oligo(dT) primers and then amplified by using a sense primer (nt 1–40), containing a T7 RNA polymerase promoter and an EcoRI restriction site, coupled with the oligo(dT) primer containing a HindIII site. PCR products were digested by EcoRI and HindIII restriction enzymes and cloned in EcoRI-HindIII-digested pUC19 (Fermentas) to obtain pUC31. Sequences were determined using specific primers, BigDye Terminator sequencing kit and a Hitachi 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Full-length HindIII-digested pUC31 cDNA sequence (GenBank accession no. EU410955) was used for the synthesis BSBMV RNA-3 infectious run-off transcripts, named tUC31.

Sequence analyses

Sequences were treated with Vector NTI advance 10.3.0 software (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and/or MacVector software.

Construction of the BSBMV RNA-3 replicons and derived transcripts

RepIII replicon was obtained by replacing the pUC31 p29-encoded sequence with a linker sequence (containing NcoI, Sall and BamHI restriction sites), while retaining the 425 and 346 nts 5' and 3' UTRs, respectively. The GFP and RFP sequences were inserted between the NcoI and BamHI restriction sites to produce RepIII-GFP and RepIII-RFP clones respectively. Similarly, RepIII-P29HA was produced using an NcoI-BamHI-digested PCR product, produced from the full-length BSBMV RNA-3 cDNA clone using reverse primers containing an HA tag complementary sequence. BNYVV Rep3-GFP, Rep3-RFP and Rep5-GFP were from Schmidlin et al. (2005). Transcriptions were performed as described previously (Klein et al., 2007).

Infection of leaves and analysis of infection products

Run-off transcripts were produced and inoculated together with the RNA-1 and -2 containing helper strain (Stras12) onto *Chenopodium quinoa*, *Beta macrocarpa* and *Tetragonia expansa* leaves as previously described by Klein et al. (2007). Local lesions appeared 7 dpi and were analyzed for GFP and RFP fluorescence, with a Nikon E800 microscope equipped with a Nikon DXM1200 camera. Total RNA contents were analyzed after Trizol reagent RNA extraction. Encapsidated RNAs were either obtained using Protocol TM (Jupin et al., 1990) or from purified virus using the method already described by Tamada et al. (1989). BNYVV RNA detection was performed as described (Link et al., 2005; Schmidlin et al., 2005). BSBMV RNA-3 and RepIII were detected using random ³²P-labeled DNA probes corresponding to nucleotides 965 to 1720. Protein analysis was carried out by Western blotting following the protocol described by Link et al. (2005) using rabbit anti-BNYVV CP and anti-GFP polyclonal IgG and mouse Anti-HA-Peroxidase monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, MO, USA) raised against the BNYVV coat protein, GFP and HA tag, respectively.

Acknowledgments

We are grateful to Marc Richard-Molard (ITB, Paris) for the BSBMV infested-soil, Malek Alioua for DNA sequencing, Danièle Scheidecker for technical support, Elodie Klein for advices, Annamaria Pisi and Ken Richards for their review of the manuscript. Kamal Hleibieh was supported by a Franco-Syrian grant and Audrey Schirmer by an Adrinord convention.

References

- Balmori, E., Gilmer, D., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G., 1993. Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on *beet necrotic yellow vein virus* RNA 3. *Biochimie* 75, 517–521.
- Blanchard, C.L., Higgins, T.J., Anderson, B.J., 1997. RNAs 4A and 5 are present in *Tomato aspermy virus* and both subgroups of *Cucumber mosaic virus*. *Arch. Virol.* 142, 1273–1283.
- Bleykasten-Grosshans, C., Guilley, H., Bouzoubaa, S., Richards, K.E., Jonard, G., 1997. Independent expression of the first two triple gene block proteins of *beet necrotic yellow vein virus* complements virus defective in the corresponding gene but expression of the third protein inhibits viral cell-to-cell movement. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 10, 240–246.
- Büttner, G., Bürcky, K., 1990. Content and distribution of *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in sugar beet varieties with different degrees of susceptibility to rhizomania. *Proceedings of the First Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*. Eugen Ulmer, Stuttgart, Braunschweig, pp. 83–86.
- Canova, A., 1959. On the pathology of sugarbeet. *Inf. Fitopatol.* 9, 390–396.
- Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., 1992a. Efficient cell-to-cell movement of *beet necrotic yellow vein virus* requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* 189, 40–47.
- Gilmer, D., Richards, K., Jonard, G., Guilley, H., 1992b. cis-active sequences near the 5'-termini of *beet necrotic yellow vein virus* RNAs 3 and 4. *Virology* 190, 55–67.
- Gilmer, D., Allmang, C., Ehresmann, C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., Ehresmann, B., 1993. The secondary structure of the 5'-noncoding region of *beet necrotic yellow vein virus* RNA 3: evidence for a role in viral RNA replication. *Nucleic Acids Res.* 21, 1389–1395.
- Habili, N., Francki, R.I., 1974. Comparative studies on tomato aspermy and Cucumber mosaic viruses. III. Further studies on relationship and construction of a virus from parts of the two viral genomes. *Virology* 61, 443–449.
- Hehn, A., Bouzoubaa, S., Bate, N., Twell, D., Marbach, J., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G., 1995. The small cysteine-rich protein P14 of *beet necrotic yellow vein virus* regulates accumulation of RNA 2 in cis and coat protein in trans. *Virology* 210, 73–81.
- Heidel, G.B., Rush, C.M., Kendall, T.L., Lommel, S.A., French, R.C., 1997. Characteristics of Beet soilborne mosaic virus, a Furo-like virus infecting sugar beet. *Plant Dis.* 1070–1076.
- Heijbroek, W., Musters, P.M.S., Schoone, A.H.L., 1999. Variation in pathogenicity and multiplication of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in relation to the resistance of sugarbeet cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 397–405.
- Hu, C.C., Sanger, M., Ghabrial, S.A., 1998. Production of infectious RNA transcripts from full-length cDNA clones representing two subgroups of *Peanut stunt virus* strains: mapping satellite RNA support to RNA1. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 8), 2013–2021.
- Jupin, I., Richards, K., Jonard, G., Guilley, H., Pleij, C.W., 1990. Mapping sequences required for productive replication of *beet necrotic yellow vein virus* RNA 3. *Virology* 178, 273–280.

- Jupin, I., Guilley, H., Richards, K.E., Jonard, G., 1992. Two proteins encoded by *beet necrotic yellow vein virus* RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J.* 11, 479–488.
- Klein, E., Link, D., Schirmer, A., Erhardt, M., Gilmer, D., 2007. Sequence variation within *Beet necrotic yellow vein virus* p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res.* 126, 53–61.
- Koenig, R., Lennefors, B.L., 2000. Molecular analyses of European A, B and P type sources of *Beet necrotic yellow vein virus* and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Arch. Virol.* 145, 1561–1570.
- Koenig, R., Lesemann, D.E., 2005. Genus *Benyvirus*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy*, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London, pp. 1043–1048.
- Lauber, E., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., Gilmer, D., 1997. Conformation of the 3'-end of *beet necrotic yellow vein virus* RNA 3 analysed by chemical and enzymatic probing and mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 25, 4723–4729.
- Lauber, E., Bleykasten-Grosshans, C., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Jonard, G., Richards, K.E., Guilley, H., 1998a. Cell-to-cell movement of *beet necrotic yellow vein virus*: I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 11, 618–625.
- Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K.E., Jonard, G., 1998b. Vascular movement of *beet necrotic yellow vein virus* in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J. Gen. Virol.* 79, 385–393.
- Lauber, E., Jonard, G., Guilley, H., Gilmer, D., 1999. Effects of structural modifications upon the accumulation in planta of replicons derived from *beet necrotic yellow vein virus* RNA 3. *Arch. Virol.* 144, 1201–1208.
- Lee, L., Telford, E.B., Batten, J.S., Scholthof, K.B., Rush, C.M., 2001. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Beet* soilborne mosaic virus, a proposed member of the genus *Benyvirus*. *Arch. Virol.* 146, 2443–2453.
- Link, D., Schmidlin, L., Schirmer, A., Klein, E., Erhardt, M., Geldreich, A., Lemaire, O., Gilmer, D., 2005. Functional characterization of the *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *J. Gen. Virol.* 86, 2115–2125.
- Mahmood, T., Rush, C., 1999. Evidence of cross-protection between *beet* soilborne mosaic virus and *beet necrotic yellow vein virus* in sugar beet. *Plant Dis.* 83, 521–526.
- Meunier, A., Schmit, J.F., Stas, A., Kutluk, N., Bragard, C., 2003. Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous detection of *beet necrotic yellow vein virus*, *Beet* soilborne virus, and *Beet virus Q* and their vector *Polymyxa betae* KESKIN on sugar beet. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2356–2360.
- Miller, W.A., White, K.A., 2006. Long-distance RNA-RNA interactions in plant virus gene expression and replication. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 447–467.
- Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G., Francki, R.I., 1992. *Cucumber mosaic virus*. *Adv. Virus Res.* 41, 281–348.
- Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., 1989. In vitro synthesis of biologically active *beet necrotic yellow vein virus* RNA. *Virology* 172, 293–301.
- Rao, A.L.N., Francki, R.I.B., 1981. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. VI. Partial compatibility of genome segments from the two viruses. *Virology* 114, 573–575.
- Salanki, K., Carrere, I., Jacquemond, M., Balazs, E., Tepfer, M., 1997. Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus*. *J. Virol.* 71, 3597–3602.
- Savenkov, E.I., Germundsson, A., Zamyatnin Jr., A.A., Sandgren, M., Valkonen, J.P.T., 2003. Potato mop-top virus: the coat protein-encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* 84, 1001–1005.
- Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., Bragard, C., Gilmer, D., Lemaire, O., 2005. Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *J. Gen. Virol.* 86, 2897–2911.
- Schmidlin, L., Link, D., Mutterer, J., Guilley, H., Gilmer, D., 2005. Use of a *Beet necrotic yellow vein virus* RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *J. Gen. Virol.* 86, 463–467.
- Shi, B., Ding, S., Symons, R.H., 1997. Two novel subgenomic RNAs derived from RNA 3 of *Tomato aspermy cucumovirus*. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 3), 505–510.
- Tamada, T., 1999. *Benyviruses*. In: Webster, R., Granoff, A. (Eds.), 2nd ed. *Encyclopedia of Virology*, Vol. II. Academic Press, New York, N.Y., pp. 154–160.
- Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kigushi, T., Harada, T., 1989. Production and pathogenicity of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* with different numbers of RNA components. *J. Gen. Virol.* 70, 3399–3409.
- Thompson, J.R., Buratti, E., de Wispelaere, M., Tepfer, M., 2008. Structural and functional characterization of the 5' region of subgenomic RNA5 of *Cucumber mosaic virus*. *J. Gen. Virol.* 89, 1729–1738.
- Van Regenmortel, M.H., Bishop, D.H., Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Calisher, C. H., 1997. Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch. Virol.* 142, 1505–1518.
- Wisler, G.C., Lewellen, R.T., Sears, J.L., Wasson, J.W., Liu, H.Y., Wintermantel, W.M., 2003. Interactions between *Beet necrotic yellow vein virus* and *Beet* soilborne mosaic virus in sugar beet. *Plant Dis.* 87, 1170–1175.

RÉSUMÉ

Étude des propriétés biologiques de la protéine p25, de l'ARN3 et de la protéine p14 du *Beet necrotic yellow vein virus* : vers de nouvelles stratégies de luttes antivirales ?

Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (BNYVV) est responsable de la rhizomanie de la betterave sucrière. La prolifération racinaire, les symptômes foliaires et le mouvement à longue distance viral sont liés à l'ARN3 viral. Si l'infection systémique du virus nécessite une séquence nucléotidique de l'ARN3 de 20 nts appelée coremin, les symptômes foliaires et racinaires sont induits par l'expression de la protéine p25. Mes recherches ont été consacrées à l'étude des modifications post traductionnelles de la protéine p25, et plus précisément l'incidence des phosphorylations sur ses propriétés connues, pour rechercher un éventuel mutant dominant négatif utilisable dans la lutte antivirale. Cette étude a montré un rôle de la phosphorylation de la protéine p25 dans la modulation de ses propriétés. J'ai recherché les partenaires cellulaires et viraux de la protéine p25 par co-immunoprécipitation et double hybride de levure et montré que la protéine p25 forme un complexe avec les composants de SCF (F-box-Kelch•ASK2•Cul1). Nos recherches concernant la séquence coremin de l'ARN3 indispensable pour l'infection systémique chez *Beta macrocarpa* ont révélé l'interaction spécifique entre cette petite séquence et la protéine p14, le suppresseur de RNA silencing codé par l'ARN2. La protéine p14 et la séquence d'ARN3 sont nécessaires au mouvement à longue distance. Leur interaction favorise mais n'apparaît pas essentielle au mouvement viral à longue distance sur *B. macrocarpa* et *Nicotiana benthamiana*. La présence de la séquence coremin complète directement ou indirectement la fonction de la protéine p14 dans l'inhibition de la mort cellulaire et dans la multiplication virale.

ABSTRACT

Study of biological properties of the p25 protein, the RNA3 and p14 protein of *Beet necrotic yellow vein virus*: towards new strategies for antiviral fights?

The *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) is responsible for the rhizomania syndrome of sugar beet. Root proliferation, leaf symptom expression and long distance movement are directly linked to the viral RNA3. If the systemic spread of the virus requires the 20 nts long coremin sequence on the RNA3, the leaf (yellowing) and root (proliferation) symptoms are induced by the expression of the p25 protein. My researches were dedicated to study the post translational modifications of p25 protein, more precisely the incidence of phosphorylations on p25 properties, looking for a possible dominant negative mutant to be used in antiviral fights. This study showed that p25 phosphorylation modulates its properties. I've searched for cellular and viral partners of the p25 protein using co-immunoprecipitation and yeast two-hybrid and showed that the p25 protein forms a complex with the components of a SCF (F-box-Kelch•ASK2•Cul1). Our researches concerning the RNA3 coremin sequence responsible for the systemic spread on *Beta macrocarpa*, evidenced a specific interaction between this RNA3 sequence and the RNA2-encoded p14 silencing suppressor protein. Both p14 and the coremin sequence are required for viral systemic spread. Their interaction favors but appear not essential for the long distance movement of the virus on *B. macrocarpa* and *Nicotiana benthamiana*. The coremin sequence can directly or indirectly complement the p14 function in symptom manifestation and in the viral multiplication.