

THESE

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

Par

Claire PELTIER

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

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

Dr. Véronique BRAULT
Dr. Mireille JACQUEMOND
Dr. Olivier LE GALL
Dr. Guy WEYENS
Pr. David GILMER

Examineur Interne
Rapporteur Externe
Rapporteur Externe
Membre Invité
Directeur de Thèse

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

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur David Gilmer de m'avoir accueillie dans son laboratoire durant presque quatre années. Il m'a fait progresser d'un point de vue scientifique, grâce à ses nombreux conseils judicieux, ses idées lumineuses et son savoir encyclopédique. Je tiens également à saluer son côté humain, qui m'a permis de garder le moral malgré les coups durs rencontrés tout au long de ma thèse. Sa grande générosité, ses blagues (plus ou moins racontables...) et sa bonne humeur contagieuse m'ont permis de vivre cette expérience dans les meilleures conditions. Encore un grand merci à toi.

Naturellement, je remercie les membres du jury, Dr Véronique Brault, Dr Mireille Jacquemond et Dr Olivier Le Gall, qui ont accepté de lire et de juger mon manuscrit de thèse, et de partager un moment de discussion enrichissante lors de ma soutenance.

Je remercie chaleureusement Guy Weyens et Marc Lefebvre d'avoir accepté le choix de David de m'embarquer dans la grande aventure du partenariat avec leur entreprise SESVanderhave. Je les remercie de leur gentillesse et des discussions intéressantes sur les maladies de la betterave (BNYVV and co. !).

Merci à Salah, Corinne, Malek, Thierry, Dimitri, Christophe, Véronique pour leurs précieux conseils.

Evidemment, comment ne pas remercier l'équipe du "409-412", sans qui ces années auraient été bien moins ensoleillées (et moins arrosées...). Merci à toi, "Mémère" Elodie, mémoire invincible du labo, de m'avoir ouvert les portes des frigos lorsque je ne savais plus où se trouvait le rep5, de m'avoir soutenue lorsque j'en avais besoin, et tout simplement d'avoir été une copine de paillasse et de bureau géniale. Kamal Bibiche, le "terroriste" du labo : merci à toi pour ton accent rigolo et pour ta bonne humeur ! Manu, le surfeur allemand le plus fêtard de tous les temps, je te remercie pour ton sourire et ta joie de vivre en toutes circonstances. Khalid, Fanny et Sophie, même si vous n'êtes pas des "409 pur-souche", je vous kiffe quand même ! Dalya, Annette, Eduardo, les rescapés du 412, merci à vous pour ces soirées vin-fromage qui resteront dans les annales. Merci à tous ceux qui ont partagé de près ou de loin des moments joyeux : Sophie, Michael, Agnès, Audrey, Macs, François, Pascale, Laura, Marie-Carmen, Diane, Julia, Clémentine, Mathieu, Cindy, Clémence, Guillaume, Tristan, Kamel, Samira, Marina, Kinda ... et un merci spécial aux fins critiques gastronomiques Damien, Christophe et Fabrice.

Merci à ma famille, qui m'a toujours soutenue dans mes choix et facilité l'aboutissement de ces longues années d'études. Merci donc à mes parents, ma sœur Caroline, sans oublier ma grand-mère, qui je crois est ma plus grande fan.

Un énorme merci à mon Sébastien, qui n'a pas cessé de m'encourager et de me reconforter. Sans toi, cette période de ma vie n'aurait pas eu la même saveur.

Tables

Table des matières

Table des matières	1
Table des figures et des tableaux	6
1. Figures	6
2. Tableaux.....	9
Abréviations.....	10
Liste des virus cités	12
Introduction générale.....	13
I. La rhizomanie	13
II. Enjeux de mon travail de thèse	24
Chapitre I Lutte contre la rhizomanie : cibler l'ARN-3.....	26
I. Les dégâts causés par la rhizomanie.....	26
1.1. Une épidémie mondiale	26
1.2. Pertes économiques	26
1.3. Persistance de la maladie	27
II. Les différents moyens de lutte antivirale.....	27
2.1. Neutralisation des vecteurs de transmission des virus	27
2.2. Recherche de plantes naturellement résistantes	28
2.3. Lutte antivirale par transgénèse	30
2.3.1. <i>Résistance dérivée du pathogène</i>	30
a) Protéine de capsid (CP)	30
b) Autres protéines virales	31
2.3.2. <i>ARN silencing</i>	32
a) Mécanisme général de l'ARN silencing	33

b) viRNA naturels	35
c) Utilisation du silencing comme défense artificielle	36
d) ARN silencing dirigé contre le BNYVV	37
III. Cibler l'ARN-3 du BNYVV : résultats	39
3.1. Construction des hairpins et analyse des siRNA	39
3.2. Analyse de l'effet des hairpins sur l'infection virale	41
3.3. Analyse de l'effet de l'hairpin DE sur l'infection virale	43
3.4. Analyse de l'effet de la protéine p14 sur l'efficacité des hairpins	44
3.5. Expression des hairpins dans la betterave sucrière (<i>B. vulgaris</i>)	44
IV. Discussion et conclusion	46
4.1. Différences d'expression des siRNA entre chaque hairpins	46
4.2. Les siRNA : des feuilles aux racines	46
4.3. Quels résultats peut-on espérer sur <i>B. vulgaris</i> ?	47
Chapitre II Etude de la protéine p25 dans un système hétérologue : analyse de plantes transgéniques exprimant la protéine virale	49
I. Introduction : connaissances générales sur la protéine p25	49
1.1. La protéine p25 est impliquée dans l'aggravation des symptômes	50
1.2. Présence de motifs NLS et NES fonctionnels sur la protéine p25	50
1.3. La protéine p25 peut activer la transcription	51
1.4. La protéine p25 est probablement phosphorylée	51
II. Résultats	53
2.1. Caractérisation des <i>A. thaliana</i> exprimant p25 de manière constitutive (Peltier <i>et al.</i>)	53
2.1.1. Résumé de la publication	53
2.1.2. Peltier <i>et al.</i> (soumise à la revue <i>Transgenic research</i> le 29-03-2010)	54
2.2. Création de lignées d' <i>A. thaliana</i> exprimant la protéine p25 de manière inductible	92
2.3. Transgenèse de <i>N. tabacum</i>	94
2.4. Analyse par CHIP des propriétés d'activation de la transcription de la protéine p25	96
III. Discussion et conclusions	98
3.1. La protéine p25 entraîne des dérégulations du transcriptome et de la balance hormonale	98
3.2. Mode d'action de la protéine p25	99
3.3. Rôle de la protéine p25 dans l'adaptation à l'hôte	100
3.4. <i>A. thaliana 35S::p25</i> et l'infection par le BNYVV	102
Chapitre III Etude du mécanisme de production et du rôle de l'ARN-3sub produit à partir de l'ARN-3 du BNYVV	103
I. Introduction sur les ARN non génomiques viraux	103
1. ARN subgénomiques	104
1.1. Rôle : expression des ORF 3' terminaux	104
1.1.1. Mécanismes de traduction	104
a) Traduction coiffe-dépendante	105
b) Traduction coiffe-indépendante	106
1.1.2. Encapsidation des ARN subgénomiques	106
1.1.3. Similitudes des extrémités 5'	107
1.2. Mécanismes de synthèse des ARN subgénomiques	107
1.2.1. Initiation interne de la transcription	107
1.2.2. Terminaison prématurée de la transcription	108
1.2.3. Synthèse discontinue de la matrice	109
1.3. Facteurs impliqués dans la synthèse	109

1.3.1 Séquences/structures sur l'ARN	109
a) Séquences	109
α. Séquences "core"	110
β. Séquences régulatrices	110
b) Structures	111
1.3.2. Protéines virales et cellulaires	111
a) ARN polymérase ARN dépendante	111
α. Structure	111
β. Initiation de la transcription	112
γ. Découplage réplication/transcription	113
b) Autres protéines virales impliquées	113
c) Facteurs cellulaires	114
1.4. ARN subgénomiques atypiques	114
1.4.1. ARN subgénomiques 5' terminaux	115
1.4.2. ARN subgénomiques permettant l'expression de protéines tronquées	115
1.4.3. ARN subgénomiques permettant l'expression de plusieurs ORF	116
1.4.4. ARN subgénomiques transactivateurs	116
1.5. ARN subgénomiques et recombinaison	116
2. ARN viraux non codants	118
2.1. Clivage par un facteur viral	118
2.2. Clivage par un facteur cellulaire	119
2.3. Des ARN viraux non-codants mènent à la production de miRNA	120
3. ARN subviraux	121
3.1. DI RNA	121
3.1.1. Mode de production	121
3.1.2. Mécanismes de la modulation des symptômes	123
3.1.3. Utilisation des DI RNA pour l'expression de protéines	123
3.2. ARN satellites	124
3.2.1. Origine	124
3.2.2. Réplication	125
3.2.3. Virulence	125
a) Influence de l'hôte et du virus assistant	126
b) Influence des séquences et des structures	126
c) Influence des protéines virales et de l'ARN silencing	126
II. Résultats : étude du mécanisme d'expression et du rôle du petit ARN-3 du BNYVV	128
2.1. Détection d'un ARN colinéaire à l'extrémité 3' de l'ARN-3 en contexte viral	128
2.2. L'expression transitoire de l'ARN-3 permet la synthèse de l'ARN-3sub	129
2.2.1. Analyse par northern-blot de l'ARN-3 exprimé transitoirement	129
2.2.2. Caractérisation de l'extrémité 5' du fragment 3'	130
2.2.3. Recherche des fragments 5' putatifs par cRT-PCR	132
2.3. Séquence coremin : une séquence multifonctions	133
2.3.1. Conservation d'une séquence de 20 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARN-3sub, appelée coremin	133
2.3.2. La séquence coremin des ARN-5 du BNYVV et ARN-3 du BSBMV	134
2.3.3. Mutagenèse de la séquence coremin sur l'ARN-3 du BNYVV	135
a) Rôle de coremin sur l'accumulation de la protéine p25	135
b) Rôle de coremin sur le mouvement systémique viral	136
c) Rôle de coremin sur l'accumulation de l'ARN-3sub	136
2.3.5. Test d'encapsulation des ARN mutants K, E, et C	138
2.3.6. Analyse de mutants de délétion et d'insertion de coremin	138
2.4. Étude du mécanisme de clivage de l'ARN-3	140
2.4.1. Rôle de l'ARN silencing	140
2.4.2. Les extraits de germes de blé permettent le clivage de l'ARN-3	141
2.4.3. Le clivage n'est pas la conséquence d'un ribozyme (cis ou trans)	142

2.4.4. Un facteur protéique est impliqué dans le clivage	142
2.4.5. Recherche des protéines présentes dans les germes de blé partiellement purifiés	144
2.4.6. Rôle de la protéine NbXRN4 dans l'accumulation de l'ARN-3sub	144
III. Discussion	148
3.1. Nature de l'ARN-3sub	148
3.2. Rôle de la séquence coremin	148
3.3. Facteur cellulaire associé au clivage.....	150
Conclusion générale et perspectives	152
Matériel et méthodes	158
I. MATERIEL VEGETAL	158
1.1. Les plantes hôtes du BNYVV	158
1.1.1. <i>Beta vulgaris</i> (betterave sucrière).....	158
1.1.2. <i>Beta macrocarpa</i> (betterave sauvage)	158
1.1.3. <i>Chenopodium quinoa</i>	159
1.1.4. <i>Nicotiana benthamiana</i>	159
1.2. Autres plantes utilisées au laboratoire	159
1.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> (arabette des dames).....	159
1.2.2. <i>Nicotiana tabacum</i> (le tabac).....	159
1.3. Culture des plantes.....	159
1.3.1. Culture de plantules <i>in vitro</i>	159
1.3.2. Culture de plantes en terre	160
1.4. Transformation des plantes	160
1.4.1. Transformation d' <i>A. thaliana</i> par floral dip (Clough and Bent, 1998).....	160
1.4.2. Transformation de <i>N. tabacum</i> ou <i>N. benthamiana</i>	161
1.4.3. Expression transitoire par infiltration d'agrobactéries dans des feuilles.....	161
1.5. Infections virales.....	161
1.5.1. Obtention d'ARN viraux du BNYVV	161
1.5.2. Inoculation mécanique d'ARN viraux.....	162
II. ARN	162
2.1. Extraction des ARN à partir de matériel végétal	162
2.1.1. Extraction des ARN au TRIZOL® Reagent (Invitrogen™)	162
2.1.2. Extraction des ARN au tampon "polysomes"	162
2.1.3. Extraction d'ARN double-brin	163
2.1.4. Test d'encapsulation (Jupin et al., 1990).....	163
2.2. Tests de clivage <i>in vitro</i>	164
2.2.1. Transcription <i>in vitro</i> d'ARN	164
2.2.2. Cinétique d'incubation de transcrits dans des extraits acellulaires végétaux	164
2.3. Analyse des ARN par hybridation moléculaire	165
2.3.1. Analyse d'ARN de haut poids moléculaire par northern-blot.....	165
2.3.2. Analyse d'ARN de faible poids moléculaire par northern-blot.....	165
2.3.3. Synthèse d'une sonde ADN marquée au [α - ³² P] dCTP.....	166
2.3.4. Synthèse de sondes ribonucléiques marquées au [α - ³² P] UTP	166
2.3.5. Marquage d'oligonucléotide au [γ - ³² P]ATP.....	166
2.4. Analyse transcriptomique par qRT-PCR	167
2.4.1. Transcription inverse	167
2.4.2. RT-PCR quantitative	167
2.5. Caractérisation des extrémités 5' et 3' des ARN	168
2.5.1. La technique du 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA End).....	168
a) Traitement à la CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase).....	168
b) Traitement à la TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase).....	168
c) Ligation par la T4 RNA ligase	168
d) Transcription inverse et amplification par PCR.....	168
e) Clonage et séquençage des produits d'amplification obtenus	169

2.5.2. La technique de cRT-PCR.....	169
a) Circularisation des ARN	169
b) Transcription inverse et amplification par PCR.....	169
III. ADN	170
3.1. Vecteurs de clonage	170
3.1.1. Le plasmide pGEM@-T (Promega).....	170
3.1.2. Le plasmide pBS (pBluescribe)	170
3.1.3. Le plasmide binaire pBin 61	170
3.1.4. Le plasmide binaire pFGC5941	170
3.1.5. Le plasmide binaire pER8.....	171
3.2. Techniques de clonage	171
3.3. Mutagenèse par PCR "mega-primer"	171
3.4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)	172
3.4.1. Préparation du matériel végétal	172
3.4.2. Préparation de la chromatine	172
3.4.3. Immunoprécipitation de la chromatine	172
3.4.4. Récupération de la chromatine	173
IV. PROTEINES	173
4.1. Analyse des protéines par Western-blot	173
4.1.1. Extraction des protéines	173
4.1.2. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	173
4.1.3. Immunodétection des protéines par Western-blot.....	174
4.2. Analyse des protéines par MS-MS	174
Bibliographie.....	175
Annexe Étiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière.....	188

Table des figures et des tableaux

1. Figures

Figure I.1. : Mécanisme général de l'ARN silencing.	33
Figure I.2. : Mécanisme du silencing antiviral.	35
Figure I.3. : Représentation schématique des mécanismes initiaux de la mise en place du PTGS dans des stratégies antivirales.	36
Figure I.4. : Représentation schématique de l'ARN-3 du BNYVV et des régions choisies pour la construction des hairpins.	39
Figure I.5. : Accumulation des sRNA après infiltration des constructions hairpin.	40
Figure I.6. : Accumulation des siRNA et ARN viraux post-infiltration dans <i>Beta macrocarpa</i> , et effets sur le mouvement systémique viral.	41
Figure I.7. : Accumulation des ARN viraux en présence des hairpins.	43
Figure I.8. : Analyse des siRNA induits par les hairpins dans les feuilles de <i>B. vulgaris</i> et de <i>N. benthamiana</i> .	44
Figure II.1. : Comparaison des symptômes sur feuille de <i>C. quinoa</i> infectées par des inoculum différents.	50
Figure II.2. : Caractérisation des sites NES et NLS de la protéine p25 et leur influence sur la symptomatologie (d'après Vetter <i>et al.</i> , 2004).	51
Figure II.3. : Caractérisation du domaine d'activation de la transcription par système du simple-hybride (Klein <i>et al.</i> , 2009).	52
Figure II.4. : Création et caractérisation des lignées <i>pER8::p25</i> .	92

Figure II.5. : Vérification de l'efficacité de la construction pER8::p25.	93
Figure II.6. : Analyse des lignées de <i>N. tabacum</i> obtenues par transformation avec le vecteur binaire 35S::p25.	94
Figure II.7. : Analyse des lignées de <i>N. tabacum</i> transformées par le vecteur binaire pER8::p25.	96
Figure II.8. : Principe du ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation).	97
Figure III.1. : Représentation schématique des différents mécanismes utilisés par les virus pour exprimer les cadres de lecture 3' terminaux.	104
Figure III.2. : Représentation schématique du mécanisme d'initiation interne de la transcription.	107
Figure III.3. : Représentation schématique des interactions ARN-ARN requises pour la synthèse des ARN subgénomiques par le mécanisme de terminaison prématurée de la transcription pour les virus RCNMV, FHV et TBSV (par White, 2002)	108
Figure III.4. : Modèle de la synthèse des ARN subgénomiques chez les Nidovirales par le mécanisme de synthèse discontinue de la matrice (adapté de Masters, 2006).	109
Figure III.5. : Structures des RdRp virales (Hansen <i>et al.</i> , 1997).	112
Figure III.6. : Les ARN génomiques et subgénomiques du CTLV (figure 5 de Tatinieni <i>et al.</i> , 2009).	115
Figure III.7. : Les ARN génomiques et subgénomiques du PFBV (adapté de Rico <i>et al.</i> , 2009).	116
Figure III.8. : Représentation schématique des interactions régulatrices entre les ARN du FHV pendant la réplication (adapté de Eckerle <i>et al.</i> , 2003).	116
Figure III.9. : Modèles de recombinaison des ARN viraux possédant des RdRp processives ou non processives.	117
Figure III.10. : Séquence des DI RNA sauvages et artificiels du BBMV (Graves <i>et al.</i> , 1996).	122
Figure III.11. : Séquence du DI RNA du TBSV (par Nagy et White, 2004).	122
Figure III.12. : Le TCV et ses satellites (par Guo <i>et al.</i> , 2009).	124
Figure III.13. : Rôle central de l'ARN silencing dans la modulation des symptômes médiés par les ARN satellites (Hu <i>et al.</i> , 2009).	127
Figure III.14. : Expression transitoire des constructions R3 et NR3.	129
Figure III.15. : Utilisation de la technique du 5'RACE (Rapid Amplification cDNA End) pour caractériser les extrémités 5' d'ARN.	130
Figure III.16. : Oligonucléotides utilisés pour le 5'RACE ciblant l'ARN-3.	131
Figure III.17. : Technique de la cRT-PCR pour caractériser les extrémités 3' d'ARN.	131
Figure III.18. : Oligonucléotides utilisés pour la cRT-PCR ciblant l'ARN-3.	132
Figure III.19. : Conservation de la séquence coremin sur le génome de plusieurs virus.	133

Figure III.20. : Oligonucléotides utilisés pour les 5'RACE et les cRT-PCR ciblant l'ARN-5 du BNYVV et l'ARN-3 du BSBMV.	134
Figure III.21. : Mutations introduites dans la séquence coremin de l'ARN-3.	135
Figure III.22. : Effet des mutations de la séquence coremin de l'ARN-3 sur l'infection virale.	136
Figure III.23. : cRT-PCR effectuée sur les ARN mutés K, E et C.	137
Figure III.24. : Analyse par northern-blot de la stabilité en solution des ARN-3sub sauvage et muté synthétisés <i>in vitro</i> .	138
Figure III.25. : Analyse de l'encapsidation des ARN-3 mutants.	138
Figure III.26. : Mutants de délétion et d'insertion de la séquence core dans l'ARN-3.	139
Figure III.27. : Recherche des petits ARN homologues ou complémentaires à la séquence coremin par northern blot.	141
Figure III.28. : Analyse par northern-blot des ARN totaux extraits des lésions de plantes infectées par les ARN-1, -2 et -3 privés ou non de la protéine p14, et mutés ou non dans la séquence coremin.	141
Figure III.29. : Analyse par northern blot des transcrits de l'ARN-3 sauvage et mutés soumis à une cinétique d'incubation dans des extraits de germes de blé.	142
Figure III.30. : Incubation des transcrits de l'ARN-3 sauvage en présence de tampon (A) ou d'ARN totaux d'extrait de germes de blé hautement purifiés (B).	142
Figure III.31. : Incubation des transcrits de l'ARN-3 en présence de germes de blé faiblement purifiés. B. Effet de l'EDTA.	143
Figure III.32. : Gel coloré au bleu colloïdal des protéines purifiées à partir d'extrait de germes de blé.	144
Figure III.33. : Constructions utilisées pour la mise en place du silencing dirigé contre XRN4.	145
Figure III.34. : Effets de la construction rep5-XRN4 sur l'accumulation de siRNA spécifiques, de l'ARN-3 viral et du messenger endogène de XRN4 dans des <i>N. benthamiana</i> infectées par les ARN-1, -2 et -3 supplémentés de rep5-XRN4 ou rep5-GFP.	145
Figure III.35. : Effet de hpXRN4 sur l'accumulation de XRN4 et sur l'accumulation de l'ARN-3sub.	146
Figure III.36. : Effet des constructions NR3 et R3 sur le taux de XRN4.	146
Figure III.37. : Effet des constructions NR3 et R3 sur l'infection virale.	147
Figure CG.1. : Modèle de la mise en place des symptômes de rhizomanie.	155
Figure MM.1. : Courbes obtenues en fin de réaction de RT-PCR quantitative.	167
Figure MM.2. : Représentation schématique des vecteurs binaires.	170

2. Tableaux

Tableau II.1. : Symptômes observés sur feuilles de <i>Tetragonia expansa</i> et <i>Beta macrocarpa</i> après inoculation par différents isolats du BNYVV (d'après Tamada <i>et al.</i> , 1999).	50
Tableau II.2. Récapitulatif des compatibilités d'infection au BNYVV des plantes présentées, et de la détection de la protéine p25 en expression transitoire ou ectopique.	101
Tableau III.1. : Séquences 5' terminales des ARN caractérisées par 5'RACE ciblant l'ARN-3 sur les ARN en contexte viral ou en expression transitoire.	131
Tableau III.2. : Résultats des analyses des séquences obtenues après amplification PCR de fragments issus d'ADNc produits suite à la réverse-transcription d'ARN circulaires (cRT-PCR) obtenus en contexte viral (ARN-3 wt) ou transitoire (pBin R3).	132
Tableau III.3. : Séquences 5'et 3' terminales des ARN caractérisées par 5'RACE et par cRT-PCR, ciblant l'ARN-5 du BNYVV et l'ARN-3 du BSBMV en contexte viral.	134
Tableau III.4. : Protéines de germes de blé analysées par MS-MS.	144
Tableau MM.1. : Séquence des oligonucléotides utilisés pour les expériences de 5'RACE et de cRT-PCR.	169

Abréviations

°C	degré celsius	<i>g</i>	constante de gravité
A	ampère	g	gramme
ADN/DNA	acide désoxyribonucléique	GFP	green fluorescent protein
ADNc	ADN complémentaire	h	heure
AGO	Argonaute	ha	hectare
ARN	ARN subgénomique	ha-siRNA	heterochromatin-associated short interfering RNA
sub/sg		HEPES	N-2 hydroxyethyl piperazine acid N'-2ethane sulfate
ARN/RNA	acide ribonucléique	hER	human estrogen receptor
ARNm	ARN messager	Hpt	hygromycine phosphotransférase
BET	bromure d'éthidium	HR	réponse hypersensible
BSA	bovine serum albumine	IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
BTE	BYDV cap-independant translation element	IR-PTGS	inverted-repeat PTGS
Ci	curie	j	jour
CIP	calf intestinal phosphatase	J	joule
cM	centimorgan	l	litre
CP	protéine de capsid	lacZ	β -galactosidase
cRT-PCR	RT-PCR circulaire	LB	Luria Broth
cv	cultivar	LB	bordure gauche du T-DNA
Da	dalton	M	molaire
DCL	Dicer-like protein	m	mètre
DNase	désoxyribonucléase	min	minute
dNTP	désoxyribonucléotide	miRNA	micro RNA
DO	densité optique	MM	masse molaire
DTT	dithiotréitol	mol	mole
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique	nat-siRNA	natural cis-antisense transcripts-siRNA
EGTA	acide éthylène glycol tétraacétique	NLS	nuclear localization signal
F	farad		

NPT	néomycine phosphotransférase	s	seconde
nts	nucléotides	satRNA	ARN satellite
OCS	octopine synthase	scFv	single chain variable fragment
ORF	open reading frame	SDS	dodécylsulfate de sodium
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	siRNA	small interfering RNA
pb	paire de bases	SSC	sel sodium citrate
pBin	plasmide binaire	ssp	sous-espèce
PBS	phosphate buffered saline	STE	tampon sel tris EDTA
PCR	réaction de polymérisation en chaîne	TAP	tobacco acid pyrophosphatase
PDR	résistance dérivée du pathogène	tasiRNA	trans-acting short interfering RNA
PEG	polyéthylène glycol	TBE	tris borate EDTA
PNK	polynucléotide kinase	T-DNA	ADN transféré
PTGS	post-transcriptional gene silencing	TE	tris-HCl-EDTA
PVP	polyvinyl pyrrolidone	TEMED	NNNN'-tétraméthyle éthylène diamine
qsp	quantité suffisante pour	TGS	transcriptional gene silencing
QTL	locus à effets quantitatifs	Tris	tri(hydroxyméthyl)aminométhane
RACE	amplification rapide des extrémités d'ADN	U	Unité enzymatique
RB	bordure droite du T-DNA	UV	ultra-violet
RdRp	ARN polymérase ARN-dépendante	V	volt
RISC	RNA induced silencing complex	VIGS	virus-induced gene silencing
RNase	ribonucléase	X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
rNTP	ribonucléotide	XRN	exoribonucléase
rpm	rotation par minute	XVE	gène de fusion LexA-VP16-hER
RT	transcription inverse	Ω	ohm

Liste des virus cités

Ad5	<i>Human adenovirus type 5</i>	IBV	<i>Infectious bronchitis virus</i>
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	LIYV	<i>Lettuce infectious yellows virus</i>
AIMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	LRV	<i>Leishmaniavirus</i>
BaMV	<i>Bamboo mosaic potexvirus</i>	MBV	<i>Mushroom bacilliform virus</i>
BBMV	<i>Broad bean mottle bromovirus</i>	MCMV	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>	MHV	<i>Mouse hepatitis virus</i>
BMYV	<i>Beet mild yellowing virus</i>	PFBV	<i>Pelargonium flower break 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>
BSBV	<i>Beet soil borne virus</i>	PVX	<i>Potato virus X</i>
BVDV	<i>Bovine viral diarrhea virus</i>	PVY	<i>Potato virus Y</i>
BVQ	<i>Beet virus Q</i>	RCNMV	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>
BWYV	<i>Beet western yellows virus</i>	SBWMV	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>	SFV	<i>Semliki Forest virus</i>
BYV	<i>Beet yellows virus</i>	SINV	<i>Sindbis virus</i>
CarMV	<i>Carnation mottle virus</i>	TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
CCFV	<i>Cardamine chlorotic fleck virus</i>	TCSV	<i>Tomato chlorotic spot virus,</i>
CLBV	<i>Citrus leaf blotch virus</i>	TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
CNV	<i>Cucumber necrosis virus</i>	TGEV	<i>Transmissible gastroenteritis virus</i>
CTLV	<i>Citrus tatter leaf virus</i>	TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>	TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
CYDV	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>	TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i>	TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
CYMV	<i>Clover yellow mosaic potexvirus</i>	TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
EAV	<i>Equine arteritis virus</i>	VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>	WNV	<i>West Nile virus</i>
FHV	<i>Flock house virus</i>	WSMoV	<i>Watermelon silver mottle virus</i>
GRSV	<i>Groundnut ringspot virus</i>	WTV	<i>Wound tumor virus</i>
GVA	<i>Grapevine virus A</i>	ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>
GVQ	<i>Grapevine virus Q</i>		
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>		

Introduction générale

Introduction générale

Avant d'aborder mon travail de thèse, je propose tout d'abord de le replacer dans le contexte global du sujet. Ainsi, dans le chapitre d'introduction j'aborderai l'état des connaissances établies sur la rhizomanie, la maladie virale associée au virus que j'ai étudié : le BNYVV (*Beet necrotic yellow vein virus*). Dans un deuxième temps, je présenterai les enjeux majeurs des différents chapitres dont ma thèse est constituée. Chaque chapitre étant indépendant, j'ai choisi de les présenter individuellement par une partie introductive permettant la mise en place du sujet.

I. La rhizomanie

La rhizomanie est une maladie virale, affectant spécifiquement la betterave sucrière (*Beta vulgaris*). Les caractéristiques de la pathologie seront abordées sous forme d'une revue, co-écrite par les membres et des collaborateurs de mon laboratoire et publiée dans le journal Plant Viruses (Peltier *et al.*, 2008). Cette revue décrit les conséquences de la maladie sur plante, les propriétés moléculaires du virus responsable de la rhizomanie (BNYVV), mais également du vecteur responsable de la propagation de la maladie. Elle décrit aussi les moyens de lutte mis en œuvre pour éviter la propagation de la rhizomanie. J'ai également participé à l'écriture d'une autre revue sur le BNYVV, en français mais moins récente et qui sera présentée en annexe (Hleibieh *et al.*, 2007).



Molecular Biology of the *Beet necrotic yellow vein virus*

Claire Peltier¹ • Kamal Hleibieh¹ • Heike Thiel² • Elodie Klein¹ •
Claude Bragard³ • David Gilmer^{1*}

¹Institut 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

²University of Goettingen, Department of Crop Sciences, Plant Virology, Grisebachstrasse 6, D-37077 Goettingen, Germany

³Unité de Phytopathologie, Université Catholique de Louvain, Croix du Sud 2bt3, 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: *Bemivirus*, 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
BEEET 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 *Bemivirus* (ICTVdB, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>). BNYVV is transmitted by the soil-borne obligate parasite *Polymyxa 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 black scorch virus* has been shown to induce rhizomania-like symptoms (Weiland *et al.* 2007).

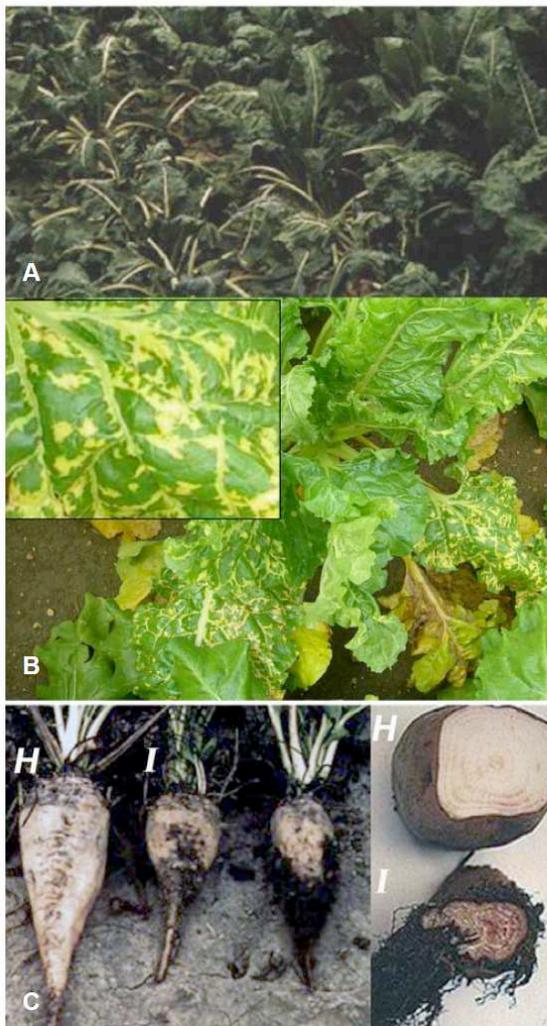


Fig. 1 Symptoms of sugar beet rhizomania. (A) During warm period, water deficiencies induced by rhizomania disease provokes plant wilt. (B) Foliar symptoms are rather rare and correspond to plant systemic infection. Vein yellowing and yellow chlorotic spots are induced by the expression of the RNA-3-encoded 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 auxine 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 *P. 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).

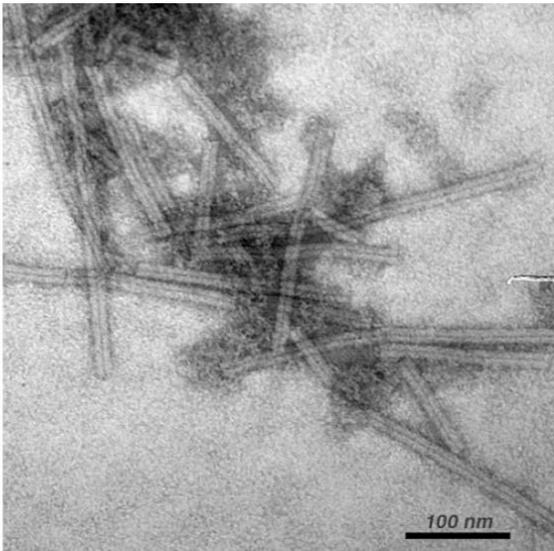


Fig. 2 Immunocaptured BNYVV particles observed by electron microscopy. (Photo M. Erhardt, IBMP).

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

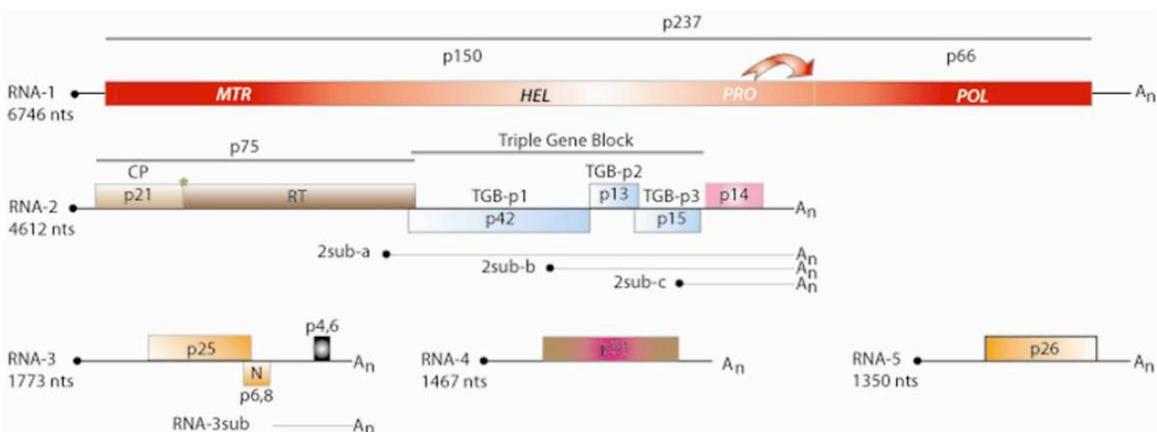


Fig. 3 BNYVV genomic organization. The sizes of the five genomic RNAs are presented. Black dot represents Cap structure and A_n the polyadenylated sequence. Squares correspond to ORF. Arrow designates the *cis* proteolysis of the RNA-1-encoded p237 polyprotein leading to the p150 and the p66 proteins. 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 *Bemoviruses*. 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 Solovyev 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 (Dumoyer *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 (Lauer *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 Fx₃FRGPGNx₂L 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, independently 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

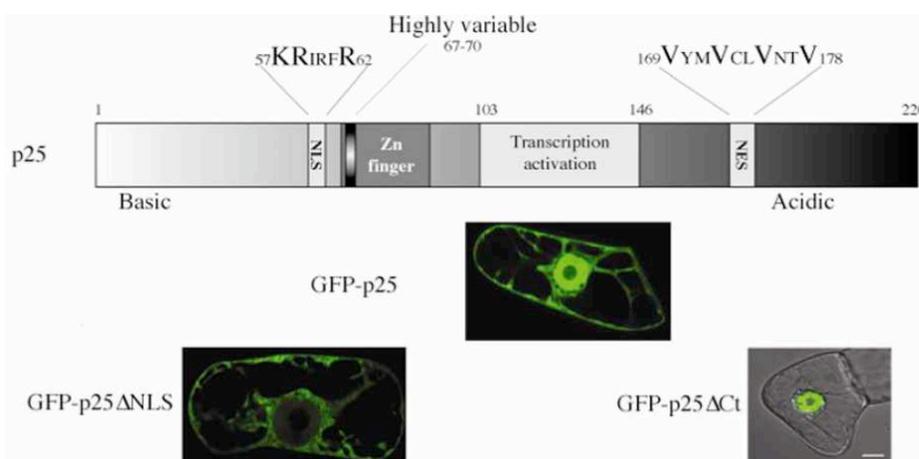


Fig. 4 Characteristics of the RNA-3-encoded p25: Line drawing representation of the p25 protein and of its known functional domains. (Top) The basic N-terminal domain contains a nuclear localization signal (NLS, 57-62), the highly variable 'Tetrad' sequence (67-70) and a Zinc finger domain. The acidic C-terminal part of the protein encompasses a domain responsible for the transcription activation (103-146) and the nuclear export sequence (NES, 169-178). (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' ²										
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 (Miyaniishi *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 (Miyaniishi *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 R_z 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 mosaic 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. polyspernum*) 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*, *Poaceae* 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; Maraite 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

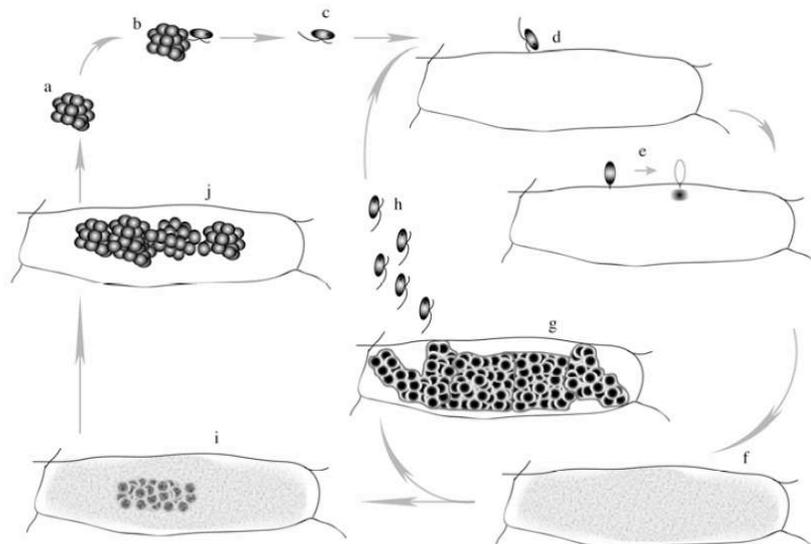


Fig. 5 Drawing of the *Polymyxa* spp. life cycles and its developing states. (a) sporosore; (b) germinating zoospore; (c), swimming zoospore to a (d) cortical or epidermal cell; (e) the zoospore encyst on the cell and injects its contents through the cell wall and the cellular membrane via the "sachel"; (f), developing plasmode 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 cytoplasm 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 *Benyvirus*, *Furovirus* 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 germplasm 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>	<u>Movement protein</u>	PDR	Excellent
G018	<i>B. vulgaris</i>	<u>Replicase</u>	PDR/PTGS	Excellent
-	<i>B. vulgaris</i>	<u>CP</u>	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 (Grümm *et al.* 2007). *Rz1* or *Rz2* carrying cultivars reduce viral titer up to 6.10^4 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 (Lennefers *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) (Lennefers *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 (Lennefers *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, Japan* 29, 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 rizomantoleranter zuckerrüben. In: International Institute for Beet Research (IIBR) (Ed) *Proceedings of the 50th Con-*

- gress of the IIRB, 11-12 February 1987, 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, Shucai 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*, 11-12 February 1987, IIRB, Brussels, pp 157-163
- Domingo E (2000) Viruses at the edge of adaptation. *Virology* 270, 251-253
- Doucet D (2006) Characterization of the pecluvirus movement in plant roots (development of a model and comparison with a benyvirus). PhD thesis, Université Catholique de Louvain, 226 pp
- 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
- Haeblerle 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
- Haeblerle 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* 51, 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, Haeblerle 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, Haeblerle 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
- Laubert 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
- Laubert 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
- Laubert 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
- Laubert 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 soilborne mosaic virus*, a proposed member of the genus *Benyvirus*. *Archives of Virology* 146, 2443-2453
- Legréve 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
- Legréve 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
- Legréve A, Schmit 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*, 5-7 September 2005, 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
- Lennefers 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
- Lennefers BL, Savenkov EI, Bensefelt J, Wremmerth-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
- Lennefers 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 AV (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 30th Congress of the IIBR*, 11-12 February 1987, 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, Ruyssens 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, Solovyev 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. *Phytopathologia Mediterranea* 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. *Phytopathologia Mediterranea* 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 64th Congress of the IIBR*, 26-27 June 2001, IIBR, Bruges, 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, Haeblerle 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 furivirus 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
- Verchof-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, Stubbley 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. Enjeux de mon travail de thèse

Comme nous venons de le voir, la rhizomanie de la betterave sucrière constitue un problème agricole mondial majeur, qui inquiète particulièrement la société semencière SESVanderhave. Mon laboratoire d'accueil étant spécialisé dans l'étude du BNYVV, une collaboration entre les deux partenaires a été mise en œuvre depuis plusieurs années afin de conjuguer les compétences et de favoriser les recherches et les perspectives de lutte contre la maladie. Ainsi, j'ai bénéficié pendant plus de trois ans, d'un financement de thèse sous forme de Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE), me permettant de mener un projet de recherche, sous la responsabilité du CNRS et de l'entreprise.

Il a été démontré que la protéine p25, codée par l'ARN-3 est majoritairement responsable de l'aggravation des symptômes foliaires et racinaires, et qu'elle serait un facteur de virulence. L'ARN-3 doit donc être particulièrement étudié afin de pouvoir trouver un moyen de limiter les conséquences de la maladie. La recherche appliquée ne pouvant progresser sans une recherche fondamentale amont, mon travail a consisté en l'association de ces deux facettes, focalisées à la fois sur l'ARN-3 et sur la protéine p25. Mon travail est ainsi divisé en trois chapitres, chacun présentés par une introduction spécifique du sujet abordé.

Le chapitre I présentera les travaux réalisés visant à évaluer une méthode de lutte contre le BNYVV, par l'utilisation d'une technique permettant la mise en place de l'ARN silencing. Je décrirai tout d'abord les connaissances actuelles de la lutte antivirale en général, ainsi que le mécanisme d'ARN silencing. Enfin, je présenterai l'application de cette technique à l'ARN-3 du BNYVV, et les résultats obtenus suite à la réalisation de tests de résistance sur différentes plantes hôtes.

Le chapitre II introduira plus en détail l'état actuel des connaissances sur la protéine p25. Si les modulations phénotypiques associées à cette protéine sont très étudiées, les mécanismes moléculaires ne sont pas encore élucidés. Nous nous sommes alors particulièrement intéressés aux conséquences cellulaires de la présence de p25, et notamment à l'étude des gènes dérégulés. Nous avons utilisé comme outil la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Des plantes transgéniques exprimant la protéine p25 ont été obtenues et leur étude initiée au cours de la thèse de Laure Schmidlin (thèse de doctorat ULP, Schmidlin, 2005), et poursuivies lors de mon travail de thèse. Le phénotype des plantes exprimant p25, leurs contenus hormonaux, ainsi que les modulations transcriptomiques ont été caractérisés, menant à l'écriture d'une publication qui sera prochainement soumise et dont je suis co-premier auteur (Peltier *et al.*, 2010). Je présenterai également les résultats obtenus suite à l'obtention de lignées d'*A. thaliana* exprimant la protéine p25 sous contrôle d'un promoteur inductible, puis ceux

concernant les analyses effectuées sur des *Nicotiana tabacum* exprimant la protéine p25. Lors de cette étude j'ai également produit des plantes transgéniques exprimant l'ARN-3 du BNYVV complet ou délété de ses séquences UTR. Ces plantes nous ont permis d'initier l'étude présentée dans le chapitre III.

Le chapitre III abordera la recherche fondamentale menée au laboratoire concernant l'ARN-3 et son ARN subgénomique, l'ARN-3sub. En guise d'introduction, je présenterai les caractéristiques majeures mais aussi plus inhabituelles des ARN subgénomiques et des autres ARN non génomiques retrouvés lors d'infections virales. Cette introduction permettra d'avoir une vision globale des mécanismes de synthèse des ARN associés aux autres espèces virales, afin de mieux appréhender le mécanisme propre au BNYVV. En effet, la partie résultats de ce chapitre montrera que l'ARN-3sub n'est pas issu d'une néosynthèse de la réplicase virale, et qu'il n'est donc pas un ARN subgénomique habituel. Nous avons étudié le mode de synthèse de l'ARN-3sub, ainsi que son rôle dans le cycle viral.

Enfin, la conclusion générale décrira les avancées scientifiques obtenues suite à mon travail de thèse. Je discuterai également des perspectives qui permettront de poursuivre mes travaux et d'approfondir les connaissances sur la mise en place de la pathogénicité liée au BNYVV.

Chapitre J

Chapitre I

Lutte contre la rhizomanie : cibler l'ARN-3

I. Les dégâts causés par la rhizomanie

1.1. Une épidémie mondiale

La rhizomanie a été observée et décrite pour la première fois dans les années 1950 dans la plaine du Pô et la vallée de l'Adige, au nord de l'Italie (Canova, 1959). D'autres foyers initiaux ont été décrits en Asie et au Moyen-Orient. Depuis, la maladie s'est propagée vers l'ensemble des pays du globe où toutes les zones betteravières sont touchées, excepté l'Angleterre où la maladie reste localisée à quelques parcelles, ainsi que les pays scandinaves qui sont à ce jour encore épargnés.

1.2. Pertes économiques

Les conséquences de la rhizomanie sont désastreuses d'un point de vue économique, puisqu'elles diminuent directement le rendement en sucre, comme cela a été décrit lors de sa découverte "fenomeno dei bassi titoli" (syndrome de faible teneur en sucre) (Piolanti *et al.*, 1957). En effet, les symptômes atteignent principalement la partie consommable de la betterave, ce qui a pour conséquence non seulement une diminution significative de la taille du pivot mais également une réduction de 10 à 20% de la teneur en sucre (Heijbroek, 1985). De plus, le rendement d'extraction du saccharose pendant la purification est lui aussi drastiquement diminué (Johansson, 1985 ; Richard-Molard, 1985) provoquant des pertes allant jusqu'à 70%.

La sévérité de la maladie et la perte de rendement dépendent également de la capacité de multiplication du vecteur *Polymyxa betae*, un protozoaire. La température est un des facteurs importants pour la multiplication du vecteur. Celle-ci est maximale entre 25 et 30°C (Rush, 2003). Dans une moindre mesure, l'humidité du sol permet également une meilleure prolifération du protozoaire, qui est donc favorisée par l'irrigation du sol. Cependant, compte-tenu des propriétés biologiques de *P. betae*, le mode d'acquisition et de transmission du virus ne sont pas bien connus. En effet, *P. betae* n'est pas cultivable *in vitro*. C'est un parasite obligatoire des cellules superficielles des radicelles des chenopodiacées. La sévérité de la maladie est aussi directement reliée au titre du virus dans la plante, qui est lui-même relié à la quantité d'inoculum présente dans le sol (Rush, 2003).

1.3. Persistance de la maladie

En plus de ses conséquences désastreuses sur une saison de culture de betterave, la rhizomanie a la particularité de pouvoir se transmettre aux cultures des saisons suivantes grâce à la persistance du vecteur dans les terres infestées. En effet, *P. betae* a un cycle de reproduction complexe, passant par un stade sous forme de spores, appelées cytosores, capables de rester en dormance plus de 15 ans jusqu'à trouver des conditions favorables pour germer (Heijbroek, 1987). Ces spores virulifères persistent donc dans le sol malgré l'alternance des cultures en champs, et peuvent transmettre le virus aux betteraves des années plus tard (Abe and Tamada, 1986). Le vecteur peut également être transmis à d'autres parcelles par le biais de terre infestée, transportée par des machines agricoles. Ce mode de transmission est d'ailleurs le principal responsable de la propagation de la maladie (Rush, 2003).

La recherche et l'utilisation de nouvelles technologies a permis d'éviter l'arrêt total des cultures de betterave dans les zones les plus touchées, et d'envisager différents moyens physiques, chimiques ou biologiques pour lutter efficacement contre cette maladie.

II. Les différents moyens de lutte antivirale

2.1. Neutralisation des vecteurs de transmission des virus

D'une manière générale il est difficile de lutter directement contre les virus de plantes qui sont des parasites intracellulaires, indissociables de leur hôte. Cependant il est possible de lutter contre leurs vecteurs. En effet, la majorité des phytovirus nécessitent des insectes, nématodes ou protozoaires pour leur transmission puisque les plantes sont immobiles. Ainsi, ces vecteurs sont devenus des cibles de choix pour limiter la propagation des virus. Aujourd'hui, beaucoup de pesticides sont répandus sur les champs afin de les éliminer, une solution certes efficace, mais dangereuse pour l'environnement et la santé humaine. En effet, plusieurs études établissent une corrélation entre l'utilisation répétée de ces

produits toxiques et le nombre de cas de cancers avérés dans la population agricole (Blair and Zahm, 1995).

Les *Polymyxa* spp. sont des vecteurs telluriques de nombreux phytovirus, dont le BNYVV (Campbell, 1996). En ce qui concerne le virus de la rhizomanie, le seul moyen d'éradication de *P. betae* est la fumigation des sols infestés par des produits toxiques comme le bromure de méthyle ou le dichloropropène/dichloropropane (Rush, 2003). Cette mesure diminue efficacement la quantité de vecteur virulifère présente dans le sol, et donc limite la propagation de la maladie, permettant une augmentation du rendement en sucre de 1,3 à 7,3 tonnes/ha aux Etats-Unis, et de 2,1 à 6,9 tonnes/ha en France (McGrann *et al.*, 2009). Cependant, les coûts et la toxicité de ces traitements ne permettent pas leur utilisation à grande échelle et ils ont par la suite été abandonnés (traité de Montréal, 1987).

Outre les mesures chimiques, il existe des mesures agronomiques adaptées pour éviter la propagation de la maladie par le vecteur virulifère. Un drainage suffisant du sol, ainsi qu'une irrigation raisonnée limitent la prolifération de *P. betae*. De plus, un maintien de la structure du sol évite son déplacement et limite la propagation du vecteur sur d'autres parcelles (Rush, 2003).

Cependant ces mesures ne sont pas suffisamment efficaces et les risques de propagation de la maladie restent élevés. D'autres moyens sont donc nécessaires afin de lutter contre les maladies virales d'origine tellurique. Les recherches sur le sujet ont permis de mettre au jour des méthodes biologiques issues de la sélection génétique naturelle, mais des essais de transgénèse de betterave ont également montré des résultats encourageants, comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants.

2.2. Recherche de plantes naturellement résistantes

La variabilité génétique permet aux organismes de bénéficier de résistances naturelles à certains agents biotiques et abiotiques, ou d'être en tout cas moins affectés par une maladie. C'est sur ce constat que les premières tentatives de sélection systématique de plantes résistantes ou tolérantes à la rhizomanie ont été effectuées en Italie dans les années 1960 par Maribo, une entreprise semencière danoise. Le cultivar diploïde "Alba P" fut la première variété de betterave sucrière (*B. vulgaris*) présentant une résistance partielle à la rhizomanie (Biancardi *et al.*, 2002). Il a été suggéré que la résistance serait due à une réaction active de la plante face au pathogène, plutôt qu'une simple tolérance. "Dora" et "Lena" sont d'autres cultivars présentant une résistance partielle à la rhizomanie (Scholten and Lange, 2000).

L'Institut Technique de la Betterave (ITB) de Paris continua les recherches alors que les champs autour de Pithiviers dans le Loiret étaient particulièrement infectés. La variété hybride "Rizor" obtenue en 1982 fut la première variété à montrer de bons résultats en réduisant significativement les dommages dus à la maladie, mais en maintenant la capacité du virus à se répliquer. Au vu de la

ségrégation de cette tolérance au sein des générations suivantes, celle-ci ne serait pas due à un gène unique, mais à un gène majeur aidé par d'autres gènes mineurs. Les mécanismes de résistance identifiés semblent multiples : ils affectent la circulation des particules virales dans les vaisseaux du xylème, mais aussi la reproduction du vecteur. Cependant, compte-tenu des mauvais rendements en terre saine et de la mauvaise résistance à d'autres maladies, d'autres lignées ont été recherchées et sélectionnées (Biancardi *et al.*, 2002).

Une autre variété de betterave sucrière (Holly) a été obtenue en 1983. Testée expérimentalement, elle présente une forte résistance due à un gène dominant nommé *Rz1* (Biancardi *et al.*, 2002). Le mécanisme de résistance n'est pas encore bien compris, mais semblerait agir davantage sur le virus que sur le vecteur. En effet, il a été montré que la réplication du BNYVV et le titre viral sont diminués dans les plantes présentant l'allèle *Rz1*. Cependant, son caractère n'est pas complètement dominant puisque la résistance au BNYVV est supérieure lorsque l'allèle *Rz1* est en contexte diploïde qu'en contexte triploïde. Bien que la résistance soit élevée, le titre viral peut être aussi élevé dans la variété portant le gène *Rz1* que dans une variété sensible, dans des conditions d'infection sévère (Scholten and Lange, 2000). Cette situation est problématique car elle maintient la charge virale dans le sol.

Rz1 est maintenant déployé à grande échelle, de l'Europe aux Etats-Unis. Cette résistance, due à un seul gène, voit ses limites atteintes car les pressions de sélection exercées par les betteraves résistantes favorisent l'évolution de nouvelles populations virales capables de contourner ces résistances, comme les isolats RB (resistance-breaking) décrits récemment (Liu *et al.*, 2005 ; Acosta-Leal *et al.*, 2008). L'utilisation de multiples résistances permettrait de ralentir l'émergence de ces nouveaux variants.

Un deuxième allèle de résistance nommé *Rz2* a été découvert chez *B. vulgaris subsp. maritima* (Scholten *et al.*, 1999). Cet allèle, localisé entre 20 cM et 35 cM du locus *Rz1* selon les sources, confère une meilleure résistance que *Rz1*. D'autres gènes ont par la suite été caractérisés. Le gène *Rz3* est localisé à 5 cM du locus de *Rz1* (Gidner *et al.*, 2005). De récentes études suggèrent que *Rz2* et *Rz3* seraient en réalité le même gène. *Rz4* (Grimmer *et al.*, 2007) et *Rz5* caractérisés par QTL (quantitative trait locus) seraient probablement alléliques du gène *Rz1* (Grimmer *et al.*, 2008). Ainsi, les locus représentés par *-Rz1*, *Rz4*, *Rz5-* et *-Rz2*, *Rz3-*, tous localisés sur le chromosome 3, sont les seuls actuellement connus capables de conférer une bonne protection contre le BNYVV. Le fait que ces deux loci soient liés rend l'obtention de variétés double-résistantes difficile.

2.3. Lutte antivirale par transgénèse

Ce chapitre ne présentera pas les approches visant à exprimer des scFv (single chain variable fragment), des protéines recombinantes mimant les domaines fonctionnels d'immunoglobulines et pouvant permettre l'inactivation de protéines virales tout comme le feraient des anticorps neutralisants (pour exemple, voir Fecker *et al.*, 1997).

2.3.1. Résistance dérivée du pathogène

Le concept de résistance dérivée du pathogène, ou PDR (pathogen-derived resistance) a été proposé pour la première fois en 1985 par Sanford et Johnston (Sanford and Johnston, 1985). Il consiste en diverses approches de transformation de plantes d'intérêt afin qu'elles expriment des gènes ou des séquences de gènes viraux, qui pourront alors conférer une forte résistance aux pathogènes ciblés. Les premiers tests encourageants ont été réalisés par l'expression de protéines virales (protéine de capsid, réplicase), puis de séquences d'ARN plus ou moins modifiées. Le paragraphe suivant relate l'actualité de l'utilisation de ces techniques, de leur diversité, de leur efficacité et de leur application pour la lutte contre le BNYVV.

a) Protéine de capsid (CP)

Le concept de PDR a été démontré pour la première fois avec l'expression de la protéine de capsid (CP) du TMV (*Tobacco mosaic virus*) dans des plants de tabac (Powell-Abel *et al.*, 1986). Le niveau de protection conférée par l'expression de la CP contre ce virus fut encourageant mais variable selon les plantes. En effet, les plantes exprimant la CP montrent un délai dans l'apparition des symptômes, et 10 à 60% des plantes sont complètement "immunisées". Dans le cas d'une concentration d'inoculum plus forte, les plantes transformées présentent une atténuation des symptômes. Il est intéressant de noter que la résistance est efficace uniquement sur un inoculum contenant des virions purifiés, mais ne l'est pas sur des inoculums constitués d'ARN viral ou des particules virales partiellement décapsidées (Powell-Abel *et al.*, 1986 ; Register and Beachy, 1988). La spécificité de la protection a également été testée en inoculant différents virus appartenant au même genre, mais avec plus ou moins d'homologie de séquence en acides aminés (Nejidat and Beachy, 1990). L'expression de la CP du TMV confère une résistance aux virus présentant au minimum 60% d'homologie au niveau de la séquence de la CP (Nejidat and Beachy, 1990).

D'autres études, en revanche, ont montré une résistance spécifique, notamment contre le TEV (*Tobacco etch virus*) qui est obtenue grâce à l'expression de sa CP dans des plants de tabac. Toutefois, ces plantes ne sont pas protégées contre l'infection par un potyvirus très proche, le PVY (*Potato virus Y*) dont la CP possède environ 63% d'homologie avec celle du TEV (Lindbo *et al.*, 1993).

Ce mécanisme de résistance médiée par la capsid est encore mal compris. Comme la résistance est souvent meilleure face à l'inoculation de virions par rapport à l'inoculation d'ARN viraux, il est supposé que la CP interviendrait dans les étapes précoces d'infection, non pas en s'associant aux ARN viraux disponibles, mais en empêchant la décapsidation des virions existants (Beachy *et al.*, 1990). Il a également été montré qu'une mutation du codon initiateur de la CP empêchant sa traduction ne permet pas de protéger la plante contre une infection, et que la quantité de CP produite est proportionnelle au taux de protection, suggérant que la protéine serait elle-même impliquée dans le mécanisme de résistance et non pas son ARN messenger (Powell *et al.*, 1990). Il est en tout cas clair que les facultés d'agrégation des protéines de CP sont corrélées à la résistance, puisque des mutants de capsid dépourvus de cette propriété ne protègent plus de l'infection par le virus (Asurmendi *et al.*, 2007 ; Bendahmane *et al.*, 2007). De plus, certaines mutations dans la CP affectent l'accumulation de protéine de mouvement (MP) et conduisent à une meilleure protection (Bendahmane *et al.*, 2007).

En ce qui concerne un autre virus, l'AIMV (*Alfalfa mosaic virus*), le mode d'action de la résistance apparaît encore plus complexe : alors qu'un faible taux de CP protège la plante contre un inoculum composé de virions encapsidés, un taux plus élevé ou une expression d'une CP mutée confère une résistance à une inoculation de virions mais aussi d'ARN (Baulcombe, 1996). Cela suggère que la résistance agit à deux niveaux : un niveau où le faible taux de CP inhibe la décapsidation des virions, alors qu'un deuxième niveau de résistance interviendrait à un stade du cycle où la CP est impliquée, en interagissant avec l'ARN viral ou des protéines de l'hôte.

Le PDR contre le PVX (*Potato virus X*) est aussi efficace contre un inoculum constitué de virions ou d'ARN. Des explications ont été proposées pour expliquer la résistance au PVX conférée par l'expression de la CP : la CP pourrait inhiber la traduction de la réplicase en se fixant sur la région 5' de l'ARN, renfermant le site d'encapsidation de l'ARN, et ainsi empêcher la réplication du virus (Baulcombe, 1996).

Toutefois, la PDR présente certaines limites dans le cas d'infections mixtes couramment rencontrées dans la nature. En effet, si la résistance contre le PVA (*Potato virus A*) est conférée par l'expression de la CP dans des plantes de *Nicotiana benthamiana*, cette résistance devient inefficace et est contournée par l'infection par un autre potyvirus, le PVY (Savenkov and Valkonen, 2001).

Des tentatives de lutte antivirale ont été mises en place contre la rhizomanie en utilisant un transgène codant pour la CP du BNYVV. Malgré l'absence de détection de la protéine CP dans les betteraves transgéniques, une résistance efficace a été démontrée en serre mais également en champs, indiquant probablement l'implication de l'ARN issu du transgène dans la résistance (Mannerlöf *et al.*, 1996).

b) Autres protéines virales

Des mécanismes de PDR basés sur l'expression de protéines virales non-structurales ont été testés (Prins *et al.*, 2008).

Ainsi, il existe un mécanisme de protection impliquant des protéines non-fonctionnelles, comme par exemple la MP du TMV, alors qu'une protéine fonctionnelle permet au contraire une augmentation des symptômes (Ziegler-Graff *et al.*, 1991). Cela peut s'expliquer par une compétition de fixation au niveau des plasmodesmes entre les MP sauvages et mutées. Il a aussi été montré que cette résistance n'est pas spécifique, puisqu'elle protège contre des potex-, cucumo- et tobnavirus en plus des tobamovirus, virus exprimant des protéines de mouvement 30K-like (Cooper *et al.*, 1995).

En ce qui concerne le BNYVV, de telles méthodes ont déjà été testées. Ainsi, il a été montré que la protéine de mouvement p15 dans sa forme sauvage ou mutée, inhibe le mouvement de cellule à cellule sur feuille de *Chenopodium quinoa* (Lauber *et al.*, 2001). Un mutant dominant-négatif de cette protéine a également été testé par transgénèse sur *B. vulgaris*, et il en résulte une bonne protection contre l'infection naturelle. Cependant, les plantes des générations suivantes peuvent perdre cette particularité, ce qui limite leur utilisation en agriculture.

Comme nous l'avons vu, le mécanisme de PDR basé sur l'expression de protéines virales est très complexe et variable suivant les plantes, les virus et les protéines utilisées, et limite ainsi la possibilité de prévoir son impact sur la résistance. La découverte de l'ARN silencing a bouleversé la lutte antivirale par transgénèse, en assurant une meilleure spécificité et une meilleure efficacité.

2.3.2. ARN silencing

Si certaines des résistances par PDR sont dues à l'expression des protéines elles-mêmes, de nombreuses ambiguïtés persistent quant à l'implication des ARN ou à la dualité d'action des deux protagonistes dans l'établissement de la résistance (Prins *et al.*, 2008). Cependant, l'implication des ARN dans la résistance a été clairement démontrée par l'utilisation de transgènes non traduisibles. Pourtant, là encore, le taux d'expression du transgène n'est pas forcément corrélé au degré de résistance. Lindbo proposa un modèle basé sur l'idée d'une résistance séquence-spécifique où le transgène ciblerait la dégradation de tous les ARN présentant une séquence homologue (Lindbo *et al.*, 1993). En effet, son équipe a montré une corrélation entre l'extinction post-transcriptionnelle du transgène et la résistance au TEV.

Ce mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle implique des petits ARN d'une vingtaine de nucléotides (nts) dérivés du transgène, appelés sRNA (short RNA), qui ont été retrouvés dans les plantes transgéniques. Comme des ARN similaires dérivés du génome viral ont également été retrouvés dans des plantes non-transgéniques infectées par des virus, il a été suggéré qu'il pourrait s'agir d'un même mécanisme, mis en place dans la résistance naturelle des plantes face aux virus (Baulcombe, 1996) : l'ARN silencing. Ce phénomène naturel ne serait qu'amplifié par l'expression du transgène. Le lien entre ces deux phénomènes a été démontré par l'extinction du gène GUS qui

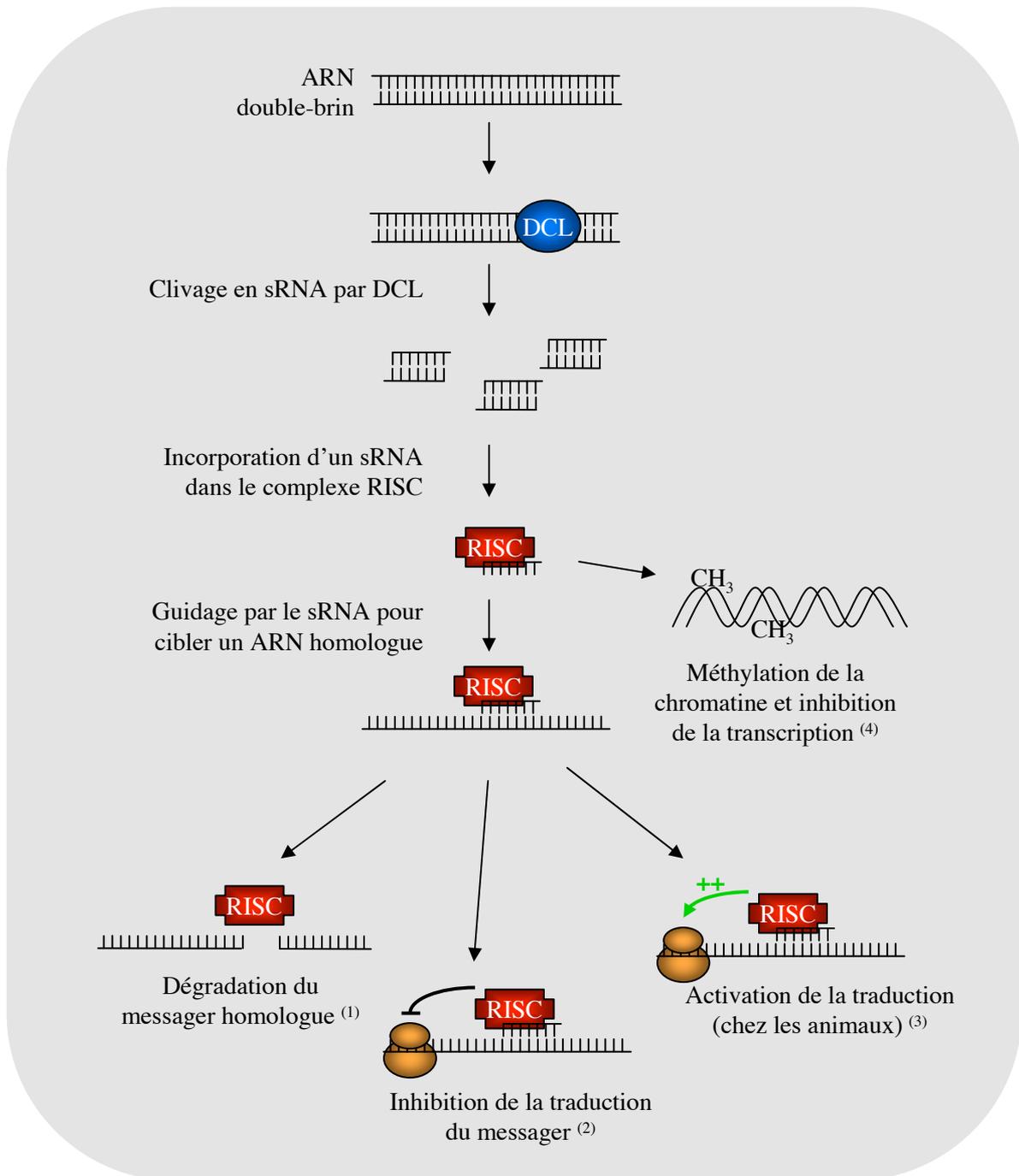


Figure I.1. : Mécanisme général de l'ARN silencing. Un ARN double-brin est reconnu par une des protéines DCL, ce qui entraîne sa coupure en petits duplexes de 21 à 24 nts appelés sRNA. Un des brins du duplexe est incorporé dans le complexe RISC, dont l'issue sera soit : 1) La dégradation de l'ARN messenger homologue par clivage via la protéine Argonaute du complexe RISC. 2) L'inhibition de la traduction du messenger cible. 3) L'activation de la traduction, pour l'instant uniquement démontrée chez les animaux. 4) La méthylation de la chromatine de séquence homologue au sRNA, conduisant à l'extinction transcriptionnelle (TGS).

confère une résistance à l'infection par un génome du PVX comportant la séquence GUS (Mueller *et al.*, 1995).

Les connaissances sur le silencing et sur les mécanismes de résistance ont évolué conjointement et continuent d'évoluer, les unes permettant un avancement des autres.

a) Mécanisme général de l'ARN silencing

L'ARN silencing est un mécanisme majeur de régulation retrouvé chez les organismes eucaryotes, et impliqué dans divers processus de développement et de défense innée. Son rôle est d'inhiber post-transcriptionnellement de manière spécifique des ARN, qui peuvent correspondre à des gènes cellulaires, afin de réguler leur expression, mais également, et c'est ce qui nous intéresse ici, à des ARN viraux. De nombreuses recherches sont effectuées sur l'ARN silencing, et les avancées dans ce domaine sont fulgurantes. Si beaucoup de processus biologiques impliquant l'ARN silencing sont décrits, les acteurs protéiques et nucléotidiques de base restent les mêmes (**figure I.1.**).

L'élément déclencheur du silencing est la présence d'une molécule d'ARN double-brin provenant de différentes origines : 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.

Des enzymes de type RNase III appelées Dicer-like (DCL, pour Dicer, la première protéine identifiée chez la drosophile (Bernstein *et al.*, 2001)), permettent le clivage de ces ARN double-brin. Chez *A. thaliana*, il existe 4 isoformes de Dicer (DCL1 à DCL4). Ces enzymes permettent la production de petits duplexes d'ARN de 21 à 24 paires de bases, appelés sRNA (small RNA) (Hamilton and Baulcombe, 1999).

Un seul des deux brins du duplexe va être sélectionné par les protéines Argonaute en fonction de certains critères : généralement le brin choisi serait celui dont l'extrémité 5' est du côté du duplexe le plus instable thermodynamiquement (Schwarz *et al.*, 2003), mais d'autres études indiquent que le nt 5' terminal serait déterminant, et variable selon les protéines Argonaute. Le brin sélectionné pourra alors servir de guide à la protéine Argonaute pour dégrader l'ARN homologue au sein du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) grâce à leur activité "slicer". *A. thaliana* compte 10 isoformes de ces protéines, nommées AGO1 à AGO10 mais l'activité de "slicer" n'a été démontrée que pour certaines d'entre-elles : AGO1 (Baumberger and Baulcombe, 2005), AGO4 (Qi *et al.*, 2006) et AGO7 (Montgomery *et al.*, 2008). Le clivage par AGO nécessite une complémentarité quasi-parfaite entre le sRNA guide et l'ARN cible, requiert des ions Mg^{2+} , et produit une extrémité 3'OH et 5'P. La coupure s'effectue sur l'ARN cible au niveau de la séquence complémentaire aux nts 10 et 11 du sRNA.

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). Chez les animaux, l'activation de la traduction par

Argonaute a également été mise en évidence (Vasudevan *et al.*, 2007). Le silencing peut également être transcriptionnel, par méthylation de l'ADN possédant une séquence homologue au sRNA, menant à l'inhibition de la transcription du messager (TGS, transcriptional gene silencing).

Il existe un mécanisme permettant l'amplification du signal de silencing par la production de sRNA secondaires, mécanisme appelé transitivity. Les enzymes impliquées sont des ARN polymérases-ARN dépendantes (RdRp). Bien qu'au nombre de 6 chez *A. thaliana* (Voinnet, 2008), seule RDR6 a un rôle démontré dans le mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle. RDR2 serait impliquée dans l'extinction transcriptionnelle. L'ARN messager cible de sRNA primaires est clivé par AGO1, et les deux brins d'ARN en résultant sont reconnus comme aberrants par RDR6. RDR6 serait alors capable de synthétiser l'ARN complémentaire, formant un ARN double-brin, cible des protéines DCL. Les sRNA secondaires produits peuvent alors cibler à leur tour d'autres ARN, entraînant une amplification du signal à d'autres séquences. Un état de maintenance de l'extinction du gène ciblé peut être mis en place par une méthylation du gène, menant à la production d'ARN aberrants, également pris en charge par le mécanisme de transitivity.

En plus du phénomène d'amplification, le silencing est capable de se propager à l'ensemble de la plante par un processus de mouvement de cellule à cellule, et même à longue distance. Il est crucial que la spécificité du signal soit conservée, or celle-ci est portée par la séquence nucléotidique des sRNA. C'est pourquoi il est suggéré que ces sRNA soient eux-mêmes les molécules circulantes à travers les plasmodesmes et les tissus vasculaires (Dunoyer and Voinnet, 2009).

Il existe de nombreux sRNA d'origines différentes et impliqués dans des mécanismes variés :

- les miRNA d'origine endogène sont codés par le génome, et transcrits sous forme de pri-miRNA par l'ARN pol II, puis maturés par DCL1 en pré-miRNA et enfin en miRNA. Ils sont impliqués dans le développement de la plante en provoquant la dégradation de l'ARN messager cible par AGO1, ou dans l'inhibition de la traduction de messagers cibles. Chez les mammifères certains miRNA pourraient permettre la promotion de la traduction (Vasudevan *et al.*, 2007). Comme cité précédemment, une telle fonction favorisant la traduction n'a pas encore été démontrée chez les plantes.
- les tasiRNA (pour trans-acting short interfering RNA) sont également endogènes et synthétisés par l'ARN Pol II en pri-tasiRNAs qui contiennent une séquence cible de miRNA. AGO1 clive le pri-tasiRNA qui va être converti par RDR6-SGS3 en ARN double-brin. DCL4 clive cet ARN double-brin pour produire des sRNA, dont certains appelés tasiRNA vont cibler la dégradation d'autres messagers.
- les nat-siRNA (pour natural cis-antisense transcripts-associated siRNAs) : deux gènes partiellement chevauchant sont transcrits après un stress et forment un ARN double-brin partiel, produisant des nat-siRNA primaires grâce à l'action de DCL2 (ou de DCL1 suivant les exemples). AGO clive ensuite

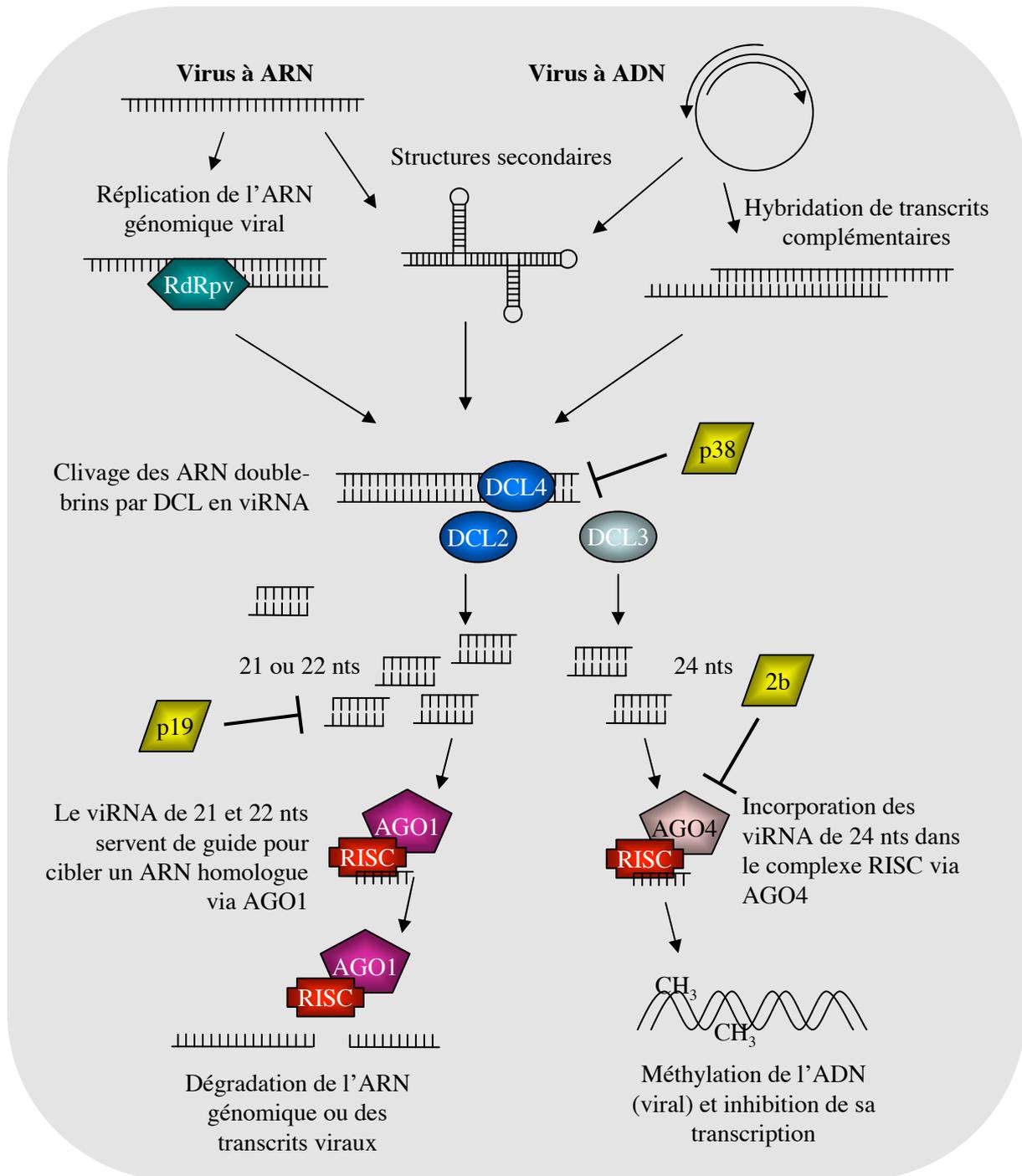


Figure I.2. : Mécanisme du silencing antiviral. Des virus à ARN ou à ADN produisent des structures double-brin par réplication ou transcription. Ces ARN double-brins vont être clivés par DCL4 ou DCL2 pour produire des viRNA de 21 ou 22 nts, qui peuvent s'incorporer dans le complexe RISC via AGO1 et cliver les ARN viraux homologues. Si DCL3 intervient, les viRNA de 24 nts produits vont induire la méthylation de l'ADN viral (ou cellulaire) et inhiber sa transcription. Des suppresseurs de silencing viraux (p38, p19 et 2b) agissent à différents niveaux du mécanisme, et sont capables d'inhiber la dégradation des ARN viraux. RdRpv : réplicase virale.

l'ARN homologue, ce qui va permettre la formation d'un ARN double-brin par RDR6. Enfin, DCL1 produit des nat-siRNA secondaires.

- les ha-siRNA (heterochromatin-associated short interfering RNA) : l'ARN Pol IV cellulaire transcrit un ARN, puis RDR2 transcrit le complémentaire sans utilisation d'amorce. L'ARN double-brin est clivé par DCL3, produisant des ha-siRNA de 24 nts. AGO4 ou AGO6 prend en charge les ha-siRNA, ce qui va entraîner la méthylation et donc le silencing de l'hétérochromatine par des méthylases : c'est le TGS (pour transcriptional gene silencing). Ce mécanisme peut aussi provenir des transgènes qui sont reconnus comme aberrants et qui produisent des ha-siRNA.

- les viRNA (viral interfering RNA) ou siRNA (short interfering RNA) proviennent de messagers d'origine exogène.

b) viRNA naturels

De nombreux phytovirus à ARN sont capables d'induire le silencing par leurs intermédiaires de réplication constitués d'ARN double-brins, ou par de fortes structures secondaires de l'ARN viral (**figure I.2.**). Les virus à ADN peuvent également induire ce mécanisme lorsque la transcription de leur génome entraîne la synthèse de brins chevauchants complémentaires ou d'ARN fortement structurés. Il en résulte une production de viRNA ciblant le brin génomique mais également le brin anti-génomique. Il existe néanmoins des exceptions où les viRNA ciblent spécifiquement le brin sens, ce qui est dû aux fortes structures secondaires que DCL peut cibler directement (pour revue voir Dunoyer, 2009).

Il semble qu'aucune protéine DCL ne soit absolument nécessaire et qu'il existe donc une certaine flexibilité dans leur mobilisation puisque des simples mutants de chacune des protéines DCL sont toujours capables d'activer le mécanisme de défense antivirale : ainsi, si DCL4 semble l'enzyme prioritairement utilisée, DCL2 prend le relais lorsque DCL4 est inactivée, menant à la synthèse de viRNA de 21 nts (ou de 22 nts dans le cas de DCL2) (Deleris *et al.*, 2006). La dégradation de l'ARN complémentaire aux viRNA est due au complexe RISC, dont l'activité catalytique serait portée par la protéine AGO1. Il a également été montré que, lors d'une infection par un virus à ADN, DCL3 peut intervenir pour former des viRNA de 24 nts qui seront incorporés grâce à AGO4 dans le complexe RISC (Moissiard and Voinnet, 2006). L'ADN génomique sera alors méthylé, empêchant ainsi la transcription de nouveaux ARN viraux.

Si le silencing constitue pour l'organisme un moyen de défense antivirale efficace, les virus ont évolué pour en éviter les conséquences : ainsi, des virus codent pour des miRNA pouvant déréguler la cellule infectée à leur profit (Pfeffer *et al.*, 2004). De plus, beaucoup de virus expriment des protéines suppresseur de silencing pour se défendre. Ces protéines, très différentes les unes des autres, sont capables de cibler différentes étapes du mécanisme de silencing (**figure I.2.**). Ainsi, la protéine de capsid du TCV (*Turnip crinkle virus*), p38, inhibe l'activité de Dicer (Qu *et al.*, 2003) ; la protéine

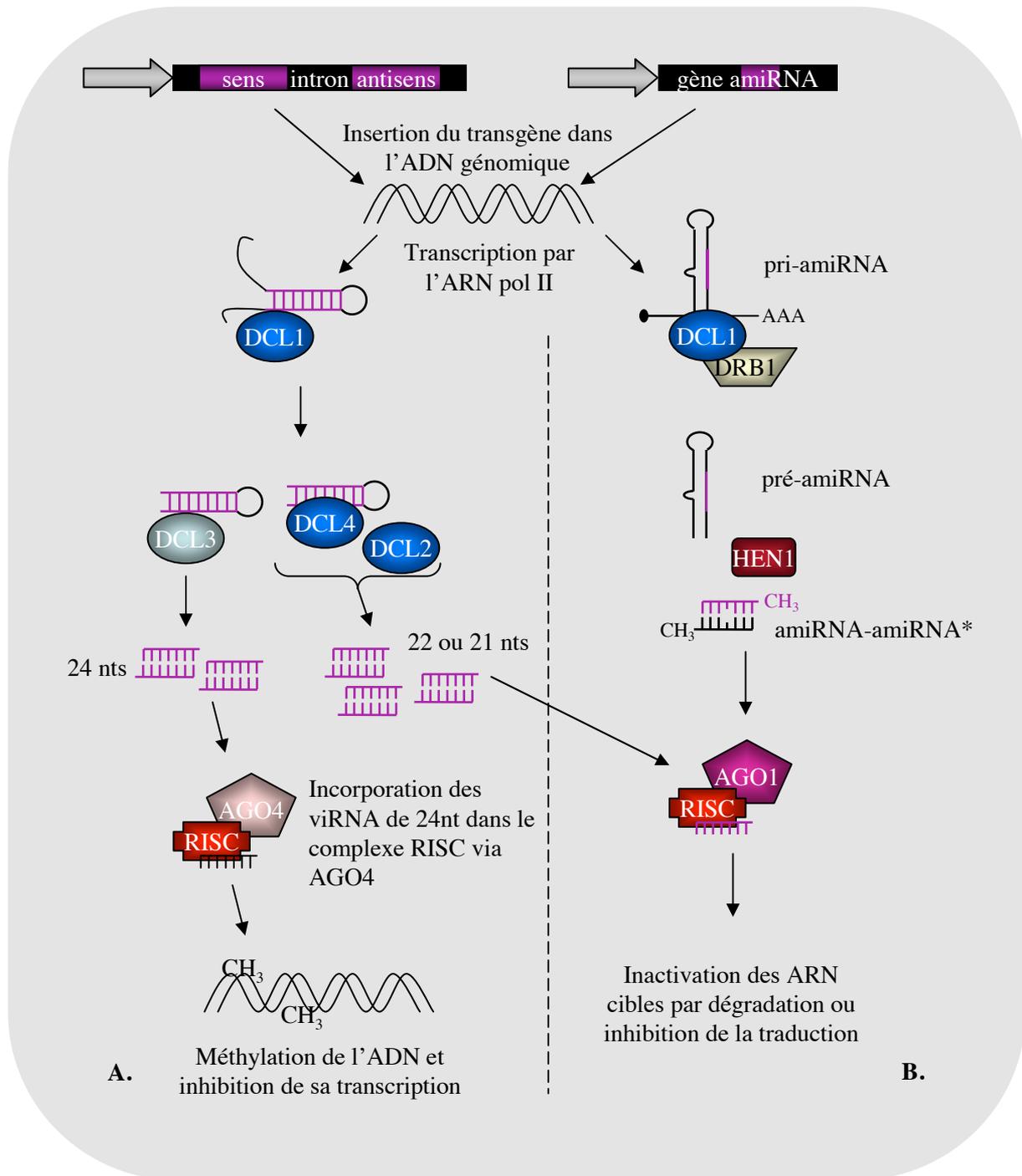


Figure I.3. : Représentation schématique des mécanismes initiaux de la mise en place du PTGS dans des stratégies antivirales. A. La voie de l'ARN silencing initiée par un transgène constitué de séquences inversées-répétées. **B.** La voie de l'ARN silencing suite à l'insertion d'un transgène codant pour un amiRNA.

p19 des tombusvirus est capable de séquestrer les sRNA double-brin (Baulcombe and Molnar, 2004) ; la protéine 2b du CMV (*Cucumber mosaic virus*) inhibe l'activité catalytique d'argonaute (Zhang *et al.*, 2006c). D'autres protéines virales sont supposées interférer avec l'activité RDR (TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*) ou avec la signalisation intercellulaire du silencing. L'issue de l'infection virale devient donc dépendante de l'équilibre silencing-suppresseur.

c) Utilisation du silencing comme défense artificielle

Les plantes mettent en place leur stratégie de défense lorsque le virus est déjà entré dans les cellules et qu'il a commencé son cycle de multiplication. Cela peut s'avérer trop tard pour lutter efficacement contre l'invasion systémique du virus. Ainsi, la mise en place précoce et artificielle du silencing antiviral avant même la synthèse des protéines suppresseur permettrait de conférer une "immunité" cellulaire (**figure I.3.A**). Une telle méthode appelée IR-PTGS (Inverted-Repeat Post Transcriptional Gene Silencing) est basée sur l'introduction d'un transgène composé de deux séquences inversement répétées et correspondant à une séquence virale, séparées par un intron (pour revue voir Brodersen and Voinnet, 2006). Après transcription, l'ARN en tige-boucle produit permet la mise en place du silencing. DCL1 excise les parties simple brin pour faciliter le travail de DCL4 (ou DCL2 si DCL4 est non fonctionnelle) qui peut alors couper l'ARN double-brin en siRNA de 21 nts. Ces siRNA sont incorporés dans le complexe RISC via la protéine AGO1, ce qui permet le ciblage et la dégradation spécifique des ARN viraux lorsqu'ils seront présents, et donc la mise en place d'une résistance. Des siRNA de 24 nts peuvent également être produits par DCL3 induisant la méthylation de l'hétérochromatine portant des séquences homologues (voir la voie des ha-siRNA), ce qui est intéressant dans la lutte contre des virus à ADN, mais pose des problèmes quant à la durabilité de l'expression de la résistance, quel que soit le transgène utilisé.

Les prémices de cette technique ont été réalisés par Waterhouse qui montra que l'expression simultanée de deux ARN sens et antisens permettaient une meilleure protection contre le PVY que des brins sens ou antisens seuls (Waterhouse *et al.*, 1998). Smith alla plus loin en transformant des plantes avec un seul transgène exprimant un ARN structuré en tige-boucle permettant la mise en place du silencing très efficacement (Smith *et al.*, 2000). Depuis, de nombreux virus ont été ciblés par des approches IR-PTGS, en ciblant diverses séquences du génome viral : P1 et HC-Pro, les deux acteurs de la suppression du silencing chez le PPV (*Plum pox virus*) (Di Nicola-Negri *et al.*, 2005), la polymérase du BYDV (*Barley yellow dwarf virus*) (Wang *et al.*, 2000), le gène N des tospovirus (Bucher *et al.*, 2006), la protéase du PVY (Smith *et al.*, 2000), la CP du CMV (Chen *et al.*, 2004).

La protéine C1 du TYLCV a également été ciblée et constitue la première démonstration de résistance artificielle par PTGS contre un virus à ADN (Fuentes *et al.*, 2006).

Si la défense antivirale est efficace, elle est aussi très spécifique, et ne permet une résistance qu'à une espèce de virus, ou à une famille de virus présentant une divergence d'homologie nucléotidique

inférieure à 10%. Ainsi, des plantes rendues résistantes au BYDV par l'introduction dans le génome d'une tige-boucle ciblant la polymérase du virus, restent néanmoins sensibles au CYDV (*Cereal yellow dwarf virus*) pourtant très proche (Wang *et al.*, 2000). Cependant, pour favoriser une résistance multiple, une tige-boucle chimérique comprenant les séquences juxtaposées de 4 différents tospovirus (TSWV, *Tomato spotted wilt virus*, TCSV, *Tomato chlorotic spot virus*, WSMoV, *Watermelon silver mottle virus*, GRSV, *Groundnut ringspot virus*) dont le pourcentage d'homologie varie de 40 à 80% a été créée (Bucher *et al.*, 2006). Cette tige-boucle a prouvé son efficacité contre l'ensemble des virus ciblés, même s'ils sont inoculés simultanément.

D'autres paramètres entrent en compte dans l'efficacité du système. Si la longueur de la séquence ciblée ne semble pas être importante pour conférer une bonne protection, il a également été montré que la nature de la séquence située entre les deux séquences inversement répétées est cruciale car elle influence le taux de résistance (Wesley *et al.*, 2001).

En plus de l'IR-PTGS, un nouveau moyen de défense antivirale basée sur l'ARN silencing a été mis au point ces dernières années : il s'agit de l'utilisation de miRNA artificiels (amiRNA) dirigés contre les séquences virales (**figure I.3.B.**). Ainsi, il a été montré chez *A. thaliana* que des amiRNA confèrent une résistance au TYMV (*Turnip yellow mosaic virus*), au TuMV (*Turnip mosaic virus*) (Niu *et al.*, 2006) et au CMV (Qu *et al.*, 2007 ; Duan *et al.*, 2008). Cette approche présente certains avantages car la région ciblée est très courte et limite les risques d'interférence avec des ARNm cellulaires, ce qui est appréciable surtout pour des plantes dont le génome n'est pas encore entièrement séquencé. Néanmoins, les virus à ARN possèdent une grande variabilité génétique et il est tentant de penser qu'en présence d'une telle pression de sélection, ils seront capables de contourner une résistance très spécifique par simple modification nucléotidique dans la séquence cible qui n'est que d'une vingtaine de nts.

d) ARN silencing dirigé contre le BNYVV

En 2006, une publication concernant la transgénèse de betterave par une construction en tige-boucle dirigée contre 400 nts de la réplicase virale du BNYVV a permis de montrer son efficacité dans la lutte contre ce virus (Lennfors, 2006). Cette tige-boucle cible une région de la réplicase conservée à 98% entre les différents isolats du BNYVV. La région séparatrice entre les deux séquences inversement répétées est constituée de la région 3' non-codante de l'ARN-1. Des betteraves transgéniques exprimant cette tige-boucle sous le contrôle du promoteur constitutif d'*A. thaliana* Ubi3 montrent une résistance accrue par rapport aux plantes sauvages, et même par rapport aux variétés naturellement résistantes comme Holly, Rizor, Alba ou des croisements de ces variétés, exceptée la variété portant l'allèle *Rz2* qui a un taux de résistance comparable aux plantes transgéniques. La résistance est corrélée au taux de siRNA produits, et le messenger codant pour la tige-boucle est peu ou n'est pas

retrouvé dans les plantes, suggérant qu'il est bien soumis au mécanisme de silencing. Les tests ont été effectués en champs sur une durée allant jusqu'à 5 mois, indiquant que la résistance mise en place est capable de se maintenir dans la durée. La résistance est efficace contre différents isolats du BNYVV comme l'isolat B provenant d'Allemagne et l'isolat P provenant de Pithiviers en France. Cette résistance est également efficace dans des plantes hétérozygotes pour le transgène.

Afin de vérifier si la co-infection avec d'autres virus pouvait favoriser la suppression de la résistance, comme cela a déjà été montré (Savenkov and Valkonen, 2001), des tests de co-infection ont été effectués avec des virus de betteraves souvent retrouvés en co-infection avec le BNYVV dans les champs : le BSBV (*Beet soil borne virus*) et le BVQ (*Beet virus Q*) transmis par le même vecteur *P. betae*, et le BMYV (*Beet mild yellowing virus*) et le BYV (*Beet yellows virus*) transmis par pucerons. Ces virus portent des suppresseurs de silencing : P21 pour le BYV, P0 supposé pour le BMYV (virus proche du BWYV ou *Beet western yellow virus* qui code pour P0, un suppresseur de silencing) qui pourraient interférer avec le mécanisme de silencing mis en place par le transgène. De manière surprenante, les résultats indiquent que la résistance reste aussi efficace qu'en l'absence des autres virus (Lenefors *et al.*, 2008). Même si ces tests d'infections mixtes suivent une cinétique inverse d'une infection réelle où le BNYVV intervient en premier suivi des polérovirus, ces résultats sont les premiers à montrer une résistance efficace contre un virus dans des conditions proches des conditions naturelles de culture de plantes d'intérêt agronomique. D'autre part, l'utilisation de la séquence 3' non-codante de l'ARN-1 comme espaceur des séquences inversées-répétées n'est pas habituelle, et pourrait impliquer d'autres mécanismes que l'ARN silencing dans le processus de résistance.

La stratégie tige-boucle développée au laboratoire est dirigée contre la protéine p15 du BNYVV (brevet Lauber *et al.*, N°11/418,384), une des trois protéines de mouvement faisant partie du triple-gene block. Cette tige-boucle est composée de la séquence complète de la protéine p15 mutée utilisée pour conférer une protection (comme décrit dans le paragraphe 2.3.1.2), mais privée du codon initiateur ce qui prive toute possibilité de synthèse de la protéine. Des essais sur feuille de *Beta macrocarpa* agroinfiltrée avec la construction puis inoculée par des ARN viraux, ont permis de montrer une résistance à l'infection par rapport aux contrôles agroinfiltrés avec un vecteur vide. Ces essais concluants ont motivé la transgénèse de *B. vulgaris*, qui montre une diminution significative des symptômes dans des conditions réelles de culture. Les analyses moléculaires n'ont pas encore été finalisées mais la résistance semble avérée.

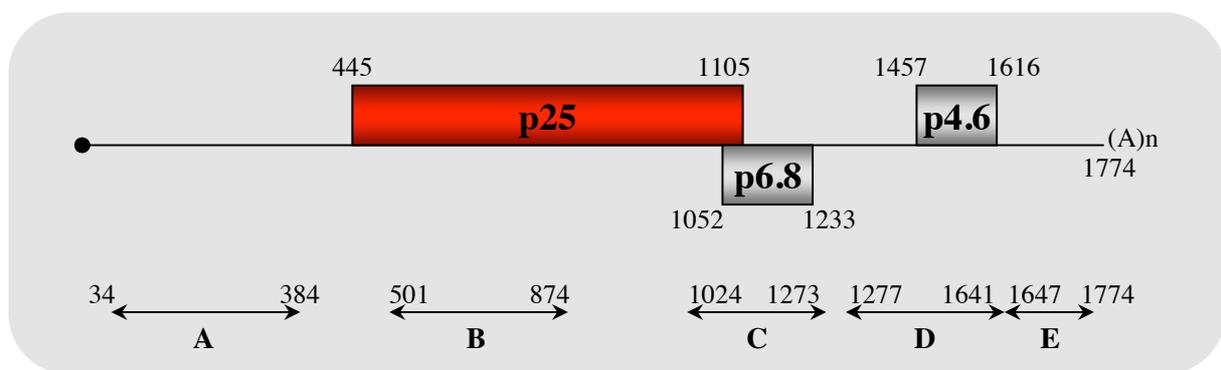


Figure I.4. : Représentation schématique de l'ARN-3 du BNYVV et des régions choisies pour la construction des hairpins. Cinq régions de l'ARN-3 nommées A à E ont été choisies pour construire des hairpins. L'ARN-3 est représenté schématiquement. Les rectangles représentent les cadres de lecture : en rouge celui de la protéine p25, et en gris celles des deux protéines putatives p6.8 et p4.6. Les séquences choisies pour les hairpins sont indiquées par des traits fléchés en bas de la figure. Les positions nucléotidiques sont précisées pour les cadres de lecture et pour les séquences choisies.

III. Cibler l'ARN-3 du BNYVV : résultats

Si des résultats probants ont d'ores et déjà été obtenus dans la lutte contre le BNYVV, cela n'exclut pourtant pas un contournement possible de la résistance par des mutations de séquences virales dans un futur plus ou moins proche. C'est pourquoi il est utile de poursuivre la recherche de nouvelles sources de résistances, afin de cumuler celles-ci, ou de pallier à l'inefficacité d'une résistance contournée.

Comme cela a été présenté dans la revue d'introduction, l'ARN-3 est responsable de l'aggravation des symptômes de rhizomanie. En effet, l'ARN-3 code pour la protéine p25 qui est impliquée dans le jaunissement des lésions sur feuilles de *C. quinoa* ou de *B. macrocarpa*. De plus, des betteraves cultivées en terre infectée par un inoculum contenant des mutants de délétions de l'ARN-3 au sein de la séquence nucléotidique de la protéine p25 présentent une diminution du taux de virus dans les racines (Tamada *et al.*, 1999). Les betteraves infectées par les isolats mutants n'acquièrent pas non plus les symptômes typiques de rhizomanie, et leur teneur en sucre ainsi que les rendements de purification sont proches de ceux obtenus avec des betteraves saines. La corrélation entre l'absence de symptômes et la faible teneur en virus et/ou l'absence de protéine p25 n'est pas encore clairement démontrée. Il est en tout cas évident que l'ARN-3 est directement responsable des dégâts qui accompagnent la rhizomanie, notamment par l'intermédiaire de l'expression de la protéine p25 (voir chapitre II) et d'une séquence nucléotidique appelée "core" (voir chapitre III) (Lauber *et al.*, 1998).

Compte-tenu de ces propriétés, l'ARN-3 représente une cible idéale pour lutter contre la rhizomanie. Bien qu'il ne soit pas nécessaire à l'infection locale puisque les ARN-1 et -2 seuls suffisent à la réplication et au mouvement de cellule à cellule, sa dégradation ciblée par ARN silencing pourrait permettre de restreindre l'infection localement au sein de betteraves néanmoins infectées, conduirait idéalement à l'élimination de l'ARN-3 au sein de l'isolat viral, et activerait les voies de défense pouvant conférer une protection croisée face à d'autres virus de betterave (Rush, 2003).

Mon projet a consisté à construire différentes tiges-boucles ou "hairpin" permettant la dégradation spécifique de l'ARN-3 et de déterminer leurs effets sur l'infection par le BNYVV.

3.1. Construction des hairpins et analyse des siRNA

Afin de trouver la séquence la plus efficace pour la synthèse de siRNA, nous avons ciblé cinq régions de l'ARN-3, nommées A à E (**figure I.4.**). La séquence A cible la région 5' non codante (nts 34-384), la séquence B correspond à une partie de la séquence codant la protéine p25 (nts 501-874), la séquence

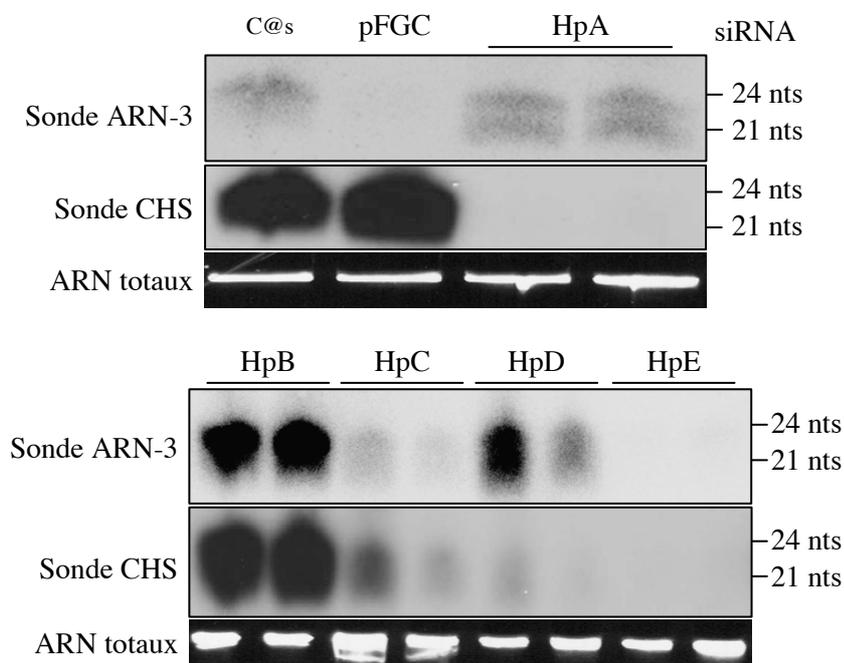
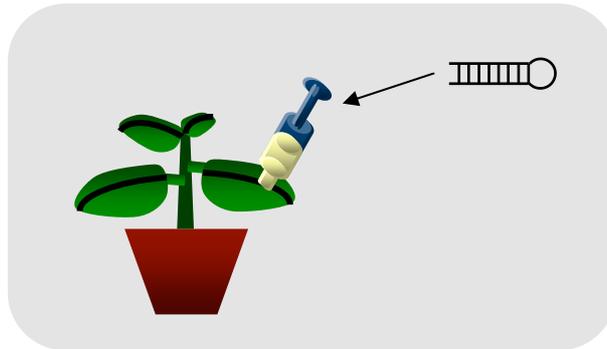


Figure I.5. : Accumulation des siRNA après infiltration des constructions hairpin. Northern-blot réalisé sur les ARN totaux extraits des feuilles 4 jours post-infiltration. Chaque construction a été testée deux fois, et les deux échantillons ont été déposés. Les sondes utilisées sont indiquées à côté des panneaux. Les tailles des ARN en nucléotides sont indiquées à droite des panneaux. La quantité d'ARN déposée sur gel est analysée par coloration au bromure d'éthidium (sous les panneaux). HpX : ARN de feuille infiltrée avec une construction hairpin (X = lettre correspondant à la séquence de l'ARN-3). pFGC : ARN de feuille infiltrée avec le vecteur vide. C@s : ARN de feuilles infiltrées avec la construction hairpin C ne contenant que le bras antisens de l'hairpin.

C comprend la séquence core impliquée dans le mouvement à longue distance (nts 1024-1273), la région D (nts 1277-1641) cible le cadre de lecture de la protéine putative p4.6, et enfin la région E (nts 1647-1774) est dirigée contre la partie 3' terminale de l'ARN-3, qui est très conservée chez tous les ARN du BNYVV et chez un autre *Benyvirus*, le BSBMV (*Beet soil borne mosaic virus*). Ces séquences ont été amplifiées à partir du plasmide pB35 comprenant la séquence de l'ARN-3 provenant d'un isolat B, puis clonées en position inversée-répétée de part et d'autre de l'intron de la chalcone synthase (CHS) dans le vecteur pFGC5941 (McGinnis *et al.*, 2005). Ce vecteur binaire permet l'expression des constructions dans les cellules de plantes transformées, sous le contrôle du promoteur constitutif 35S.

Les infiltrations des agrobactéries transformées par ces différents vecteurs ont d'abord été effectuées dans des feuilles jeunes de *N. benthamiana*, où la technique d'infiltration est connue pour être efficace. Les ARN totaux des feuilles infiltrées ont été extraits 4 jours post-infiltration, et les siRNA, indicateurs du mécanisme de silencing ont été recherchés par northern-blot. L'analyse a été effectuée avec une sonde ARN-3 dirigée contre l'ensemble des séquences, et les résultats sont présentés sur la **figure I.5.** Les signaux observés indiquent que l'ensemble des constructions permet la synthèse de siRNA en quantité suffisante pour être visualisés par cette technique, excepté pour la construction la plus courte, HpE, où aucun signal n'est visible.

Parmi les différentes constructions, on peut noter une différence d'intensité dans les signaux obtenus : si les constructions HpB et HpD montrent des signaux très forts, ce n'est pas le cas pour les constructions HpA et HpC dont le signal est faible. Ce phénomène peut s'expliquer par une différence dans le taux d'expression des siRNA, mais cela peut également résulter d'une différence d'hybridation de la sonde, qui peut avoir une affinité différente pour chaque séquence.

Deux populations de siRNA sont retrouvés : les siRNA de 21 nts et ceux de 24 nts (cf paragraphe 2.3.2.c). Les siRNA de 21 nts sont produits par DCL1 et servent de guide aux protéines Argonaute pour dégrader les ARN homologues. Les siRNA de 24 nts, quant à eux, sont produits par DCL3 et ont pour fonction de méthyliser l'ADN homologue afin de silencer le gène. Il est donc possible que certains des transgènes soient transcriptionnellement affectés dans la production de siRNA. Ce mécanisme ne peut pas être mis en évidence par la simple recherche de la quantité du messenger du transgène, car celle-ci est fonction à la fois du mécanisme du PTGS par dégradation, et du TGS par absence de transcription.

La construction C@s contient uniquement la séquence C en antisens, une des deux séquences inversées-répétées retrouvées dans HpC, et ne forme donc pas d'hairpin. Puisqu'elle produit un ARN complémentaire à la séquence core impliquée dans le mouvement à longue distance, C@s pourrait empêcher l'action de cette séquence et inhiber le mouvement. Étonnamment, seuls les siRNA de 24 nts sont retrouvés.

Nous avons également recherché la synthèse de siRNA induits par l'intron de la chalcone synthase. L'épissage des introns a lieu dans le noyau de la cellule (Moore and Proudfoot, 2009), alors que le

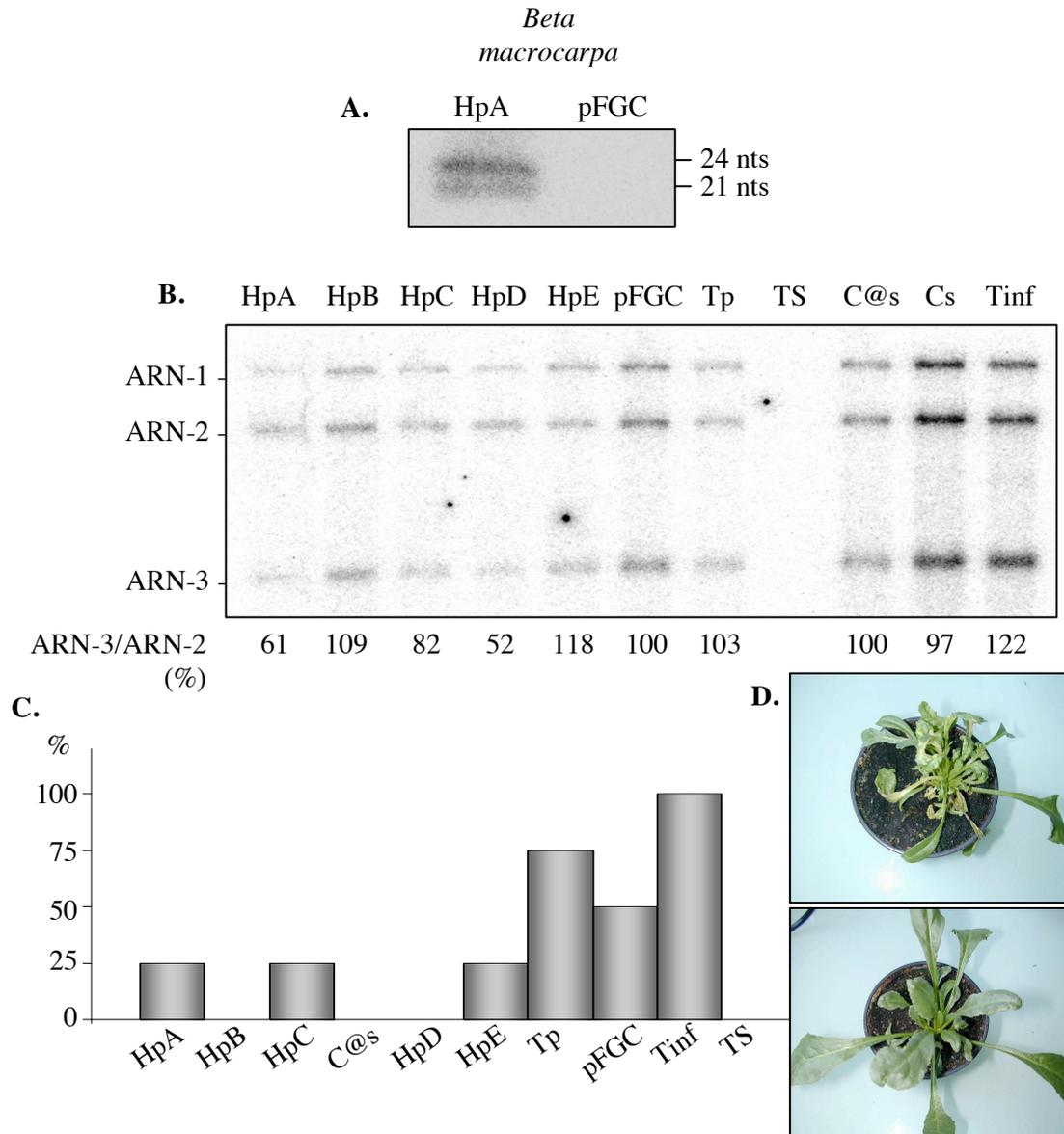


Figure I.6. : Accumulation des siRNA et ARN viraux post-infiltration dans *Beta macrocarpa*, et effet sur le mouvement systémique viral. **A.** Northern-blot réalisé sur les ARN totaux extraits des feuilles 4 jours post-infiltration. La sonde cible la région A de l'ARN-3 (voir figure 3.1.A). La taille des fragments en nucléotides est indiquée à droite. **B.** Northern-blot réalisé sur les ARN totaux d'une lésion prélevée sur feuille 7 jours après inoculation. Les sondes ciblent les ARN-1, -2 et -3 du BNYVV. Le ratio ARN3/ARN2 est indiqué en dessous de l'image. **C.** Graphique présentant le pourcentage de plantes développant des symptômes de systémie virale 13 jours après l'infection. **D.** Photos de *B. macrocarpa* prises 13 jours après inoculation. En haut : infection systémique. En bas : infection localisée. HpX : Construction hairpin agroinfiltrée. pFGC : ARN de feuille infiltrée avec le vecteur vide. Tp : feuille infiltrée avec du tampon d'infiltration. TS : témoin sain. Cs et C@s : intermédiaires de clonage de la construction hairpin C, ne contenant qu'un bras de l'hairpin, respectivement C sens et C antisens. Tinf : témoin non infiltré mais infecté.

silencing se produit dans le cytoplasme. Les introns ne devraient donc pas être soumis au mécanisme d'ARN silencing. Pourtant, il est intéressant de noter que cette séquence simple brin est également soumise au silencing, puisque des siRNA spécifiques sont retrouvés (**figure I.5.**). Néanmoins, les siRNA dirigés contre cette séquence sont produits de façon variable en fonction des différentes constructions. La région HpB, ainsi que le contrôle pFGC et la construction C@s produisent des siRNA issus de l'intron chalcone synthase à un taux beaucoup plus élevé que les autres constructions. Ces résultats suggèrent que l'épissage de l'intron n'a pas lieu dans le cas des constructions HpB et pFGC, alors qu'il se produit partiellement pour les constructions HpC et HpD, et que l'intron est complètement épissé pour les constructions HpA et HpE. Toutefois, il n'y a pas de corrélation claire entre le taux de siRNA spécifiques de l'ARN-3 et l'épissage de l'intron.

3.2. Analyse de l'effet des hairpins sur l'infection virale

Les plantes *B. macrocarpa* sont hôtes du BNYVV et permettent une infection systémique en présence d'ARN-3 (Lauber *et al.*, 1998). C'est pourquoi nous avons choisi cette plante pour tester les effets des hairpins sur l'infection virale. En effet, si les hairpins peuvent permettre la dégradation spécifique de l'ARN-3, le virus ne pourra plus se propager à longue distance et sera restreint à une infection localisée. De plus, les lésions virales jaunes en présence d'ARN-3 devraient devenir chlorotiques vertes si l'ARN-3 est dégradé spécifiquement.

L'efficacité de production des siRNA dans *B. macrocarpa* a d'abord été testée. Nous avons donc procédé à la même expérience que celle décrite dans le paragraphe 3.1, en agroinfiltrant la construction HpA sur des feuilles de *B. macrocarpa*. Tout comme dans le cas de *N. benthamiana*, les résultats mettent en évidence une expression des siRNA de 21 et de 24 nts à un taux similaire (**figure I.6.A.**), et indiquent donc une mise en place efficace du mécanisme de silencing. Les tests d'infection virale ont donc été réalisés avec l'ensemble des constructions.

A cinq jours post-infiltration, les feuilles infiltrées ont été inoculées par une suspension de virus contenant les ARN 1, 2 et 3 du BNYVV. A sept jours post-inoculation, des lésions chlorotiques jaunes ont pu être observées, indiquant la présence d'ARN-3 (résultats non montrés). Pour chaque construction, les ARN ont été extraits d'une lésion et analysés par northern-blot à l'aide de sondes spécifiques des ARN viraux du BNYVV (**figure I.6.B.**). Chaque lésion renferme les 3 ARN viraux, comme attendu après observation des lésions, suggérant que les siRNA produits ne sont pas capables d'interférer complètement avec l'accumulation d'ARN-3. Cependant afin de quantifier l'accumulation d'ARN-3, nous avons estimé les ratios d'accumulation d'ARN-3 par rapport à l'ARN-2 grâce au logiciel ImageJ (**figure I.6.B., partie basse**). Ces rapports ont été normalisés par rapport à celui du témoin infiltré par le vecteur vide (pFGC). Cette approche permet de constater que l'infiltration affecte

légèrement l'accumulation de l'ARN-3 et donc l'infection virale, puisque les feuilles non infiltrées (Tinf) ont un taux d'ARN-3 supérieur (122%) à celui des témoins infiltrés par du tampon d'infiltration seul (Tp) (103%) ou par la construction pFGC (100%). De même, les constructions HpB, HpE et C@s n'influencent pas l'accumulation de l'ARN-3 puisque les ratios sont là aussi voisins de 100% (109, 118 et 100% respectivement). Pourtant il faut noter que la construction HpE cible l'ensemble des ARN viraux puisque sa séquence est homologue de la région 3' conservée. Cette hairpin pourrait avoir une influence sur l'accumulation de l'ARN-3 et des autres ARN viraux mais non visualisé par ce type de calcul. En comparant la quantité des ARN-1, -2 et -3 au témoin, on constate qu'il n'en est rien.

En revanche, les constructions HpA et HpD permettent une réduction de l'accumulation de l'ARN-3 par rapport à l'ARN-2 jusqu'à des taux de 61% et 52% respectivement. Cela suggère que les siRNA dirigés contre ces régions permettent une dégradation ciblée de l'ARN-3. La construction HpC permet elle-aussi une diminution de l'accumulation de l'ARN-3, mais plus faiblement puisqu'elle ne chute que de 18%. Même si certaines constructions semblent efficaces, le taux d'ARN-3 diminue sans disparaître, ce qui implique que toutes les molécules d'ARN-3 ne sont pas dégradées.

Les effets sur l'accumulation d'ARN-3 viral ayant été encourageants pour certaines constructions, nous avons analysé les effets sur le mouvement à longue distance du virus chez *B. macrocarpa*. Rappelons que l'ARN-3 est responsable du mouvement systémique du virus, et que son absence prévient ce mouvement. Généralement, le mouvement systémique apparaît environ 13 jours post-inoculation sur 90% des plantes infectées, et se caractérise par un jaunissement, une déformation des feuilles supérieures, et un nanisme des plantes.

Les plantes témoin non infiltrées montrent les symptômes caractéristiques d'une infection systémique dans 3 cas sur 4, indiquant la bonne qualité de l'expérience (**figure I.6.C. et D.**). Les autres plantes témoins infiltrées par le tampon (Tp) et par le vecteur vide (pFGC) présentent une infection systémique pour 3 et 2 plantes respectivement. Dans le cas des constructions hairpin HpA, HpC, HpE et Cs, seule 1 plante sur 4 développe les symptômes d'une infection généralisée. L'efficacité des constructions est encore plus visible pour les constructions HpB, HpD et C@s qui ne présentent pas de symptômes caractéristiques d'infection sur les feuilles supérieures.

La construction HpD semble être la plus efficace pour limiter l'amplification de l'ARN-3 et pour protéger les plantes contre l'infection systémique par le BNYVV. Afin d'améliorer son efficacité, nous avons créé une hairpin permettant d'agir potentiellement à la fois sur l'accumulation d'ARN-3 par sa région HpD, mais aussi sur les autres ARN viraux de *Benyvirus*, en ajoutant la séquence de la région HpE (3'UTR), créant ainsi une hairpin nommée HpDE. Nous avons également recherché si le maintien de l'ARN-3 pourrait être expliqué par l'action du suppresseur viral d'ARN silencing, p14.

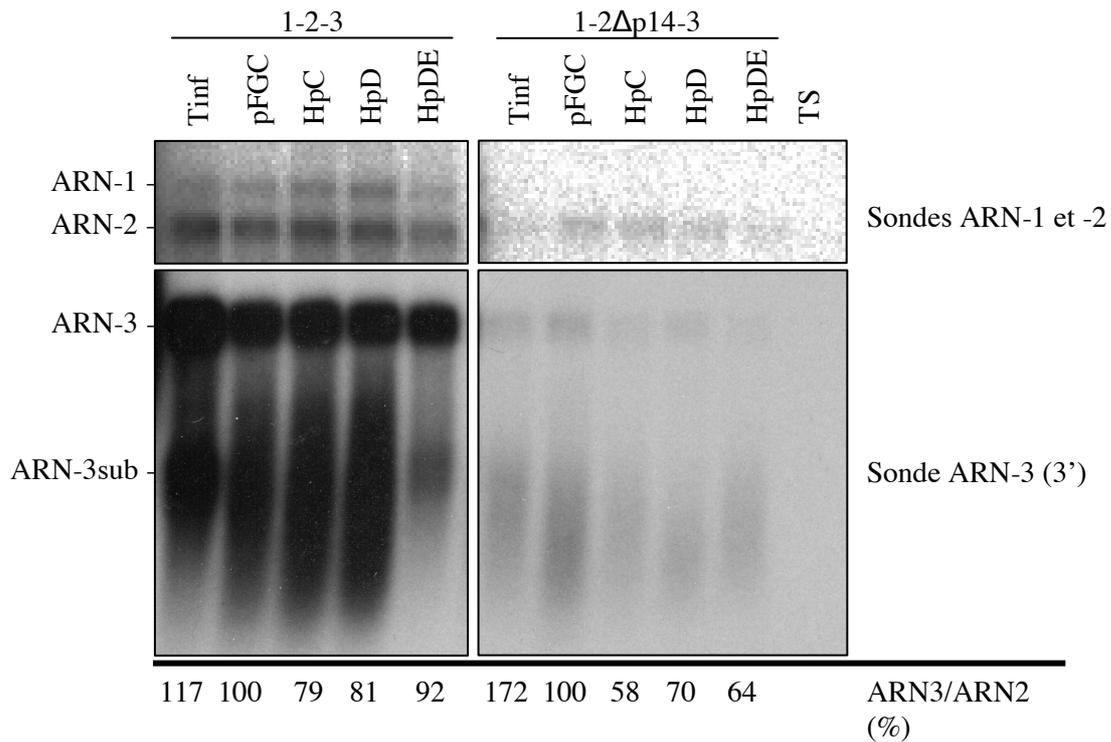


Figure I.7. : Accumulation des ARN viraux en présence des hairpins sur *Beta macrocarpa*. Northern blot réalisé sur des ARN totaux extraits d'un pool de 6 lésions dans le cas d'une inoculation avec les ARN-1,-2 et -3, et de 2 lésions dans le cas d'une inoculation avec les ARN-1, -2 Δ p14 et -3. Les sondes ciblent les ARN-1 et -2 (panneau du haut), ou la partie 3' de l'ARN-3 (panneau du bas). HpX : Construction hairpin agroinfiltrée. pFGC : ARN de feuille infiltrée avec le vecteur vide. TS : témoin sain. Tinf : témoin non infiltré mais infecté.

3.3. Analyse de l'effet de l'hairpin DE sur l'infection virale

La construction HpDE est une fusion de deux constructions : HpD qui a donné les meilleurs résultats sur l'infection virale locale et systémique, et HpE qui permet de cibler l'ensemble des ARN viraux mais qui à elle seule n'est pas efficace. Afin de tester son effet sur l'infection virale, HpDE a été soumise à un test d'infection sur plantes de *B. macrocarpa*.

Les constructions HpC, HpD et HpDE, ainsi que le contrôle vecteur vide (pFGC) ont été infiltrées sur des feuilles de *B. macrocarpa*, qui ont été infectées 5 jours plus tard par un inoculum composé de transcrits des ARN-1, -2 et -3 (1-2-3). Sept jours post-infection les lésions locales ont été prélevées et les ARN en ont été extraits. Les ARN de 6 lésions ont été rassemblés et analysés par northern-blot, présenté sur le panneau gauche de la **figure I.7.**

A l'exception du témoin sain (TS), on remarque que l'ARN-3 est présent dans toutes les pistes, indiquant qu'il n'est jamais totalement dégradé par le mécanisme d'ARN silencing. Comme précédemment, nous avons voulu quantifier le taux d'ARN-3 par rapport à l'ARN-2 en normalisant par rapport au témoin infiltré par la construction pFGC. Comme dans l'expérience précédente, l'infiltration n'interfère que faiblement sur l'expérience puisque le témoin non infiltré présente un taux d'ARN-3 légèrement supérieur (117%). De plus, la construction HpC diminue d'environ 20% l'accumulation de l'ARN-3 (79%) comme précédemment (82%). Dans cette expérience, HpD diminue l'accumulation de l'ARN-3 à 81%, ce qui est moins important que dans l'expérience précédente (40%). Ce résultat peut s'expliquer par les erreurs de mesure via le logiciel ImageJ, ou par une différence dans l'expression des hairpins en fonction des expériences, de la période de l'année, ou de l'état physiologique des plantes.

En ce qui concerne HpDE, le taux d'accumulation de l'ARN-3 est de 92%. Ce taux est supérieur à celui d'HpD, mais inférieur au contrôle pFGC. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'il cible à la fois l'ARN-3 et les autres ARN viraux par sa région E. En effet, si les ARN-1 et -2 sont dégradés par l'hairpin au même titre que l'ARN-3, le ratio ARN-3/ARN-2 n'est plus comparable.

Les quantités d'ARN totaux déposées sont homogènes (non montré) et permettent de comparer les pistes entre-elles. On peut alors observer que l'HpDE diminue légèrement la quantité d'ARN viraux, puisque les signaux des bandes des ARN-1, -3 ainsi que l'ARN-3 subgénomique, visibles en dessous de l'ARN-3 sont moins forts. Cela suggère que l'accumulation des ARN viraux est affectée dans les feuilles exprimant HpDE.

L'analyse de la systémie n'a pas été effectuée sur ces plantes.

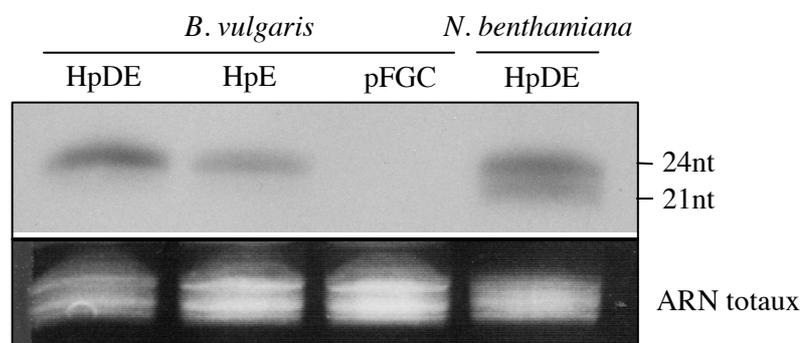


Figure I.8. : Analyse des siRNA induits par les hairpins dans les feuilles de *B. vulgaris* et de *N. benthamiana*. Northern-blot réalisé à partir d'ARN totaux de feuilles infiltrées par des agrobactéries exprimant des constructions hairpins. Le panneau du haut correspond aux signaux révélés par une sonde de séquence E. Les tailles des siRNA sont indiquées sur le côté droit. Le panneau du bas permet de visualiser la quantité d'ARN totaux déposés dans chaque puits après coloration au BET. HpX ou pFGC : construction hairpin agroinfiltrée.

3.4. Analyse de l'effet de la protéine p14 sur l'efficacité des hairpins

Puisque la dégradation de l'ARN-3 n'est pas totale, nous avons voulu savoir si le mécanisme d'ARN silencing était freiné par le suppresseur p14. Afin d'analyser l'effet de la protéine p14 sur l'efficacité des hairpins, nous avons utilisé des inoculums du BNYVV composés de transcrits d'ARN-1, -2 et -3, dont l'ARN-2 était privé du codon initiateur de la protéine p14 (1-2 Δ p14-3). L'infection par un inoculum 1-2 Δ p14-3 produit de petites lésions qui nécrosent rapidement, et ne permet pas au virus de se propager à longue distance. La réplication localisée est toutefois possible et c'est donc l'accumulation de l'ARN-3 qui peut être comparée en fonction de la présence ou non de la protéine p14.

Comme pour l'expérience précédente (paragraphe 3.3), les feuilles de *B. macrocarpa* préalablement infiltrées ont été infectées cinq jours plus tard par l'inoculum 1-2 Δ p14-3. Sept jours post-infection, des lésions nécrotiques locales sont apparues et ont été récoltées. Les ARN de deux lésions en ont été extraits et analysés par northern-blot, présenté sur le panneau droit de la **figure I.7.**

En absence de suppresseur, les quantités d'ARN viraux sont très faibles dans les lésions nécrotiques exprimant l'ARN-2 Δ p14 par rapport aux lésions chlorotiques contenant l'ARN-2 non muté. Cependant, les ARN peuvent quand même être détectés et quantifiés. La même analyse de quantification d'ARN-3 par rapport à l'ARN-2 a été conduite, en normalisant avec le témoin vecteur vide. Il en ressort que la dégradation de l'ARN-3 est plus importante en l'absence de p14. En effet, si le taux d'accumulation d'ARN-3 est de 100% pour le contrôle pFGC, elle passe à 58, 70 et 64% pour les constructions HpC, HpD et HpDE respectivement. Cependant, malgré l'absence du suppresseur de silencing viral p14, la dégradation de l'ARN-3 n'est pas totale, suggérant que les hairpins elles-mêmes ne sont pas entièrement efficaces, ou que le virus dispose d'un autre mécanisme échappatoire à l'ARN silencing.

3.5. Expression des hairpins dans la betterave sucrière (*B. vulgaris*)

L'expression des hairpins a également été testée dans l'hôte naturel du BNYVV, *B. vulgaris* (betterave sucrière). Comme dans les précédentes expériences, les constructions HpDE et HpE ont été infiltrées dans les feuilles, qui ont été récoltées cinq jours plus tard et dont les ARN ont été analysés par northern-blot (**figure I.8**). Les deux populations de siRNA de 21 nts et 24 nts sont retrouvées chez *N. benthamiana* comme dans les expériences précédentes. En revanche, si des siRNA sont détectés pour les deux constructions testées chez *B. vulgaris*, il est intéressant de noter qu'il n'existe qu'une population majoritaire correspondant aux siRNA de 24 nts détectés pour HpDE chez *N. benthamiana*. Chez *A. thaliana*, les siRNA de 24 nts correspondent aux produits de DCL3, impliqués dans la

méthylation de l'ADN, mais pas dans la dégradation des ARN messagers homologues, ceux-ci étant les siRNA de 21 nts produits par DCL4.

IV. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre nous avons créé et testé l'efficacité d'hairpins capables de cibler l'ARN-3 du BNYVV afin d'évaluer la résistance au BNYVV des plantes exprimant ces transgènes.

4.1. Différences d'expression des siRNA entre chaque hairpin

Nous avons montré que certaines régions de l'ARN sont plus efficaces que d'autres dans le silencing antiviral. Ici, la région D est celle qui donne le meilleur résultat dans la première expérience. Ce n'est certainement pas dû à la taille de la séquence ciblée puisque les bras des HpA, HpB et HpD possèdent des tailles comparables (350 nts, 373 nts et 364 nts respectivement). De plus, ces séquences sont toutes capables d'induire une forte expression de siRNA, avec même un avantage pour HpB (**figure I.5.**). Pourtant, HpB n'est pas capable de dégrader suffisamment l'ARN-3 pour diminuer significativement son accumulation. L'expression de siRNA n'est donc pas suffisante pour induire un silencing efficace. La structure secondaire de l'ARN, par exemple, peut jouer un rôle important en résistant à la dégradation par le complexe RISC qui a une affinité particulière pour les ARN simple-brin (Ameres *et al.*, 2007). En ce qui concerne l'ARN-3, nous savons qu'il comporte de fortes structures secondaires dans ses parties 5' et 3' non codantes, mais rien n'est connu dans les régions que ciblent HpB et HpD. On peut alors supposer l'existence d'une forte structure secondaire au niveau du gène de la protéine p25, et une structure moins stable dans la région de la protéine putative p4.6.

De plus, la présence de siRNA spécifiques de l'intron de la chalcone synthase, une séquence simple brin indique non seulement une absence d'épissage, mais également une mise en place d'une transivité du signal de l'ARN silencing. En effet, la production de siRNA spécifiques d'une séquence simple-brin nécessite l'action de RDR6, permettant la synthèse du brin complémentaire menant à la formation d'un ARN double-brin pouvant être cible des protéines DCL (pour revue voir Voinnet, 2008).

4.2. Les siRNA : des feuilles aux racines

Nous avons vu que les siRNA produits à la suite d'une infiltration de feuilles de *N. benthamiana* et de *B. macrocarpa* forment deux populations : les siRNA de 21 nts et ceux de 24 nts. Ces deux populations sont celles également retrouvées après expression d'un transgène en structure hairpin chez la plante modèle *A. thaliana* dont le mécanisme de silencing est très étudié. Les siRNA de 24 nts sont produits par DCL3 et sont impliqués dans la méthylation de la chromatine, afin de réguler la transcription de gènes codés par l'ADN. Les siRNA de 21 nts sont produits par DCL4 et permettent la dégradation d'ARN homologues. Ce sont ces derniers siRNA qui sont intéressants pour notre étude puisque nous voulons dégrader spécifiquement l'ARN-3. La régulation de la transcription d'ADN par le biais des siRNA de 24 nts n'aura aucun effet sur le virus puisque son génome est composé

uniquement d'ARN. Par contre, les siRNA de 24 nts peuvent provoquer le TGS et donc inhiber la transcription du transgène, empêchant ainsi la mise en place du silencing.

Pourtant, chez *B. vulgaris*, la seule population de siRNA détectés est celle des 24 nts. Il est vrai que seules les feuilles ont été infiltrées et analysées, alors qu'une différence peut apparaître entre les différents tissus d'une même plante (feuilles ou racines). D'ailleurs, les études menées sur les hairpins ciblant la réplicase virale, indiquent que les betteraves transgéniques expriment davantage de siRNA dans les racines que dans les feuilles (Lennfors *et al.*, 2008). Il est donc possible que les quantités déposées sur notre gel n'étaient pas suffisantes pour détecter les siRNA de 21nt. Toutefois une étude contradictoire portant sur le silencing ciblant le BNYVV dans des *N. benthamiana* transgéniques exprimant la protéine de translecture p54, indique que le silencing dirigé contre le BNYVV est plus efficace dans les feuilles que dans les racines puisque les siRNA sont majoritairement retrouvés dans les feuilles, et que les ARN viraux s'accumulent davantage dans les racines (Andika *et al.*, 2005). La protéine p31 codée par l'ARN-4 et impliquée dans la transmission par le vecteur est également décrite comme un suppresseur d'ARN silencing dont l'action serait restreinte aux tissus racinaires (Rahim *et al.*, 2007). Sa présence lors de l'infection naturelle pourrait inhiber encore davantage le silencing conféré par les hairpins.

4.3. Quels résultats peut-on espérer sur *B. vulgaris* ?

Les résultats de nos expériences peuvent être critiqués, puisque même le contrôle pFGC induit une diminution de l'ARN-3 et la diminution du nombre de plantes présentant les symptômes de mouvement systémique viral. La technique elle-même est mise en cause, car les agrobactéries préalablement infiltrées peuvent interférer avec l'infection virale de manière aspécifique.

Cependant, les différentes expériences réalisées sur *B. macrocarpa* ont permis de valider l'HpDE comme construction la plus efficace. En effet, cette construction diminue de 21% la quantité d'ARN-3 par rapport au témoin infecté non infiltré, allant même jusqu'à 63% en absence de p14. La comparaison de l'infection obtenue sur feuilles infiltrées par les constructions pFGC et HpDE permet de visualiser une baisse de l'accumulation de 9% de l'ARN-3 en contexte sauvage et de 36% en absence de p14. Il semble qu'il y ait également une diminution du taux global d'ARN viraux en présence de l'HpDE par rapport aux contrôles et aux autres constructions. Cette diminution est visible mais elle n'atteint jamais un rapport de 2, suggérant que le virus n'est qu'à peine freiné dans son cycle viral. On peut donc penser que les hairpins ciblant les ARN "accessoires" ne présentent pas une efficacité suffisante pour lutter contre l'accumulation du BNYVV. Toutefois, l'effet de HpDE sur l'inhibition de l'infection systémique est intéressant et pourrait éventuellement servir de base à la mise en place d'un moyen de lutte antivirale.

Il est évident que le meilleur moyen de tester ces constructions serait d'obtenir des betteraves transgéniques et de tester l'infection virale dans des conditions naturelles par inoculation du virus par le vecteur *P. betae* au niveau des racines. Mais là encore, le protocole de transgénèse de *B. vulgaris* est long et ne rentrait pas dans mon projet initial. Mon but était d'étudier les effets des différents hairpins sur des plantes facilement manipulables afin de choisir la plus susceptible d'être efficace chez *B. vulgaris*. Cependant, au vu des résultats préliminaires peu encourageants, une transgénèse de *B. vulgaris* ciblant la dégradation de l'ARN-3 semble déconseillée, ou doit être combinée avec l'autre stratégie RNAi ciblant l'ARN-2 qui est très efficace. Une nouvelle méthode de transformation des racines de *B. vulgaris* a été récemment décrite, et pourrait permettre l'analyse rapide de l'efficacité de ces constructions sur l'infection virale (Pavli *et al.*, 2010).

En comparaison des résultats déjà obtenus par ciblage de l'ARN-2, ces éléments sont en défaveur de la poursuite de telles analyses exploratoires pour une recherche appliquée.

Chapitre JJ

Chapitre II

Etude de la protéine p25 dans un système hétérologue : analyse de plantes transgéniques exprimant la protéine virale

I. Introduction : connaissances générales sur la protéine p25

Parmi les protéines codées par le BNYVV, la protéine p25 est actuellement la plus étudiée car elle constitue le facteur majeur de virulence et de pathogénicité du virus. Beaucoup de données ont déjà été abordées dans l'introduction générale portant sur le BNYVV. Cette introduction va détailler l'état des connaissances globales sur la protéine p25, puis aborder les résultats obtenus par Laure Schmidlin pendant sa thèse (thèse de doctorat ULP, Schmidlin, 2005). J'ai confirmé et complété les données obtenues afin de les soumettre à publication. Cette publication constitue une grande partie de ce chapitre.

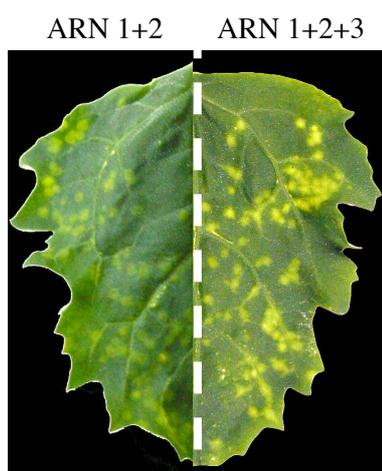


Figure II.1. : Comparaison des symptômes sur feuille de *C. quinoa* infectées par des inoculum différents. A gauche, l'inoculation des ARN-1 et -2 du BNYVV provoque l'apparition de lésions locales vertes. A droite, l'ajout de l'ARN-3 induit un changement phénotypique des lésions qui deviennent jaunes.

Isolat	ARN	<i>Tetragonia expansa</i>		<i>Beta macrocarpa</i>	
		I	I	I	S
S-34	1+2+3+4	LJ	LJ	LJ	MJ, R
S-3	1+2+3	LJ	LJ	LJ	MJ, R
S-4	1+2+4	LC	LC	ILC	∅
S-3c	1+2+3c	LC	LC	ILC	MM
S-3c4	1+2+3c+4	LCs	LC	LC	MM
T-34	1+2+3+4	LJ	LJ	LJ	MJ, R
T-3	1+2+3	LJ	LJ	LJ	MJ, R
T-4	1+2+4	LC	LC	ILC	∅
T-3d	1+2+3d	LC	LC	ILC	MM
T-3d4	1+2+3d+4	LCs	LC	LC	MM

S- et T- représentent deux isolats du BNYVV; I : feuilles infectées ; S : feuilles systémiques ; LJ : lésions jaunes ; LC : lésions chlorotiques ; ILC : légères lésions chlorotiques ; LCs : lésions chlorotiques sévères ; MJ : marbrures jaunes ; R : courbure des feuilles ; MM : marbrures modérées ; ∅ : pas d'infection.

Tableau II.1. : Symptômes observés sur feuilles de *Tetragonia expansa* et *Beta macrocarpa* après inoculation par différents isolats du BNYVV (d'après Tamada *et al.*, 1999). L'absence d'ARN-3 dans l'inoculum, ou la présence des mutants de l'ARN-3 dans la partie codante du gène de la protéine p25 (3c Δ 95-214 ; 3d Δ 91-184) provoquent la disparition des symptômes jaunes. L'absence d'ARN-3 abolit le mouvement systémique du virus sur *B. macrocarpa*.

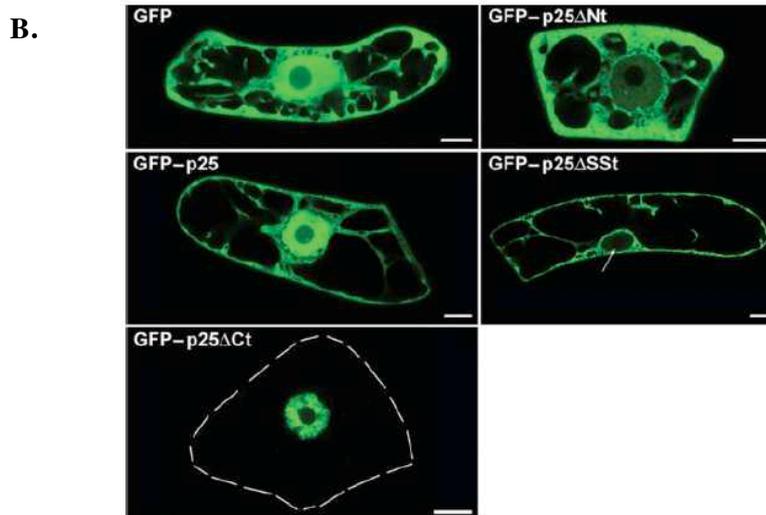
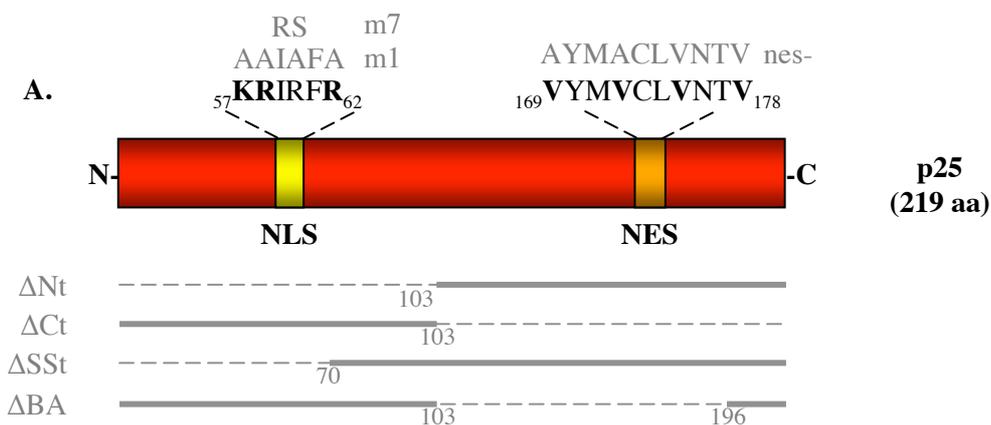
1.1. La protéine p25 est impliquée dans l'aggravation des symptômes

L'ARN-3 et donc la protéine p25 sont toujours retrouvés en contexte d'infection naturelle. Au laboratoire, l'infection de feuilles de plante hôte est possible à partir d'un inoculum constitué des seuls ARN-1 et -2. Lorsque l'ARN-3 est ajouté, des symptômes de chlorose jaune apparaissent (Jupin *et al.*, 1992) (**figure II.1.**). Il a été montré qu'une partie de la région codante de la protéine p25 est responsable de l'aggravation des symptômes, à la fois sur feuilles et sur racines (Tamada *et al.*, 1999). En effet, des délétions dans le cadre de lecture de la protéine p25 (363 et 282 nts) entraînent une diminution de la sévérité des symptômes (**tableau II.1.**) : sur *B. macrocarpa* les lésions sur feuilles locales deviennent vertes alors qu'elles sont jaunes en présence d'une p25 sauvage. De plus, si le virus se propage toujours à longue distance, les symptômes sur feuilles systémiques sont réduits : les marbrures jaunes des feuilles deviennent modérées en présence de protéine p25 tronquée. Sur *B. vulgaris*, les mutants ne sont plus capables d'induire les symptômes caractéristiques de la rhizomanie. Si ces résultats ne permettent pas de confirmer l'implication de la protéine p25 dans la pathogénicité virale, ils ne peuvent pas l'exclure.

Les quatre acides-aminés 67 à 70 de la protéine p25 forment un motif hyper-variable nommé "tétrade" (Schirmer *et al.*, 2005), dont de nouvelles séquences sont régulièrement décrites (Koenig *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2008 ; Acosta-Leal *et al.*, 2010). L'implication de ce motif dans le mécanisme de virulence du BNYVV mais aussi dans la reconnaissance de la protéine p25 comme cible d'un gène de résistance est désormais étayée par plusieurs études indépendantes (Klein *et al.*, 2007 ; Chiba *et al.*, 2008 ; Koenig *et al.*, 2008 ; Acosta-Leal *et al.*, 2010). Ainsi, la modification de la séquence de la tétrade de p25 module la réponse de la plante vis-à-vis de l'infection (Chiba *et al.*, 2008) et influence les effets intrinsèques de la protéine virale (Klein *et al.*, 2007). Ces résultats ne permettent cependant pas de comprendre les mécanismes intimes liés aux fonctions de p25. Une hypothèse est émise : il pourrait s'agir d'une interaction hôte-pathogène similaire à celle observée entre les bactéries ou champignons et leur hôte végétal (Doubly *et al.*, 1960). Une protéine cellulaire, produit d'un gène de résistance pourrait ou non reconnaître la protéine p25, produit d'un gène d'avirulence et conduire à une réaction soit incompatible, soit compatible.

1.2. Présence de motifs NLS et NES fonctionnels sur la protéine p25

Quel est le mécanisme de la modulation des symptômes ? Des études au laboratoire ont permis de montrer que la protéine p25 possède une séquence NLS (nuclear localization signal) constituée du motif ⁵⁷KRIRFR₆₂ dans la partie N-terminale, et une séquence NES (nuclear export signal) ¹⁶⁹VYMVCLVNTV₁₇₈ dans la partie C-terminale de la protéine (**figure II.2.A.**). La fonctionnalité de



C.

Constructs	Symptoms	p25 cellular location	
		Viral expression	Transient expression
Mock	none	NA	NA
Stras12 + rep0	CS*	NA	NA
Stras12 + RNA-3	YS	N/C†	NT
Stras12 + repGFP	CS	NA	NA
Stras12 + repGFP-p25	YS	N/C	N/C
Stras12 + repGFP-p25ΔNt	CS	C	C
Stras12 + repGFP-p25ΔSSt	CS	C	C
Stras12 + repGFP-p25-m1	CS	C	C
Stras12 + repGFP-p25-m7	CS	C	C
Stras12 + repGFP-p25ΔBA	Nec	N	N
Stras12 + repGFP-p25ΔCt	Nec	N	N
Stras12 + repGFP-p25ΔCt-m1	CS	C	C
Stras12 + repGFP-p25nes-	CS	N	NT

Figure II.2. : Caractérisation des sites NES et NLS de la protéine p25 et leur influence sur la symptomatologie (d'après Vetter *et al.*, 2004). **A.** Protéine p25 schématisée où les motifs NLS et NES sont représentés. Leur séquence, ainsi que celles des mutants sont indiquées au dessus des motifs. Les mutants de délétion utilisés dans les expériences suivantes sont représentés en gris. **B.** Visualisation de la localisation subcellulaire de la fluorescence dans des cellules de BY-2 exprimant transitoirement la protéine mutée ou non. **C.** Tableau représentant les symptômes et les localisations subcellulaires des différents mutants testés en expression virale (où la protéine p25 est fusionnée à la GFP et exprimée à partir d'un réplicon dérivant de l'ARN-3 du BNYVV) ou en expression transitoire.

N, nucléaire ; C, cytoplasmique ; N/C, nucléaire et cytoplasmique ; CS, lésion chlorotique ; YS, lésion jaune ; Nec, lésion nécrotique ; NT, non testé ; NA ; non applicable.

ces séquences a été démontrée par l'utilisation de multiples mutants délétés dans les parties N et C-terminales de la protéine et surtout par des mutants de substitution (non montré). Ces domaines permettent à la protéine d'avoir une localisation nucléo-cytoplasmique (**figure II.2.B.**), et probablement de se déplacer d'un compartiment à un autre de manière dynamique (Vetter *et al.*, 2004). Il existe une corrélation partielle entre les symptômes et la localisation subcellulaire de la protéine, indiquant que sa fonction est dépendante de sa localisation (**figure II.2.C.**). En effet, une localisation nucléo-cytoplasmique entraîne des symptômes jaunes, alors qu'une localisation uniquement cytoplasmique entraîne l'apparition de lésions vertes, comme celles où la protéine p25 est absente. Une localisation purement nucléaire entraîne des lésions nécrotiques. L'effet de la protéine p25 est donc accentué lorsque sa localisation est nucléaire, mais réduit lorsqu'elle est restreinte au cytoplasme.

1.3. La protéine p25 peut activer la transcription

La protéine p25 comporte un domaine zinc-finger putatif composé d'un motif typique ${}_{73}CX_5-CX_4-CX_5-C_{90}$ (Jupin *et al.*, 1992). Compte-tenu de l'ensemble de ses caractéristiques, la capacité de la protéine à activer la transcription a été testée et confirmée en système simple-hybride (Klein *et al.*, 2007). Le domaine d'activation de la transcription a été localisé entre les acides aminés 103 et 146 de la protéine (**figure II.3.**). Dans le même système hétérologue de levure, il a également pu être montré que deux protéines p25 exprimées en système double-hybride permettent aux levures de croître sur milieu sélectif. Ces résultats indiquent que la protéine p25 est capable d'interagir avec elle-même. Elle peut donc former des dimères, mais il n'est pas exclu que les interactions aient lieu sous forme de multimères. La réalité biologique de ces phénomènes lors de l'infection virale n'est pas confirmée puisqu'ils ont été décrits en système de levure. Des analyses en système végétal sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

1.4. La protéine p25 est probablement phosphorylée

Lors de l'analyse par western-blot, la protéine p25 apparaît parfois sous la forme d'un doublet, suggérant la présence de modifications post-traductionnelles. Au laboratoire, Kamal Hleibieh consacre une partie de ses travaux de thèse à l'étude des modifications de la protéine p25 et de leurs incidences sur ses propriétés biologiques. Les résultats qu'il a obtenus indiquent que la protéine p25 est phosphorylée (un site identifié, deux autres non caractérisés). L'utilisation de mutants non phosphorylables ou mimant l'état phosphorylé montre le rôle de certaines phosphorylations dans l'adressage nucléaire, l'activation de la transcription et les symptômes foliaires (Kamal Hleibieh, non publié).

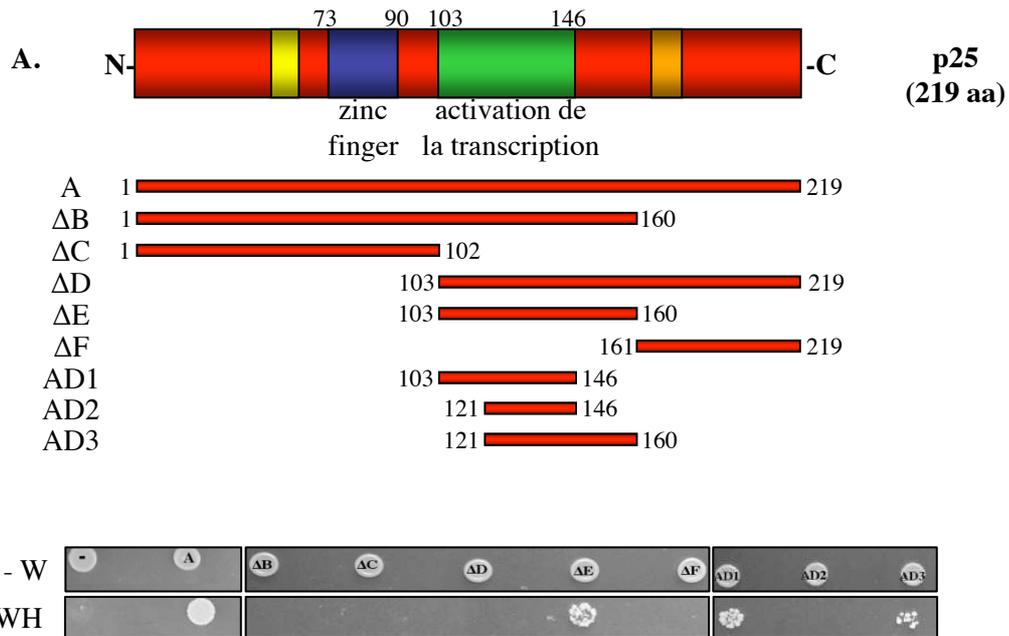


Figure II.3. : Caractérisation du domaine d'activation de la transcription par système du simple-hybride (Klein *et al.*, 2007). **A.** Les domaines zinc finger et d'activation de la transcription sont indiquées sur le schéma représentant la protéine p25. Les différents mutants de délétion de la protéine p25 utilisés en simple hybride sont représentés. **B.** Expériences de simple hybride menées avec les mutants de délétion présentés en A. Les levures transformées ont été déposées sur des milieux de croissance sélectifs sans tryptophane (-W) ou sans tryptophane ni histidine (-WH). Seules les constructions permettant l'activation de la transcription assurent la croissance des levures sur milieu -WH.

Ces études ont permis de mieux caractériser les propriétés de la protéine p25, mais ne permettent toujours pas de comprendre les mécanismes intimes de son effet sur la symptomatologie. Afin de poursuivre l'étude de ses propriétés biologiques, et notamment les interactions entre la protéine et la plante, des *A. thaliana* exprimant constitutivement la protéine p25 ont été créées au laboratoire (thèse de doctorat ULP, Schmidlin, 2005). Le but final était d'analyser la dérégulation globale du transcriptome des plantes exprimant cette protéine. La suite de ce chapitre sera consacrée à la présentation des résultats obtenus et complétés de mes propres résultats.

II. Résultats

La première partie du paragraphe résultat sera présentée sous forme de publication, qui a été soumise pendant l'écriture de ce manuscrit. L'article présente la caractérisation des *A. thaliana* transgéniques qui expriment la protéine virale p25 de manière constitutive. Des analyses de phénotype, de sensibilité aux hormones et de comparaison transcriptomique entre les plantes sauvages et transgéniques ont été réalisées. Ce travail avait été initié par Laure Schmidlin, et j'y ai contribué en confirmant les résultats et en réalisant de nouvelles analyses.

La deuxième partie des résultats sera consacrée à l'obtention de lignées d'*A. thaliana* transgéniques exprimant la protéine p25, mais cette fois-ci de manière inductible, et à l'obtention et l'analyse de lignées de tabac exprimant la protéine p25. Je présenterai aussi la tentative de caractérisation des séquences d'ADN cibles de l'activation de la transcription par la protéine p25.

2.1. Caractérisation des *A. thaliana* exprimant p25 de manière constitutive (Peltier et al.)

2.1.1. Résumé de la publication

Un vecteur binaire permettant l'expression de la protéine p25 sous contrôle d'un promoteur 35S a été construit. Son efficacité a été tout d'abord testée par agroinfiltration dans des feuilles de *B. vulgaris*. Les zones infiltrées par le vecteur 35S::P25 présentent un jaunissement qui rappelle celui observé dans des lésions locales virales où la protéine p25 est exprimée.

Trois lignées d'*A. thaliana* transgéniques 35S::P25 homozygotes et monocopies ont été caractérisées. Ces plantes expriment des quantités similaires de la protéine p25 qui a été localisée, à l'instar de l'infection virale, dans le cytoplasme et le noyau. Les plantes transgéniques présentent des branchements racinaires plus importants que les plantes Col-0. Ce phénotype n'est pas sans rappeler les symptômes de rhizomanie observés sur les betteraves infectées, où les racines latérales prolifèrent anarchiquement. La croissance des plantes 35S::P25 est légèrement plus rapide que celle des plantes sauvages quelle que soit la lignée observée.

Il a alors été supposé que la voie de l'auxine pouvait être modulée dans les lignées 35S::P25. Pour le vérifier, nous avons d'une part effectué des dosages de cette hormone ainsi que d'autres hormones végétales. D'autre part, nous avons croisé des *A. thaliana* 35S::P25 avec une lignée DR5::GFP exprimant la GFP sous contrôle d'un promoteur sensible à l'auxine, pour évaluer et comparer les taux d'auxine des plantes 35S::P25 à ceux d'un contrôle grâce à la quantification du messager de la GFP. Nous avons montré que les plantes 35S::P25 renferment des taux d'auxine plus élevés que les plantes de référence. L'ACC (Acide 1-AminoCyclopropane-1-Carboxilique), précurseur de l'éthylène est

retrouvé moins abondamment dans les lignées *35S::P25* que dans Col-0, à l'inverse des formes conjuguées de l'ACC, qui s'accumulent fortement dans les plantes transgéniques. Ces résultats ont pu être corrélés avec ceux mesurés dans les feuilles de *B. macrocarpa* infectées par les ARN-1, -2 et -3 du BNYVV.

De plus, nous avons montré que l'élongation racinaire des plantes *35S::P25* est davantage affectée par un apport exogène d'un analogue de l'auxine (2,4-D) que les Col-0. A l'inverse, l'apport exogène de méthyl-jasmonate a moins d'effet sur la croissance racinaire des plantes transgéniques que des plantes sauvages. Contrairement aux génotypes Col-0, la germination des plantes *35S::P25* est moins affectée par la présence dans le milieu de méthyl-jasmonate, d'acide salicylique ou d'acide abscissique. Ces résultats suggèrent que la protéine p25 induit des dérégulations hormonales globales.

De telles dérégulations hormonales pourraient être corrélées à des dérégulations transcriptomiques induites par l'expression de la protéine p25. Afin de répondre à cette question, une étude comparative des ARN exprimés en présence ou en absence du transgène a été réalisée par deux approches CATMA (Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray). Les ARN des racines des plantes sauvages et *35S::P25* ont été extraits après 12 et 17 jours de croissance, correspondant aux stades 1.02 ou 1.04 et 1.06 (Boyes *et al.*, 2001) et soumis à une analyse comparative des transcriptomes par "cDNA microarray" par l'utilisation de puces CATMA de la plateforme de l'URGV à Evry (Dr J.P. Renou).

Les expressions différentielles ont été validées par circularisation vectorielle des données et par RT-PCR quantitative. Certains gènes retrouvés dérégulés dans les trois lignées analysées ont été retrouvés dans la base de données "pathoplant" (www.pathoplant.de). Ces gènes répondent à l'infection par le TMV ou à des traitements au MeJA, à l'éthylène et à l'acide salicylique.

2.1.2. Peltier *et al.* (soumise à la revue *Transgenic research* le 29-03-2010)

Expression of the *Beet necrotic yellow vein virus* p25 protein induces hormonal changes and a root branching phenotype on *Arabidopsis thaliana*.

Claire Peltier^{1†}, Laure Schmidlin^{1†}, Elodie Klein¹, Ludivine Taconnat⁴, Els Prinsen², Mathieu Erhardt¹, Dimitri Heintz¹, Guy Weyens³, Marc Lefebvre³, Jean-Pierre Renou⁴ and David Gilmer^{1,5}.

¹ Institut 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.

² University of Antwerp, Department of Biology, Groenenborgerlaan 171, B-2020 Antwerpen, Belgium.

³ SESVanderHave nv, Industriepark 15, Soldatenplein Z2 3300 Tienen, Belgium.

⁴ URGV, UMR INRA 1165 - CNRS 8114 - UEVE, 2 rue Gaston Crémieux, CP5708, 91057 Evry cedex, France.

[†] These authors contributed equally to this work

⁵ Corresponding author.

Tel : +333 88 41 72 59

Fax: +333 88 61 44 42

david.gilmer@ibmp-cnrs.unistra.fr

ABSTRACT

The RNA-3-encoded p25 protein was previously characterized as one of the major symptom determinants of the *Beet necrotic yellow vein virus*. Previous analyses reported the influence of the p25 protein in root proliferation phenotype observed in rhizomania disease on infected sugar beets (*Beta vulgaris*). A transgenic approach was developed, in which the p25 protein was constitutively expressed in *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ecotype in order to provide new clues as to how the p25 protein might promote alone disease development and symptom expression. Transgenic plants were characterized by Southern blot and independent lines carrying single and multiple copies of the transgene were selected. Mapping of the T-DNA insertion was performed on the monocopy homozygote lines. P25 protein was localized both in the nucleus and in the cytoplasm of epidermal and root cells of transgenic plants. Although *A. thaliana* was not described as a susceptible host for BNYVV infection, abnormal root branching was observed on p25 protein-expressing *A. thaliana* plants. Moreover, these transgenic plants were more susceptible than wild-type plants to auxin analog treatment (2,4-D) but more resistant to methyl jasmonate (MeJA), abscisic acid (ABA) and to lesser extent to salicylic acid (SA). Hormonal content assays measuring plant levels of auxin (IAA), jasmonate (JA) and ethylene precursor (ACC) revealed major hormonal changes. Global transcript profiling analyses on roots displayed differential gene expressions that could corroborate root branching phenotype and stress signaling modifications.

Keywords: BNYVV, root, microarray, hormonal changes, auxin, jasmonate.

Introduction:

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV; genus Benyvirus) is the causal agent of rhizomania disease on sugar beet (for review see Peltier et al. (2008) characterized by extensive rootlet proliferation from the main taproot and other abnormalities. BNYVV genes required for basic viral housekeeping functions reside on RNA-1 and RNA-2 (Tamada et al., 1999), two genome components that are sufficient for virus multiplication in *Chenopodiaceae* host leaves of laboratory diagnostic species such as *Chenopodium quinoa* (Quillet et al., 1989; Tamada et al., 1989). All field isolates of BNYVV contain two additional RNAs. RNA-4 carries information necessary for vector transmission of the virus (Tamada and Abe, 1989) and root silencing suppression demonstrated in *Nicotiana benthamiana* (Rahim et al., 2007), while RNA-3 controls rhizomania symptom expression on natural host (Tamada et al., 1999) and lesion phenotype on leaves (Tamada et al., 1989; Jupin et al., 1992). RNA-3 also governs BNYVV invasion of the plant root system (Lauber et al., 1998). BNYVV RNA-3 encodes a ~25 kDa protein (p25), an important determinant of leaf symptom phenotype (Tamada et al., 1989; Jupin et al., 1992; Tamada et al., 1999) acting both as an avirulence (Avr)-gene product and a pathogenicity determinant (Chiba et al., 2008) believed to act as a key factor for rootlet proliferation in sugar beet (Tamada et al., 1999).

B. vulgaris transgenic plants expressing the p25 protein have never been regenerated (Guy Weyens, unpublished). Therefore, to investigate the function of the p25 protein, we studied the effect of its constitutive heterologous expression in *A. thaliana*. We constructed binary vectors to transform *A. thaliana* Col-0 ecotype. About twenty distinct independent T3 lines were analyzed for their transgene copy number and their ubiquitous protein expression levels. Three homozygous single copy lines were selected as most representative candidates and T-DNA insertion sites were characterized for two of them. Detailed phenotype characterization of these transgenic plants demonstrated abnormal root branching correlated to the constitutive expression of the p25 protein. As previous studies on rhizomania syndrome reported the higher level of auxin hormone present in susceptible sugar beets (Pollini et al., 1990), we analyzed hormonal responses (with sensitivity assays to exogenous hormones and hormone content assays) and transcriptome changes (with microarrays and qRT-PCR analyses) in p25 protein-expressing transgenic *A. thaliana* plants.

Results

Transient expression of the p25 protein in *B. vulgaris* induces leaf yellowing

To test for the effective CaMV 35S-promoter-driven expression of the p25 protein from binary vector, *Agrobacterium tumefaciens* carrying pBin-p25 or empty vector (pBin-0) were infiltrated on *B. vulgaris* half-leaves together with *A. tumefaciens* expressing the BWYV silencing suppressor P0 to allow the durability of transient expression (Voinnet et al., 2003). Six days post infiltration, yellowing appeared on half-leaves infiltrated with pBin-p25 construct but not with control vector (Figure 1a). P25 protein expression was confirmed by its immunodetection within yellowing plant tissues and not detected in those infiltrated with control vector (Figure 1b). Similar yellowing phenotype was obtained without P0 silencing suppressor but led to p25 protein lower accumulation or performing agroinfiltrations on *Tetragonia expansa* leaves (data not shown).

Production and characterization of p25 protein-expressing *A. thaliana* lines

A. thaliana Col-0 ecotype transformed by floral dip (with *A. tumefaciens* carrying pBin-p25 construct) served to produce seeds that were selected on MS media containing kanamycin. After T2 generation, plants were screened by western blotting for the expression of the p25 protein in leaves and roots and total DNA was extracted for the detection of transgene copy number (data not shown). Three monocopy lines called B, E and T (*35S::P25B*, *35S::P25E* and *35S::P25T*) were self-crossed to produce homozygous lines. Single T-DNA insertion site was successfully identified by inverse PCR (iPCR) for two of them: B line harboring an intergenic insertion on ChrIV at the position 14552 kbp and E line harboring an insertion in *At5g46550* gene on ChrV at the position 18901 kbp. To compare p25 protein levels within the three selected lines, the p25 protein was immunodetected after western blotting of serial diluted protein extracts of leaf tissues. All three groups of plant exhibited similar p25 protein expression levels (Figure 2a). We have previously demonstrated the nuclear and cytoplasmic localization of the p25 protein (Vetter et al., 2004). To ensure that the protein behaves in *A. thaliana* as well as in viral context or transient expression, we performed immunogold labeling of the protein within leaves and root sections observed by transmission electron microscopy (TEM). The viral protein was found both in the nucleus (74%) and in the cytoplasm (26%) of transgenic cells (n=24, 88 gold particles numbered) whereas control plants (transgenic plants transformed with empty pBin vector) exhibited a uniform and unspecific low labeling in the entire surface of the slices observed (n=22, 26 gold particles, 42% nuclear and 58% cytoplasmic) (Figure 2b). To ensure that no post-transcriptional gene silencing occurred in the transgenic lines, we performed siRNA detection using the entire p25 protein-coding sequence as template for radiolabeled probes. No siRNAs were detected whatever the monocopy line used (Figure 2c).

Constitutive expression of the P25 protein in *A. thaliana* induces root branching phenotype and auxin level increase

If the foliar phenotype of p25 protein-expressing plants did not differ from wild-type Col-0 plants, root elongation appeared modified when the p25 protein was constitutively expressed. When plants were

grown vertically on MS media, p25 protein-expressing plants presented a significant root branching phenotype that appeared independent of the T-DNA insertion site and was not observed on wild-type Col-0 seedlings (Figure 3a) nor on non-expressing multicopy lines (not shown).

Previous studies reported higher auxin contents of BNYVV-infected sugar beets (Pollini et al., 1990). To produce a tool for an auxin-response study, homozygous plants were crossed with *DR5::GFP* transgenic lines provided by Dr. Mark Estelle. *DR5::GFP* construction is composed of 7 auxin responsive elements linked to the minimal CaMV 35S promoter allowing the expression of green fluorescence proteins (GFP) in response to auxin stimuli (Ulmasov et al., 1997; Ottenschlager et al., 2003). Resulting heterozygous *DR5::GFPx35S::P25* plants displayed a root branching phenotype (Figure 3b) and were still expressing the p25 protein (Figure 3c), indicating a dominant phenotype persistent after backcrosses. Homozygous plants were produced to compare GFP-coding messenger RNA contents between *DR5::GFP* and *DR5::GFPx35S::P25* root meristems. Each pool of root meristems was collected from 10 individual seedlings, total RNAs were extracted, cDNA were produced and served as template for real time PCR amplification of GFP-coding and p25 protein-coding sequences, using Actin2 (*ACT2*) sequence amplification as standard. Expression of *GFP* mRNA was $1.9 \pm 4\%$ time more abundant in *DR5::GFPx35S::P25* roots compared to *DR5::GFP* roots, confirming the higher fluorescence of GFP proteins observed in root meristems (data not shown) and suggesting higher auxin levels in p25 protein-expressing plants.

Transgenic *A. thaliana* plants show significant hormonal content modifications

Auxin and its conjugated forms were first assayed in *A. thaliana* wild-type and transgenic plants. Interestingly, p25 protein-expressing seedlings exhibited more than twice the amount of free indol-3-acetic acid (IAA) when compared to Col-0 seedlings (30.6 vs 12.5 pmol.g⁻¹ fresh weight [FW]). Total auxin conjugate assays revealed that p25 protein-expressing plants contained 1.3 more conjugates than Col-0 plants (2162 vs 1609 pmol.g⁻¹ FW). Similar assays were also conducted on *Beta macrocarpa* systemic infected plants. Comparable amounts of free IAA were found in control and systemic infected leaves (18.9 vs 19.8 pmol.g⁻¹ FW) indicating a specific hormonal variation in infected root tissues. Unfortunately, total auxin conjugates recovery was too low from infected leaves.

Wild-type and transgenic seedlings were as well assayed for 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), which is a precursor of ethylene. Reduced amounts of free ACC were assayed in p25 protein-expressing plants when compared to Col-0 plants (1277 vs 3376 pmol.g⁻¹ FW), whereas conjugated ACC levels were about 5 times higher in transgenic seedlings (25141 vs 4745 pmol.g⁻¹ FW). Regarding *B. macrocarpa* systemic infected plants, free ACC contents were comparable in control and systemic infected leaves (1916 vs 2054 pmol.g⁻¹ FW) but ACC conjugate levels were more than twice higher in infected leaves (15153 vs 5981 pmol.g⁻¹ FW).

Jasmonate (JA) contents were also assayed in *A. thaliana* plants, resulting in the detection of lower JA levels in transgenic lines than in Col-0 plants (10.9 vs 36.2 pmol.g⁻¹ FW).

Root growth of transgenic *A. thaliana* plants is more sensitive to exogenous auxin analog but more resistant to MeJA treatment

We have studied the incidence of exogenous 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), a non-cleavable analog of IAA, on the root elongation of wild-type and transgenic *A. thaliana* plants. Five-day-old seedlings were transferred on vertical MS media supplemented or not with increasing amounts of 2,4-D and root elongation was quantified on twenty seedlings of each group after 6 days of vertical growth. Root elongation of p25 protein-expressing plants from transgenic lines B, E and T was slightly higher than wild-type Col-0 plants in the absence of 2,4-D, but clearly more inhibited than wild-type plants in the presence of 2,4-D, namely with the concentrations of 50 nM and 85 nM of 2,4-D (Figure 4a). We determined the relative inhibition average to abrogate growth difference variations and visualize similar behavior of the three transgenic lines (Figure 4b). Root elongation of p25 protein-expressing plants was more inhibited ($IC_{50} = 45$ nM) than in wild-type plants ($IC_{50} = 60$ nM), supporting the idea that transgenic plants are more sensitive to auxin treatment.

A similar approach was performed to determine the effect of exogenous methyl jasmonate (MeJA) on the root elongation (Staswick et al., 1992). Conversely, root elongation of wild-type Col-0 plants was drastically inhibited but much more than in 35S::P35 lines B, E and T (Figure 4c). The relative inhibition average was also determined (Figure 4d) and permitted to see a root elongation inhibition higher in wild-type plants ($IC_{50} = 0.08$ μ M) than in transgenic p25 protein-expressing plants ($IC_{50} = 6.5$ μ M), demonstrating a resistant phenotype of transgenic plants towards MeJA treatment.

Seed germination of transgenic *A. thaliana* plants is not affected by hormones

We further characterized p25 protein-expressing plants by the analysis of seed germination in the presence of exogenous hormones with concentrations known to affect plant germination or development (Corbineau et al., 1988; Van Der Straeten et al., 1993; Finkelstein, 1994; Canet et al., 2010) in order to mimic biotic and abiotic stresses. Similar amounts of wild-type Col-0 and transgenic seeds were plated on control MS media or media containing MeJA (100 μ M), SA (400 μ M), ABA (300 nM) or ACC (50 μ M) and seedling growth was compared after 14 days (Figure 5). Differences between wild-type plants and 35S::P35 lines B, E and T were more visible in the presence of MeJA and ABA: germination and growth were strongly affected in wild-type plants in both hormonal conditions, while transgenic plants developed as well as in MS standard conditions. In the presence of SA, distinctions of growth inhibition were less pronounced but transgenic plants even demonstrated less growth inhibition phenotype than wild-type plants. On the contrary, no obvious effect on wild-type and p25 protein-expressing lines was observed when seeds were in the presence of the ethylene precursor (ACC).

Global transcript profiling revealed stress signaling gene expression modifications

Comparative CATMA microarray analyses were carried out to underpin genes whose expression is induced by p25 protein constitutive expression and which play directly or indirectly a role in the root branching phenotype. To perform standardized plant cultures needed for accurate transcriptome

analyses, wild-type and transgenic seeds were first plated separately and 5-day-old seedlings were then transferred on definitive MS media in order to normalize growth stages within each group of plants, redistribute plant places equally and co-cultivate wild-type and transgenic plants under identical sterile conditions (Figure 6a). The first part of the experiment consisted of the comparison between wild-type Col-0 and *35S::P25B* plants after 5 days on new MS media, corresponding to the 1.02 stage of growth for 10-day-old Col-0 seedlings (Figure 6b, upper part) as described by Boyes et al. (2001). The second part of the experiment was dedicated to the comparison between wild-type Col-0 plants and the transgenic plants from the three homozygous lines B, E and T (*35S::P25B*, *35S::P25E*, *35S::P25T*) after 12 days on new MS media, corresponding to the 1.06 stage of growth for 17-day-old Col-0 seedlings (Figure 6b, lower part) according to Boyes et al. (2001). For each experimental group, 300 individuals were harvested and roots pooled for total RNA extraction. RNA extracts were then labeled and used to perform two-color microarray analyses (see arrows on Figure 6b for hybridization planning) to compare transcriptomes of plants of the same age (10d or 17d independently) as well as transcriptomes of plants with distinct ages (10d and 17d together).

We first analyzed deregulated genes in the *A. thaliana 35S::P25B* line because the T-DNA insertion was detected in a non-coding region of the genome, calculating the differential expression between 10- and 17-day-old seedlings to reduce growth difference effects. To check for the quality of the measures, we performed a calculation of the sum of vector values (X+Z-Y-W) observed for each deregulated gene (see the scheme on Figure 6c), where X is the vector between WT(10d) and B(10d), Z the vector between B(10d) and B(17d), Y the vector between WT(17d) and B(17d) and W the vector between WT(10d) and WT(17d). This ratio (X+Z-Y-W) should theoretically lead to a zero value. The mean value of the entire set of genes was $\mu = -0.03 \pm 0.22$, validating the differential expression measured (see the graph on Figure 6c). We then applied a cutoff of the genes that did not behaved as expected (standard deviation SD of 0.22), selecting 1442 differentially expressed genes. Among these genes, 169 candidate genes have retained our attention (Table 1), because of their role in biological mechanisms, which could be linked to hormonal changes (stress and hormone signaling genes) and root disorders (genes involved in cell expansion and modification) observed on p25 protein-expressing *A. thaliana* plants. A second cutoff was then applied, taking into account expression variations of the *nptIII* gene conferring antibiotic resistance that was only present in transgenic lines and under the control of the 35S constitutive promoter. We calculated the differential expression of *nptIII* gene during plant development (i.e. the Log ratio of vectors Z-W, Figure 6c) equal to 0.61 and we selected only genes with a differential expression equal to or higher than 0.61 or -0.61. Using this approach 1363 candidate genes were selected, with 1067 up-regulated genes (log ratio between 0.61 and 4.51) and 296 down-regulated genes (log ratio between -1.51 and -0.61). All these deregulated genes were classified according to their biological process (figure 7) using TAIR's GO annotations (Berardini et al., 2004).

To validate gene differential expressions, we performed quantitative RT-PCR analyses on the same RNA samples used in microarray experiments, focusing on root extracts from 10-day- and 17-day-old *A. thaliana* transgenic 35S::P25B seedlings. We chose the TRF-like 7 transcription factor-encoding gene *TRFL7* (AT1G06910) as a reference gene among unaffected genes within our microarray analyses. We tested 12 genes among the most interesting candidate genes implicated in cell growth regulation and morphogenesis (expansin-coding genes *EXP18* and *EXP7* and the extracellular LRR-extensin gene *LRXI*), in response to auxin stimulus (the auxin response factor-encoding gene *ARF2*, one auxin-responsive gene *IAA16* and the ABCB transport protein member gene *ABCB19*), in response to ethylene stimulus (the gene *RCN1* encoding a regulatory subunit of the protein phosphatase 2A), in defense response (a member gene of the TIR-NBS-LRR class and a DnaJ heat shock protein-encoding gene *DnaJHSP*), in translational elongation (60S ribosomal protein-encoding gene *RPP0A*), in protein binding (a zinc finger-containing protein-coding gene) and a gene with no function assigned (an ubiquitin interaction motif-containing gene). We calculated expression ratios (Δ CT) between the reference gene and each candidate gene in 10- and 17-day-old Col-0 and 35S::P25B seedlings to determine differential gene expression between plants at two distinct growth stages ($\Delta\Delta$ CT(10d) and $\Delta\Delta$ CT(17d) in Table 2). The resulting final p25 protein-induced variation obtained by qRT-PCR ($\Delta\Delta$ CT(17d)- $\Delta\Delta$ CT(10d) in Table 2) was compared to the final Log ratio obtained in microarray studies (Δ B- Δ WT in Table 2). All the differential gene expressions were validated: up- and down-regulations trends were confirmed.

We then focused on the deregulated genes that were common to the three p25 protein-expressing *A. thaliana* lines. Eighteen candidate genes were identified as deregulated genes common to the 17-day-old seedlings of the three transgenic lines B, E and T (Table 3). Among them, some genes have been already described as deregulated genes in rhizomania-infected plants such as expansin genes (Schmidlin et al., 2008) or induced genes in other infected plants such as the Tobamovirus multiplication protein-encoding gene *TOM3* (Yamanaka et al., 2002). Using pathoplant® microarray database (<http://www.pathoplant.de/index.php>), we searched for stimuli that affected similarly the expression profile of each candidate gene, except for the gene AT3G30720 described in pathoplant® as a miRNA-regulated gene (n°2, Table 3). For two genes, one encoding a putative peroxidase (AT1G05250) and a SADHU-non coding retrotransposon (AT2G10410), neither pathogen infection nor abiotic stimuli affected their expression profile, demonstrating a specific deregulation of these two genes by only the ectopic expression of the p25 protein (n°8 and 18, Table 3). Other genes were shown to be deregulated by only one type of stress, such as AT5G15120 (n°7, Table 3) up-regulated upon TMV systemic infection, AT4G34290 (n°14, Table 3) up-regulated by lipopolysaccharide-induced (LPS), flagellin-induced (flg22) and hairpin-induced stresses, AT3G55920 (n°3, Table 3) up-regulated by hormonal stresses induced by SA and MeJA, and many genes up-regulated only by MeJA (n°4, 5, 6, 11, 13 and 17, Table 3). Interestingly, many other genes were up-regulated upon MeJA treatment but also after TMV infection (n°1, 9, 10, 12, 15 and 16, Table 3). Some of these genes were also up-

regulated by SA or ethylene treatment (n°10, 12, Table 3), or by LPS-, flg22- and hairpin-induced stresses (n°15, Table 3). All these data demonstrated that a lot of up-regulated genes in p25 protein-expressing *A. thaliana* plants are also induced by other stress conditions.

Discussion:

Previous analyses reported the influence of the p25 protein in BNYVV pathogenicity and demonstrated a major role of this protein in lesion phenotype upon leaf infection of *C. quinoa*, *T. expansa*, *B. vulgaris* and *B. macrocarpa* (Jupin et al., 1992; Tamada et al., 1999; Klein et al., 2007). Performing *A. tumefaciens*-mediated transient expression of the p25 protein in sugar beet leaves, we evidenced its direct implication in leaf yellowing phenotype in host plants without any help of other BNYVV factors. Yellowing was observed on *B. vulgaris* (right part, Figure 1a) and *T. expansa* (data not shown) and always correlated with p25 protein expression in leaf tissues (Figure 1b). Such phenotype was never observed with *A. tumefaciens* carrying control empty vectors (left part, Figure 1a), suggesting no influence of bacteria or leaf wounding. Moreover, adding *A. tumefaciens* expressing the P0 silencing suppressor in leaf tissues, we postulated that this yellowing phenotype could probably not be due to a siRNA effect.

Concerning root proliferation phenotype observed on rhizomania-infected sugar beets, there was previously no evidence of p25 protein implication, even though natural deleted forms of BNYVV RNA-3 did not cause root disorders (Tamada et al., 1999). The transgenic approach using *A. thaliana* Col-0 plants expressing constitutively the p25 protein demonstrated its major role in root branching phenotype in non-host plants and without any infection. These root disorders were observed on several p25 protein-expressing transgenic *A. thaliana* lines selected as homozygous and single copy lines (Figure 3a) and always correlated with the ubiquitous expression of the p25 protein (Figure 2a). The p25 protein conserved its functional cellular activity, as shown by its nuclear and cytoplasmic localizations (Figure 2b) in accordance with its nucleo-cytoplasmic shuttling capabilities described previously (Vetter et al., 2004). Moreover, no specific siRNAs produced from p25 protein-encoding mRNAs were detected in all these transgenic *A. thaliana* plants (Figure 2c), thus excluding a role of such siRNAs in the root branching phenotype. Regarding leaf phenotype of these p25 protein-expressing plants, no dramatic changes such as yellowing or leaf deformation was observed. These differences could be explained by the specific interaction of the p25 protein with host factors present in *Beta* species but absent in *A. thaliana* leaves.

Previous studies on rhizomania sugar beet disease reported the higher levels of auxin in infected host plant roots (Pollini et al., 1990). All the experiments conducted on p25 protein-expressing *A. thaliana* plants presented here permitted to confirm the role of this protein in auxin level increase and to suggest that this protein acts in *A. thaliana* as well as in infected sugar beet roots. Sensitivity-assays to exogenous 2,4-D (Figures 4a and 4b) demonstrated that transgenic plants are more sensitive to auxin treatments and hormonal content assays revealed more contents in free IAA and other auxin conjugates in transgenic plants than in wild-type plants. Moreover, using *A. thaliana* DR5::GFPx35S::P25 plants expressing GFP in response to auxin signaling, observing GFP fluorescence of their root meristems (data not shown) and targeting GFP-coding transcripts by qRT-PCR, we were able to confirm higher auxin levels in p25 protein-expressing plants than in wild-type

plants. Microarray analyses focusing on deregulated genes in transgenic *A. thaliana* 35S::P25B roots revealed at least 26 genes involved in auxin signaling (Table 1). Among them, many genes were identified as auxin-responsive protein genes coding for auxin transporters and Aux/IAA transcription factors, such as *IAA13* (AT2G33310), *IAA16* (AT3G04730) and *ARF10* (AT2G28350) up-regulated in 35S::P25B plants, and *ARF2* (AT5G62000) down-regulated in 35S::P25B plants. These results are in agreement with other studies reporting auxin-induced genes among deregulated genes upon BNYVV infection (Larson et al., 2008; Schmidlin et al., 2008). The direct implication of the p25 protein is yet not clear but recent data evidenced the interaction between the p25 protein and cellular factors involved in auxin signaling such as *IAA28* (Thiel and Varrelmann, 2009).

Other hormonal assays conducted on transgenic *A. thaliana* plants permitted to show other variations in hormone signaling linked to the p25 expression. Sensitivity-assays to exogenous ABA (Figure 5) and MeJA (Figures 4c, 4d and 5) demonstrated that transgenic plants are more resistant to ABA and MeJA treatments than wild-type plants, and JA content assays evidenced lower amounts of JA within p25 protein-expressing rootlets. Microarray analyses on transgenic *A. thaliana* 35S::P25B roots revealed some JA-related genes such as *JAR1* (AT2G46370) and the phenylalanine ammonia lyase-encoding gene *PAL1* (AT2G37040) whose orthologous gene was also up-regulated in infected sugar beet roots (Schmidlin et al., 2008). The repression of another PAL-encoding gene *PAL3* (AT5G04230) involved in defense response and response to wounding was as well detected. These results are also in accordance with global proteomic studies reporting hormone-responsive proteins detected in BNYVV-infected beets (Larson et al., 2008). Yet, our current data do not allow a complete comprehension of mechanisms involved in JA content diminution and JA-responsive gene modulation. Further experiments are conducted to understand these phenomena. Another aspect of changes in hormone signaling lays on higher amounts of ethylene precursor (ACC) conjugates assayed in *A. thaliana* transgenic lines and infected *B. macrocarpa* leaves, whereas comparable amounts of ACC were found. These data could be explained by a possible effect of p25 expression on ACC conjugation inducing storage of inactive forms, thus preventing rapid transformation in ethylene signaling molecules and delaying responses to infection. Thiel & Varrelmann discovered the ability of the p25 protein to interact with several *B. vulgaris* cellular factors involved in auxin, jasmonate and ethylene responses as well as with proteasome components (Thiel and Varrelmann, 2009).

Microarray analyses on transgenic *A. thaliana* 35S::P25B roots revealed another group of very interesting genes involved in cell wall biosynthesis, elongation, modification, and catabolism (Table 1). This group was composed of seven expansin genes, such as *EXPL2* (AT4G38400) and *EXP15* (AT2G03090) down-regulated in 35S::P25B plants and *EXP6* (AT2G28950), *EXP7* (AT1G12560), *EXP14* (AT5G56320) and *EXP18* (AT1G62980) up-regulated in 35S::P25B plants, and four up-regulated pectinesterase-encoding genes (AT5G53370, AT2G47550, AT2G45220, AT5G04960). Two of these expansin genes were also retrieved among the 18 deregulated genes common to the three independent transgenic *A. thaliana* lines (*EXP7* and *EXP18*, Table 3), confirming their importance in

root phenotype in accordance with the link described between their expression and root hair initiation (Cho and Cosgrove, 2002). Moreover, one expansin gene (BQ583860) was also previously reported as typically up-regulated in infected sugar beet roots (Schmidlin et al., 2008). All these results are consistent with root expansion and branching phenotype observed on p25 protein-expressing *A. thaliana* plants and with rhizomania sugar beet disease.

Interestingly, on the one hand most of the genes involved in disease resistance were down-regulated such as many resistance (R) genes of the TIR-NBS-LRR class and the defence-associated gene *EDS1* (AT3G48090) (Table1). On the other hand, genes that benefit viral infection were up-regulated such as one gene coding for the cell death suppressor Bax inhibitor 1 (BI-1) (AT5G47120) and the two Tobamovirus multiplication protein-encoding genes *TOM1* and *TOM3*, *TOM3* commonly found in the three independent transgenic *A. thaliana* lines (Table 3). This could suggest that such protein expression modifications contribute to a cellular environment favoring optimal replication of the virus (Ishikawa et al., 1993; Falk et al., 1999; Yamanaka et al., 2000; Peart et al., 2002; Huckelhoven et al., 2003; Tsujimoto et al., 2003). Another set of up-regulated genes consisted of 7 peroxidase-encoding genes (Table1) whose expression could contribute to the limitation of reactive oxygen species in the cells, thus leading to higher tolerance against oxidative stress and growth stimulation (Kawaoka et al., 2003; Yoshida et al., 2003). Such effects will be further characterized to understand how the p25 protein interferes with host factors and if hormonal changes are causes or consequences of transcriptional deregulations.

Hence, the characterization of transgenic *A. thaliana* plants expressing the BNYVV p25 protein has uncovered the effect of this factor of pathogenicity on transcriptome deregulation and hormonal changes in roots, highlighting major modifications that need to be confirmed in roots of *Beta* species. Sequencing of *B. vulgaris* genome combined with recent advances allowing ectopic root expression using *A. rhizogenes* (Pavli et al., 2010) will permit to compare transcriptional changes within roots expressing or not the p25 protein under the control of an inducible promoter.

Experimental procedures:

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia was used in this study. Seeds were surface-sterilized by treating sequentially in 70% ethanol for 10 min, then 5% sodium hypochlorite for 20 min, and rinsing 4 times in sterilized water. Seeds were plated onto Petri dishes containing MS medium pH5.7 consisting of Murashige and Skoog M0255 salts (Duchefa) supplemented with 0,7% Bacto-agar (Difco) and 1% sucrose (Duchefa). Plates were kept for 4 days in dark conditions at 4°C to synchronize germination, and then transferred to growth chambers with the standard conditions of a 16-h-light (21°C)/8-h-dark (17°C) photoperiod. For root elongation studies, 5-day-old seedlings were transferred to square plates kept vertically in order to correctly estimate root expansion. For auxin sensitivity assays or other root growth inhibition assays, after seed germination on classical MS media, 5-day-old seedlings were transferred to MS media supplemented with various concentration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), or methyl jasmonate (MeJA). All seedlings were positioned so that their root tips were aligned on a drawn line and Petri plates were placed in a vertical position. After 6 days, root elongation was measured and percentage of root growth inhibition calculated relative to root growth on minimal medium without any hormone. For all experiments, three sets of measurements were made on 20 plants for each genotype and averaged. For other hormonal treatments, seeds were directly kept on MS medium supplemented with abscissic acid (ABA), salicylic acid (SA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), or MeJA. Seed germination and plant development were appreciated after 14 days of room culture. 2,4-D (Duchefa), ACC (ScienceLab) and ABA (Duchefa) were provided as crystalline powder and 1 M, 100 mM, 10 mM and 1 mM stock solutions prepared and kept in 100% ethanol. SA stock solutions were prepared with sodium salicylate (Sigma-Aldrich) diluted in sterilized water. MeJA solution was supplied as a 4,5 M concentrated solution prepared in 100% ethanol (Sigma-Aldrich) and then diluted in 100% ethanol. All these compounds were added to cooled (50°C) MS medium as concentrated and sterile solutions, and the medium was poured into Petri dishes. For microarray studies, after germination of Col-0 and transgenic seeds on separated MS media, 5-day-old seedlings were transferred to new MS media. All seedlings were positioned so that Col-0 and transgenic plants were alternatively placed on drawn lines. After 5 days or 12 days of growth on new media, plantlets were harvested and used for microarray analyses.

Molecular construction of the P25 protein-expressing vector

The p25 protein-coding nucleotide sequence was amplified from pB35 full-length cDNA clone (Quillet et al., 1989) by polymerase chain reaction (PCR) using sense and reverse primers containing respectively *NcoI* and *XbaI* sites. After *NcoI* and *XbaI* digestion, protruding ends were blunt-ended using Klenow fragment. PCR product was cloned into *SmaI* digested pBin61 (Voinnet et al., 1998) to obtain the pBin-p25 construct. The cloned fragment was sequenced to ensure that the correct sense of the p25 sequence was inserted, according to the CaMV 35S promoter and terminator. The pBin-p25

construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (Holsters et al., 1980) using electroporation.

Transient expression of the p25 protein in *B. vulgaris* leaves

A. tumefaciens strains carrying empty pBin construct, pBin-p0 vector expressing the BWYV silencing suppressor P0 (Pfeffer et al., 2002), and pBin-p25 vector were infiltrated in leaf tissues as described previously (Voinnet et al., 1998). For the co-infiltration of two *Agrobacterium* cultures carrying distinct vector, equal volumes of both cultures ($OD_{600}=1$) were mixed just before infiltration. Mature leaves of 4-week-old *B. vulgaris* plants were infiltrated and observed after 4, 6 and 9 days.

A. thaliana transformation, selection and characterization

Wild-type *A. thaliana* (ecotype Columbia) plants were transformed with *A. tumefaciens* strain GV3101 bearing pBin-p25 binary vector by floral dip (Clough and Bent, 1998). Seed selection was made on MS medium supplemented with $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin and 25 resistant T1 seedlings were regenerated and separately transferred into greenhouse (16h light (22°C)/8h dark (18°C)) to obtain independent populations of pBin-p25 transformed T2 seeds. After kanamycin selection, 4 plants of each independent line were arbitrarily selected to self-pollinate. The progeny (T3 seeds) was tested for the p25 ubiquitous and stable expression by western blot analysis, and number of T-DNA insertions was determined by Southern blot analysis. Monocopy lines were self-pollinated and homozygous T4 seeds were recovered from these populations and subsequently used for root development studies and gene expression analyses. Backcrosses were performed as followed: two or three unopened flowers from the main inflorescence on *A. thaliana* 35S::*GFP* mature plants were emasculated with the help of a pair of fine forceps, and several anthers from male donors (from homozygous lines 35S::*P25B*, 35S::*P25E* or 35S::*P25T*) were used to pollinate the recipient stigmas. The rest of the flowers from the inflorescence were removed, and then appropriate seeds were carefully recovered.

DNA extraction and Southern blot analysis

Approximately 500 mg of leaf tissue were collected from each independent transgenic or wild-type *A. thaliana* plants, frozen and ground in liquid nitrogen. Genomic DNA was extracted and 15 μg per sample were overnight digested at 37°C. Two independent experiments were performed using either *AccI* or *BamHI* restriction enzymes. Only one *AccI* restriction site was found in the pBin-p25 binary vector, located in p25 protein-coding region, 600 bp downstream from the initiation codon. Whereas two *BamHI* restriction sites were determined, one located in the multiple cloning sequence inside the T-DNA region, upstream from the p25 protein-coding region, and the second located in p25 protein-coding sequence, 303 bp downstream from the initial codon. Digested products were purified by Tris-saturated phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1), precipitated and dissolved in sterile water. These DNA fragments were separated on 1% agarose gel, visualized by ethidium fluorescence, and then blotted onto nylon Hybond-NX membranes (Amersham Biosciences). Following transfer, DNA was covalently linked to the filters by UV irradiation. Radiolabeled probes detecting the p25 protein-coding sequence were made by random priming reactions in the presence of (α - ^{32}P) dCTP using

Prime-a-gene Labeling System (Promega). Non overlapping templates used in labeling experiments were either 5'-terminal PCR products (consisting of the first 300 bp of the p25 sequence) to reveal *AccI* digested fragments, or 3'-terminal PCR products (consisting of the last 360 bp of the p25-coding sequence) to reveal *BamHI* digested fragments. These nucleotide sequences were derived from pB35 and amplified with appropriate specific primers. Hybridization of probes was performed overnight in PerfectHyb Plus buffer (Sigma-Aldrich) at 65°C. Signals were detected by autoradiography and quantified using a Fuji MAS 1000 BioAnalyser and MacBAS image analysis software.

Identification of genomic sequences flanking T-DNA insertions by inverse PCR (iPCR)

For T-DNA insertion sequencing, 15 µg of genomic DNA was digested with *AccI* enzyme in a 200 µl volume and purified as described before. A ligation was set up, under diluted conditions to generate circular fragments, with 2 µg of digested DNA in a 1 ml volume using T4 DNA Ligase (Fermentas) overnight at room temperature. The ligated solution was purified by Tris-saturated phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1), and DNA was precipitated and redissolved in 10 µl sterile water. Purified DNA (2,5 µl per sample) was used as the template for inverse PCR with the following invPCR primer pairs (Table 4). PCR amplifications using the PfuTurbo DNA Polymerase (Stratagene) consisted of 45 cycles of 94°C for 10 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 2 min. Cycling was preceded by an initial denaturation step (94°C for 1 min) and followed by a final extension step (72°C for 5 min). PCR products were purified on 1% agarose gel and directly sequenced with Hitachi 3100 genetic analyser (Applied Biosystems). Genomic *A. thaliana* sequences flanking T-DNA Left Border insertions were determined by sequence comparisons using the NCBI BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1997) and T-DNA insertions mapped using NCBI Map Viewer software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>).

TEM immunolocalization of the p25 protein

Leaf and root tissue samples were taken from 21-day-old plantlets and were fixed for 2 h in 2% (v/v) glutaraldehyde and then treated for 12 h at 4°C in 10% (w/v) picric acid and stained for 2 h in 0.1% (v/v) osmium tetroxide and 12 h in 2% (w/v) uranyl acetate. All treatments were performed in 150 mM sodium phosphate buffer, pH7.2. Samples were then dehydrated through ethanol series and infiltrated with EPON 812 medium grade resin (Polysciences Inc, Germany). Polymerization was for 60 h at 60°C. Ultra-thin sections (90 µm) were cut using an Ultracut E microtome (Reichert) and collected on grids coated with formvar (EMS, Washington). Immunolocalization of the p25 protein was performed by incubating the sections with a rabbit anti-p25 antibody diluted 1/10000 in 1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffered saline (PBS) for 2 h at room temperature. The secondary goat anti-rabbit (GAR) coupled to 15 nm gold particles (Aurion EM reagents, EMS, Washington) was diluted 1/50 in 0.1% BSA.

mRNA and siRNA detection by northern blot analyses

Total RNA from leaves was extracted using Purescript RNA Isolation Kit (Gentra Systems) according to the manufacturer's instructions, quantified by spectrophotometry and redissolved in 50%

formamide. Northern analyses of low molecular weight RNA were performed with 20 µg of total RNA, as described previously (Himber et al., 2003). Ethidium bromide staining of the denaturing gel before transfer on the Hybond-NX membrane was used to detect total RNAs. Radiolabeled probes specific to the full-length p25 protein-coding sequence were obtained by random priming reactions in the presence of (α -³²P) dCTP using Prime-a-gene Labeling System (Promega). Hybridizations were performed overnight in PerfectHyb Plus buffer (Sigma-Aldrich) at 42°C. Radioactive signals were detected by autoradiography and quantified using a Fuji MAS 1000 BioAnalyser and MacBAS image analysis software.

Reverse transcription and quantitative PCR (qPCR)

Reverse-transcription of mRNAs into cDNAs was performed using ImProm-II™ Reverse Transcription System kit (Promega) according to manufacturer's instructions. cDNAs were used as templates to perform real-time PCR amplifications with a LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and specific primers targeting candidate genes selected after CATMA microarrays analyses. PCR reactions were performed using an iCycler Optical System (Bio-Rad) in 96-well plates heated at 95°C for 10 min as activation step, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 20 s, extension at 72°C for 40 s allowing data acquisition, and ended by 80 cycles with temperature increasing 0.5°C per cycle from 55°C to 95°C (melting curve recommended to confirm the specificity of the reactions). Identical conditions were used for all gene amplifications. Expression levels were presented as CT values and normalized using Actin2 gene (*ACT2*) or TRF-like 7 transcription factor-encoding gene *TRFL7* (AT1G06910) as internal control, resulting in Δ CT values. Global gene expression variation between two plants (transgenic vs Col-0) was then determined by the differences of the Δ CT leading to $\Delta\Delta$ CT values.

Western blot analysis

Plant tissues used for immunoblot analysis (usually 10 mg of leaf tissues) were frozen and ground in liquid nitrogen. Samples were homogenized in 100 µl of 2x concentrated gel loading Laemmli buffer (125 mM Tris-HCl, pH6.8 ; 5% SDS ; 20% Glycerol ; 5% β Mercapto Ethanol ; 0,005% Bromo Phenol Blue ; (Laemmli, 1970)), and centrifuged briefly to remove insoluble material. The soluble proteins were heated to 95°C for 5 min, 10 µl were loaded on a 12% polyacrylamide gel, resolved by SDS-PAGE and transferred by electro blotting onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore). Immunodetection of the p25 protein was performed by incubating membranes with rabbit polyclonal anti-p25 antibody diluted 1/40000 in phosphate buffer saline (PBS) containing 1% Tween/5% skimmed milk overnight at 4°C. Membranes were rinsed 3 times with PBS/1% Tween and then incubated for 2 h at room temperature with the secondary goat anti-rabbit antiserum coupled to peroxidase (Molecular Probes) diluted 1/10000 in PBS/1% Tween/5% skimmed milk. After 4 washing steps with PBS/1% Tween, complexes were revealed using chemiluminescent substrate (Roche Lumi-LightPLUS). Images were acquired by using a Chemdoc (Bio-Rad) digital imaging system, and band pattern analysed with Quantity One software (Bio-Rad).

Hormone assays

IAA and IAA conjugates were assayed as described previously (Devos et al., 2006).

Characterization of jasmonate (JA) from plant samples was performed by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS). The characterization was performed by comparing retention times, MS transitions and MS-MS analyses of sample and standard molecules of JA (Sigma). For JA content quantifications we used calibration curves made with distinct MS peak area obtained from different JA standard concentrations. JA standards were injected separately to the UPLC-MS/MS. Methyl dihydro jasmonate has been added during grinding of plant tissues in methanol 90% and used as an internal standard for JA recovery calculation after extraction. All analyses were performed using a Waters Quattro Premier XE (Waters, Mildorf, MA USA) equipped with an electrospray ionisation (ESI) source and coupled to an Acquity UPLC system (Waters). Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m; Waters), coupled to an Acquity UPLC BEH C₁₈ pre-column (2.1 x 5 mm, 1.7 μ m; Waters). Elution program was as followed: 100% A (2 min), a linear gradient to 100% B (10 min), 100% B (isocratic flow for 2 min), 100% A (1 min) and 100% A (isocratic flow for 2 min) at 450 μ l.min⁻¹ (sample injection volume 3 μ l). Mobile phase buffers were (A) water/acetonitrile/formic acid (94.9/5/0.1, v/v/v) and (B) acetonitrile/formic acid (99.9/0.1v/v). Nitrogen generated from pressurized air in a N2G nitrogen generator (Mistral, Schmidlin-dbs-AG, Switzerland) was used as the drying and nebulizing gas. The nebulizer gas flow was set to approximately 50 l.h⁻¹, and the desolvation gas flow to 900 l.h⁻¹. The interface temperature was set at 400°C and the source temperature at 135°C. The capillary voltage was set at 3.4 kV and the cone voltage and the ionization mode (positive and negative) were optimised for each molecule. The selected ion recording (SIR) MS mode was used to determined parent mass transition of JA (m/z: 209 in negative mode) and Methyl dihydro jasmonate (m/z: 227 in positive mode) with cone of 25 V for all the components. JA fragmentation was performed by collision-induced dissociation with argon at 1.10⁻⁴ mbar using multiple reaction monitoring (MRM). The collision energy was set to 20 V and the following transitions was used for JA: 209> 59 as described (Pan et al., 2008). The combination of chromatographic retention time, parent mass and unique fragment ion analysis was used to selectively monitor JA. Low mass and high mass resolution were 15 for both mass analyzers, ion energies 1 and 2 were 0.5 V, entrance and exit potential were 2 V and 1 V and detector (multiplier) gain was 650 V. Data acquisition and analysis were performed with the MassLynx software (ver.4.1) running under Windows XP professional on a Pentium PC.

Transcriptome analyses

Microarray analysis was carried out at the Unité de Recherche en Génomique Végétale (Evry, France), using the CATMA arrays containing 24,576 gene-specific tags corresponding to 22089 genes from *A. thaliana* (Crowe et al., 2003; Hilson et al., 2004). Two independent biological replicates were

produced. Plants were cultivated as described above. For each biological repetition and each experimental group, 300 plantlets were harvested, roots pooled and immediately frozen in liquid nitrogen and ground in Micro Dismembrator of Sartorius (30 s, 2000 rpm). Total RNA was extracted using RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) according to the supplier's instructions. For each comparison, one technical replication with fluorochrome reversal was performed for each biological replicate (i.e. 4 hybridizations per comparison). Labeling of cRNAs with Cy3-dUTP or Cy5-dUTP (Perkin-Elmer-NEN Life Science Products), slide hybridization and scanning were performed as described (Lurin et al., 2004).

Statistical analysis of microarray data

A normalization and statistical analysis method has been developed specifically for the CATMA programme by M.L. Martin-Magniette in collaboration with the 'Statistique et Génome' team from the unit UMR INRA/AgroParisTech MIA 518, Paris, France. It was based on two dye swaps (i.e. 4 arrays, each containing 24,576 GSTs and 384 controls) as described in (Gagnot et al., 2008). To determine differentially expressed genes, we performed a paired t-test on the Log ratios, assuming that the variance of the Log ratios was the same for all genes. Spots displaying extreme variance (too small or too large) were excluded. The raw P-values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the Family Wise Error Rate, (with a type I error equal to 5%) in order to keep a strong control of the false positives in a multiple-comparison context (Ge et al., 2003). We considered as being differentially expressed the genes with a Bonferroni P-value ≤ 0.05 , as described in (Gagnot et al., 2008).

Data deposition

Microarray data from this article were deposited at Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, accession no. GSE E-MEXP-404) and at CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; Project: CATMA-AU-05-01_P25) according to the "Minimum Information About a Microarray Experiment" standards.

Acknowledgements:

The authors are grateful to Valérie Cognat for her help with statistical analysis of hormonal growth effects, Malek Alioua for qPCR advices and sequencing, Danièle Scheidecker for technical assistance and Thierry Heitz for helpful discussion on JA assays. EP performed hormonal assays of auxins, ACC and ABA. ME and DH performed TEM and JA assays respectively. CP and LS were supported by SES-VanderHave France (Nérac) under CIFRE conventions.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Berardini, T.Z., Mundodi, S., Reiser, L., Huala, E., Garcia-Hernandez, M., Zhang, P., Mueller, L.A., Yoon, J., Doyle, A., Lander, G., Moseyko, N., Yoo, D., Xu, I., Zoeckler, B., Montoya, M., Miller, N., Weems, D., and Rhee, S.Y. 2004. Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. *Plant Physiol* 135:745-755.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., and Gorch, J. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13:1499-1510.
- Canet, J.V., Dobon, A., Ibanez, F., Perales, L., and Tornero, P. 2010. Resistance and biomass in Arabidopsis: a new model for salicylic acid perception. *Plant Biotechnology Journal* 8:126-141.
- 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.
- Cho, H.-T., and Cosgrove, D.J. 2002. Regulation of Root Hair Initiation and Expansin Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 14:3237-3253.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 16:735-743.
- Corbineau, F., Rudnicki, R.M., and Come, D. 1988. The effect of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant growth regulation* 7:157-169.
- Crowe, M.L., Serizet, C., Thareau, V., Aubourg, S., Rouze, P., Hilson, P., Beynon, J., Weisbeek, P., van Hummelen, P., Reymond, P., Paz-Ares, J., Nietfeld, W., and Trick, M. 2003. CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic Acids Res* 31:156-158.
- Devos, S., Laukens, K., Deckers, P., Van Der Straeten, D., Beeckman, T., Inze, D., Van Onckelen, H., Witters, E., and Prinsen, E. 2006. A hormone and proteome approach to picturing the initial metabolic events during Plasmodiophora brassicae infection on Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* 19:1431-1443.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D., Daniels, M.J., and Parker, J.E. 1999. EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3292-3297.

- Finkelstein, R. 1994. Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *The Plant Journal* 5:765-771.
- Gagnot, S., Tamby, J.P., Martin-Magniette, M.L., Bitton, F., Taconnat, L., Balzergue, S., Aubourg, S., Renou, J.P., Lecharny, A., and Brunaud, V. 2008. CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Res* 36:D986-990.
- Ge, Y., Dudoit, S., and Speed, T.P. 2003. Resampling-based testing for microarray data analysis. *Test* 12.
- Hilson, P., Allemeersch, J., Altmann, T., Aubourg, S., Avon, A., Beynon, J., Bhalerao, R.P., Bitton, F., Caboche, M., Cannoot, B., Chardakov, V., Cognet-Holliger, C., Colot, V., Crowe, M., Darimont, C., Durinck, S., Eickhoff, H., de Longevialle, A.F., Farmer, E.E., Grant, M., Kuiper, M.T., Lehrach, H., Leon, C., Leyva, A., Lundeberg, J., Lurin, C., Moreau, Y., Nietfeld, W., Paz-Ares, J., Reymond, P., Rouze, P., Sandberg, G., Segura, M.D., Serizet, C., Tabrett, A., Taconnat, L., Thareau, V., Van Hummelen, P., Vercruyse, S., Vuylsteke, M., Weingartner, M., Weisbeek, P.J., Wirta, V., Wittink, F.R., Zabeau, M., and Small, I. 2004. Versatile gene-specific sequence tags for Arabidopsis functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res* 14:2176-2189.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., and Voinnet, O. 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J* 22:4523-4533.
- 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.
- Huckelhoven, R., Dechert, C., and Kogel, K.H. 2003. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5555-5560.
- Ishikawa, M., Naito, S., and Ohno, T. 1993. Effects of the *tom1* mutation of Arabidopsis thaliana on the multiplication of tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. *J Virol* 67:5328-5338.
- 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.
- Kawaoka, A., Matsunaga, E., Endo, S., Kondo, S., Yoshida, K., Shinmyo, A., and Ebinuma, H. 2003. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *Plant Physiol* 132:1177-1185.

- 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.
- 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., and Nunez, A. 2008. Proteome changes in sugar beet in response to *Beet necrotic yellow vein virus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72:62-72.
- Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K.E., and Jonard, G. 1998. Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3' sequence domain rather than a gene product. *J Gen Virol* 79:385-393.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Taconnat, L., and Small, I. 2004. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16:2089-2103.
- Ottenschlager, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M., and Palme, K. 2003. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2987-2991.
- Pan, X., Welti, R., and Wang, X. 2008. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69:1773-1781.
- Pavli, O.I., Panopoulos, N.J., Goldbach, R., and Skaracis, G.N. 2010. BNYVV-derived dsRNA confers resistance to rhizomania disease of sugar beet as evidenced by a novel transgenic hairy root approach. *Transgenic Res.*
- Peart, J.R., Cook, G., Feys, B.J., Parker, J.E., and Baulcombe, D.C. 2002. An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J* 29:569-579.
- 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.
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K.E., Jonard, G., and Ziegler-Graff, V. 2002. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 76:6815-6824.
- Pollini, C.P., Masia, A., and Giunchedi, L. 1990. Free indole-3-acetic acid in sugar-beet root of rhizomania-susceptible and moderately resistant cultivars. *Phytopathologica Mediterranea*. 29:191-195.

- 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.
- Rahim, M.D., Andika, I.B., Han, C., Kondo, H., and 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. *J Gen Virol* 88:1611-1619.
- Schmidlin, L., De Bruyne, E., Weyens, G., Lefebvre, M., and Gilmer, D. 2008. Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease. *Molecular Plant Pathology* 9:741-751.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6837-6840.
- Tamada, T., and Abe, H. 1989. Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J Gen Virol* 70:3391-3398.
- 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.
- Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kigushi, T., and Harada, T. 1989. Production and pathogenicity of isolates of Beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J Gen Virol* 70:3399-3409.
- 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.
- Tsujimoto, Y., Numaga, T., Ohshima, K., Yano, M.A., Ohsawa, R., Goto, D.B., Naito, S., and Ishikawa, M. 2003. *Arabidopsis* TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. *Embo J* 22:335-343.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963-1971.
- Van Der Straeten, D., Djudzman, A., Van Caeneghem, W., Smalle, J., and Van Montagu, M. 1993. Genetic and Physiological Analysis of a New Locus in *Arabidopsis* That Confers Resistance to 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid and Ethylene and Specifically Affects the Ethylene Signal Transduction Pathway. *Plant Physiol* 102:401-408.
- 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.

- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., and Baulcombe, D.C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95:177-187.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and 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.
- Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S., and Ishikawa, M. 2000. TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10107-10112.
- Yamanaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., Kubota, K., Meshi, T., Naito, S., and Ishikawa, M. 2002. Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *J Virol* 76:2491-2497.
- Yoshida, K., Kaothien, P., Matsui, T., Kawaoka, A., and Shinmyo, A. 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:665-670.

Table 1: List of 169 selected genes differentially expressed in *A. thaliana 35S::P25B* roots categorized according to their biological groups (a to j). Expression levels ($\Delta B/\Delta WT$) assessed by CATMA analyses comparing 10- and 17-day-old seedlings of wild-type (WT) and transgenic *35S::P25B* (B) plants (microarray scheme on Figure 6c) are indicated as Log ratio (Log2 data). 28 genes appear twice and 2 appear in triplicate within the table.

	Acc. Number	Gene description	$\Delta B/\Delta WT$
a	Auxin signaling: 26 genes		
f	AT5G62000	auxin response factor1 Binding prot. (ARF2)	-0.68
	AT3G25290	auxin-responsive family prot.	-0.61
	AT5G54490	pinoid-binding prot. 1 (PBP1)	-0.61
d	AT1G12820	auxin binding / ubiquitin-protein ligase (AFB3)	0.72
	AT2G01420	auxin transport prot. (PIN4)	0.75
f	AT2G28350	auxin response factor 10 (ARF10)	0.86
	AT2G20120	expressed prot.	0.88
	AT4G34750	auxin-responsive prot.	0.89
	AT5G19140	auxin/aluminum-responsive prot. (AILP1)	0.96
fij	AT3G47600	myb family transcription factor (MYB94)	1.05
	AT1G28130	indole-3-acetic acid amido synthetase (GH3.17)	1.09
	AT1G16510	auxin-responsive family prot.	1.24
e	AT1G10210	mitogen-activated prot. kinase / MAPK (MPK1)	1.30
	AT4G12980	auxin-responsive prot., put.	1.35
f	AT4G29080	auxin-responsive AUX/IAA family prot. (IAA27)	1.51
c	AT2G38120*	amino acid permease (AUX1)	1.66
	AT4G36760	aminopeptidase P1	1.67
	AT1G56220	dormancy/auxin associated family prot.	1.76
f	AT5G65670	indoleacetic acid-induced prot. 9 (IAA9)	1.78
i	AT2G46370	jasmonate resistant 1 (JAR1)	1.80
	AT3G09870	auxin-responsive family prot.	1.88
f	AT3G04730	indoleacetic acid-induced prot. 16 (IAA16)	1.94
f	AT2G33310	indoleacetic acid-induced prot. 13 (IAA13)	2.17
j	AT1G25490	prot. phosphatase 2A (PP2A) regulatory s.u. (RCN1)	2.27
c	AT2G36910	multidrug resistance P-glycoprot. (ABCB1)	2.36
c	AT3G28860	multidrug resistance P-glycoprot., put. (ABCB19)	2.82
b	Cell wall modification: 7 expansin genes, 5 extensin genes, 4 pectinesterase genes		
	AT3G45960	expansin family prot. (EXPL3)	-0.79
	AT4G38400	expansin family prot. (EXPL2)	-0.66
	AT2G03090	expansin family prot. (EXP15)	-0.61
	AT4G13340	leucine-rich repeat family prot. / extensin family prot.	0.76
	AT2G47540	pollen Ole e 1 allergen and extensin family prot.	0.77
	AT4G02270	pollen Ole e 1 allergen and extensin family prot.	0.90
	AT5G56320	expansin family prot. (EXP14)	0.94
	AT2G15880	leucine-rich repeat family prot. / extensin family prot.	0.96
	AT5G53370	pectinesterase family prot. (PMEPCRF)	1.03
	AT5G05500	pollen Ole e 1 allergen and extensin family prot. (MOP10.4)	1.29
	AT2G28950*	expansin family prot. (EXP6)	1.44
	AT1G12560	expansin family prot. (EXP7)	1.51
	AT1G62980	expansin family prot. (EXP18)	1.57
	AT2G47550	pectinesterase family prot.	1.78
	AT2G45220	pectinesterase family prot.	1.84
	AT5G04960	pectinesterase family prot.	1.86
c	Transport: 15 genes of AAP or ABC transporters out of 19		

	AT1G30400	glutathione S-conjugate transporting ATPase (MRP1)	-0.75
	AT2G39480	ABC transporter family prot. (PGP6)	-0.65
i	AT1G04120	ABC transporter family prot. (MRP5)	-0.61
	AT3G28345	ABC transporter family prot.	0.80
	AT5G01240	amino acid permease, put.	1.03
	AT3G13620	amino acid permease family prot.	1.15
	AT2G39130	amino acid transporter family prot.	1.30
a	AT2G38120*	amino acid permease (AUX1)	1.66
	AT3G19553	amino acid permease family prot.	1.72
	AT1G58360	amino acid permease I (AAP1)	1.82
	AT2G21050	amino acid permease, put.	2.28
a	AT2G36910	multidrug resistance P-glycoprot. (ABCB1)	2.36
i	AT1G59870	ABC transporter family prot. (PEN3)	2.73
a	AT3G28860	ABC transporter family prot. (ABCB19)	2.82
	AT3G30390	amino acid transporter family prot.	3.96
d	Proteasome: 41 F-box and ubiquitin-related genes		
	AT1G61340	F-box family prot.	-0.80
	AT5G15400	U-box domain-containing prot.	-0.70
	AT2G30110	ubiquitin activating enzyme 1 (UBA1)	-0.63
	AT4G10925	F-box family prot.	0.61
	AT5G01720	F-box family prot. (FBL3)	0.65
	AT4G05230	ubiquitin family prot.	0.68
	AT1G49140	NADH-ubiquinone oxidoreductase-related	0.69
a	AT1G12820	auxin binding / ubiquitin-prot. ligase (AFB3)	0.72
	AT1G64840	F-box family prot.	0.73
	AT4G39910	ubiquitin-specific protease 3 (UBP3)	0.74
	AT2G26860	F-box family prot.	0.79
	AT2G46500	ubiquitin family prot.	0.79
	AT4G05260	ubiquitin family prot.	0.81
	AT1G76920	F-box family prot. (FBX3)	0.95
j	AT4G24210	F-box family prot. (SLEEPY1)	0.97
	AT3G05530	26S proteasome AAA-ATPase s.u. (RPT5a)	0.98
	AT3G06240	F-box family prot.	1.07
	AT2G36090	F-box family prot.	1.08
	AT3G63220	kelch repeat-containing F-box family prot.	1.10
	AT4G03510	prot. binding / ubiquitin-prot. ligase/ zinc ion binding (RMA1)	1.14
	AT5G18780	F-box family prot.	1.15
	AT5G50870	ubiquitin-conjugating enzyme (UBC27)	1.20
	AT2G01150	prot. binding / ubiquitin-prot. ligase/ zinc ion binding (RHA2B)	1.20
	AT5G02880	ubiquitin-prot. ligase (UPL4)	1.20
	AT2G21950	SKP1 interacting partner 6 (SKIP6)	1.30
	AT1G21720	20S proteasome beta s.u. C1 (PBC1)	1.30
	AT4G38600	ubiquitin-prot. ligase (KAK)	1.33
	AT1G27340	F-box family prot.	1.38
	AT3G23880	F-box family prot.	1.46
j	AT2G25490	EIN3-binding F-box prot. 1 (EBF1)	1.46
	AT2G30100	ubiquitin family prot.	1.47
	AT1G26930	kelch repeat-containing F-box family prot.	1.59
	AT3G27150	kelch repeat-containing F-box family prot.	1.62
i	AT2G33770	ubiquitin-prot. ligase (PHO2)	1.62
	AT1G29150	non-ATPase s.u. 9 (ATS9)	1.65
	AT1G30090	kelch repeat-containing F-box family prot.	1.66
	AT5G27750	F-box family prot.	1.70

	AT5G25760	prot. binding / ubiquitin-prot. ligase (PEX4)	1.73
	AT1G74510	kelch repeat-containing F-box family prot.	1.74
	AT5G19990	26S proteasome AAA-ATPase s.u. (RPT6A)	2.38
e			Signal transduction: 17 genes
	AT1G19050	two-component response regulator (ARR7)	-1.13
	AT1G03060	WD/BEACH domain protein	-1.01
	AT3G08510	phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC2)	-0.83
	AT5G19010	mitogen-activated prot. kinase, put. / MAPK, put. (MPK16)	-0.79
f	AT3G22170	far-red elongated hypocotyls 3 (FHY3)	-0.74
	AT2G31680	Rab GTPase homolog A5d	-0.71
	AT1G58230	WD-40 repeat family prot. / beige-related	-0.64
	AT1G03440	leucine-rich repeat family prot.	-0.62
	AT1G33610	leucine-rich repeat family prot.	0.63
	AT4G35950	Rac-like GTP-binding prot. (ARAC6)	0.81
a	AT1G10210	mitogen-activated prot. kinase / MAPK (MPK1)	1.30
	AT3G56070	cyclosporin A binding (ROC2)	1.45
	AT3G26030	protein phosphatase type 2A regulator	1.55
h	AT1G71400	disease resistance family prot. / LRR family prot. (RLP12)	1.63
	AT2G42880	mitogen-activated prot. kinase (MPK20)	1.69
	AT3G29350	Histidine phosphotransfer kinase (AHP2)	1.72
	AT2G16600	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/cyclophilin/(ROC3)	2.01
f			Transcription factors: 34 genes
	AT3G55980	zinc finger (CCCH-type) family prot. (SZF1)	-1.35
h	AT1G80840	WRKY family transcription factor (WRKY40)	-1.02
	AT1G18860	WRKY family transcription factor (WRKY61)	-0.92
	AT4G26640	WRKY family transcription factor (WRKY20)	-0.82
e	AT3G22170	Far-red elongated hypocotyls 3 (FHY3)	-0.74
j	AT3G04580*	Ethylene receptor (EIN4)	-0.73
a	AT5G62000	auxin response factor1 Binding prot. (ARF2)	-0.68
	AT3G04670	WRKY family transcription factor (WRKY39)	-0.67
	AT2G03340	WRKY family transcription factor (WRKY3)	-0.66
	AT5G41410	homeodomain prot. (BEL1)	-0.65
a	AT2G28350	auxin response factor 10 (ARF10)	0.86
aij	AT3G47600	myb family transcription factor (MYB94)	1.05
	AT2G28160	DNA binding / transcription factor (FRU)	1.09
	AT5G08520	myb family transcription factor	1.13
	AT2G24260	basic helix-loop-helix (bHLH) family prot.	1.15
	AT5G22890	zinc finger (C2H2 type) family prot.	1.17
j	AT2G40220	abscisic acid-insensitive 4 (ABI4)	1.18
	AT1G53910	AP2 domain-containing prot. RAP2.12 (RAP2.12)	1.20
	AT1G53320	phosphoric diester hydrolase/ transcription factor. (TULP7)	1.31
j	AT2G35940	homeodomain-containing prot. (BLH1)	1.39
	AT5G09750	DNA binding / transcription factor (HEC3)	1.44
h	AT2G24570	WRKY family transcription factor (WRKY17)	1.45
a	AT4G29080	auxin-responsive AUX/IAA family prot. (IAA27)	1.51
	AT1G25280	phosphoric diester hydrolase/ transcription factor (TLP10)	1.53
	AT3G46640	myb family transcription factor (PCL1)	1.55
	AT5G25810	AP2 domain-containing transcription factor TINY (TINY)	1.65
	AT3G60530	zinc finger (GATA type) family prot.	1.76
a	AT5G65670	indoleacetic acid-induced prot. 9 (IAA9)	1.78
	AT1G50600	scarecrow-like transcription factor 5 (SCL5)	1.79
a	AT3G04730	indoleacetic acid-induced prot. 16 (IAA16)	1.94
j	AT5G07580*	Ethylene-responsive element-binding family prot.	2.16

a	AT2G33310	indoleacetic acid-induced prot. 13 (IAA13)	2.17
	AT1G13260	DNA-binding prot. RAV1 (RAV1)	2.19
g	AT4G36990	heat shock factor prot. 4 (HSF4)	2.59
g	Heat shock proteins: 6 genes		
	AT2G29500	17.6 kDa class I small heat shock prot. (HSP17.6B-CI)	-0.91
	AT5G15450	Casein Lytic proteinase B3 (CLPB3)	-0.76
	AT1G18700	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing prot.	-0.70
f	AT4G36990	heat shock factor prot. 4 (HSF4)	2.59
	AT5G42020	luminal binding prot. 2 (BIP2)	4.55
	AT3G09440	heat shock cognate 70 kDa prot. 3 (HSC70-3) (HSP70-3)	4.63
h	Resistance (R) and other defence-associated genes : 14 genes		
f	AT1G80840	WRKY family transcription factor (WRKY40)	-1.02
	AT4G19500	disease resistance prot. (TIR-NBS-LRR class), put.	-0.86
	AT1G61100	disease resistance prot. (TIR class), put.	-0.86
	AT5G22690	disease resistance prot. (TIR-NBS-LRR class), put.	-0.84
	AT4G12010	disease resistance prot. (TIR-NBS-LRR class), put.	-0.78
	AT5G51630	disease resistance prot. (TIR-NBS-LRR class), put.	-0.70
	AT1G27170	disease resistance prot. (TIR-NBS-LRR class), put.	-0.66
	AT5G38850	disease resistance prot. (TIR-NBS-LRR class), put.	-0.65
i	AT3G48090	disease resistance prot. (EDS1)	-0.61
	AT5G47120	Bax inhibitor-1 (BI-1) put.	0.90
	AT3G13650	disease resistance response prot.	1.05
f	AT2G24570	WRKY family transcription factor (WRKY17)	1.45
	AT2G28670	disease resistance-responsive family prot. / fibroin-related	1.52
e	AT1G71400	disease resistance family prot. / LRR family prot. (RLP12)	1.63
i	Response to biotic or abiotic stress and JA biosynthesis: 24 genes		
	AT5G42650	AOS / hydroperoxide dehydrase / cyt. P450 74A (CYP74A)	-0.84
	AT4G02260	RelA/SpoT prot., put. (RSH1)	-0.77
	AT5G64930	CPR5 protein	-0.73
	AT5G04230	phenylalanine ammonia-lyase 3 (PAL3)	-0.69
c	AT1G04120	ABC transporter family prot. (MRP5)	-0.61
h	AT3G48090	disease resistance prot. (EDS1)	-0.61
	AT5G18100	copper/zinc superoxide dismutase (CSD3)	0.76
	AT4G26010	peroxidase, put.	1.00
afj	AT3G47600	myb family transcription factor (MYB94)	1.05
	AT5G64100	peroxidase, put.	1.25
	AT1G44970	peroxidase, put.	1.52
d	AT2G33770	ubiquitin-prot. ligase (PHO2)	1.62
a	AT2G46370	jasmonate resistant 1 (JAR1)	1.80
	AT1G05250	peroxidase, put.	1.81
	AT4G36430	peroxidase, put.	1.85
	AT5G67400	peroxidase 73 (PER73) (PRXR11)	1.97
	AT3G49960	peroxidase, put.	2.17
	AT3G61060	phloem protein (AtPP2-A13)	2.17
	AT4G21790	tobamovirus multiplication protein 1 (TOM1)	2.57
c	AT1G59870	ABC transporter family prot. (PEN3)	2.73
	AT2G37040	phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1)	3.08
	AT2G02180	tobamovirus multiplication protein 3 (TOM3)	3.14
	AT5G17820	peroxidase 57 (PER57) (PRXR10)	3.39
	AT2G30490	trans-cinnamate 4-monooxygenase (C4H)	3.64
j	Other hormone signaling : 9 genes		
f	AT3G04580*	ethylene receptor (EIN4)	-0.73
d	AT4G24210	F-box family prot. (SLEEPY1) (gibberellic acid regulation)	0.97

afi	AT3G47600	myb family transcription factor (MYB94)	1.05
f	AT2G40220	abscisic acid-insensitive 4 (ABI4)	1.18
	AT3G63150	GTP-binding prot.-related	1.27
f	AT2G35940	homeodomain-containing prot. (BLH1)	1.39
d	AT2G25490	EIN3-binding F-box prot. 1 (EBF1)	1.46
f	AT5G07580*	ethylene-responsive element-binding family prot.	2.16
a	AT1G25490	prot. phosphatase 2A (PP2A) regulatory s.u. (RCN1)	2.27

Prot., protein; put., putative; s.u., subunit; * genes whose mRNA levels were outside ± 0.22 SD (refer to text for details).

Table 2: P25 protein-dependant gene expression modifications detected by comparing 10-day-old (10d) and 17-day-old (17d) plants from wild-type (WT) and transgenic *A. thaliana* 35S::P25B (B) lines. Comparison between CATMA microarray expression values ($\Delta B/\Delta WT$, Log2 ratio) and qRT-PCR expression ratios ($\Delta\Delta CT(17d)/\Delta\Delta CT(10d)$, fold changes). * expression ratio corresponding to W vector in microarray scheme (Figure 6c). ** expression ratio corresponding to Z vector in microarray scheme (Figure 6c). # genes whose mRNA levels were outside ± 0.22 SD.

Acc. Number Gene name	Microarray Log ratios			qRT-PCR Fold change		
	WT 17d/10d*	B 17d/10d**	$\Delta B/\Delta WT$	$\Delta\Delta CT$ (10d)	$\Delta\Delta CT$ (17d)	$\Delta\Delta CT(17d)-$ $\Delta\Delta CT(10d)$
AT5G62000 <i>ARF2</i>	-0.54	-1.21	-0.68	1.1	0.4	-0.7
AT1G62980 <i>EXP18</i>	0.32	1.89	1.57	0.44	1.91	1.47
AT1G12560 <i>EXP7</i>	0.20	1.72	1.51	0.23	1.82	1.59
AT3G04730 <i>IAA16</i>	-1.23	0.71	1.94	0.26	1.05	1.59
AT2G42750 # <i>DnaJHSP</i>	0.10	-0.8	-0.92	0.83	0.35	-0.48
AT1G25490 <i>RCNI</i>	-0.52	1.74	2.27	0.05	1.12	1.07
AT5G45060 # <i>TIR-NBS-LRR</i>	-0.76	-1.25	-0.49	1.35	0.33	-1.02
AT1G43690 # Ubi. inter.	-0.91	2.24	3.16	0.01	6.06	6.05
AT1G12040 # <i>LRX1</i>	-0.52	-0.94	-0.41	1.78	0.76	-1.02
AT1G14200 # Zinc finger	1.48	1.96	0.48	2.12	3.91	1.79
AT2G40010 # <i>RPP0A</i>	-0.42	2.79	3.22	0.39	3.65	3.26
AT3G28860 # <i>ABCBI9</i>	-1.39	1.43	2.82	0.02	0.55	0.53

Table 3: List of candidate genes up- or down-regulated in common in the three independent lines B, E and T of *A. thaliana* p25 protein-expressing plants, comparing the three columns B/WT, E/WT, T/WT. All CATMA microarray comparisons are detailed here and all expression values are indicated as Log ratio (Log2 data). Such genes were found in other *A. thaliana* transcriptome analyses similarly up-regulated upon treatments specified in the last column. (a) TMV infection, (b) LPS-, flg22-, or hairpin-induced stresses, (c) SA and MeJA treatments, (d) MeJA treatment, (e) ethylene treatment, (nd) not determined.

N°	Acc. number	Gene description	GO classification	B/WT (10d)	B/WT (17d)	E/WT (17d)	T/WT (17d)	WT (17d/10d)	B (17d/10d)	$\Delta B/\Delta WT$	Other profiles
1	AT3G55910	expressed protein	unknown	2,13	1,12	1,10	0,55	0,01	-0,88	-0,89	a,d
2	AT3G30720	Qua-quine starch (QQS)	starch biosynthetic process	-0,57	-1,41	-1,27	-1,40	0,69	0,00	-0,69	nd
3	AT3G55920	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin	protein folding	3,57	4,36	4,06	3,67	0,01	0,73	0,73	c
4	AT1G07740	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	unknown	-0,90	0,92	0,94	0,99	-0,35	1,12	1,47	d
5	AT1G12560	expansin (<i>EXP7</i>)	cell wall modification during cell expansion	-0,53	0,91	0,81	1,12	0,20	1,72	1,51	d
6	AT1G62980	expansin (<i>EXP18</i>)	cell wall modification during cell expansion	-0,49	1,12	1,13	0,88	0,32	1,89	1,57	d
7	AT5G15120	expressed protein	unknown	-0,69	0,79	0,78	1,76	1,43	3,05	1,63	a
8	AT1G05250	putative peroxidase	response to oxidative stress	-0,96	0,74	0,76	1,31	0,06	1,87	1,81	-
9	AT5G07580	ethylene-responsive element-binding family protein	regulation of transcription, DNA-dependent	-0,70	1,06	0,71	1,15	-0,19	1,96	2,16	a,d
10	AT1G02140	mago nashi family protein	sex determination	-1,50	0,76	0,77	1,30	-0,21	2,23	2,44	a,d,c,e
11	AT5G64460	expressed protein	unknown	-1,98	0,88	0,80	1,20	-0,49	2,29	2,78	d
12	AT5G19120	aspartic-type endopeptidase	proteolysis	-1,63	1,32	1,27	1,79	-0,64	2,15	2,79	a,d,c,e
13	AT1G70330	equilibrative nucleoside transporter family protein	transport	-1,84	0,99	0,89	1,91	-0,65	2,36	3,02	d
14	AT4G34290	SWIB complex BAF60b domain-containing protein	unknown	-2,12	0,94	0,78	2,11	-0,52	2,51	3,03	b
15	AT2G02180	tobamovirus multiplication protein 3 (<i>TOM3</i>)	viral replication complex formation and maintenance	-2,07	1,17	0,91	1,10	-0,40	2,74	3,14	a,b,d
16	AT2G46930	putative pectinacetyltransferase	carboxylesterase activity	-1,57	0,84	0,79	1,66	-0,07	3,08	3,15	a,d
17	AT2G40010	60S acidic ribosomal protein P0 (<i>RPP0A</i>)	translational elongation	-2,28	1,18	0,77	1,68	-0,43	2,79	3,22	d
18	AT2G10410	SADHU non-coding retrotransposon, SADHU1-1	unknown	-1,92	1,26	1,32	2,11	-0,43	3,34	3,77	-

Table 4: List of primers used in this study

Acc. number	Gene name	Forward primer	Reverse primer
	P25 ^a	5'-GTGGCCGTCCATGGGTGATATATTAG-3'	5'-TTTCTAGACTAATCATCATCATCAACACC-3'
	P25 ^b	5'-AGCTGAATTCGCGGATCCTACCAGACTCGACAG-3'	5'-AGATGTCGACTCAAGGATCCGCAACAAAGCGCC-3'
	P25 ^c	5'-AGCTGAATTCGCGGATCCTACCAGACTCGACAG-3'	5'-AAAATCTAGACTAATCATCATCATCAACACCGTCAG-3'
	T-DNA/P25 ^d	5'-CGACTGTCTTTCGTGGTCTGG-3' (P25:428-449)	5'-GCCATCGCCCTGATAGACG-3' (Rev35S Prom) or 5'-AAGCGTCAATTTGTTTACACCAC-3' (Rev T-DNA LB)
AT3G18780	<i>ACT2</i> ^e	5'-GCACCCTGTTCTTCTTACCG-3'	5'-AACCCCTCGTAGATTGGCACA-3'
	<i>GFP</i> ^e	5'-AGCAGAACACCCCATCG-3'	5'-CGGTCACGAACTCCAGCAG-3'
AT1G06910	<i>TRFL7</i>	5'-GAGCCTCTTAGATACTGAACTGGAAAGACC-3'	5'-AAAGCTTTCATTAGCTCGATTTTACTAGCTCTCA-3'
AT5G62000	<i>ARF2</i>	5'-GGGAACTGCAGGCTCTTTGGCATT-3'	5'-TCGTTTGTGATTTTGACCCTTTTGA-3'
AT1G62980	<i>EXP18</i>	5'-TGAGCACAGCCCTGTTCAACGA-3'	5'-CGTGGCGGATTACACCATCCA-3'
AT1G12560	<i>EXP7</i>	5'-TACTCTGGAAAATCAACAGTGGTCACA-3'	5'-AACTGGGATGATACCGCCCTCCA-3'
AT3G04730	<i>IAA16</i>	5'-GGCCACGGAGCTGAGATTAGGG-3'	5'-CGACCTTCTCCTTCATATTTCTAAATCG-3'
AT2G42750	<i>DnaJHSP</i>	5'-AGGAAGAAGTACAAGAACGAGCACAGC-3'	5'-TATAAGTGATTTCTGTCTATGGTTTCAGTTGTCTCC-3'
AT1G25490	<i>RCN1</i>	5'-CAAGGTTGCACTGATGTGTTGAAGA-3'	5'-CATCGAACATAGTCATGATCTCAGCAA-3'
AT5G45060	<i>TIR-NBS-LRR</i>	5'-CGTGAAGTGAACCACCGAACTCACA-3'	5'-TCCTTCTGGAGCAATTGGTGTCT-3'
AT1G43690	Ubi. inter.	5'-GGAGGCGAAATCTCGTCGGTTG-3'	5'-CCCAAACAAGATCCCACTTCC-3'
AT1G12040	<i>LRX1</i>	5'-TCCTACGTCCTACTTTCCACCGATGC-3'	5'-CACACAAATTAAAGTCTCGCAGCCAAA-3'
AT1G14200	Zinc finger	5'-AGCTTTAGCCGCCAGAGAAGACGA-3'	5'-GACTTCAACGCCGGCGACCT-3'
AT2G40010	<i>RPP0A</i>	5'-TCCAACCAAGTTTGCAGTTGCAGTG-3'	5'-GGAAAGGCTGGCAAAAGATAAGACG-3'
AT3G28860	<i>ABC19</i>	5'-TCAATCATGGGAGCAGTAGGCTCA-3'	5'-CCCACAGCATAGAGACCAGCACCA-3'

^a primers used for cloning of the p25 protein-coding nucleotide sequence in binary vector.

^b primers used to generate radiolabeled probes needed for Southern hybridization of *AccI* digested DNA fragments.

^c primers used to generate radiolabeled probes needed for Southern hybridization of *BamHI* digested DNA fragments.

^d primers used for the identification of T-DNA insertion by iPCR on transgenic P25 protein-expressing *A. thaliana* plants.

^e primers used for qRT-PCR analyses on *DR5::GFP* and *DR5::GFPx35S::P25* plants.

Legend to figures:

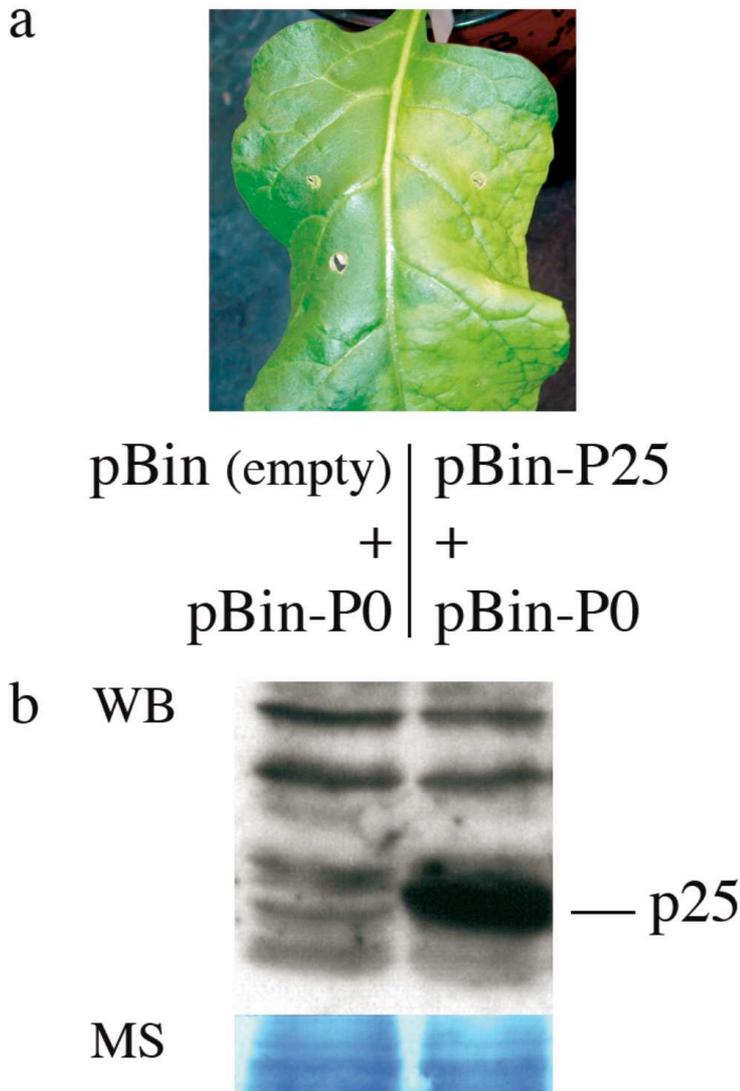


Figure 1

Figure 1: Ectopic expression of the p25 protein in sugar beet leads to leaf yellowing. (a) Leaves of sugar beets (*B. vulgaris*) were infiltrated with a suspension of *A. tumefaciens* containing binary vector expressing the BWYV-silencing suppressor P0 (pBin-P0) mixed with *A. tumefaciens* carrying empty binary vector on the left part of the leaves (pBin empty) or with *A. tumefaciens* carrying p25 protein-expressing binary vector on the right part of the leaves (pBin-P25). One of the most representative leaves is presented at 6 days post infiltration (b) Detection of the p25 protein expression by western blot (WB) within infiltrated leaf tissues. Total protein load is presented (MS).

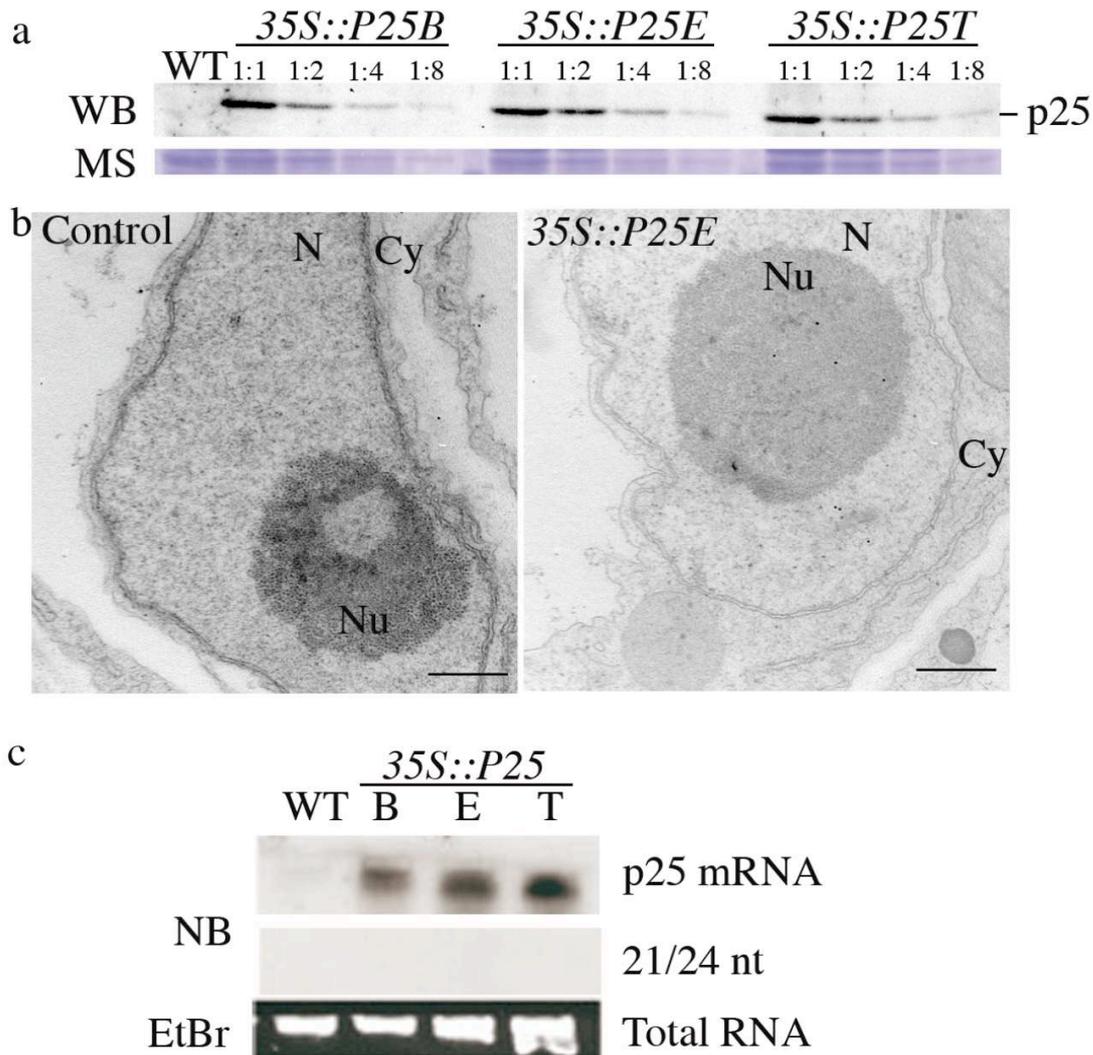


Figure2

Figure 2: Independent monocopy lines of *A. thaliana* transgenic plants express comparable amounts of functional p25 proteins. (a) Comparison of p25 protein expression between three transgenic lines *35S::P25B*, *35S::P25E* and *35S::P25T*. Serial dilutions (1:1, 1:2, 1:4 and 1:8) of protein samples extracted from 20 μ g of leaf tissues of each group of plants were loaded on SDS-PAGE (MS) and analyzed by western blot (WB). Protein samples from wild-type Col-0 *A. thaliana* plants (WT) were used as negative control. (b) TEM visualization of the subcellular localization of the p25 protein expressed in transgenic tissues after immunogold labeling. Control *A. thaliana* plants displayed few randomly positioned gold particles whereas p25 protein-expressing plants (*35S::P25E*) presented gold labeling in the nucleus and in the cytoplasm. Bar: 500 nm. (c) Comparison of p25 protein-encoding mRNA contents between three transgenic lines *35S::P25B*, *35S::P25E* and *35S::P25T*. Total RNAs were extracted from 20 μ g of leaf tissues, separated on denaturing gels and visualized by Ethidium bromide staining (EtBr). P25 protein-encoding mRNAs and siRNAs were analyzed by northern blot (NB). Wild-type Col-0 *A. thaliana* plants (WT) were used as negative control.

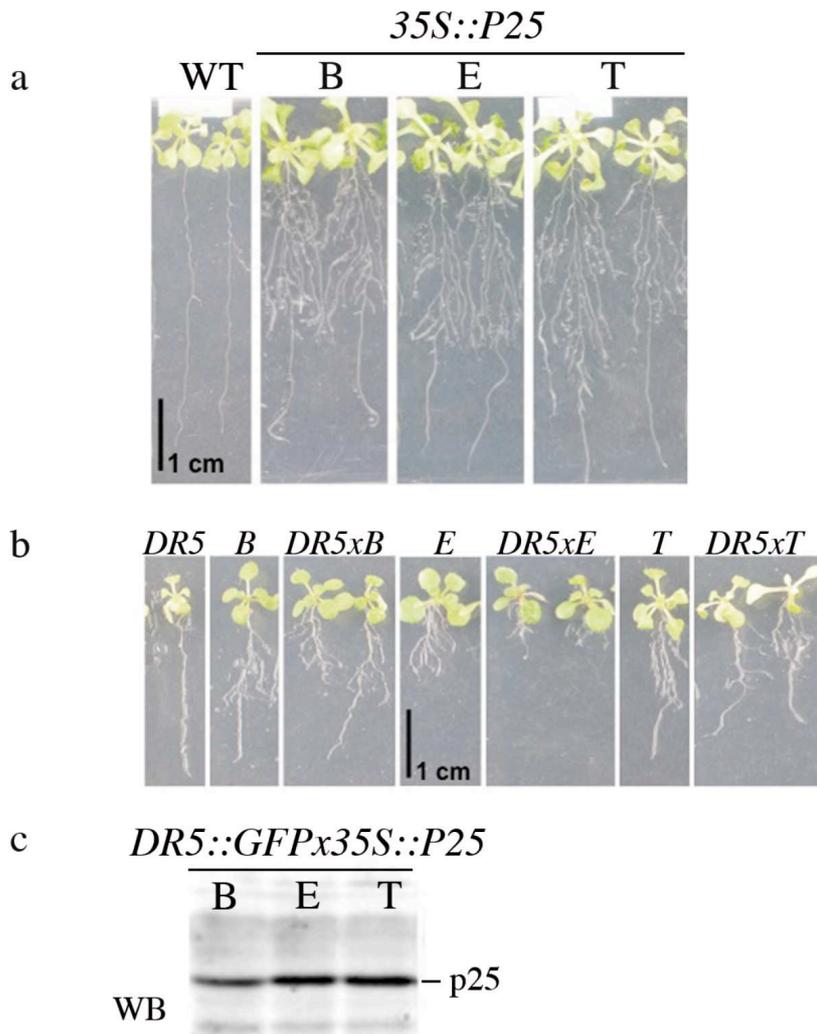


Figure3

Figure 3: Ectopic expression of the p25 protein in *A. thaliana* induces a dominant root branching phenotype. (a) Under identical sterile conditions, transgenic plants expressing constitutively the p25 protein ($35S::P25B$, $35S::P25E$ and $35S::P25T$) display higher number of rootlets when compared to wild-type Col-0 plants (WT). (b) Heterozygous plants expressing the p25 protein $DR5::GFPx35S::P25B$ ($DR5xB$), $DR5::GFPx35S::P25E$ ($DR5xE$) and $DR5::GFPx35S::P25T$ ($DR5xT$) conserved a root branching dominant phenotype as well as homozygous lines $35S::P25B$ (B), $35S::P25E$ (E) and $35S::P25T$ (T). $DR5::GFP$ plants (DR5) were used as negative control. (c) Detection of the p25 protein expression by western blot (WB) within protein samples extracted from leaves of heterozygous plants ($DR5::GFPx35S::P25B$, $DR5::GFPx35S::P25E$ and $DR5::GFPx35S::P25T$).

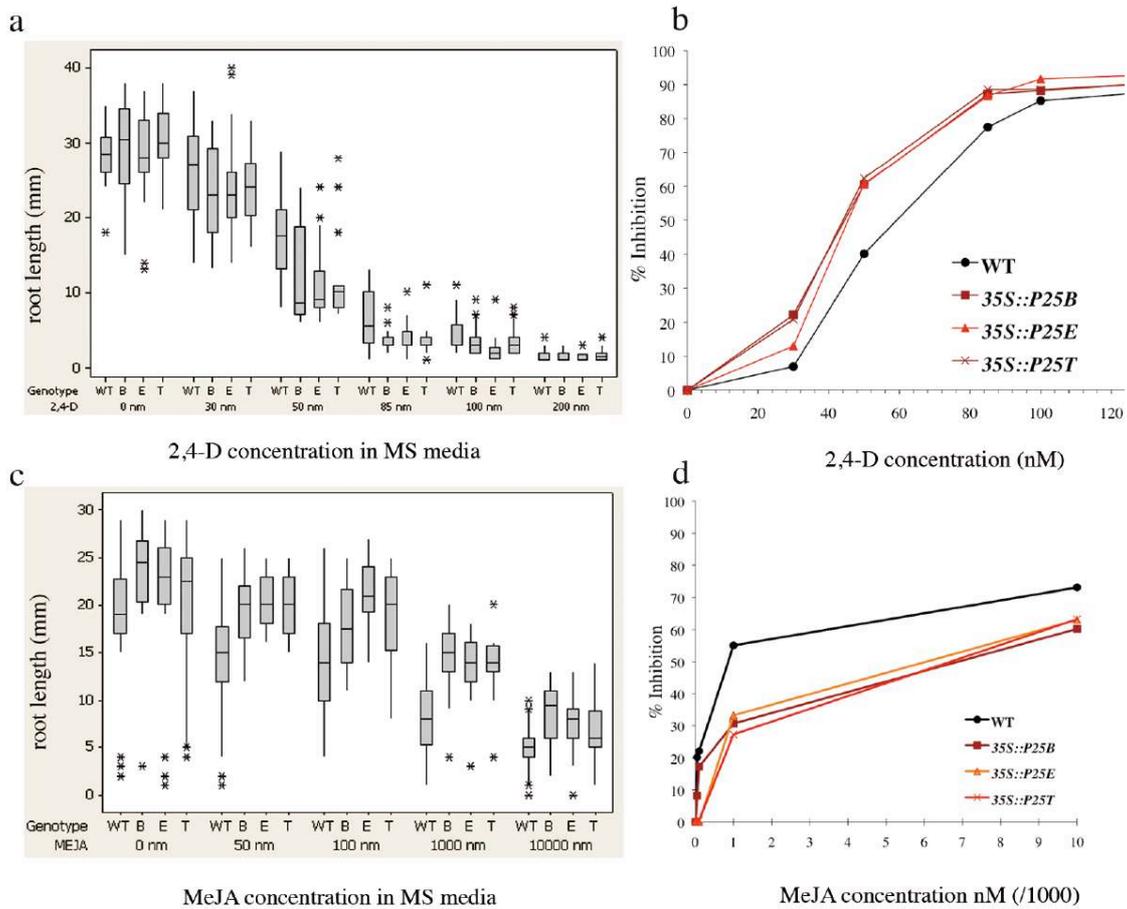


Figure4

Figure 4: P25 protein-expressing transgenic *A. thaliana* plants are more susceptible to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and resistant to methyl jasmonate (MeJA). Five-day-old seedlings were transferred on vertical MS media supplemented or not with increasing amounts of 2,4-D or MeJA and roots of twenty seedlings per condition were measured after 6 days of growth. Root elongation of the three transgenic lines 35S::P25B (B), 35S::P25E (E) and 35S::P25T (T) was compared to wild-type Col-0 plants (WT). (a, c) Box plot representation of root length (mm) at distinct hormone concentrations of 2,4-D (a, up to 200 nM) or MeJA (c, up to 10 μ M). This representation allows the visualization of the data dispersion. Stars correspond to outliers. (b, d) Representation of root growth inhibition percentage at distinct concentrations of 2,4-D (b) or MeJA (d). Root growth inhibition values for each group of plants are mean values.

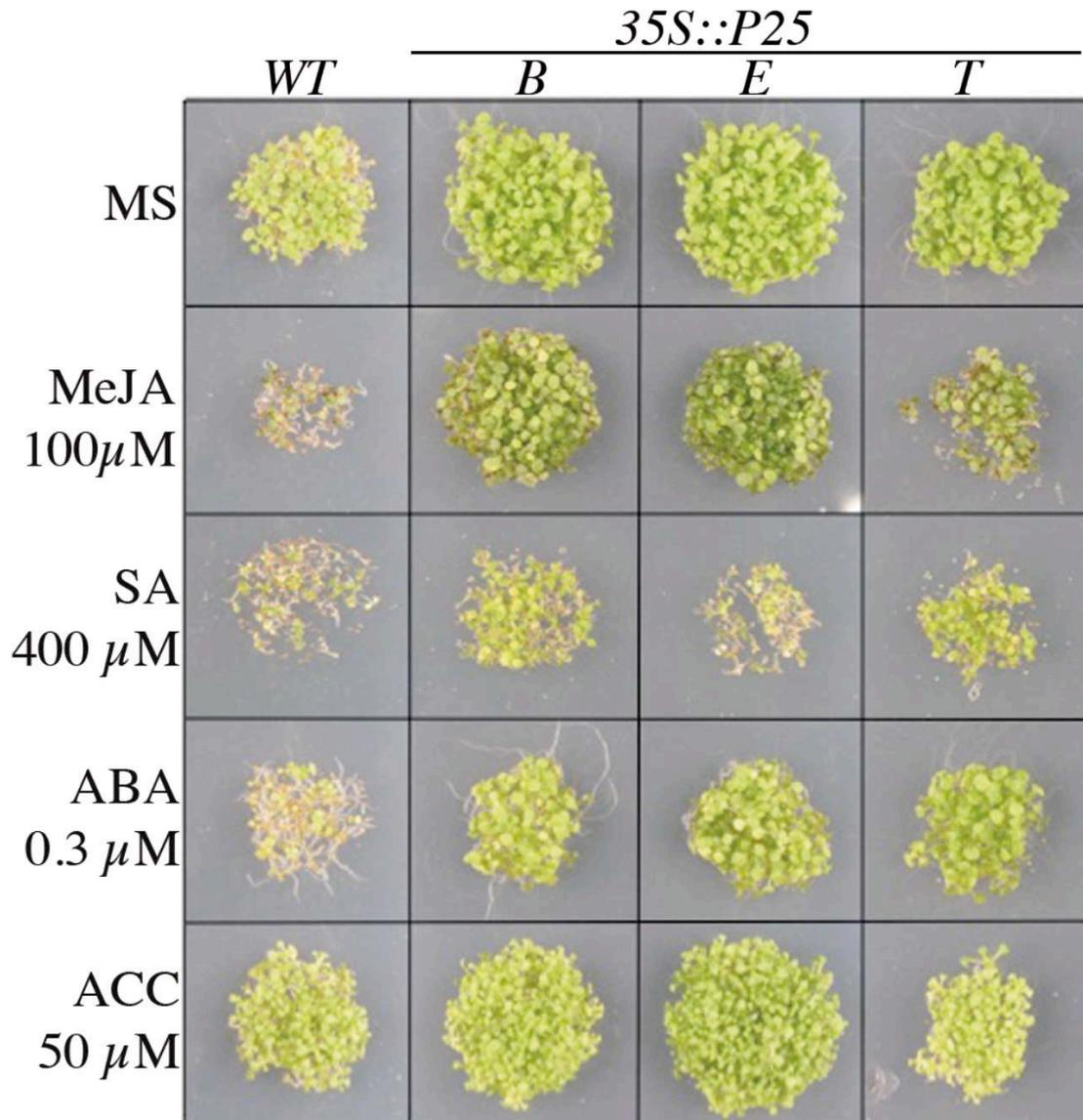


Figure 5

Figure 5: Expression of the p25 protein allows germination of *A. thaliana* plants in non-permissive conditions. Seeds from wild-type Col-0 plants (WT) and p25 protein-expressing transgenic lines (*35S::P25B*, *35S::P25E* and *35S::P25T*) were sowed on control media (MS) or media containing MeJA (100 μ M), SA (400 μ M), ABA (300 nM) or ACC (50 μ M). Seed germination and plant growth were compared after 14 days.

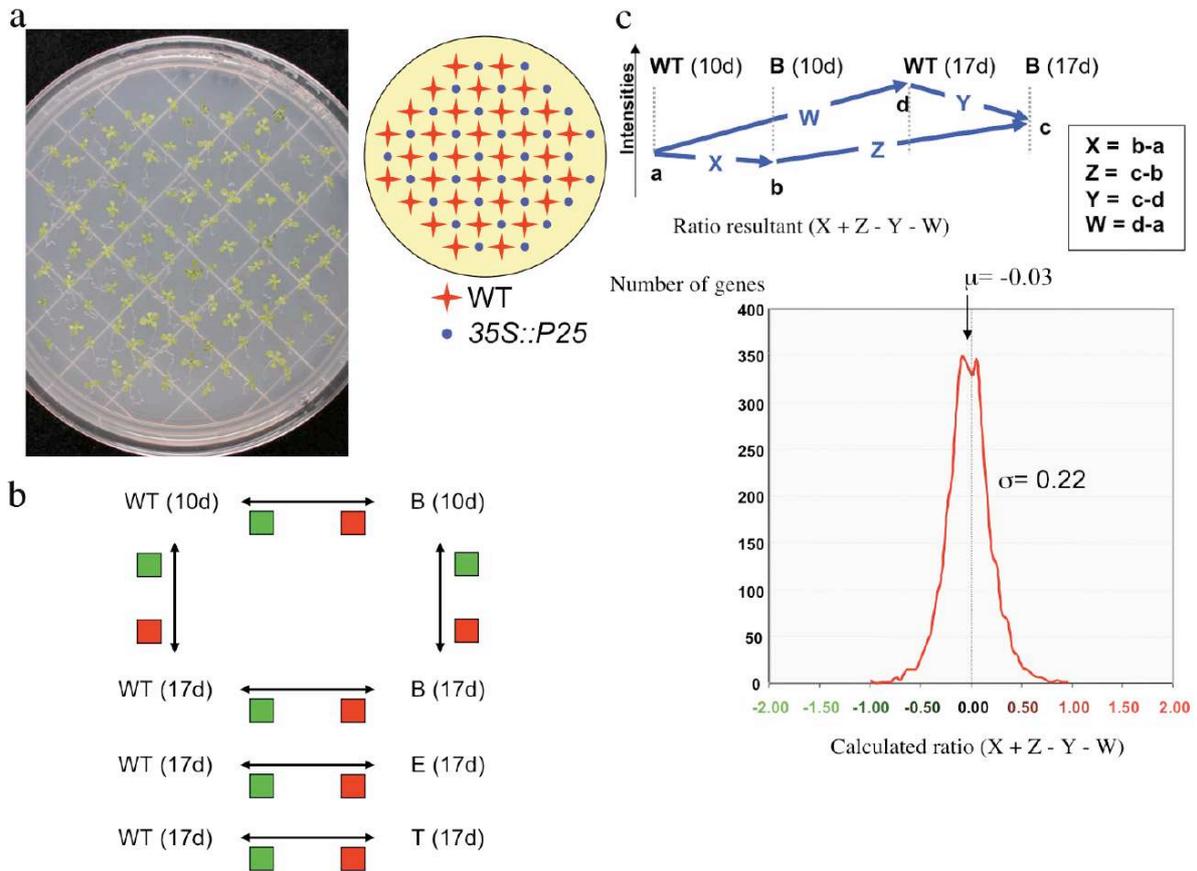
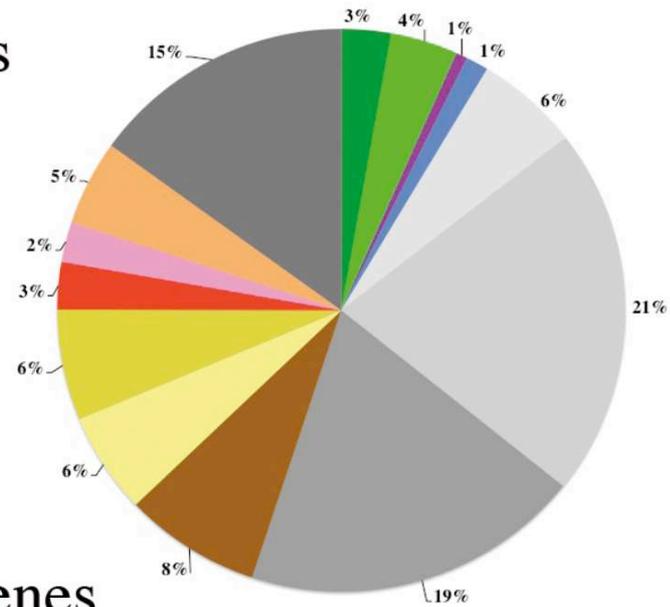


Figure6

Figure 6: Presentation of transcript profiling experiments comparing roots of wild-type *A. thaliana* plants (WT) and p25 protein-expressing transgenic *35S::P25B* (B), *35S::P25E* (E) and *35S::P25T* (T) lines after 10 days (10d) or 17 days (17d) of sterile growth. (a) Picture and scheme of plant distribution on MS media followed to standardize growth conditions of wild-type and transgenic seedlings. (b) Scheme of hybridization planning of the two-colour microarray analyses. (c) Circularization of the expression ratios (X+Z-Y-W) comparing wild-type plants (WT) and *35S::P25B* plants (B) after 10 days (10d) and 17 days (17d) provides theoretically a zero value. Calculation with the entire set of 3428 differentially deregulated genes provides a mean value equal to -0.03 with a standard deviation (SD) of 0.22.

Up-regulated genes



Down-regulated genes

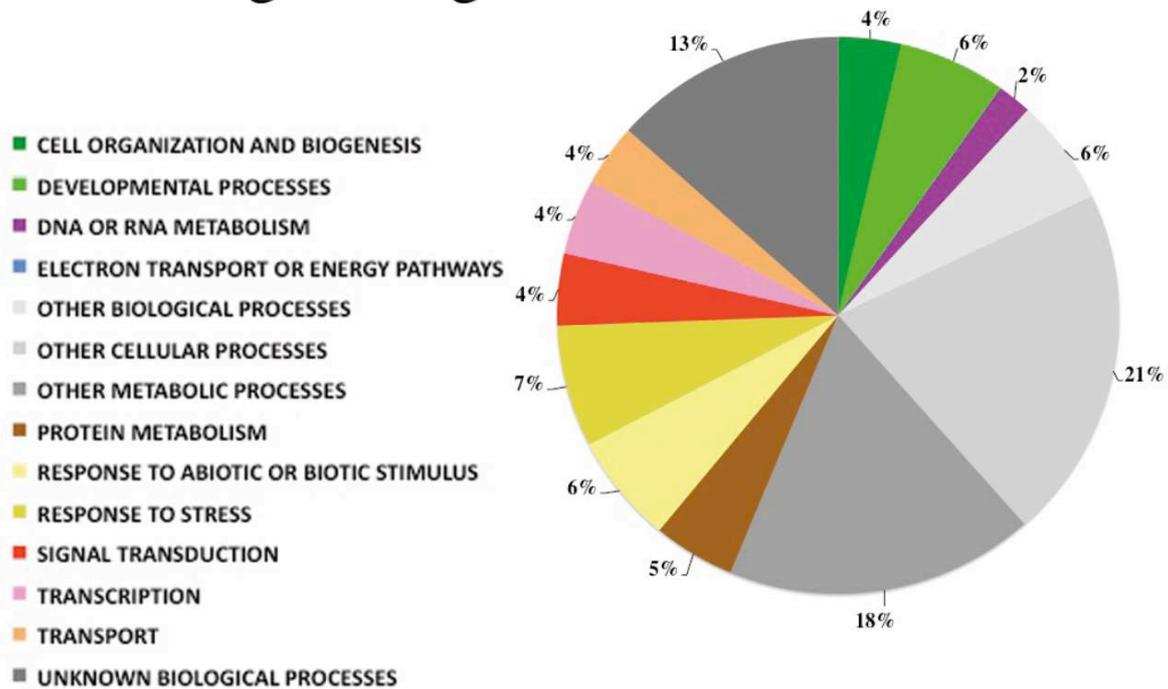


Figure 7: Functional GO biological process categorization of differentially regulated genes in roots of the transgenic *35S::P25B* plants. Only genes with a differential expression equal to or higher than 0.61 or -0.61 were included in the analysis, resulting in 1363 candidate genes (1067 up-regulated and 296 down-regulated).

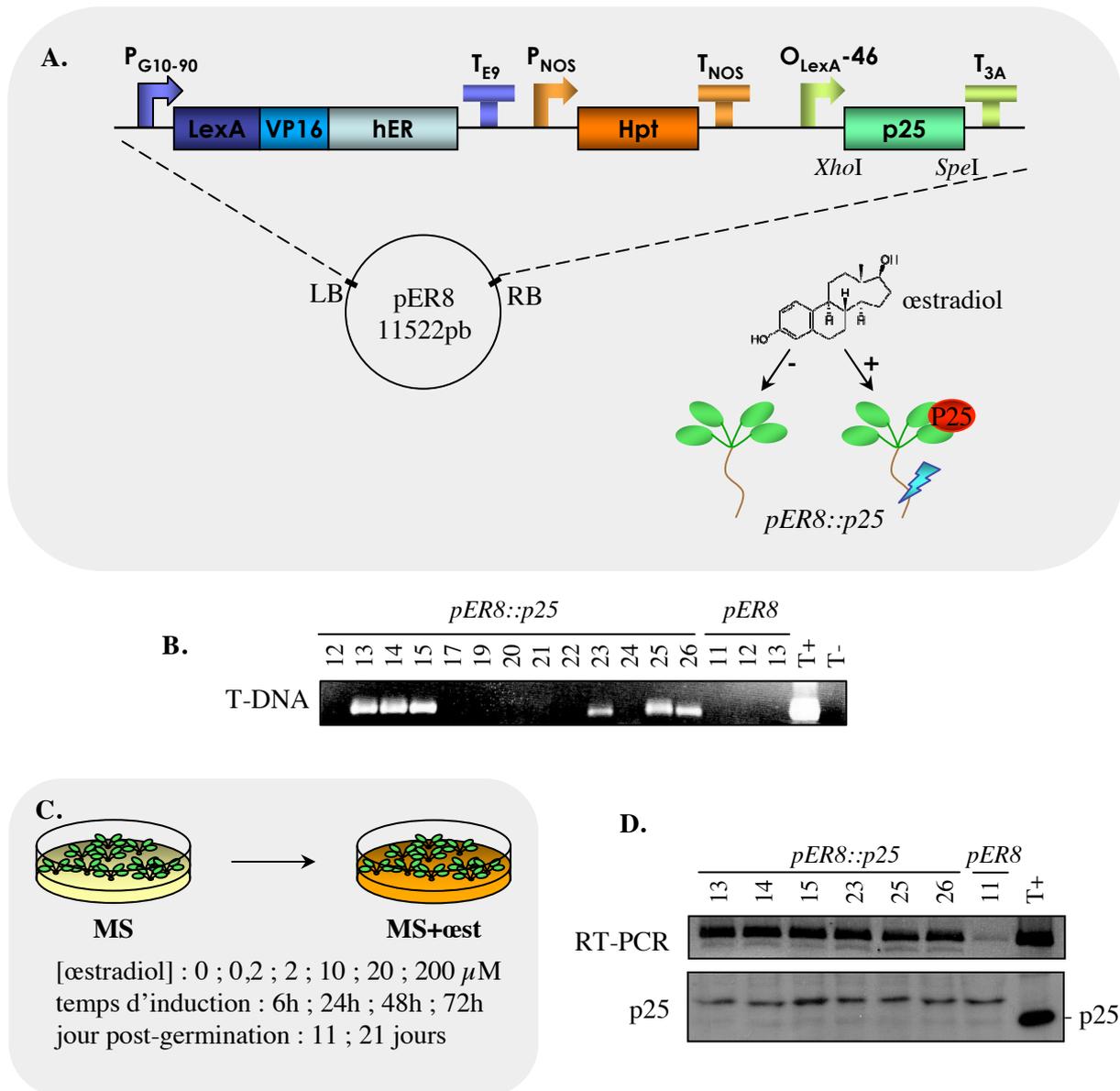


Figure II.4. : Création et caractérisation des lignées *pER8::p25*. **A.** Représentation schématique du vecteur binaire pER8. La séquence codant pour p25 clonée entre les sites *XhoI* et *SpeI* est placée sous le contrôle de l'opérateur LexA. La protéine de fusion LexA-VP16-hER est fonctionnelle uniquement en présence d'œstradiol, et permettra la transcription du gène d'intérêt. L'expression du gène d'intérêt dans les plantes transgéniques obtenues, résistantes à l'hygromycine grâce au gène Hpt sera induite par l'œstradiol ajouté au milieu. Des plantes d'une même lignée peuvent être comparées entre elles. **B.** Vérification de la présence du gène de la protéine p25 par amplification par PCR sur l'ADN extrait des différentes plantes résistantes à l'hygromycine, obtenues par transformation avec les vecteurs pER8::p25 et pER8 (vecteur vide). **C.** Conditions d'induction à l'œstradiol testées sur les lignées sélectionnées. Les plantes produites sur un milieu sans œstradiol sont repiquées 11 ou 21 jours après germination sur des milieux contenant différentes concentrations d'œstradiol, durant 6 à 72h. **D.** Analyse sur gel d'agarose des produits obtenus par RT-PCR ciblant le gène p25 effectuées sur les ARN extraits des plantes de 21 jours induites 72h à 10 µM d'œstradiol (panneau du haut). Analyse par western-blot de la présence de la protéine p25 dans les plantes transgéniques induites (panneau du bas). Les témoins T⁺ et T⁻ correspondent à l'amplification par PCR des vecteurs pER8::p25 et pER8, respectivement.

2.2. Création de lignées d'*A. thaliana* exprimant la protéine p25 de manière inductible

Les résultats CATMA obtenus précédemment correspondent à des dérégulations de gènes dont l'expression est affectée dès la germination puisque la protéine p25 y est exprimée constitutivement. Dans le but d'identifier les gènes précocement dérégulés par la protéine virale, nous avons créé des *A. thaliana* exprimant la protéine p25 sous contrôle d'un promoteur inductible à l'œstradiol. Le vecteur binaire choisi, nommé pER8 contient un T-DNA renfermant le gène Hpt qui confère une résistance des plantes à l'hygromycine, un gène qui code une protéine de fusion LexA-VP16-hER sous contrôle d'un promoteur constitutif, et une cassette de clonage permettant l'insertion d'un gène à exprimer sous contrôle du promoteur inductible de type LexA (**figure II.4.A.**) (Zuo *et al.*, 2000). La protéine de fusion produite se lie à l'opérateur LexA et VP16 permet l'activation de la transcription du gène sous contrôle de l'opérateur LexA seulement si une molécule d'œstradiol se fixe au domaine hER. La séquence codant pour la protéine p25 a été introduite en aval du promoteur inductible dans ce vecteur pER8, menant à l'obtention de la construction pER8::p25. Une telle approche permet l'obtention puis la comparaison de plantes induites ou non induites, provenant de la même lignée. Ainsi, il est possible d'effectuer une cinétique d'expression des ARN de la plante, permettant de suivre la dérégulation des gènes à des temps très précoces, et de manière progressive. En parallèle, une construction témoin a été produite en introduisant le gène codant pour l'eGFP sous contrôle du promoteur inductible.

Plusieurs lignées d'*A. thaliana* résistantes à l'hygromycine ont été obtenues. Les lignées 13, 14, 15, 23, 25 et 26 renferment le gène codant pour p25 car elles sont positives au génotypage par PCR (**figure II.4.B.**). Ces plantes ont été caractérisées pour rechercher l'expression du messager de p25 et de la protéine virale. Pour cela nous avons fait germer des graines sur un milieu non inducteur, puis repiqué les plantules sur un nouveau milieu afin de les soumettre à différentes conditions d'induction, incluant plusieurs paramètres contrôlés : 1) les concentrations en œstradiol (de 0 à 200 μ M), 2) la durée d'induction (de 6h à 72h) et 3) le stade des plantes (de 11 à 21 jours post-germination) (**figure II.4.C.**). Nous avons ensuite procédé à la recherche de l'expression du transgène par RT-PCR sur les ARN extraits des plantes positives au génotypage et induites à l'œstradiol. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure II.4.D. (panneau du haut)**. Un signal est visualisé pour chaque lignée transformée par pER8::p25, mais pas dans le cas de la lignée 11 qui a été transformée par le vecteur pER8. Ces résultats indiquent que chaque lignée pER8::p25 exprime l'ARN messager de la protéine p25. Nous avons ensuite recherché par western-blot la présence de la protéine p25 par une analyse des protéines totales extraites des plantes induites. Toutes les conditions d'induction citées précédemment ne sont pas présentées, puisque tous les tests ont produit les mêmes résultats. Si la protéine p25 est détectée dans la piste témoin, aucun signal spécifique n'est visible dans les pistes correspondant aux

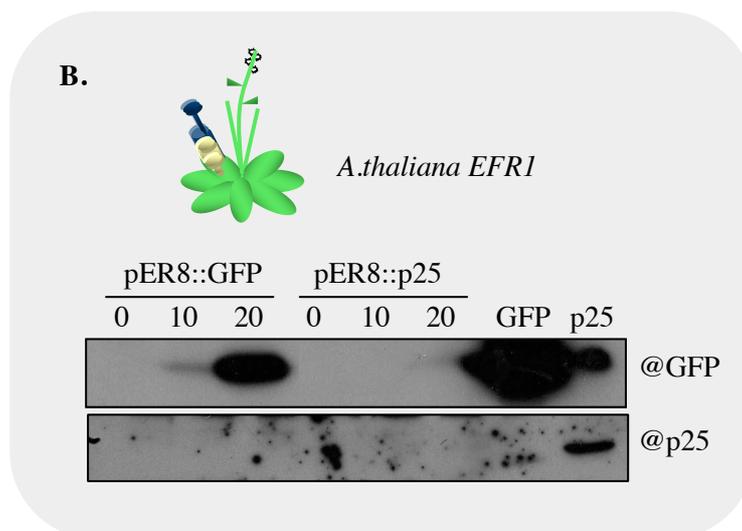
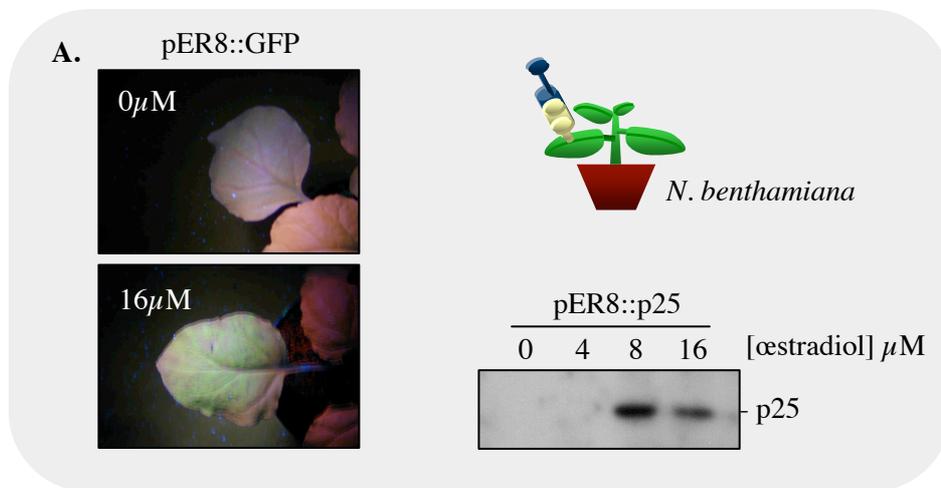


Figure II.5. : Vérification de l'efficacité de la construction pER8::p25. **A.** Infiltration de feuilles de *N. benthamiana* avec les constructions pER8::GFP ou pER8::p25 supplémentées de concentrations croissantes d'œstradiol. La visualisation de l'expression de la GFP est effectuée sous UV (panneaux de gauche). L'expression de la protéine p25 est recherchée par western-blot à l'aide d'un anticorps polyclonal. **B.** Infiltration de feuilles d'*A. thaliana EFR1*, compatibles à l'agroinfiltration, avec les constructions pER8::GFP ou pER8::p25 en présence de concentrations croissantes d'œstradiol. Les pistes GFP et p25 correspondent aux protéines extraites de lésions prélevées de feuilles infectées par les ARN-1, -2, additionnés du rep3-GFP ou de l'ARN-3 du BNYVV, respectivement. L'expression des protéines GFP et p25 est recherchée par western-blot à l'aide d'anticorps spécifiques (panneau du haut et du bas, respectivement).

lignées transgéniques *pER8::p25* (**figure II.4.D., panneau du bas**). La bande située légèrement plus haut correspond à du bruit de fond, puisqu'elle est également retrouvée dans la lignée 11 qui ne possède pas le gène de la protéine virale. Ainsi, la protéine p25 n'est pas détectée dans ces lignées transgéniques induites malgré l'expression de son message. Nous avons voulu comprendre ce phénomène en vérifiant l'efficacité de la construction dans un autre système qu'*A. thaliana*.

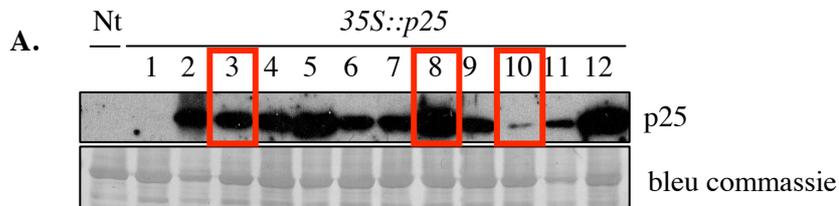
Pour cela, des feuilles de *N. benthamiana* ont été infiltrées par des agrobactéries renfermant les constructions *pER8::p25* ou *pER8::GFP* en présence de concentrations croissantes en œstradiol. L'expression des protéines a été vérifiée par observation des feuilles sous lumière UV et par western-blot pour les protéines GFP et p25, respectivement.

La coloration rouge observée sur la feuille de *N. benthamiana* infiltrée par *pER8::GFP* sans œstradiol correspond à la fluorescence de la chlorophylle à cette longueur d'onde (**figure II.5.A., photo du haut**). En présence de 16 μM d'œstradiol, la fluorescence verte est nettement visible 4 jours post-infiltration (**figure II.5.A., photo du bas**). Ce résultat indique que la coinfiltration des agrobactéries avec l'œstradiol permet l'expression transitoire des protéines contrôlées par le promoteur inductible du T-DNA.

Nous avons alors recherché la présence de la protéine p25 dans les protéines totales extraites des plantes infiltrées par les agrobactéries *pER8::p25* et l'œstradiol. Les extraits protéiques ont été analysés par western-blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre p25. Les pistes correspondant aux concentrations de 0 et 4 μM d'œstradiol ne montrent pas de signal, alors que des bandes spécifiques apparaissent en présence de concentrations de 8 et 16 μM d'œstradiol (**figure II.5.A., droite**). Nous avons donc conclu que la construction *pER8::p25* est fonctionnelle, car elle est capable de diriger l'expression de la protéine p25 en présence de concentrations adéquates d'inducteur. Il faut préciser que *pER8::GFP* et *pER8::p25* produisent des ARNm dont les séquences UTR sont identiques.

Les mêmes expériences de coinfiltration ont été réalisées sur des feuilles d'*A. thaliana efr1*, dont la mutation du gène EFR les rend compatibles à l'agroinfiltration (Zipfel *et al.*, 2006). Cette fois-ci, la GFP et la protéine p25 ont toutes deux été recherchées par western-blot dans les extraits protéiques des plantes infiltrées. L'anticorps dirigé contre la GFP permet la visualisation de bandes spécifiques dans les pistes correspondant aux feuilles coinfiltrées par *pER8::GFP* en présence de 10 et 20 μM d'œstradiol (**figure II.5.B., panneau du haut**). Le signal observé avec 20 μM d'œstradiol est beaucoup plus fort que celui où seuls 10 μM d'œstradiol ont été infiltrés.

L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine p25 permet la détection de la protéine dans la piste correspondant au témoin (plante infectée), alors qu'aucun signal n'a pu être visualisé dans les feuilles infiltrées par *pER8::p25*, quelle que soit la concentration en œstradiol utilisée (**figure II.5.B., panneau du bas**).



B. Corrélation entre la taille des plantes (en cm) et le taux d'expression de la protéine p25

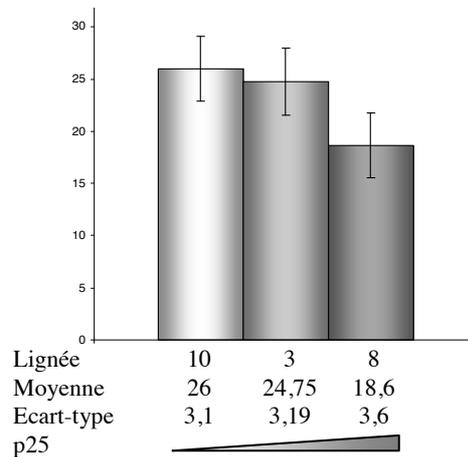


Figure II.6. : Analyse de lignées de *N. tabacum* obtenues par transformation avec le vecteur binaire 35S::p25. A. Analyse par western-blot du taux d'expression de la protéine p25 des différentes lignées 35S::p25 obtenues. Le panneau du haut correspond aux signaux obtenus avec l'anticorps dirigé contre la protéine p25. Le panneau du bas correspond à la coloration de la membrane au bleu de commassie, permettant la visualisation des protéines totales. Les pistes encadrées en rouge représentent les trois lignées choisies pour l'analyse de la vitesse de croissance des plantes. **B.** Graphique représentant la taille moyenne des tiges des plantes (en cm) des trois lignées, analysées 50 jours après repiquage en terre.

La protéine GFP est retrouvée à la fois chez *N. benthamiana* et chez *A. thaliana* infiltrées. Ces résultats indiquent que la méthode de coinfiltration est efficace chez ces deux hôtes. Pourtant, la protéine p25 est retrouvée uniquement chez *N. benthamiana*. Nous avons montré que le promoteur est efficace dans *A. thaliana* puisque nous détectons la GFP et le messager de p25. Cela semble indiquer que la protéine p25 est exprimée de la même façon dans les deux plantes, mais qu'elle ne s'accumule pas en quantité suffisante pour permettre sa détection. Ainsi, il est probable que la demi-vie de la protéine p25 soit plus courte chez *A. thaliana* que chez *N. benthamiana*. Dans les plantes transgéniques, la dégradation de p25 expliquerait l'absence de détection par western-blot. Cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer la faible accumulation de la protéine dans les *A. thaliana* transgéniques l'exprimant de manière constitutive (35S::p25).

Ainsi, le projet d'effectuer une analyse transcriptomique comparative par l'utilisation de plantes induites vs non induites n'a donc pas été poursuivi en raison de l'absence de détection de la protéine.

2.3. Transgénèse de *N. tabacum*

Le phénotype dominant de croissance et de floraison rapide observé sur *A. thaliana* exprimant la protéine p25 nous a semblé intéressant et nous avons cherché à savoir s'il pouvait être transposé à d'autres plantes d'intérêt horticole ou agronomique. Nous avons donc entrepris la transformation d'autres plantes afin d'analyser l'effet de la protéine p25 sur la croissance accélérée des végétaux.

Pour cela, nous avons utilisé la méthode de transformation par callogenèse. Cette méthode consiste à transformer des cellules par l'intermédiaire d'*A. tumefaciens*. Les cellules végétales, totipotentes sont capables de se diviser sous formes de cals et sont sélectionnées grâce à l'utilisation d'antibiotiques. Des plantules sont régénérées à partir des cals suite à l'action d'hormones végétales.

Ainsi, 12 *N. tabacum* 35S::p25, 4 *N. tabacum* pER8::p25 et 2 *N. benthamiana* 35S::p25 ont été obtenues. Aucun transformant *N. benthamiana* pER8::p25 n'a été obtenu.

Nous avons privilégié la recherche directe de la protéine p25 dans les plantes régénérées. Les protéines totales des lignées de *N. tabacum* T0 35S::p25 ont été analysées par western-blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine p25. Si la quantité de protéines totales déposées est équivalente dans chaque puits (**figure II.6.A., panneau du bas**), l'intensité des signaux détectés est variable suggérant des expressions différentes de la protéine p25 (**figure II.6.A., panneau du haut**). Les lignées 10 et 11 expriment faiblement la protéine p25. A l'inverse, la protéine virale s'accumule très fortement dans les lignées 5, 8 et 12. Nous avons choisi d'étudier trois lignées exprimant différemment p25 : nous avons sélectionné les lignées 10, 3 et 8, dans l'ordre croissant de l'expression de p25 pour déterminer s'il existe un lien entre le taux d'expression et les phénotypes observés.

Dans le cas des plantes *N. tabacum* possédant le gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur inductible (pER8::p25), nous avons infiltré les feuilles matures de la génération T0 à l'œstradiol. Aucune expression n'a pu être visualisée par western-blot, quelle que soit la concentration en œstradiol et le moment du prélèvement après infiltration (non montré).

A l'instar des *A. thaliana* pER8::p25, les *N. benthamiana* obtenues n'expriment pas la protéine p25 que ce soit en condition d'expression constitutive ou inductible. Nous n'avons donc pas poursuivi l'étude de ces plantes.

Des graines de *N. tabacum* provenant des générations T0 des plantes exprimant la protéine p25 ont été récoltées et ont servi à produire des plantes de génération T1 que nous avons utilisées pour la suite de nos expériences. Toutefois, les plantes T0 n'étant pas homozygotes, la ségrégation du transgène n'est pas homogène dans la descendance T1. Nous avons sélectionné les plantules pour leur résistance à l'antibiotique et recherché la présence du transgène puis l'expression de la protéine virale pour chaque plante T1 obtenue, ceci dans le but d'éviter un délai supplémentaire lié à l'obtention de la génération T2. Ainsi, 26 plantes résistantes à la kanamycine issues des graines T0 des plantes *N. tabacum* 3, 8 et 10 ont été repiquées sur un nouveau milieu après 21 jours de croissance. Un morceau de feuille a été prélevé sur chaque plante afin de réaliser un génotypage par PCR et la recherche de la protéine p25 par western-blot (non montré). L'ensemble des plantes positives en PCR présente des expressions de protéine p25 variables. Dans le cas de la lignée 10, aucune expression de la protéine p25 n'est détectée malgré la forte amplification du transgène par PCR. Un tel résultat peut s'expliquer soit par l'absence de transcription du transgène, soit par l'extinction post-transcriptionnelle des messagers codant pour p25. Les lignées 8 et 3 permettent l'expression de la protéine p25 à des taux qui semblent corrélés à la quantité d'amplicons obtenus lors du génotypage.

Nous avons repiqué en terre 10 plantes de chaque lignée (10, 3 et 8) dans le but de visualiser leur vitesse de croissance que nous avons cherché à corréler avec la quantité de protéine p25 exprimée. Lors de la mise en terre, une observation du phénotype racinaire n'a pas permis de distinguer des différences phénotypiques entre les trois lignées (non montré). Nous avons mesuré la taille des tiges, de la base au méristème apical, 50 jours après repiquage en terre. Les dix plantes ont été analysées, et les deux mesures extrêmes ont été éliminées. Les moyennes et les écart-types des valeurs obtenues sont représentés sur la **figure II.6.B.** La lignée 10 présente une taille moyenne de 26 cm, proche de celle de la lignée 3 à 24,75 cm. Les plantes de la lignée 8 ont une taille moyenne plus faible, avec seulement 18,6 cm. Ces résultats indiquent que chez *N. tabacum* la protéine p25 induit un retard de croissance proportionnel à son taux d'expression.

Pour analyser les 4 lignées pER8::p25, nous avons procédé à une croissance et une induction des plantes *in vitro*. Pour cela, les graines ont été déposées sur un milieu contenant ou non de l'œstradiol

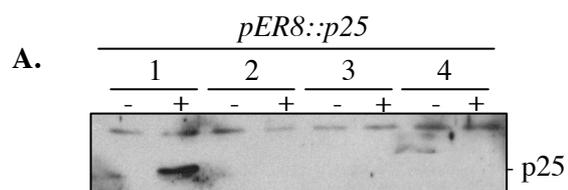


Figure II.7. : Analyse des lignées de *N. tabacum* transformées par le vecteur binaire *pER8::p25*. **A. Analyse par western-blot des protéines extraites des feuilles des plantes *pER8::p25* induites ou non à l'œstradiol. La bande du haut correspond à un signal aspécifique, et permet de quantifier les protéines totales déposées. **B.** Photographie des *N. tabacum pER8::p25* ayant germé et poussé 21 jours sur milieu gélosé contenant (droite) ou non (gauche) 10 μ M d'œstradiol.**

(10 μ M). Après 21 jours de croissance, des plantules ont été transférées sur un nouveau milieu pour réaliser des mesures d'élongation racinaire. Des fragments de feuilles ont été prélevés pour rechercher l'expression de la protéine p25 par western-blot. Les résultats obtenus sont résumés sur la **figure II.7.** Seule la lignée 1 est capable d'exprimer la protéine p25 après induction (**figure II.7.A.**). Nous avons comparé le phénotype de croissance et de branchement racinaire entre les plantules de la lignée 1 induites et non induites (**figure II.7.B.**). Aucune différence n'a pu être observée entre les deux conditions, ce qui suggère que l'action de la protéine p25 chez *N. tabacum* est différente de celle observée chez *A. thaliana*.

2.4. Analyse par ChIP des propriétés d'activation de la transcription de la protéine p25

Pour rechercher si la protéine p25 se comporte comme un activateur direct de la transcription (capable de reconnaître des séquences promotrices) et identifier la, ou les, séquence(s) spécifique(s) reconnue(s) par la protéine, nous avons analysé la capacité de fixation de la protéine directement sur l'ADN *in vivo*. Pour cela, nous avons effectué une analyse par ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) (**figure II.8.**). Le principe de la technique est de fixer les tissus à l'aide du formaldéhyde afin de créer des liaisons covalentes entre les partenaires interagissant et en particulier entre l'ADN et les protéines. Ainsi, une protéine facteur de transcription peut se retrouver fixée covalamment à l'ADN. Après extraction du matériel nucléaire, l'ADN est fragmenté par sonication. Les protéines sont ensuite immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps spécifique, entraînant avec elles les fragments d'ADN associés. Les protéines sont alors éliminées par traitement à la protéinase K, et l'ADN est cloné et analysé.

Des plantes *B. macrocarpa* ont été infectées par les ARN-1 et -2, additionnés de l'ARN-3 ou de l'ARN-3 HA25 (123HA25). L'ARN-3 HA25 permet l'expression de la protéine p25 étiquetée par l'antigène HA, ce qui permet sa précipitation avec un anticorps monoclonal dirigé contre l'étiquette. Comme témoins de l'expérience, nous avons utilisé du matériel infecté par 123HA25 mais non immunoprécipité, et du matériel infecté par les ARN-1, -2 et -3 soumis aux mêmes traitements que 123HA25. Après immunoprécipitation et purification de l'ADN, celui-ci a été soumis à un traitement à l'ADN polymérase (fragment de Klenow) pour reconstituer des extrémités franches. Les fragments ont été clonés dans le vecteur BSM digéré par l'endonucléase *Sma*I, qui permet également l'obtention d'extrémités franches. La transformation de bactéries par ces plasmides recombinants a permis d'obtenir des colonies, dont la séquence plasmidique a été analysée. La majorité des clones obtenus renferment des séquences correspondant aux espèces *Schistosoma japonicum*, *Salvelinus alpinus* et

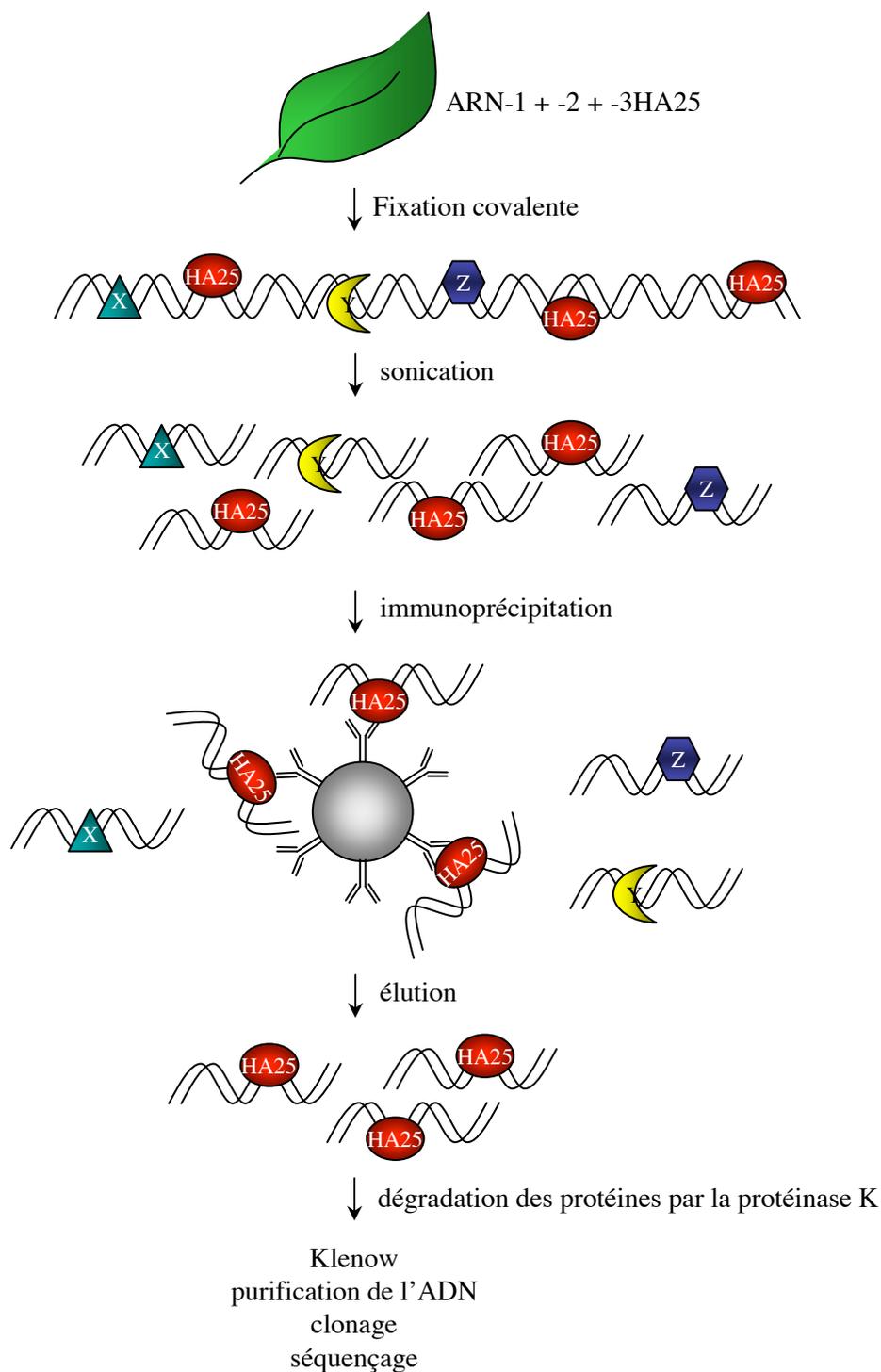


Figure II.8. : Principe du ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation). Les feuilles infectées par les ARN-1, -2 et -3HA25 sont fixées au formaldéhyde. Le matériel nucléaire est extrait puis soniqué afin de fragmenter l'ADN. L'étape d'immunoprécipitation permet de retenir spécifiquement les complexes ADN-HA25 sur les billes d'agarose couplées aux anticorps anti-HA. L'élution permet de récupérer les complexes composés de la protéine d'intérêt et de l'ADN associé. Après dégradation des protéines à la protéinase K, l'ADN est purifié, cloné et séquencé. X, Y et Z représentent d'autres protéines liées à l'ADN chromatinien.

Ralstonia solanacearum, provenant vraisemblablement de l'ADN de sperme de saumon ayant servi à saturer les billes d'agarose. Aucune séquence provenant d'un organisme végétal n'a pu être clonée. Ces résultats pourraient indiquer que l'activation de la transcription de la p25 n'est pas directe. Cependant, il est également possible que l'expérience réalisée n'ait pas fonctionné comme attendu, puisque le protocole utilisé est adapté pour *A. thaliana*, mais pas pour *B. macrocarpa*.

III. Discussion et conclusions

3.1. La protéine p25 entraîne des dérégulations du transcriptome et de la balance hormonale

L'incidence de l'expression de la protéine p25 sur la mise en place de la symptomatologie n'est pas comprise d'un point de vue moléculaire. Certaines fonctions ont été mises en évidence dans des systèmes hétérologues (activation de la transcription, multimérisation...) mais ils n'ont pas encore pu être corrélés aux rôles de la protéine dans la cellule hôte.

Une transgénèse de *B. vulgaris* avait été initiée afin de déterminer les effets de p25 en absence d'infection virale, mais aucun transformant n'a été obtenu (Guy Weyens, communication personnelle). Des analyses ont alors été réalisées par la caractérisation de l'expression différentielle des gènes entre des betteraves saines et infectées (Schmidlin *et al.*, 2008). Si de nombreux gènes sont retrouvés dérégulés, ils sont attribués à la présence du virus dans l'organisme mais ne peuvent pas être directement corrélés à l'expression d'une protéine virale en particulier. La transgénèse d'*A. thaliana* par le gène de la protéine p25 conférerait donc un outil pour explorer les conséquences de l'expression de cette protéine dans un organisme modèle.

Le phénotype des *A. thaliana* qui expriment la protéine p25 est particulier : les plantes arborent une croissance plus rapide, et des branchements racinaires plus nombreux. La croissance accélérée pourrait être attribuée au plus grand nombre de racines, qui assureraient un apport nutritif plus efficace. Ces résultats intéressants sur *A. thaliana* nous ont conduits à rechercher s'ils pouvaient être transposés sur d'autres plantes. En effet, une telle croissance accélérée serait économiquement avantageuse pour les horticulteurs, qui pourraient voir leurs cultures atteindre le stade de croissance attendu plus rapidement que les plantes sauvages. Malheureusement, la transgénèse de *N. tabacum* a révélé que le phénotype de croissance rapide n'est pas généralisable et peut être opposé à celui recherché.

L'analyse comparative du transcriptome d'*A. thaliana* exprimant ou pas p25 révèle de profonds changements dont l'extériorisation n'est visible qu'au niveau des racines des plantules. Toutefois, des analyses plus fines ont permis de mettre en lumière des dérégulations hormonales qui pourraient être liées aux dérèglements des gènes cellulaires, ou inversement.

Quoi qu'il en soit, nous avons pu corréler l'expression de p25 à l'augmentation de la teneur en auxine. Cette augmentation du taux d'auxine avait été décrite par Pollini *et al.* en 1990 lors d'analyses comparatives entre betteraves saines et rhizomaniées (Pollini *et al.*, 1990). D'autres pathogènes, comme *Pseudomonas syringae* interfèrent sur la voie de signalisation de l'auxine pour favoriser l'infection (Navarro *et al.*, 2006 ; Padmanabhan *et al.*, 2008). Nos résultats suggèrent qu'une action de

la protéine p25 serait d'induire l'augmentation du taux d'auxine dans la plante pour favoriser l'infection. Une autre fonction de p25 serait de diminuer la signalisation liée au jasmonate, à l'éthylène et à l'acide abscissique. Compte tenu des nombreux "cross-talk" de ces voies de signalisation, nous ne pouvons pas déterminer si ces multiples actions sont liées à une ou plusieurs fonctions de la protéine virale.

3.2. Mode d'action de la protéine p25

Les dérégulations des gènes sont nombreuses, mais aucun élément ne permet de savoir quelle est la chronologie des événements suite à l'expression de la protéine p25. Un seul gène pourrait être induit ou réprimé par p25, menant à la dérégulation en cascade d'autres gènes. Afin de comprendre qui des facteurs des voies hormonales ou des autres gènes sont en premier lieu affectés, nous avons créé des *A. thaliana* transgéniques exprimant la protéine sous contrôle d'un promoteur inductible. Malheureusement, nous n'avons jamais pu détecter l'expression induite de la protéine p25 malgré la détection du messenger, rendant impossible l'étude des gènes précocement dérégulés.

Comment s'effectuent ces dérégulations transcriptomiques ? La protéine p25 interagit-elle avec une ou plusieurs protéines, ou est-elle impliquée dans une activation directe de la transcription ? Les résultats en système levure ont montré que p25 pouvait activer la transcription (Klein *et al.*, 2007). Si la protéine p25 est un activateur direct de la transcription de certains gènes cellulaires, elle pourrait se fixer sur des séquences d'ADN chromatinienne. Nous avons tenté de caractériser ces séquences par immunoprécipitation de la chromatine, mais malheureusement, là encore, nos expériences sont restées vaines car nous n'avons pas co-immunoprécipité de séquences d'ADN végétal. Ces résultats laissent cette hypothèse en suspens.

Des résultats récents ont mis à jour l'existence d'interactions entre la protéine p25 et des protéines de *B. vulgaris* par l'utilisation d'un crible par double-hybride d'une banque d'ADNc issue de *B. vulgaris* Rz2 résistantes à l'infection (Thiel and Varrelmann, 2009). La découverte d'une interaction de la protéine p25 avec des protéines comportant un domaine F-box permet de supposer que la protéine p25 aurait une action sur le protéasome. D'autres protéines comme des extensines, des clathrines, des protéines induites par le stress interagissent également avec p25. De telles interactions protéine-protéine ont été mises en évidence dans des plantes résistantes, et n'indiquent pas si les protéines identifiées ont un rôle dans la mise en place de l'infection ou au contraire dans celle de la résistance.

3.3. Rôle de la protéine p25 dans l'adaptation à l'hôte

La protéine p25 aggrave les symptômes foliaires et provoque la prolifération racinaire. De tels symptômes pourraient être liés à des dérégulations majeures du transcriptome en parallèle de changements hormonaux, conduisant aux dérégulations physiologiques favorables à la réplication virale. La prolifération racinaire n'est pas sans avantages pour le virus puisqu'elle permet l'augmentation du nombre de cellules "hôte" à la réplication virale, mais aussi une meilleure probabilité d'acquisition des particules virales par *P. betae* et donc une transmission optimale. L'accumulation virale en présence de p25 n'est accrue que dans les racines (Tamada *et al.*, 1999). Sur feuille, les quantités d'ARN sont comparables en absence ou en présence de protéine p25. L'aggravation des symptômes sur feuille pourrait correspondre à un dommage collatéral. En effet, le BNYVV reste principalement localisé au niveau racinaire et ne tire aucun bénéfice de son amplification foliaire. Cependant, lorsqu'elles surviennent, les dérégulations cellulaires n'apportent rien au virus dans cet environnement précis.

L'infection mécanique des feuilles de *B. vulgaris* sensibles ou résistantes (*Rz1*, *Rz2*, *Rz1+Rz2*) conduit à l'apparition de lésions locales comparables (David Gilmer, observations personnelles ; Mark Varrelmann, communications personnelles (thèse de doctorat ULP Link, 2004). Ainsi, si les plantes tolérantes arborent une réduction du titre viral dans les racines, celui des feuilles n'est que partiellement affecté, suggérant un mécanisme différent de la réponse hôte-pathogène entre ces deux organes.

Les plantes possèdent des gènes de résistance (R) dont le produit interagit spécifiquement avec le produit d'un gène d'avirulence (Avr) porté par le pathogène pour induire une cascade de signalisation aboutissant à la réaction hypersensible (HR) caractérisée par une incompatibilité à l'infection (pour revue voir Sacristan and Garcia-Arenal, 2008). L'absence d'interaction liée à la modification de R ou d'Avr (mutation ponctuelle, délétion, absence d'expression) conduit à la mise en place d'une réaction compatible au cours de laquelle le pathogène se multiplie. La protéine p25 pourrait-elle être le produit d'un gène Avr ? Un gène Avr code généralement pour une protéine essentielle au cycle biologique du pathogène et est souvent impliquée dans la pathogénicité. Si la protéine p25 est nécessaire à la prolifération racinaire, son absence n'empêche pas la multiplication racinaire du virus qui reste toutefois restreinte. Sur feuille, l'absence de p25 n'affecte en rien la multiplication *sensus stricto* du virus. Les travaux récents d'Acosta-Leal (Acosta-Leal *et al.*, 2010) montrent que les isolats capables de contourner la résistance *Rz1* possèdent une valine en position 67 de la protéine p25 (le premier acide aminé de la tétrade). Les isolats possédant une Ala₆₇ ne sont pas capables d'infecter efficacement les plantes *Rz1*. Une telle observation conforte les analyses effectuées par Koenig *et al.* à l'aide de pseudorecombinants (Koenig *et al.*, 2009). Toutefois, la coinfection d'isolats V₆₇ et A₆₇ induit la rhizomanie, indiquant que la protéine p25 A₆₇ n'est pas un produit d'un gène Avr. Il faut cependant

	Compatibilité à l'infection par le BNYVV	Détection de la protéine p25			
		<i>35S::p25</i>		<i>pER8::p25</i>	
		transitoire	stable	transitoire	stable
<i>A. thaliana</i>	- (+)	ND	+	-	-
<i>N. benthamiana</i>	+	+	-	+	ND
<i>N. tabacum</i>	-	ND	+	ND	+
<i>B. vulgaris</i>	+	+	létal	ND	ND

Tableau II.2. Récapitulatif des compatibilités d'infection au BNYVV des plantes testées, et de la détection de la protéine p25 en expression transitoire ou stable. + : oui ; - : non ; ND : non testé ; létal : provoque la mort de l'hôte. Entre parenthèse : observé de rares fois.

3.4. *A. thaliana* 35S::p25 et l'infection par le BNYVV

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'infection d'*A. thaliana* par le BNYVV avait été testée et avait permis de montrer que seules des plantes exprimant la p25 (lignée B, E, T) étaient capables de répliquer les ARN-1 et -2 du BNYVV au niveau des feuilles inoculées, les plantes Col-0 n'étant pas hôtes de ce virus. Cependant, cette infection n'était pas systématique, difficile à reproduire et restreinte aux feuilles inoculées. Puisque l'ARN-3 du BNYVV est nécessaire au mouvement systémique, nous avons voulu savoir si la présence de l'ARN-3 entier dans la plante pourrait favoriser à la fois l'infection localisée, et la systémie virale. Ainsi, nous avons créé des constructions où l'ARN-3 est cloné en entier dans un vecteur binaire, et où il est privé des séquences 5' et 3' UTR. Les plantes transgéniques obtenues n'exprimaient pas l'ARN entier, ni la protéine p25. L'analyse des constructions binaires après leur agroinfiltration sur feuilles de *N. benthamiana* nous ont conduit aux résultats présentés dans le chapitre III.

Chapitre III

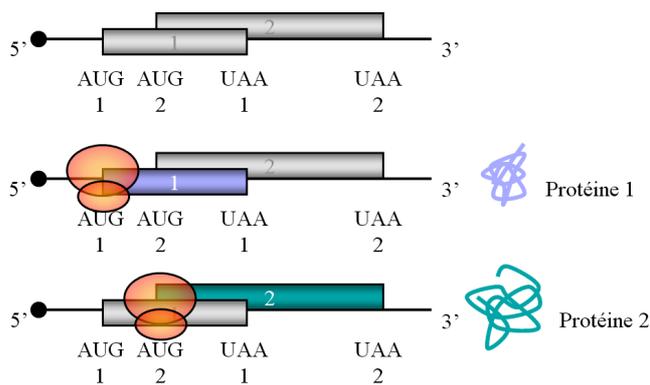
Chapitre III

Etude du mécanisme de production et du rôle de l'ARN-3sub produit à partir de l'ARN-3 du BNYVV

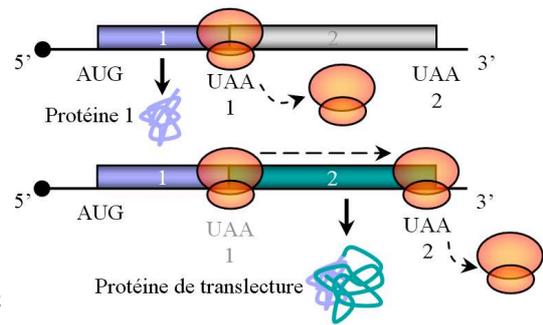
I. Introduction sur les ARN non génomiques viraux

La compaction souvent extrême de l'information génétique des virus rend nécessaire l'adoption de stratégies d'expression qui vont permettre à la fois le bon déroulement du cycle viral mais aussi le contournement de mécanismes de défense cellulaire. Parmi les différentes stratégies virales, nous nous intéresserons plus particulièrement à la production d'ARN subgénomiques qui permettent l'expression d'ORFs (open reading frame ou cadre de lecture ouvert) 3' proximaux ou à celle d'ARN non-codants pouvant interférer avec les mécanismes de défense. Leur grande diversité rend difficile leur classification. Cette introduction va principalement résumer l'état des connaissances sur les ARN viraux non génomiques de virus à ARN de polarité positive, leur mode de production et leurs rôles. Selon les virus, les ARN subgénomiques sont synthétisés par différents mécanismes par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) virale. Nous verrons l'implication des protéines virales ou cellulaires et l'existence d'ARN subgénomiques atypiques : 5' terminaux, polycistroniques, ou exprimant des protéines tronquées. Enfin, nous nous intéresserons à leur rôle dans la recombinaison des ARN viraux. La suite du chapitre sera consacrée à d'autres ARN viraux non génomiques, parfois considérés comme subgénomiques, mais qui sont non-codants et le plus souvent issus de dégradations impliquant des protéines virales ou cellulaires. Les ARN "defective interfering" et les ARN satellites, parfois retrouvés associés aux virus de plantes seront également présentés.

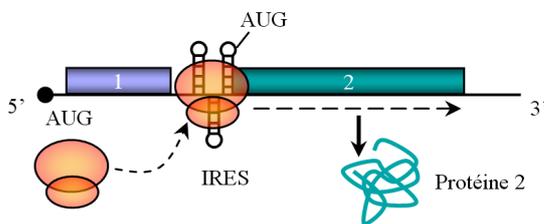
A. Leaky scanning



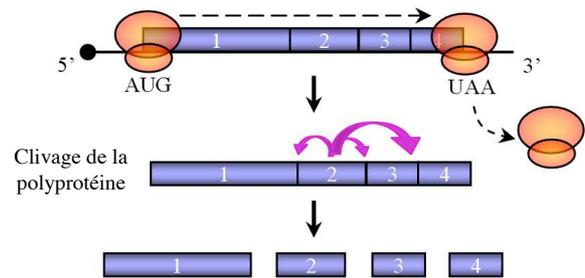
B. Translecture



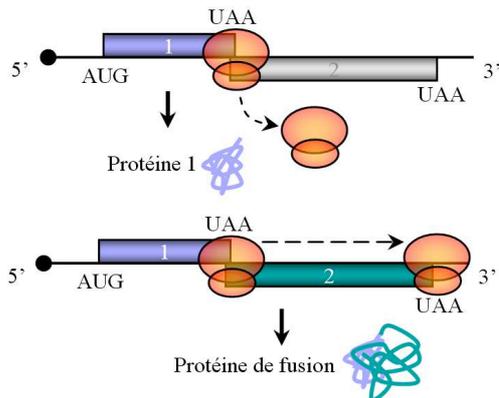
C. Initiation interne de la traduction



D. Polyprotéine



E. Frameshift



F. ARN subgénomique

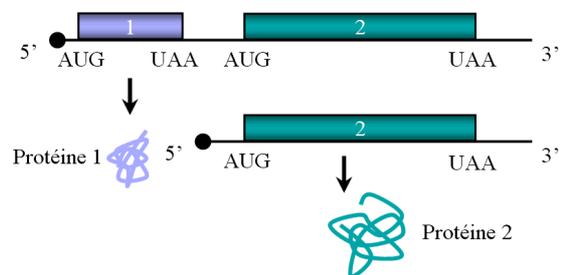


Figure III.1. : Représentation schématique des différents mécanismes utilisés par les virus pour exprimer les cadres de lecture 3' terminaux. **A.** Le leaky scanning. Deux ORF chevauchants peuvent être traduits indépendamment l'un de l'autre. Le ribosome rencontre le premier AUG et synthétise la protéine 1. Le ribosome peut également passer outre le premier AUG, et ne commencer la synthèse qu'au second AUG rencontré pour exprimer la protéine 2. **B.** La translecture. Le premier ORF est traduit par le ribosome jusqu'au premier codon stop rencontré. Suivant l'environnement du codon stop et sa nature, un ARNt suppresseur peut incorporer un acide aminé et permettre à la synthèse de continuer jusqu'au codon stop suivant. **C.** Une IRES (internal ribosome entry site) permet au ribosome de commencer la traduction d'une protéine sans scanner l'ARN messager à partir de la coiffe. **D.** Polyprotéine. Le ribosome traduit l'unique ORF de l'ARN, et la protéine produite subit un clivage cis par la protéase, libérant ainsi l'ensemble des protéines. **E.** Le frameshift. Le ribosome change le cadre de lecture après la synthèse du premier ORF, ce qui lui permet de synthétiser la protéine codée par le deuxième ORF, menant à la production d'une protéine de fusion. **F.** ARN subgénomique. La synthèse d'un ARN plus court, appelé ARN subgénomique, permet de placer l'ORF2 en première place sur l'ARN afin qu'il soit efficacement traduit.

Les deux cercles orange représentent le ribosome. Les rectangles gris correspondent aux ORF non traduits. Les rectangles de couleur représentent les ORF traduits.

1. ARN subgénomiques

1.1. Rôle : expression des ORF 3' terminaux

Si, chez les procaryotes, un seul et même messager permet l'expression de plusieurs ORF, les messagers eucaryotiques sont, dans la plupart des cas, monocistroniques. L'existence de plusieurs ORF sur un ARN génomique viral nécessite des mécanismes particuliers de traduction (initiation interne, leaky scanning, saut du ribosome...) ou la synthèse d'un ARN colinéaire à la partie 3' de l'ARN génomique qui portera l'ORF à exprimer à son extrémité 5', portant alors le nom d'ARN subgénomique.

Les virus à ARN peuvent porter l'information génétique de manière positive (sur un brin directement codant) ou négative (non codant). Un même brin peut le plus souvent porter plusieurs cadres de lecture. En effet, les virus sont de petites entités qui sont souvent limitées dans la taille de leur génome par la taille de leur capsid, et nécessitent une condensation de leur organisation génomique. Il est courant d'observer plusieurs cadres de lectures sur un même brin, à l'instar du TMV (*Tobacco mosaic virus*) qui ne contient qu'un seul ARN, mais code au moins pour 4 protéines. De même, le génome du BNYVV comporte 4 à 5 ARN selon les isolats, mais code pour au moins 9 protéines différentes. Pourtant, chez les eucaryotes, seul le premier cistron est efficacement traduit par le ribosome, puisque le mécanisme de scanning de l'ARN s'arrête au premier codon AUG rencontré à partir de la coiffe de l'extrémité 5' (Kozak, 1989). Les virus utilisent diverses stratégies (leaky scanning, translecture, initiation interne, frameshift, polyprotéines, voir **figure III.1.**) pour pallier ce problème, et parmi celles-ci se place la synthèse d'ARN subgénomiques. Les ARN subgénomiques sont en général des ARN colinéaires aux extrémités 3' des ARN viraux, et sont néosynthétisés par la réplicase virale à partir des ARN antigénomiques. Ils sont redondants avec les ARN génomiques. Leur rôle est de placer les cistrons, qui ne peuvent pas être directement traduits à partir de l'ARN génomique, en position 5' proximale. Ainsi, le système de traduction pourra être efficace sur ces ORF et permettra la synthèse de protéines.

Généralement, les premières protéines exprimées par le génome viral sont celles impliquées dans la réplication virale, permettant la multiplication du génome, et la production des ARN subgénomiques. Suivent alors les protéines de mouvement et les protéines structurales, qui permettront la propagation du virus dans l'hôte et sa transmission.

1.1.1. Mécanismes de traduction

Les ARN subgénomiques ont pour fonction principale d'exprimer des protéines. Or, le mécanisme de traduction des organismes eucaryotes nécessite une coiffe en 5' de l'ARN messager. Habituellement,

la coiffe est ajoutée aux ARN messagers transcrits par l'ARN polymérase II cellulaire, en trois étapes (Schoenberg and Maquat, 2009) : 1) le domaine N-terminal de la triphosphatase hydrolyse le 5' triphosphate de l'ARNm en formation en diphosphate, 2) un GMP fixé covalamment à la guanylyltransférase est ajouté au diphosphate par un pont 5'5' triphosphate, et enfin 3) la guanine-7-méthyltransférase permet la méthylation du GMP.

Les virus à ARN positif à répllication cytoplasmique n'ont pas accès à ce mécanisme nucléaire puisqu'ils sont synthétisés par la répllication virale. Les ARN génomiques et subgénomiques doivent cependant être efficacement traduits et les virus ont développé diverses stratégies pour y parvenir.

Si un mécanisme de "capping" similaire a récemment été découvert dans le cytoplasme, l'activité méthyltransférase n'a pas pu être mise en évidence et le rôle de ce capping cytoplasmique n'est pas encore élucidé (Otsuka *et al.*, 2009).

a) Traduction coiffe-dépendante

L'existence d'une coiffe en 5' d'ARN subgénomiques a été démontrée pour beaucoup de virus, comme par exemple les ARN-4 et ARN-4A du BMV (*Brome mosaic virus*) (Ahlquist, 1992 ; Blanchard *et al.*, 1996) ou le SINV (*Sindbis virus*) (Mi *et al.*, 1989). En revanche, l'ARN-5 du CMV (*Cucumber mosaic virus*), colinéaire à l'extrémité de l'ARN-3 n'est pas coiffé, mais le fait qu'il soit réellement un ARN subgénomique reste encore discuté (de Wispelaere and Rao, 2009). Toutefois, les ARN antigénomiques pourtant synthétisés par les mêmes répllication ne sont pas coiffés et sont non-codants. Ceci suggère que ces enzymes utilisent des mécanismes de transcription différents lors de la synthèse des brins (-) et des brins (+).

Comment ces coiffes sont-elles ajoutées aux ARN viraux qui ne sont pas transcrits par l'ARN polymérase II ? Il a été montré que chez de nombreux virus, les répllication virales possèdent des activités similaires aux protéines cellulaires impliquées dans la synthèse de la coiffe. En effet, les analyses bioinformatiques révèlent l'existence de domaines MET souvent localisés dans les parties N-terminales des RdRp de virus à génome ARN positif coiffé (Koonin, 1991). Même si le mécanisme complet n'a pas été clairement démontré, il est tentant de penser que ces protéines virales sont réellement capables d'ajouter la coiffe aux extrémités 5' des ARN viraux codants.

Chez le SINV, la protéine nsP1 porte un domaine guanine-7-méthyltransférase, capable de former une liaison covalente avec un m⁷GMP, à l'instar de la guanylyltransférase nucléaire (Aholu and Ahlquist, 1999 ; Kong *et al.*, 1999). Le BMV est également muni de cette activité, suggérant que ces deux virus peuvent eux-mêmes apporter les coiffes à leurs ARN messagers (génomiques ou subgénomiques).

Dans le cas des coronavirus, les protéines nsP13 et nsP16 portent respectivement l'activité RNA 5'-triphosphatase, et l'activité 2'-O-méthyltransférase (Masters, 2006).

La protéine L du VSV (*Vesicular stomatitis virus*), responsable du capping des ARN viraux, peut également produire des ARN portant une guanosine(5')tétraphospho(5')adénosine (GppppA) qui peuvent être efficacement traduits (Ogino and Banerjee, 2008).

b) Traduction coiffe-indépendante

Certains virus ne possèdent pas de coiffe en 5' de leurs ARN génomiques. Ils utilisent d'autres stratégies d'expression. Dans le cas du tombusvirus TBSV (*Tomato bushy stunt virus*), la traduction s'effectue de manière coiffe-indépendante et implique une séquence située en 3' de l'ARN messenger nommé 3'CITE (3' cap-independent translational enhancer), qui permet la circularisation des messagers et le recrutement du complexe de traduction (White and Nagy, 2004).

De la même manière, le BYDV (*Barley yellow dwarf virus*) utilise une traduction coiffe-indépendante grâce à la région BTE (BYDV cap-independent translation element) située en 3' de l'ARN génomique (Shen *et al.*, 2006). Pour recruter les ribosomes, cette séquence interagit avec la région BCL (BTE complementary loop) en 5'UTR des ARN génomiques et des ARN subgénomiques -1 et -2 pour former une boucle.

Certains virus, à l'image des Caliciviridae et des Potyviridae, codent pour une protéine VPg liée de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ARN génomique. La protéine VPg aurait un rôle dans l'expression des gènes viraux, en recrutant les facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et eIFiso4E (Goodfellow *et al.*, 2005 ; Khan *et al.*, 2008).

Quel que soit leur mode de traduction, les ARN subgénomiques utilisent, à ma connaissance, le même type de traduction que l'ARN génomique dont ils sont issus. Les virus à ARN génomiques coiffés vont exprimer des ARN subgénomiques utilisant, dans la plupart des cas, un mécanisme coiffe-dépendant, alors que les virus à ARN génomiques privés de coiffe vont utiliser un mécanisme coiffe-indépendant pour assurer l'expression des ARN subgénomiques.

1.1.2. Encapsidation des ARN subgénomiques

Les ARN génomiques contiennent l'intégralité de l'information nécessaire au cycle viral, il est donc imaginable que ce soient les seuls ARN produits par le virus à être encapsidés. Pourtant, certains ARN subgénomiques, portant une information redondante des ARN génomiques, peuvent être encapsidés. C'est le cas de l'ARN subgénomique I2 du TMV et des ARN subgénomiques de certains coronavirus (TGEV, *Transmissible gastroenteritis virus* ou le IBV, *Infectious bronchitis virus*) mais pas du MHV (*Mouse hepatitis virus*) où seul l'ARN génomique est encapsidé (Masters, 2006). Les CMV de groupe II sont aussi capables d'encapsider les ARN subgénomiques (de Wispelaere and Rao, 2009). Cela suggère que les sites d'encapsidation sont situés dans la partie 3' commune aux ARN

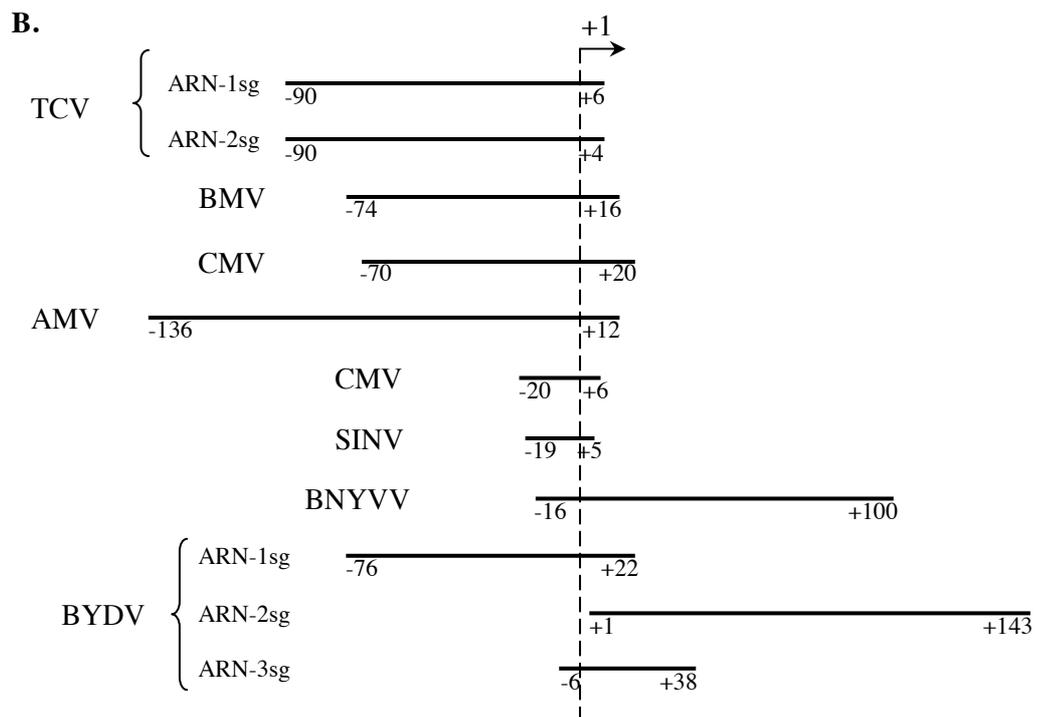
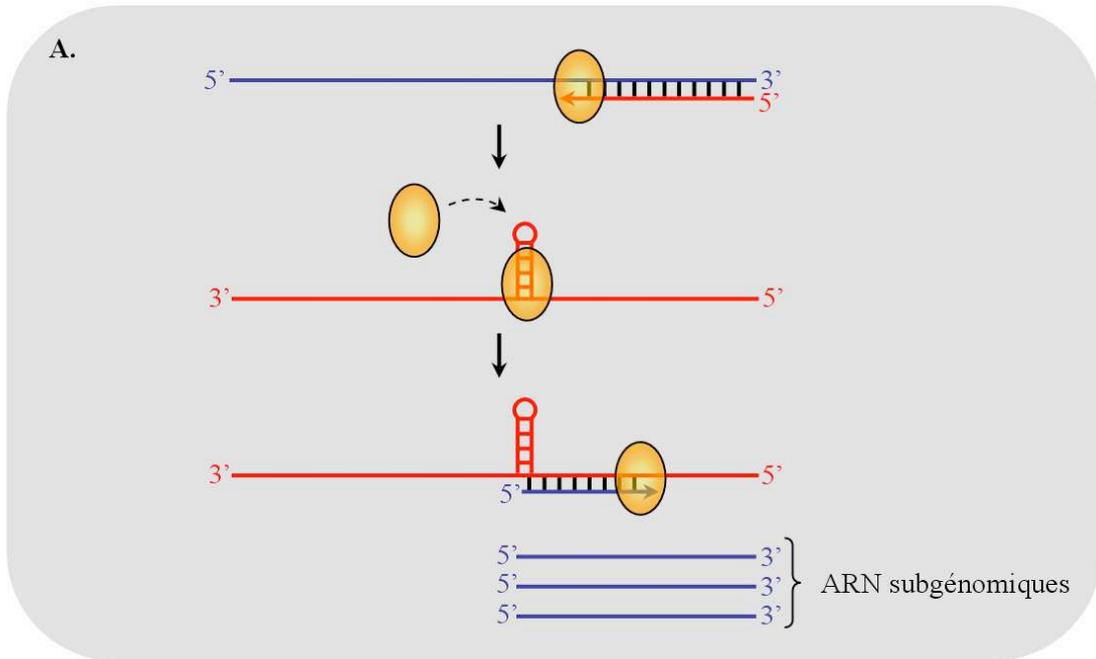


Figure III.2. : Représentation schématique du mécanisme d'initiation interne de la transcription. **A.** Les brins positifs sont représentés en bleu, et les brin négatifs en rouge. La sphère jaune correspond à la RdRp. La répliquase virale synthétise le brin (-) à partir de l'ARN génomique, puis elle se fixe sur un promoteur interne situé sur l'ARN viral antigénomique, qui servira de matrice à la synthèse de l'ARN subgénomique. **B.** Représentation schématique des promoteurs d'ARN subgénomiques (par Miller and Koev, 2000). Les traits gras correspondent aux séquences promotrices identifiées de part et d'autre du site +1 de transcription, représenté par la ligne pointillée.

génomiques et subgénomiques. L'encapsidation des ARN subgénomiques permettrait la synthèse plus rapide des protéines virales lors de l'infection initiale.

1.1.3. Similitudes des extrémités 5'

Les ARN génomiques et subgénomiques partagent parfois des homologies de séquence en 5'. Ainsi, les carmovirus comme le TCV (*Turnip crinkle virus*), le CarMV (*Carnation mottle virus*) et le CCFV (*Cardamine chlorotic fleck virus*) possèdent quatre nts conservés en 5' des ARN génomiques et subgénomiques : GGUA/U (Wang and Simon, 1997). De même, des conservations de séquences en 5' des ARN génomiques et subgénomiques ont été rapportées pour le CLBV (*Citrus leaf blotch virus*) (Vives *et al.*, 2002), le BMV (Marsh and Hall, 1987), le CMV (Boccard and Baulcombe, 1993), l'AIMV (*Alfalfa mosaic virus*) (van der Kuyl *et al.*, 1990), le RCNMV (*Red clover necrotic mosaic virus*) (Zavriev *et al.*, 1996), le MCMV (*Maize chlorotic mottle virus*) (Lommel *et al.*, 1991) et le MBV (*Mushroom bacilliform virus*) (Revill *et al.*, 1999).

1.2. Mécanismes de synthèse des ARN subgénomiques

Trois modèles de synthèse d'ARN subgénomique sont proposés à ce jour : 1) l'initiation interne de la transcription, 2) la terminaison prématurée de la transcription, et enfin 3) la synthèse discontinue de matrice, une variante entre ces deux modèles (pour revue voir Miller and Koev, 2000). Ces trois modèles requièrent la présence d'un brin antigénomique (complet ou non) qui sera utilisé comme matrice, ainsi que la réplicase virale pour effectuer la transcription.

1.2.1. Initiation interne de la transcription

Ce mécanisme est le plus fréquemment retrouvé chez les virus. Il implique la présence d'un promoteur de transcription reconnu par la réplicase sur le brin antigénomique viral, en amont d'une ORF. La réplicase virale peut alors transcrire le brin complémentaire, positif, qui sera identique à la partie 3' de l'ARN génomique (**figure III.2.A.**). Ce mécanisme a été démontré pour la première fois pour le BMV (Miller *et al.*, 1985) et, par la suite, pour de nombreux autres virus.

De nombreux promoteurs d'ARN subgénomiques ont pu être caractérisés mais aucune homologie de séquence entre ces promoteurs n'a pu être retrouvée, suggérant l'existence de mécanismes de reconnaissance distincts par la réplicase et/ou par des protéines cellulaires.

La majorité des promoteurs décrits sont des séquences nucléotidiques de 24 à plus de 100 nts de long, situées plutôt en amont du site d'initiation (+1) de transcription de l'ARN subgénomique, à l'image du TCV (Wang and Simon, 1997), du BMV (Haasnoot *et al.*, 2000), du CMV (Boccard and Baulcombe, 1993), de l'AIMV (van der Vossen *et al.*, 1995), du CNV (*Cucumber necrosis virus*) (Johnston and

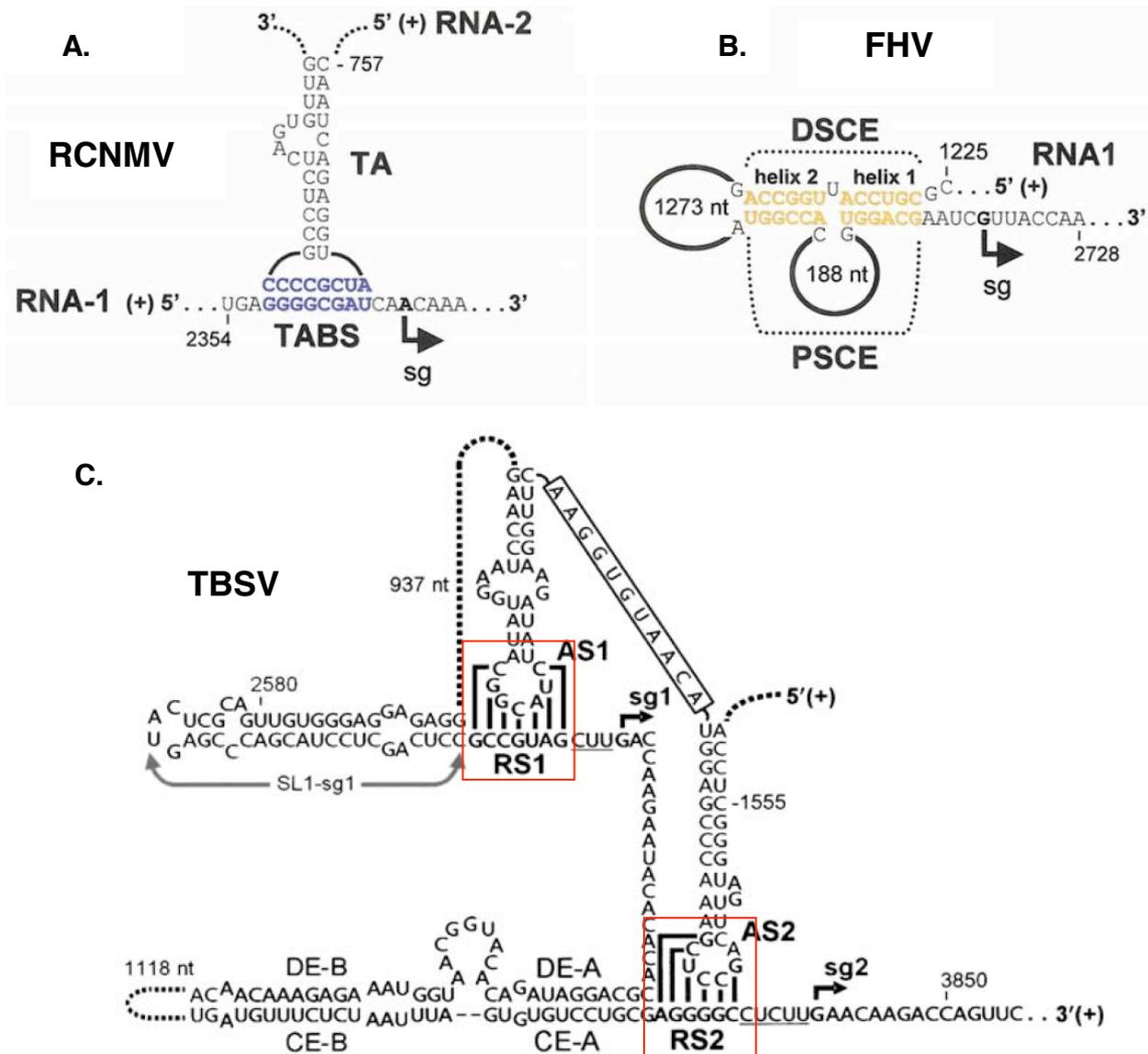


Figure III.3. : Représentation schématique des interactions ARN-ARN requises pour la synthèse des ARN subgénomiques par le mécanisme de terminaison prématurée de la transcription pour les virus RCNMV, FHV et TBSV (adapté de White, 2002). Les interactions essentielles pour la synthèse des ARN subgénomiques sont indiquées en couleur et par leurs noms. Le RCNMV (A) nécessite l'interaction de deux ARN génomiques au site TABS (*trans*-activation binding site), alors que le FHV (B) et le TBSV (C) effectuent des *cis*-activations, par l'interaction de deux séquences du même ARN. Le FHV utilise les sites DSCE (distal subgenomic control element) et PSCE (proximal subgenomic control element) pour la synthèse de son ARN subgénomique. Le TBSV utilise les sites AS1 (activator sequence 1) et RS1 (receptor sequence 1) pour la synthèse de l'ARN subgénomique 1, et les sites AS2, RS2, DE-A (distal element A) et CE-A (core element A) pour la synthèse de l'ARN subgénomique 2.

Rochon, 1995). En revanche, d'autres ont été localisés davantage en aval du +1 comme dans le cas de l'ARN-3sub du BNYVV (Balmori *et al.*, 1993).

Etonnamment, un virus peut posséder des promoteurs différents pour chaque ARN subgénomique. Ainsi, le BYDV possède des promoteurs distincts pour chacun de ses trois ARN subgénomiques (**figure III.2.B.**) (Koev and Miller, 2000). Le promoteur de l'ARN subgénomique 1 est une séquence de 98 nts localisée principalement en amont du site +1 de transcription alors que les promoteurs des ARN subgénomiques -2 et -3 sont plutôt localisés en aval du +1 et sont respectivement constitués de 143 nts et de 44 nts. Même si ces promoteurs renferment tous des structures secondaires en tige-boucle, leurs séquences sont différentes. Les seules homologues de séquence entre les promoteurs des ARN subgénomiques 1 et 2 sont un hexanucléotide GUGAAG situé en 5' des ARN subgénomiques. Cette absence d'homologie suggère que les régulations se font différemment et impliquent des facteurs favorisant l'expression fine et temporelle des protéines virales durant le cycle de multiplication du virus.

1.2.2. Terminaison prématurée de la transcription

Ce deuxième mécanisme utilise un arrêt prématuré de la transcription du brin négatif à partir du brin génomique. Ceci conduit à la synthèse d'un ARN antigénomique incomplet. Cet intermédiaire peut alors servir de matrice pour la transcription d'un brin positif, plus court que l'ARN génomique car privé d'une partie 5', et dont la séquence contient au moins une ORF à traduire. Le RCNMV utilise ce mécanisme pour la synthèse de ses ARN subgénomiques (Sit *et al.*, 1998 ; White, 2002). Le modèle proposé pour expliquer la terminaison prématurée de la transcription du brin (-) de l'ARN-1 implique le rôle transactivateur de l'ARN-2 (Sit *et al.*, 1998). La formation d'une structure par complémentarité de séquence entre l'ARN-2 et l'ARN-1 permettrait l'arrêt prématuré de la transcription du brin (-), et favoriserait alors la synthèse de l'ARN subgénomique transcrit à partir de cette nouvelle matrice. La conservation de séquence entre le 5' de l'ARN-1 génomique et subgénomique suppose que la réplicase reconnaît cette séquence spécifique pour initier la transcription du subgénomique.

Ces interactions ARN-ARN formeraient une barrière physique à la réplicase, et seraient responsables de la terminaison prématurée de la transcription du brin (-) pour tous les virus utilisant ce mécanisme de synthèse d'ARN subgénomique, que ce soit en *cis* au sein d'un seul ARN pour le FHV (*Flock house virus*) (**figure III.3.B.**) (Zhong and Rueckert, 1993 ; Price *et al.*, 2000) ou le TBSV (**figure III.3.C.**) (Zhang *et al.*, 1999 ; Choi *et al.*, 2001 ; Choi and White, 2002), ou en *trans* par l'interaction de deux ARN différents pour le RCNMV (Sit *et al.*, 1998) (**figure III.3.A.**). Des protéines pourraient intervenir dans la stabilisation des structures impliquées dans les interactions décrites pour le RCNMV (Sit *et al.*, 1998), mais pas dans le cas du TBSV (Wang *et al.*, 2008).

1.2.3. Synthèse discontinue de la matrice

Le troisième mécanisme de synthèse des ARN subgénomiques à avoir été décrit implique une transcription discontinue. A partir du brin génomique, le brin (-) est synthétisé de manière discontinue, et servira de matrice pour la transcription du subgénomique (**figure III.4.**). C'est le cas des Nidovirales comme le MHV ou l'EAV (*Equine arteritis virus*).

Dans le cas du MHV, le mécanisme est bien décrit (Sawicki *et al.*, 2007). Le brin génomique comporte une séquence leader en 5', suivie d'une séquence TRS (transcription-regulating sequence) composée d'un motif d'environ 10 nts riche en AU. Des séquences TRS sont également retrouvées en amont de chaque ORF du virus. Le complexe de réplication se fixe en 3' de l'ARN génomique et synthétise le brin antigénomique (-), jusqu'aux séquences complémentaires TRS, où la réplicase va alors soit outrepasser et continuer la synthèse, soit s'arrêter et se relocaliser sur le TRS situé en 5' du génome. La synthèse du brin (-) peut alors continuer et se finalise par la synthèse de la séquence complémentaire leader située en 5' de l'ARN génomique, nécessaire à l'initiation de la traduction. Le mécanisme de relocalisation du complexe de transcription sur le TRS en 5', et non sur les autres, n'est pas encore élucidé, mais on peut supposer que des facteurs protéiques viraux interviennent dans cet évènement. Des motifs pouvant s'apparier aux séquences TRS sont retrouvés sur le génome mais ne sont pas utilisés comme "promoteur" des ARN subgénomiques. Finalement, la synthèse du brin subgénomique (+) peut s'effectuer, en commençant par la séquence leader, suivie de la séquence TRS. Ainsi, tous les ARN subgénomiques posséderont la même séquence 5', composée du leader et de la séquence TRS, et une partie 3' du génome. Ces ARN subgénomiques pourront également être amplifiés par la réplicase (Sawicki and Sawicki, 1998 ; van Marle *et al.*, 1999a ; Pasternak *et al.*, 2001 ; Sawicki *et al.*, 2007).

1.3. Facteurs impliqués dans la synthèse des ARN subgénomiques

1.3.1 Séquences/structures sur l'ARN

Comme nous l'avons vu précédemment, les ARN portent eux-mêmes des informations nécessaires à la synthèse des ARN subgénomiques. En général, la séquence et la structure jouent des rôles importants pour la synthèse des ARN subgénomiques (Koev *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1999 ; Haasnoot *et al.*, 2000).

a) Séquences

Ainsi, quel que soit le mode de synthèse de l'ARN subgénomique, des séquences nucléotidiques doivent être reconnues comme signal d'initiation ou de terminaison de la transcription.

Ces séquences peuvent être classées en deux groupes : les séquences "core" nécessaires à l'expression basale des ARN subgénomiques, et les séquences impliquées dans l'augmentation de l'expression.

α. Séquences "core"

Les alphavirus, représentés par le SINV, utilisent l'initiation interne de la transcription pour la synthèse de leur ARN subgénomique. Le promoteur de l'ARN subgénomique du SINV est constitué d'une séquence localisée entre les positions -19 à +5 par rapport au site d'initiation +1 de la transcription (Levis *et al.*, 1990). Ce promoteur comporte des homologies de séquence avec le promoteur du BMV. La séquence core du promoteur de l'ARN subgénomique du BMV est constituée d'une séquence de 20 nts localisée en amont du site d'initiation. Cette séquence est suffisante pour initier la transcription. Quatre nts sont absolument indispensables au promoteur : ils sont positionnés en -17, -14, -13 et -11 par rapport au site d'initiation +1 (Siegel *et al.*, 1997). Ces nts sont strictement conservés chez l'ensemble des virus de la superfamille des alphavirus, qui possèdent une pyrimidine au site initiateur (U chez les virus animaux et C/U chez les phytovirus), ainsi qu'un A en position +2 (Siegel *et al.*, 1997).

Dans le cas du BYV (*Beet yellows virus*), sept ARN subgénomiques sont décrits. L'étude des séquences au voisinage du site +1 d'initiation de la transcription a révélé l'existence de deux types de motifs de 34 et 14 nts. Ces motifs pourraient agir de manière indépendante et permettraient de réguler le taux de synthèse de chaque ARN subgénomique (Vitushkina *et al.*, 2007).

β. Séquences régulatrices

Les séquences impliquées dans l'augmentation de l'efficacité du promoteur de la synthèse des ARN subgénomiques du BMV sont situées en amont du promoteur "core", et constituées de répétitions AU retrouvées de -54 à -40 du site d'initiation +1 de la transcription. L'insertion de séquences AU supplémentaires augmente l'efficacité de production du subgénomique *in vivo* (Sullivan and Ahlquist, 1997). De plus, la séquence polyA située entre -40 et -20 est également responsable de l'augmentation de l'efficacité de la transcription de l'ARN subgénomique du BMV.

Dans le cas du TBSV, le remplacement du G initiateur en position +1 par n'importe quel autre nt induit une diminution de l'accumulation de l'ARN subgénomique de plus de 20 fois (Choi *et al.*, 2001 ; Choi and White, 2002).

Chez les coronaviridae, les motifs régulateurs de la synthèse des ARN subgénomiques sont présents à des positions précises au sein des séquences TRS (Pasternak *et al.*, 2001). En effet, si l'introduction de mutations dans une séquence TRS régulant la synthèse de l'ARN subgénomique 7 du EAV peut en abolir la synthèse, l'introduction de mutations compensatoires dans la TRS 5' ne suffit pas forcément à restaurer l'efficacité de synthèse du subgénomique correspondant (Pasternak *et al.*, 2001). Comme

indiqué précédemment (paragraphe 1.2.3.), des protéines virales sont certainement requises pour optimiser la sélection des TRS.

b) Structures

Des tiges-boucles sont très souvent nécessaires à la production des ARN subgénomiques par initiation de la transcription comme cela a été décrit pour le BYDV (Koev *et al.*, 1999), l'AIMV (Haasnoot *et al.*, 2000) et le TCV (Wang *et al.*, 1999). Le BMV contient également une tige-boucle dans le promoteur de l'ARN subgénomique, dont la séquence est importante pour sa reconnaissance par la RdRp (Adkins *et al.*, 1997 ; Siegel *et al.*, 1997). Le CMV contient quant à lui une tige-boucle composée de 9 paires de bases et d'une boucle de 6 nts riche en purines. L'introduction de mutations conservant la structure secondaire n'engendre pas de réduction drastique de la synthèse d'ARN subgénomique, suggérant un mécanisme différent de reconnaissance de la tige-boucle entre le BMV et le CMV, pourtant très proches (Chen *et al.*, 2000).

Il est intéressant de noter que pour la synthèse de l'ARN subgénomique 1 du BYDV, le promoteur comporte deux tiges-boucles. Pour l'une des deux, la séquence est essentielle alors que sa structure ne l'est pas, et pour la deuxième, seule la structure secondaire est primordiale et la séquence peut être modifiée (Koev *et al.*, 1999). Chez le CTLV (*Citrus tatter leaf virus*), on retrouve également deux tiges-boucles au voisinage du +1 de transcription. Ces deux tiges-boucles renferment une séquence de 8 nts conservés (Tatineni *et al.*, 2009).

Comme nous l'avons vu précédemment aux paragraphes 1.2.2. et 1.2.3., d'autres appariements à longue distance (en *cis* et en *trans*) sont parfois nécessaires à la synthèse des ARN subgénomiques.

1.3.2. Protéines virales et cellulaires

Si l'ARN viral porte les informations nécessaires en *cis* à la synthèse d'ARN subgénomiques (séquence et/ ou structure), des facteurs protéiques sont toutefois requis pour leur reconnaissance et l'initiation de la transcription. Parmi ceux-ci on retrouve la RdRp, mais également d'autres protéines virales ou facteurs cellulaires.

a) ARN polymérase ARN dépendante

α. Structure

Les RdRp sont les protéines virales qui portent l'activité de néosynthèse des ARN viraux à partir d'une matrice ARN. Elles sont responsables à la fois de la réplication du génome viral, et de la production des ARN subgénomiques. Les RdRp sont les protéines virales les plus conservées car elles ont une activité essentielle à la réplication de tous les virus à ARN. Plusieurs RdRp ont été cristallisées

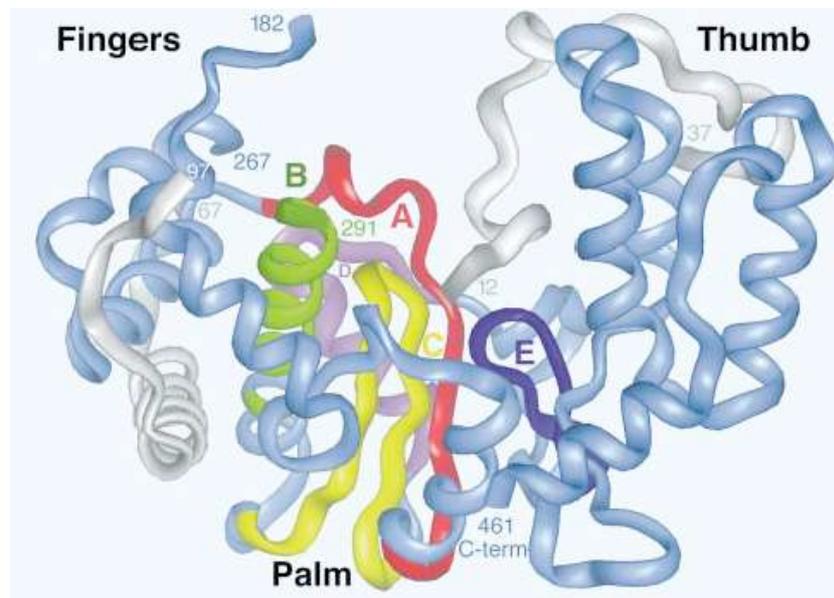


Figure III.5. : Structures des RdRp virales (Hansen *et al.*, 1997). Structure en forme de main-droite de la RdRp du poliovirus. Les trois domaines conservés sont indiqués : les doigts (fingers), la paume (palm), le pouce (thumb). Les lettres (A-E) indiquent les différents motifs du domaine « paume », et sont visibles grâce au code couleur.

et leurs structures désormais résolues présentent beaucoup d'homologies entre elles (HCV, *Hepatitis C virus* (Bressanelli *et al.*, 1999), BVDV, *Bovine viral diarrhea virus* (Choi *et al.*, 2004), poliovirus (Hansen *et al.*, 1997)). Les RdRp possèdent en général une structure conservée en forme de "main-droite" composée de 3 régions distinctes : les doigts, la paume (catalytique) et le pouce (Ferrer-Orta *et al.*, 2006) (**figure III.5.**). Contrairement aux autres polymérases qui ont une structure en forme de main ouverte ou en forme de U, les RdRp virales présentent une structure fermée, où les doigts rejoignent le pouce (Ferrer-Orta *et al.*, 2006). Cette structure close forme un tunnel où la matrice est chargée.

La paume est la région la plus conservée car elle correspond au domaine purement catalytique, composé d'un feuillet beta à 3 brins antiparallèles, flanqués par 3 hélices alpha (Ferrer-Orta *et al.*, 2006). Le domaine catalytique se divise en 5 motifs conservés nommés A, B, C, D, et E et retrouvés dans cet ordre précis chez de nombreux virus (BNYVV, TMV...) (Poch *et al.*, 1989). Il a été montré récemment que certains virus ont des inversions de ces motifs, à l'image du GVQ (*Grapevine virus Q*) où l'ordre est le suivant : C, A, B (Sabanadzovic *et al.*, 2009). Le dernier motif E est quant à lui spécifique des polymérases ARN-dépendantes, et est absent chez les polymérases ADN-dépendantes. Deux résidus acide aspartique présents dans les motifs A et C sont impliqués dans la formation des liaisons phosphodiester par un mécanisme faisant intervenir des cations (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) (Ng *et al.*, 2008). Quant au motif B, il est impliqué dans la sélection des NTP (Hansen *et al.*, 1997).

Le domaine "pouce" est composé de la partie C-terminale de la protéine, partie la plus variable des RdRp. Elle forme un sillon qui mène vers le centre catalytique de l'enzyme.

β. Initiation de la transcription

L'initiation de la synthèse d'ARN de manière ARN-dépendante peut se faire de deux façons : amorce-dépendante ou *de novo* (sans amorce) (van Dijk *et al.*, 2004).

L'initiation amorce-dépendante peut se faire par le biais de plusieurs amorces : 1) des séquences 5' de divers ARN cellulaires coiffés et clivés, 2) de courts oligoribonucléotides résultants d'initiations abortives, 3) des extrémités 3' du brin matrice s'hybridant à son propre brin, ou 4) des protéines permettant une liaison phosphodiester avec le premier nt (van Dijk *et al.*, 2004).

La synthèse des ARN subgénomiques se fait en général par une initiation *de novo*, ce qui requiert au moins 4 interactants : la RdRp, la matrice, un nucléoside tri-phosphate initiateur, et le deuxième NTP (van Dijk *et al.*, 2004). Cette initiation permet de ne perdre aucune information génétique. Elle ne nécessite pas l'utilisation d'enzymes qui génèrent l'amorce ou doivent cliver l'amorce du brin synthétisé (van Dijk *et al.*, 2004). La synthèse *de novo* peut conduire à des initiations abortives où de courts oligonucléotides sont relâchés.

γ. Découplage réplication/transcription

Un certain nombre d'études permettent d'envisager que la synthèse d'ARN génomique et celle d'ARN subgénomique utilisent deux mécanismes distincts.

Pour le TBSV, la transcription a pu être découplée de la réplication. En effet, une délétion jusqu'à 5 acides aminés en C-terminal de la RdRp diminue sévèrement la production de l'ARN subgénomique 2 (par terminaison prématurée), mais n'affecte que très légèrement la synthèse d'ARN génomique. De plus, la délétion d'un sixième acide aminé abolit la réplication, suggérant une séparation fine mais néanmoins existante des activités de réplication et de transcription. De manière surprenante, la région impliquée dans la régulation de la transcription de l'ARN subgénomique 1 chevauche la séquence codant pour la partie C-terminale de la RdRp (Wu and White, 2007).

De façon plus précise, les différentes fonctions de la réplicase ont pu être découplées pour l'alphavirus SINV. En effet, une mutation d'un résidu arginine central de la réplicase nsP4 abolit la synthèse des ARN subgénomiques puisqu'elle empêche la fixation de la RdRp sur le promoteur. Cela a pu être mis en évidence *in vitro*, mais pas *in vivo*, puisqu'une telle mutation est létale pour le virus (Li and Stollar, 2004, 2007).

La RdRp du BMV ne réagit pas de la même manière pour la réplication et pour la transcription : alors que des concentrations importantes de GTP et d'UTP sont nécessaires à la synthèse des ARN subgénomiques, seule une forte concentration de GTP est nécessaire à la synthèse des ARN antigénomiques du BMV (Adkins *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les RdRp sont décrites comme des protéines flexibles, capables de s'adapter aux contraintes des promoteurs des ARN subgénomiques. Par exemple, chez le BMV, les promoteurs de transcription du brin (-), du brin génomique, et du subgénomique sont très différents, et ne présentent aucune séquence ou structure commune, excepté le premier nt incorporé qui est systématiquement un GTP. La RdRp flexible est alors capable d'ajuster son interaction avec le promoteur ou d'altérer la structure locale du promoteur pour interagir avec les nts clés (Stawicki and Kao, 1999).

b) Autres protéines virales impliquées

En plus de la protéine portant l'activité RdRp, d'autres protéines virales font partie du complexe de réplication et jouent un rôle dans la synthèse des ARN subgénomiques. L'utilisation d'un mutant thermosensible du SINV a permis de montrer que la phosphoprotéine nsP3 de fonction inconnue serait probablement impliquée dans la synthèse des ARN subgénomiques. Cette mutation correspondant à l'insertion de trois acides aminés entre les résidus 252 et 253 de nsP3, n'est pas létale pour le virus (LaStarza *et al.*, 1994). La protéase nsP2 du SINV doit également jouer un rôle en clivant la polyprotéine P123 pour modifier l'activité du complexe de réplication et favoriser sa spécificité vers la matrice brin (-) et ainsi synthétiser le brin (+) et les ARN subgénomiques (LaStarza *et al.*, 1994).

Cette propriété a également été retrouvée pour la protéine nsP2 du SFV (*Semliki Forest virus*), un autre alphavirus (Suopanki *et al.*, 1998).

Chez l'EAV (Nidovirales), les ARN subgénomiques sont synthétisés par transcription discontinue. La mutation d'un Ser-2429-Pro de la protéine non structurale nsP10 provoque une baisse de la production des ARN subgénomiques (van Marle *et al.*, 1999b), mais n'affecte pas la réplication. Cette protéine nsP10 contient deux domaines : un domaine putatif de liaison aux métaux, et un domaine hélicase. Elle est obtenue par clivage de la polyprotéine codée par l'ORF1b, grâce à l'action de la protéase. Si le rôle de nsP10 n'est pas résolu, il se pourrait que la protéine ait un rôle direct ou indirect dans la translocation de la transcription d'une séquence TRS vers une autre. L'EAV code également pour la protéine nsP1, une protéine multifonctionnelle à activité papaine-like autoprotéase lui permettant de s'autocliner de la polyprotéine. La protéine nsP1 est impliquée dans la biogenèse de virions infectieux mais également dans la production des ARN subgénomiques. En effet, la mutation des deux cystéines Cys-41-Ala et Cys-44-Ala d'un domaine zinc finger provoque la disparition des ARN subgénomiques et une augmentation de la réplication, suggérant une compétition entre ces deux phénomènes (Tijms *et al.*, 2007).

c) Facteurs cellulaires

Des facteurs cellulaires sont également nécessaires à la synthèse des ARN subgénomiques. Ainsi, hnRNP A1 (ou p35/38), une protéine cellulaire impliquée dans l'épissage alternatif des ARN cellulaires, est capable de se fixer au site leader et aux régions intergéniques du brin (-) du MHV. Des mutations introduites dans ces séquences inhibent la fixation de cette protéine, et induisent une diminution de la production des ARN subgénomiques (Zhang and Lai, 1995), suggérant que hnRNP A1 agirait comme un facteur de transcription des ARN viraux. De plus, la protéine hnRNP I (ou p55 ou PTB) interagit avec hnRNP A1 en contexte cellulaire normal et est capable de se fixer à la région leader UC meta du brin (+) (Li *et al.*, 1999). L'interaction des deux protéines hnRNP A1 et hnRNP I, associées aux différents sites des ARN viraux permettrait une circularisation de l'ARN afin de faciliter la formation du complexe de transcription viral (Li *et al.*, 1999).

1.4. ARN subgénomiques atypiques

De nombreux ARN subgénomiques ont été décrits, mais certains d'entre eux n'en sont pas à proprement parler car ils ont des propriétés originales. Leurs natures ou leurs fonctions sont différentes des ARN subgénomiques les plus courants.

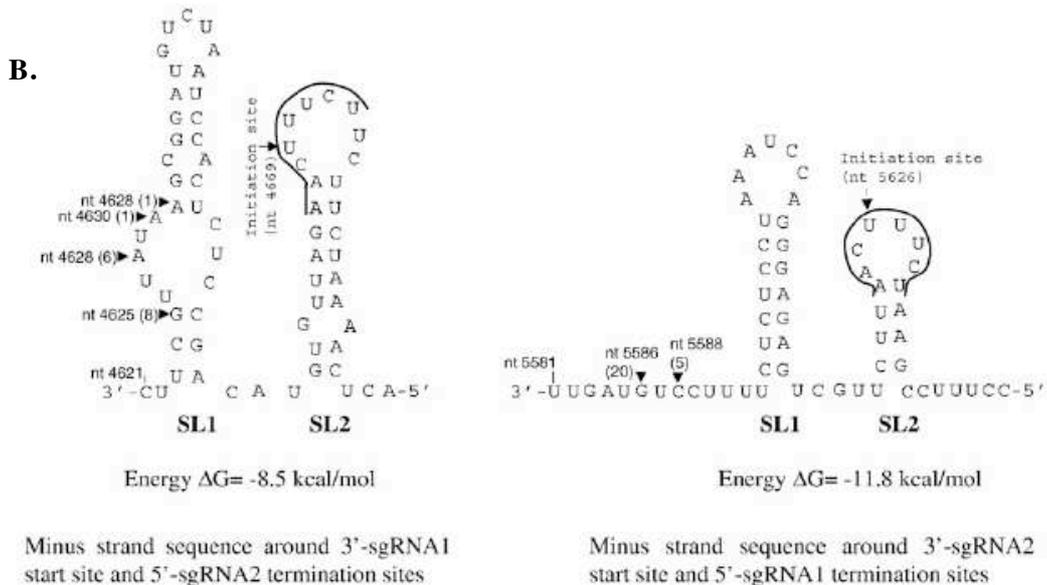
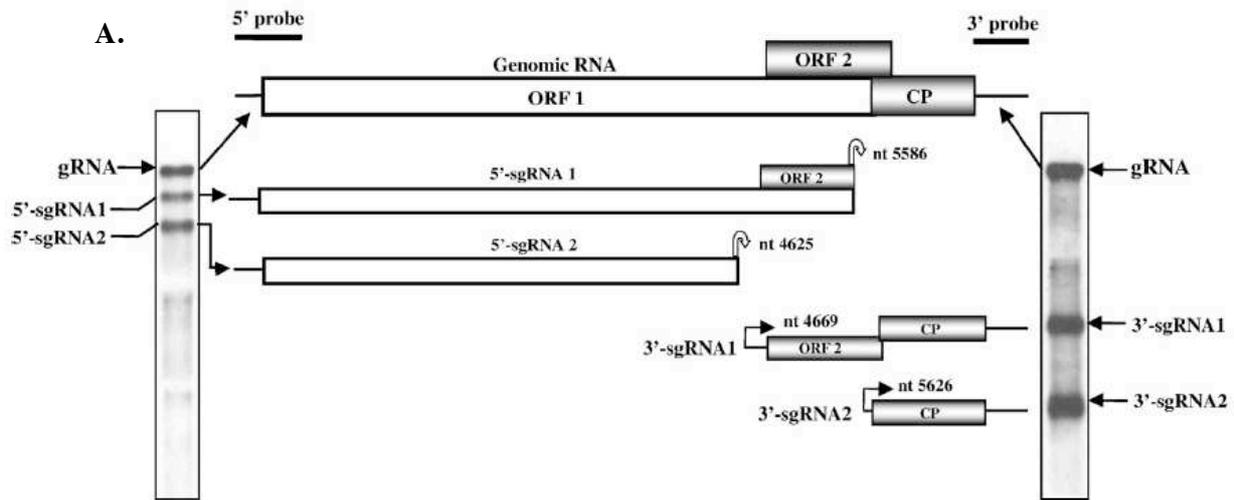


Figure III.6. : Les ARN génomiques et subgénomiques du CTLV (figure 5 de Tatinieni *et al.*, 2009). **A.** Les ARN représentés schématiquement sont alignés avec les bandes détectées en northern blot à l'aide des sondes 5' (à gauche) et 3' (à droite). Les ARN subgénomiques 5' correspondent aux séquences génomiques manquantes des ARN subgénomiques 3'. **B.** Représentation schématique des structures secondaires en tiges-boucles (SL1 et SL2) retrouvées au voisinage des sites de terminaison de la synthèse des ARN subgénomiques 5', et des sites d'initiation des ARN subgénomiques 3'. Les sites sont indiqués par des flèches. La séquence complémentaire à l'octanucléotide conservé UUGAAAGA est surlignée.

1.4.1. ARN subgénomiques 5' terminaux

Le CTLV possède un ARN génomique de polarité positive et code pour trois protéines. Deux ARN subgénomiques 3' terminaux ont été identifiés et permettent l'expression de l'ORF2 et de la CP (3'-sgRNA1 et 3'-sgRNA2 respectivement). Deux autres ARN subgénomiques correspondant exactement à la partie 5' restante du génome ont également été détectés (5'-sgRNA1 et 5'-sgRNA2) (**figure III.6.A.**). Deux tiges-boucles sont présentes entre les deux ARN subgénomiques 5' et 3' correspondants, dont l'une porte un octanucléotide conservé UUGAAAGA (**figure III.6.B.**). Bien que cela ne soit pas démontré, les ARN subgénomiques 5' pourraient être produits par un arrêt de la répliquase au niveau du promoteur des ARN subgénomiques 3' où une répliquase serait déjà présente (Tatineni *et al.*, 2009). Cette hypothèse, déjà proposée pour le *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV, German *et al.*, 1977) est d'ailleurs étayée par une étude sur le CTV (*Citrus tristeza virus*) décrivant des mutations capables d'inhiber la synthèse des ARN subgénomiques 3' et qui entraînent la disparition de la synthèse des ARN subgénomiques 5' (Gowda *et al.*, 2003). Des ARN 5' terminaux de petite taille sont également retrouvés chez le CTV : LMT1 (low-molecular weight tristeza 1) d'environ 750 nts, et LMT2 de 650 nts. Si LMT1 est synthétisé par terminaison de transcription au niveau d'un élément de contrôle, LMT2 correspond, par contre, à la taille de la partie d'ARN encapsidée par la protéine mineure de capsid CPM en absence de protéine majeure de capsid (Gowda *et al.*, 2009). Le BMV (Wierzchoslawski *et al.*, 2006), le SINV (Wielgosz and Huang, 1997) et le CLBV (Vives *et al.*, 2002) expriment également des ARN colinéaires aux parties 5' des ARN génomiques. Leur mécanisme de synthèse serait le même, à savoir un détachement de la répliquase au niveau du promoteur du subgénomique. Le rôle de cet ARN serait d'être préférentiellement traduit, laissant l'ARN génomique entier accessible au complexe de répliquase (Wierzchoslawski *et al.*, 2006). Des expériences de traduction *in vitro* sont toutefois nécessaires pour valider cette hypothèse. En effet, l'absence de structures 3' pourrait diminuer l'efficacité de traduction de tels ARN.

1.4.2. ARN subgénomiques permettant l'expression de protéines tronquées

Chez le PFBV (*Pelargonium flower break virus*), un carmovirus, deux ARN subgénomiques permettant l'expression des protéines de mouvement et de capsid sont détectés. Deux autres subgénomiques, plus grands, sont aussi systématiquement retrouvés en condition d'infection, y compris sous forme d'ARN double-brin. Ces ARN contiennent les séquences 3' terminales de l'ORF codant pour la répliquase et pourraient servir d'ARN messagers (**figure III.7.**). Ils permettraient ainsi l'expression de protéines tronquées, p56 et p44, qui n'ont pas encore été détectées (Rico and Hernandez, 2009). De telles protéines pourraient avoir un rôle dans la régulation du complexe de transcription, ou faciliteraient la recombinaison entre l'ARN génomique et l'ARN subgénomique, afin de pallier des mutations éventuelles

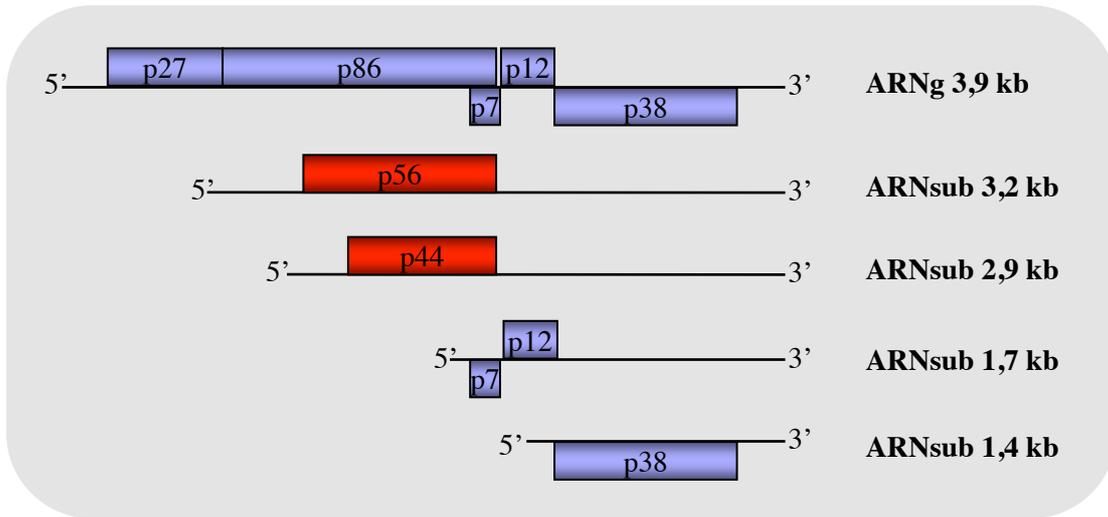


Figure III.7. : Les ARN génomiques et subgénomiques du PFBV (adapté de Rico *et al.*, 2009). Les ARN subgénomiques de 3,2 kb et de 2,9 kb permettent l'expression des protéines tronquées p56 et p44 respectivement (rouge). Les deux autres ARN subgénomiques de 1,7 kb et 1,4 kb quant à eux servent d'ARN messagers pour la synthèse des protéines p7, p12 et p38 (bleu).

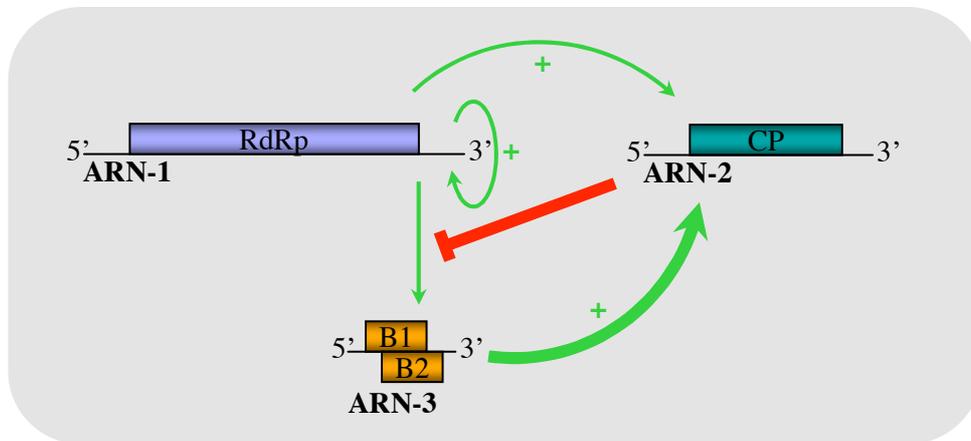


Figure III.8. : Représentation schématique des interactions régulatrices entre les ARN du FHV pendant la réplication (adapté de Eckerle *et al.*, 2003). L'ARN-1 est responsable de la réplication des deux ARN génomiques et de la synthèse de l'ARN subgénomique, l'ARN-3 (flèches vertes fines). Alors que la réplication de l'ARN-2 est transactivée par l'ARN-3 (flèche verte large), l'ARN-2 inhibe la synthèse de l'ARN-3 (trait rouge).

1.4.3. ARN subgénomiques permettant l'expression de plusieurs ORF

Si les ARN subgénomiques ont habituellement pour rôle de positionner un ORF secondaire en 5' d'un nouvel ARN, quelques virus font exception à la règle : un vitivirus, le GVA (*Grapevine virus A*) ne possède pas d'ARN subgénomique dédié à la synthèse de l'ORF 3' terminal (Galiakparov *et al.*, 2003). Ce cistron serait donc traduit par initiation interne *via* d'autres ARN subgénomiques multicistroniques, ou *via* l'ARN génomique. Ce même phénomène a été observé pour d'autres familles de virus : un lutéovirus (Dinesh-Kumar *et al.*, 1992), un tombusvirus (Rochon and Johnston, 1991), un hordeivirus (Zhou and Jackson, 1996) et le BNYVV (Gilmer *et al.*, 1992).

1.4.4. ARN subgénomiques transactivateurs

Le FHV est un virus bipartite qui possède deux ARN génomiques, et transcrit un ARN subgénomique (ARN-3) à partir de l'ARN-1. Cet ARN-3 subgénomique de 387 nts est coiffé et code pour deux protéines non structurales, B1 et B2. En plus de sa fonction de messenger, l'ARN-3 est nécessaire à la réplication de l'ARN-2 par un mécanisme mal connu de transactivation (Eckerle and Ball, 2002) (**figure III.8.**). La séquence de transactivation dépendante de l'ARN-3 est située sur la partie 3' de l'ARN-2. Après la transactivation, une régulation s'opère puisque l'ARN-2 réprime l'accumulation de l'ARN-3. De plus, l'ARN-3 subgénomique non encapsidé est répliqué par la RdRp virale (Eckerle *et al.*, 2003).

1.5. ARN subgénomiques et recombinaison

Les réplicases des virus à ARN ont généralement un taux d'erreur élevé (Domingo *et al.*, 1996). Ceci permet aux virus de maintenir une population hétérogène de molécules d'ARN appelées quasi-espèces. L'avantage de ce phénomène est qu'il existe probablement dans cette population quelques ARN génomiques capables de résister à des pressions de sélection changeantes. Le désavantage est l'accumulation de mutations souvent létales pour le virus. Ce problème peut être pallié par recombinaison, qui permet l'acquisition de toute une partie de génomes fonctionnels en une étape (Miller and Koev, 1998).

Il existe trois types de recombinaison, basées sur les séquences impliquées (Miller and Koev, 1998) : la recombinaison homologue, homologue aberrante, et non-homologue. La recombinaison homologue se fait entre deux séquences très similaires, et ne provoque pas d'altération de séquence, alors que la recombinaison homologue aberrante induit des mutations, délétions, insertions, au niveau du site de recombinaison ou dans son voisinage proche. La recombinaison non-homologue peut se faire entre deux ARN viraux dissimilaires, ou entre un ARN viral et un ARN cellulaire. Ces concepts ont été

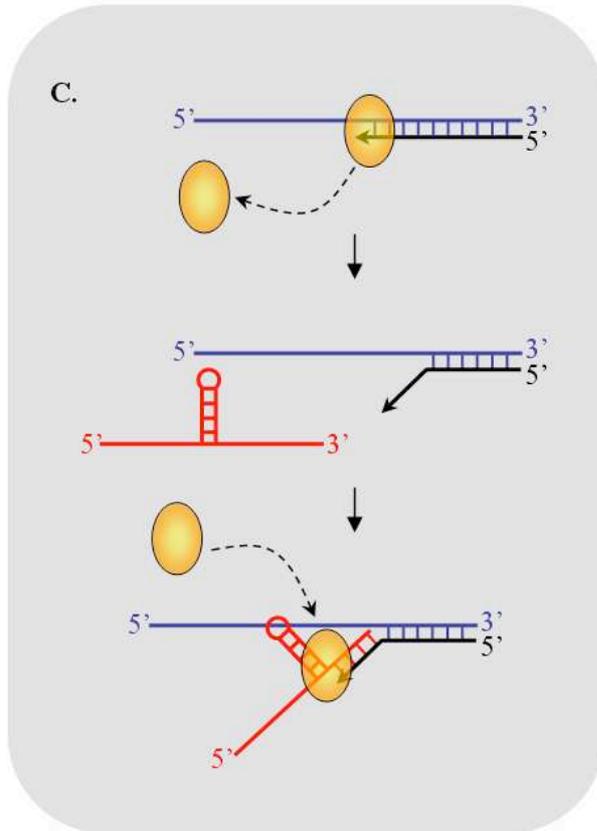
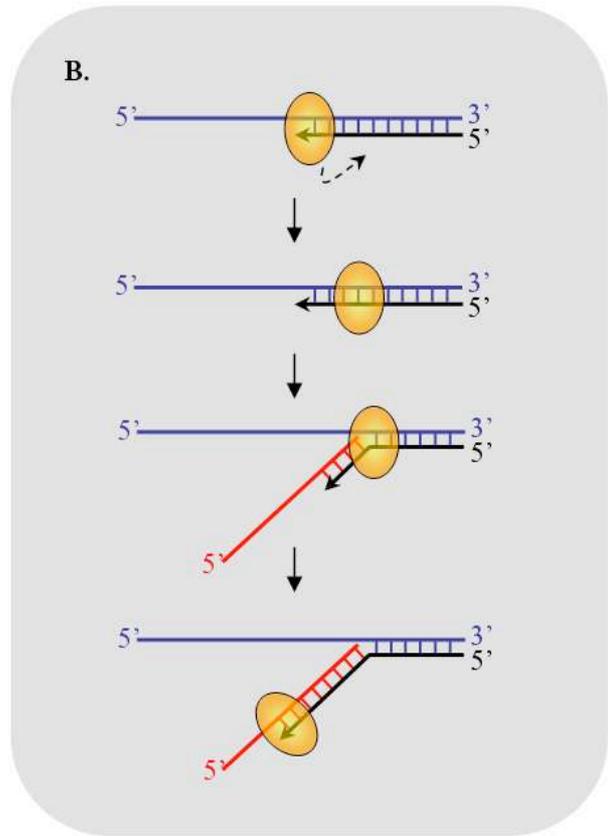
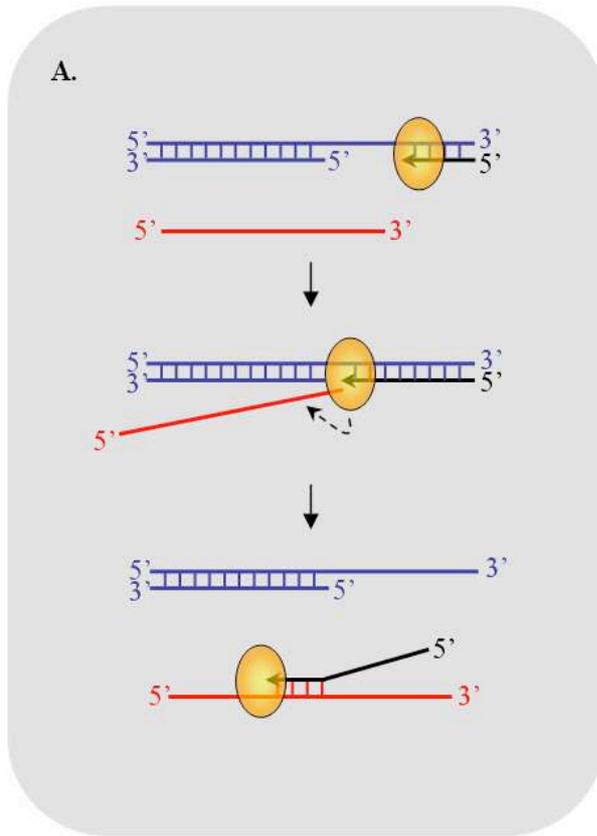


Figure III.9. : Modèles de recombinaison des ARN viraux possédant des RdRp processives ou non processives. A. et B. Deux modèles processifs proposés. C. Modèle non processif. Les traits bleus représentent les matrices donneuses, les traits rouges les matrices acceptrices. La sphère jaune représente la RdRp du virus. Le trait noir correspond au brin en cours de synthèse.

classés différemment en recombinaisons similarité-essentielle, similarité-assistée et similarité-non-essentielle (Nagy and Simon, 1997).

Le mécanisme de recombinaison implique la synthèse du brin naissant à partir de la matrice donneuse, puis le transfert du brin naissant et de la réplicase sur la matrice acceptrice, et enfin l'élongation à partir de la matrice acceptrice.

Pourquoi la réplicase se détache-t-elle d'un brin pour continuer la synthèse sur une autre matrice ? La dissociation est attribuée au degré de processivité de la réplicase. En effet, afin que la réplicase puisse changer de matrice, elle doit avant tout faire une pause de transcription, grâce à des séquences ou des structures situées sur l'ARN matrice. Ces séquences peuvent être des tiges-boucles stables (Nagy and Simon, 1997), des séquences riches en A/U où la polymérase incorpore des nts aléatoirement, puis change de matrice.

Dans le cas de RdRp processive à l'image de la RdRp du BMV, l'enzyme fait une pause au niveau où la matrice s'apparie à un autre ARN, puis la RdRp continue la synthèse en utilisant une autre matrice appelée le brin accepteur (**figure III.9.A.**). Ce mécanisme pourrait expliquer l'apparition des defective-interfering RNA (DI RNA) chez les tombusvirus et les bromovirus (Nagy and Simon, 1997). Un autre modèle décrit pour les poliovirus et les bromovirus serait que la RdRp recule de 10 à 20 nts sur le brin naissant, ce qui permettrait à la séquence libérée de se réhybrider sur le brin accepteur (**figure III.9.B.**). Puis la RdRp se repositionnerait en 3' et continuerait la synthèse en utilisant le nouveau brin matrice accepteur.

Le modèle non processif (TCV, coronavirus) serait expliqué par le relargage du brin naissant par la RdRp. Ce brin pourrait s'hybrider à une autre matrice et recruter la RdRp qui continuerait la synthèse sur cette nouvelle molécule (**figure III.9.C.**). Si la RdRp du poliovirus est capable d'utiliser des amorces aléatoires (Paul *et al.*, 1994), les RdRp du TCV et du BMV en sont incapables, ce qui suggère qu'un tel changement de brin ne pourrait se faire qu'à proximité de promoteurs où la RdRp est recrutée.

Les promoteurs d'ARN subgénomiques correspondent souvent à des points chauds de recombinaison puisque les structures en tige-boucle permettent une pause de la RdRp. C'est le cas du promoteur du subgénomique du CMV et du TAV (Thompson *et al.*, 2008), (Suzuki *et al.*, 2003), (Shi *et al.*, 2008), (de Wispelaere *et al.*, 2005), du BMV (Wierzoslawski *et al.*, 2003), du TCV (Nagy and Simon, 1997 ; Miller and Koev, 1998) et probablement de nombreux autres virus. D'ailleurs, dans le cas du BMV, la synthèse de l'ARN subgénomique est nécessaire pour que la recombinaison se fasse *in vitro* (Dzianott *et al.*, 2001 ; Wierzoslawski *et al.*, 2003). Toutefois, certains promoteurs de subgénomiques ne correspondent pas à des points chauds de recombinaison : le sgARN-4 du CMV en est un exemple (de Wispelaere *et al.*, 2005).

Les virus qui utilisent une synthèse discontinue de la matrice comme mécanisme de production des ARN subgénomiques (comme les Nidovirales), utilisent un mécanisme assimilable à de la recombinaison homologue (high-frequency similarity-assisted) (Pasternak *et al.*, 2001). Pour le MHV, la recombinaison augmente du 5' au 3' de l'ARN génomique, indiquant l'implication des ARN subgénomiques dans le mécanisme de recombinaison homologue puisqu'ils peuvent apporter une source de brins accepteurs ou donneurs de plus en plus nombreuses à l'extrémité 3' terminale (Masters, 2006). La recombinaison se ferait principalement lors de la synthèse du brin négatif, car les brins positifs accepteurs sont largement plus nombreux pour permettre un changement de matrice (Masters, 2006).

2. ARN viraux non codants

En plus des ARN subgénomiques servant à la synthèse des protéines, il existe des ARN viraux, non génomiques, synthétisés lors de l'infection virale. Ces ARN non codants ont des fonctions et des mécanismes de synthèse variés. Les ARN viraux, tout comme les ARN cellulaires sont la cible de ribonucléases. Des protéines cellulaires, mais aussi des facteurs viraux sont impliqués dans ces clivages. Les coupures et les ARN tronqués ont certainement des implications sur le cycle viral, et si leurs rôles sont encore peu compris, différentes hypothèses sont toutefois avancées.

2.1. Clivage par un facteur viral

Le LRV (*Leishmaniavirus*) infecte le protozoaire *Leishmania*. C'est un virus à génome ARN double-brin qui produit *in vivo* et *in vitro* un petit ARN de 320 nts correspondant à la partie 5' de l'ARN génomique (MacBeth and Patterson, 1995a, 1995b). Il est synthétisé par coupure site-spécifique dans la région 5' non codante. La protéine de capsid du virus est responsable de cette coupure, au site de séquence consensus 5'GNUM''CGNA3'. La délétion de cette région abolit le clivage. Le rôle de cette coupure n'est pas très bien compris. En effet, le clivage produit une population d'ARN viraux incompetents pour la réplication et la traduction, ce qui serait létal pour le virus. Il est donc supposé que le clivage soit maintenu à un taux basal lors d'une faible concentration en virus, et que le clivage augmente lorsque la population virale croît, afin de maintenir la persistance de l'infection dans la cellule. D'autres rôles proposés sont que des séquences inhibant la traduction se trouveraient en 5'UTR et seraient clivées pour donner des messagers fonctionnels. Enfin, de façon moins probable, la capsid cliverait des ARN messagers cellulaires possédant la séquence consensus, et le clivage de l'ARN viral résulterait d'un dommage collatéral.

2.2. Clivage par un facteur cellulaire

Certains ARN viraux sont la cible de ribonucléases cellulaires : si c'est *a priori* un moyen pour la cellule de se défendre face à une infection virale, pour certains virus ce clivage est un atout précieux pour leur infectivité.

L'étude du TBSV en système hétérologue de levure a permis de montrer que l'endoribonucléase Ng12p peut cliver l'ARN génomique dans la région RII du TBSV. Le fragment 3' est alors dégradé rapidement par la protéine Xrn1p, une protéine de levure impliquée dans la dégradation 5'→3' des ARN. Son absence permet la stabilisation des ARN du TBSV et l'apparition de formes partiellement tronquées en 5' (Cheng *et al.*, 2006). Ce processus diminue également la fréquence de recombinaison du virus en réduisant la quantité d'ARN viral, source de recombinaison. L'orthologue de Xrn1p chez la plante est la protéine AtXrn4p. Lorsque cette protéine d'*A. thaliana* est exprimée dans *N. benthamiana*, le CNV subit davantage de dégradations, menant à l'apparition de formes tronquées en 5' (Cheng *et al.*, 2007). Alors que quelques variants du CNV sont capables d'infecter des protoplastes, un des variants privé des 138 premiers nts reste capable d'infecter *N. benthamiana* à longue distance, et entraîne des symptômes atténués par rapport au virus sauvage. Ces résultats indiquent qu'une seule protéine cellulaire peut être impliquée dans l'apparition de nouveaux variants.

Les flavivirus, à l'image du WNV (*West Nile virus*) produisent un ARN non-codant sfRNA (subgenomic flavivirus RNA), colinéaire à l'extrémité 3'UTR du génome. Il serait produit par dégradation de l'ARN génomique par la nucléase 5'→3' XRN1, et serait protégé de l'entière dégradation par une structure très conservée (Pijlman *et al.*, 2008). Ce sfRNA est essentiel pour une bonne efficacité d'infection et entraîne également une aggravation de la pathogénicité virale. Si son mécanisme d'action n'est pas connu, certaines hypothèses sont avancées : il pourrait servir de cible aux miRNA endogènes, protégeant ainsi l'ARN génomique. Le sfRNA pourrait également inhiber les activités antivirales liées à la machinerie de dégradation des ARN messagers cellulaires (Esteban *et al.*, 2008), et aussi inhiber le taux de recombinaison des ARN viraux (Cheng *et al.*, 2006).

De petits ARN viraux, considérés au départ comme des ARN subgénomiques, n'en sont en réalité pas et proviennent de mécanismes de clivages. Ainsi, le RCNMV produit pendant l'infection virale sur plante et dans les protoplastes une grande quantité d'un ARN de 0,4 kb appelé SR1f. Il contient presque intégralement la séquence 3'UTR de l'ARN-1 génomique, et ne code pour aucune protéine. Son mode de production implique un clivage de l'ARN-1 génomique (probablement par une protéine cellulaire), et requiert une séquence de 58 nts nommée Seq1f58, nécessaire et suffisante à la protection du produit de clivage contre une dégradation 5'→3' (Iwakawa *et al.*, 2008). Cette séquence est structurée en trois tiges-boucles. La fonction de SR1f serait d'inhiber la traduction, menant à la répression de la synthèse de la réplicase et à la diminution de la synthèse du brin antigénomique. Il est

intéressant de constater que la séquence 3'TE-DR1, essentielle pour la traduction cap-indépendante et située en 3' de SR1f, contient 17 nts retrouvés également sur l'élément BTE du BYDV qui a une fonction de traduction cap-dépendante. Ces deux séquences sont donc supposées agir de façon similaire, pour inhiber la traduction en séquestrant eIF4F et eIFiso4F, un mécanisme démontré pour l'ARNsg2 du BYDV (Treder *et al.*, 2008). L'ARNsg2 est capable d'inhiber la traduction de l'ARN génomique par une action en *trans* de sa séquence BTE. La synthèse de la réplicase est stoppée, alors que les protéines structurales et de mouvement sont préférentiellement traduites à partir des ARN sg (Shen *et al.*, 2006). Parmi les ARN subgénomiques du BYDV, l'ARNsg3 ne code pour aucune protéine et sa fonction est inconnue.

L'ARN-5 du CMV est un ARN non codant, dont la séquence est identique aux ARN-2 et ARN-3 desquels il est issu. Toutefois, son mode de synthèse n'est pas bien compris. La réplicase virale n'est pas impliquée dans sa synthèse, puisque l'ARN-5 est retrouvé lors d'expression transitoire des ARN viraux -2 ou -3, ne codant pas pour la réplicase virale (de Wispelaere and Rao, 2009). Ce petit ARN-5 présente une séquence de 20 nts conservés qui est nécessaire à sa production. Le rôle de l'ARN-5 reste inconnu, mais il semble favoriser la recombinaison et l'atténuation des symptômes (Shi *et al.*, 2008). Nous reviendrons ultérieurement sur cet ARN-5 (partie résultats, paragraphe 2.3.1).

2.3. Des ARN viraux non-codants mènent à la production de miRNA

Ce paragraphe nous emmène transitoirement dans le règne des virus à ADN car rien n'est encore décrit pour les virus à ARN (+).

Les adénovirus (virus à ADN double-brin linéaire), notamment l'Ad5 (*Human adenovirus type 5*) codent pour un ou deux VA RNA (virus-associated RNA), de petits ARN non codants d'environ 160 nts, transcrits par l'ARN pol III. Ils sont extrêmement structurés, et ressemblent aux précurseurs de miRNA car ils ont une tige-boucle imparfaite. De manière surprenante, ils ont à la fois un rôle de suppresseur de silencing en inhibant les activités de Dicer et de RISC, et un rôle de précurseur de petits ARN. VA RNAI a pour rôle d'interférer avec le système de défense médié par la voie interféron, en bloquant l'activité d'une protéine kinase ARN-dépendante (PKR). De plus, ils interfèrent avec la voie du silencing en étant des substrats de Dicer, l'empêchant ainsi de jouer son rôle dans le mécanisme de défense antiviral. Ils sont clivés par Dicer en mivaRNA (VA RNA derived miRNA). Bien que VA RNAI soit présent en 20 fois plus grande quantité que VA RNAII, les mivaRNAII sont deux fois plus nombreux que les mivaRNAI (Xu *et al.*, 2007). Les mivaRNA sont incorporés dans RISC contenant AGO2. Le VA RNAI a deux sites d'initiation de la transcription, situés à 3 nt l'un de l'autre, menant à la synthèse de VA RNAI(G) majoritaire, et VA RNAI(A) minoritaire. Seul le brin 3' est efficacement incorporé dans RISC (Xu *et al.*, 2009). Des travaux récents ont montré que ces

mivaRNA ciblent des ARN messagers cellulaires impliqués dans la croissance cellulaire, l'expression des gènes et la réparation de l'ADN (Aparicio *et al.*, 2009).

Les ARN non codants exprimés par l'EBV (*Epstein-Barr virus*, virus à ADN double-brin linéaire), nommés EBER1 et EBER2 (EBV encoded RNA) ressemblent à ceux des adénovirus par leur structure en tige-boucle. Ils permettent l'inhibition de l'activité de PKR et l'infection persistante. Récemment, il a été montré qu'ils activent le récepteur Toll-like 3. Ils seraient sécrétés hors de la cellule infectée, et activeraient le système immunitaire (Iwakiri *et al.*, 2009).

3. ARN subviraux

Les ARN subviraux (Simon *et al.*, 2004) ne sont pas nécessaires à la propagation normale du virus avec lesquels ils sont retrouvés, mais peuvent moduler les symptômes. Leur réplication est totalement dépendante des protéines codées par le virus assistant, et leur amplification est donc limitée aux cellules infectées. Il existe principalement deux classes d'ARN subviraux : les "DI RNA" (defective interfering RNA) et les ARN satellites. Les DI RNA sont retrouvés aussi bien chez les virus animaux et végétaux, alors que les ARN satellites ne sont retrouvés que chez les phytovirus.

Ces ARN, bien que non codants, provoquent des modulations des symptômes produits par le virus assistant. Au départ, la variation des symptômes était supposée être corrélée à une simple compétition des facteurs de réplication présents en quantité limitante, mais les mécanismes sont bien plus complexes. Si ces ARN subviraux étaient considérés comme des parasites des virus assistants, des études démontrent que chaque partenaire tire un profit.

3.1. DI RNA

3.1.1. Mode de production

Les defective interfering RNA (DI RNA) et les defective RNA (D RNA) (qui n'interfèrent pas avec le virus assistant) ont été décrits pour la première fois en association avec un Tombusvirus (Hillman *et al.*, 1987). D'autres genres de virus ont ensuite été décrits comme produisant des DI RNA (*Carmovirus*, *Potexvirus*, *Bromovirus*, *Tospovirus*, *Cucumovirus*) (Graves *et al.*, 1996). Les DI RNA sont produits après plusieurs passages sur une plante hôte, et ne sont en général pas retrouvés lors d'infections naturelles (Celix *et al.*, 1997). Ils dérivent des ARN génomiques car ils sont produits par recombinaison (voir paragraphe 1.5) lors de la transcription des ARN génomiques. Généralement, la production des DI RNA conduit à la perte de certains gènes de réplication, de mouvement ou d'encapsidation, tout en conservant les séquences *cis* nécessaires à la reconnaissance par la réplicase

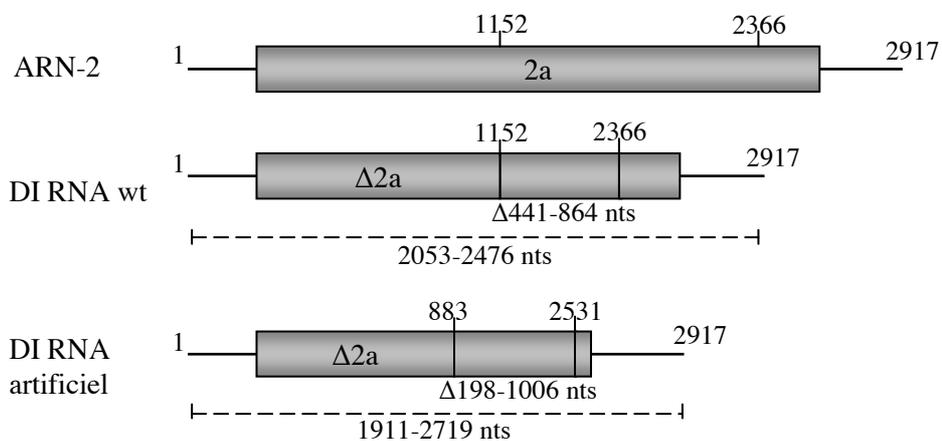


Figure III.10. : Séquence des DI RNA sauvages et artificiels du BBMV (Graves *et al.*, 1996). La séquence du DI RNA sauvage dérive de l'ARN-2 du BBMV, qui a subi une seule délétion interne de 441 à 864 nts. Les DI RNA artificiels peuvent être davantage délétés.

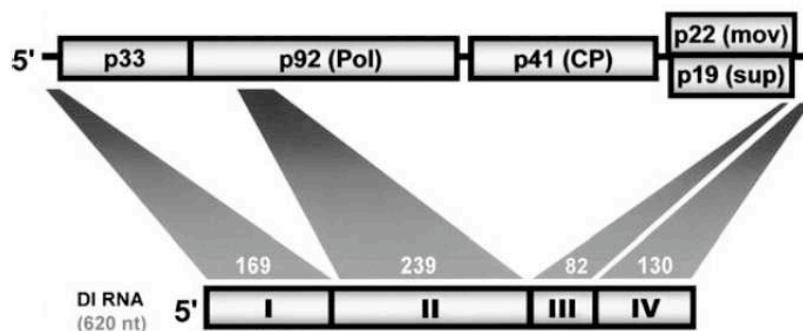


Figure III.11. : Séquence du DI RNA du TBSV (par Nagy et White, 2004). Les quatre régions I, II, III et IV dérivent de quatre régions différentes du génome du TBSV. Les longueurs des séquences du DI RNA sont indiquées au dessus des régions correspondantes.

du virus assistant et à l'amplification de l'ARN. Les DI RNA constituent donc de très bons outils pour étudier de telles séquences impliquées dans la réplication.

Si les séquences 5' et 3' terminales sont essentielles à la production de DI RNA, la longueur et la capacité codante de l'ARN sont également importantes. En effet, le BBMV (*Broad bean mottle bromovirus*) nécessite au minimum les 883 nts 5' et les 387 nts 3'. Les DI RNA artificiels (transcrits *in vitro*) du BBMV nécessitent également une longueur minimale de 1712 nts (59% du génome) pour atteindre des niveaux d'accumulation détectables, ou 1911 nts (66% du génome) pour atteindre le niveau d'accumulation des DI RNA naturels (**figure III.10.**). Les DI RNA naturels retrouvés présentent des délétions maximales de 864 nts (**figure III.10.**). Ils contiennent l'ORF $\Delta 2a$, indiquant l'importance de la protéine $\Delta 2a$ tronquée ou de la traduction de l'ORF par le ribosome dans la formation et le maintien des DI RNA. Le TSWV (*Tomato spotted wilt tospovirus*) et le TBSV produisent des DI RNA qui codent pour une partie de la réplicase, qui pourrait permettre la stabilisation des ARN (Graves *et al.*, 1996) (White, 1996).

Des duplications de séquences en orientation sens, ou en orientation antisens ont été introduites sur des DI RNA du BBMV. Les DI RNA artificiels possédant des séquences inversées-répétées disparaissent après infection et donnent naissance à des DI RNA plus courts ne possédant pas la répétition. A l'inverse, les DI RNA possédant les séquences dans la même orientation restent stables (Pogany *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent l'importance de structures secondaires ou de régions complémentaires dans la formation des DI RNA.

La température influence également la production des DI RNA : une température de 12°C permet l'obtention de DI RNA après un seul passage de BBMV sur feuille, alors que entre 16°C et 20°C, plusieurs passages sont nécessaires avant d'observer des DI RNA (Llamas *et al.*, 2004). L'hôte du virus a également une influence sur la production des DI RNA (Llamas *et al.*, 2004).

Les DI RNA représentent une mosaïque des séquences des génomes parentaux comme les DI RNA du TBSV, du CNV et du TCV, ou proviennent d'une délétion unique au sein du génome comme pour les DI RNA du CYMV (*Clover yellow mosaic potexvirus*), du CMV, de l'AIMV, du BBMV et du TSWV (**figure III.11.**). Il est intéressant de noter que dans le cas des virus multipartites, seuls certains des ARN génomiques produisent des DI RNA (Graves *et al.*, 1996). Ainsi, le CMV et l'AIMV ne produisent de DI RNA qu'à partir de l'ARN-3, le BBMV à partir de l'ARN-2. Le WTV (*Wound tumor virus*) produit des DI RNA à partir des ARN génomiques -2 et -5.

Chez le BNYVV, le DI RNA de l'ARN-2 peut, dans certains cas, remplacer l'ARN-2 sauvage (Tamada and Kusume, 1991). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'ORF-2 de l'ARN-2 du BNYVV est impliquée dans la transmission, et est donc inutile lors d'inoculations mécaniques. De plus, d'autres DI RNA issus des ARN-3 et -4 peuvent apparaître rapidement, après seulement un ou deux passages sur feuille de *C. quinoa* (Bouzoubaa *et al.*, 1991). L'ARN-4 subit une délétion par

élimination d'une séquence répétée de 15 nts, suggérant une implication de la réplicase. L'ARN-3, quant à lui, subit une délétion d'une séquence commençant par un GU et finissant par un AG, rappelant l'épissage des introns. Cependant, aucune indication d'un passage des ARN par le noyau n'est connue. Ces délétions ne sont pas délétères pour la réplication des ARN-1 et -2 sur feuille. Étonnamment, ces inoculums peuvent malgré tout être transmis à la betterave sucrière par inoculation naturelle via *P. betae*, ce qui suggère une conservation à un niveau très faible des ARN entiers codant pour les protéines de transmission. L'utilisation de DI RNA artificiels produits à partir de délétions dans les ARN -1, -2, -3 et -4 a permis de montrer que seul un DI RNA issu de l'ARN-2 était capable d'interférer avec la réplication. Le mécanisme d'interférence serait expliqué par une haute affinité d'une séquence de l'ARN-2 pour la réplicase, ce qui induirait sa séquestration (Hehn *et al.*, 1994).

Des virus défectifs ou "defectives viruses" ont également été décrits pour les virus des genres Reovirus, Tosopovirus, Furovirus et Tobravirus (Graves *et al.*, 1996). Ils dérivent des virus assistants, dont la présence est requise sous certaines conditions comme par exemple la transmission (Graves *et al.*, 1996).

3.1.2. Mécanismes de la modulation des symptômes

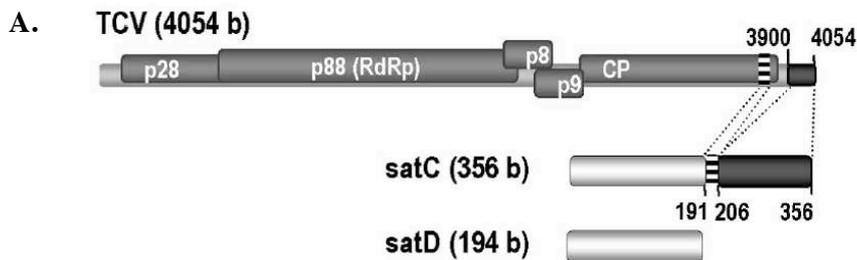
Si la majorité des DI RNA entraîne une diminution de la réplication du virus assistant et des symptômes associés, les DI du CMV et de l'AIMV sont sans effet (Graves *et al.*, 1996), et les DI RNA du TCV (Li *et al.*, 1989), du BBMV (Romero *et al.*, 1993) et du SBWMV (*Soil-borne wheat mosaic virus*) (Chen *et al.*, 1994) sont les rares à entraîner une exacerbation de la sévérité des symptômes.

L'atténuation des symptômes peut s'expliquer par trois mécanismes : 1) une compétition avec le virus pour les facteurs de réplication, à l'image des DI RNA retrouvés chez le TBSV (Jones *et al.*, 1990), 2) une interaction spécifique avec les produits codés par le virus comme les subgénomiques, menant à une diminution de l'accumulation des ARN subgénomiques et des protéines correspondantes sans affecter l'ARN génomique et la RdRp, comme pour le TBSV (Scholthof *et al.*, 1995) ; 3) le dernier mécanisme implique une activation du mécanisme d'ARN silencing par les DI RNA, alors qu'ils ne sont eux-mêmes que peu ciblés (Szittyá *et al.*, 2002).

Leur rôle serait donc d'atténuer les effets de l'infection, pour permettre à la plante de continuer sa croissance et sa reproduction, et ainsi permettre au virus assistant de continuer à se propager.

3.1.3. Utilisation des DI RNA pour l'expression de protéines

Les DI RNA sont capables de se répliquer, mais ne sont pas indispensables au virus : ils peuvent ainsi être modifiés par insertions de séquences codantes. Ils se transforment alors en vecteur d'expression de protéines. Cela a été réalisé pour le BBMV (Sandoval *et al.*, 2008), mais également pour d'autres virus



B.

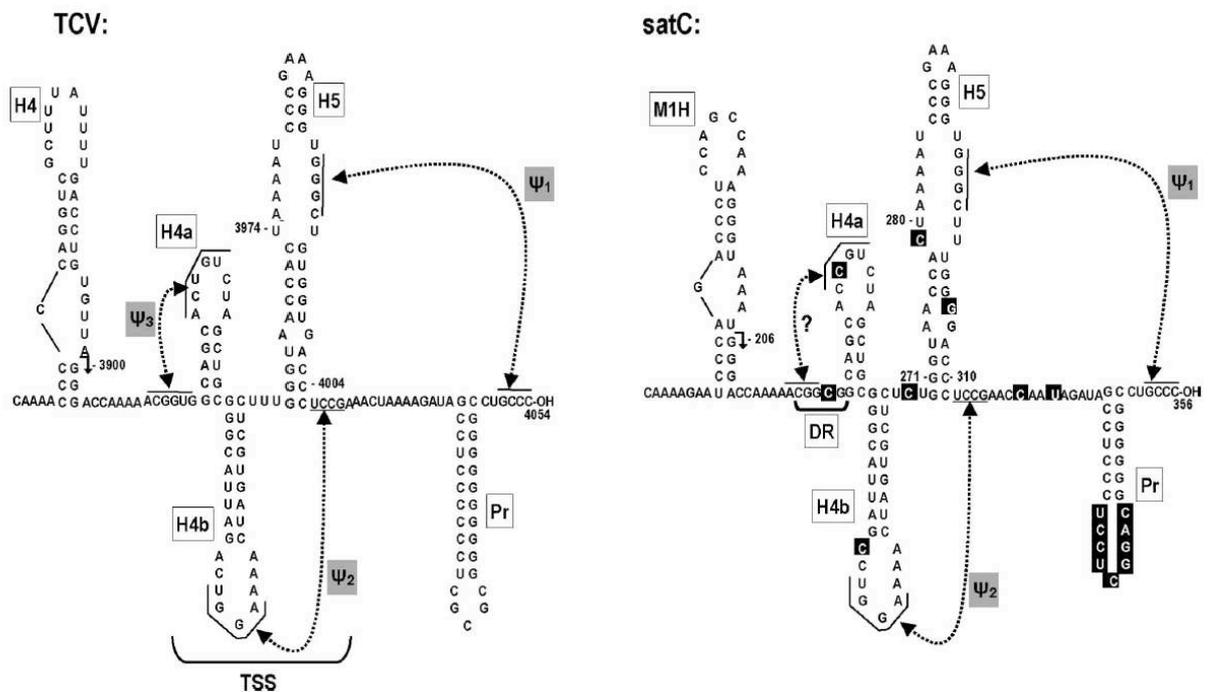


Figure III.12. : Le TCV et ses satellites (par Guo *et al.*, 2009). **A.** Organisation génomique du TCV et des ses deux satellites, satC et satD (pas à l'échelle). La partie 3' du satC représentée en rayé et en gris foncé dérive du TCV. SatD contient uniquement la séquence 5' du satC (gris clair) et aucune séquence commune avec le génome du TCV. **B.** Structures similaires des séquences 3' terminales du TCV et du satC. Les nucléotides encadrés en noirs représentent les variations entre le TCV et le satC. Les noms des différents domaines sont indiqués dans des rectangles blancs. Les interactions en pseudonoeud sont indiquées par des doubles-flèches pointillées.

comme le CymRSV (*Cymbidium ringspot virus*), le MHV, et le LIYV (*Lettuce infectious yellows virus*).

3.2. ARN satellites

Les ARN satellites sont retrouvés uniquement en association avec des phytovirus. Ils se caractérisent par une molécule d'ARN linéaire ou circulaire, qui partage des séquences communes avec le virus assistant. Les ARN satellites nécessitent les protéines du virus assistant pour leur réplication, leur mouvement, puisqu'ils ne codent pas eux-mêmes pour leurs propres protéines de réplication. Ceux qui utilisent la capsid du virus assistant pour leur encapsidation sont appelés "ARN satellites" (satRNA). Il en existe deux types : ceux qui codent pour une protéine non-structurale (large satRNA) ou qui sont non codants (small satRNA). En revanche, certains satellites codent pour leur propre protéine de capsid et portent le nom de "virus satellites".

3.2.1. Origine

L'origine des satRNA reste assez mystérieuse mais semble impliquer la recombinaison. La présence de similarités de séquences avec les virus assistants indique qu'ils en dérivent, mais le reste des séquences, très différentes du virus, suggère qu'un mécanisme différent de la recombinaison existe. De multiples terminaisons-réinitiations de la transcription par la RdRp pourraient conduire à la transcription de séquences aléatoires à l'origine des satRNA. De plus, le PTGS serait impliqué dans l'évolution des satRNA, menant à la sélection de molécules naturellement résistantes à ce mécanisme (Wang *et al.*, 2004). Le génome d'*A. thaliana* contient des séquences comportant des similarités avec les satellites du CMV. Des miRNA ou siRNA générés suite à l'infection virale dans la cellule hôte pourraient être assemblés par la RdRp virale pour former les satRNA (Hu *et al.*, 2009). L'émergence de nouveaux satellites suite à l'utilisation de souches de virus en laboratoires permet de soulever une question : l'apparition de ces satellites serait-elle une forme de défense de la plante contre le virus (Hajimorad *et al.*, 2009) ?

Ainsi, les ARN satellites possèdent des séquences singulières. Par exemple, le satCymRSV est un ARN de 621 nts, qui comporte une séquence de 51 nts (188-239) homologue à 90% à une séquence située en 5' de l'ARN génomique (99-151). L'origine de la séquence restante est inconnue (Pantaleo and Burgyan, 2008).

Les ARN satellites du TCV sont aussi originaux (**figure III.12.A.**). Ainsi, le satD est composé d'une multitude de courtes séquences juxtaposées du génome du TCV, alors que le satC a une séquence particulière. Il est une sorte de mélange entre un DI RNA et un satRNA. En effet, il possède en sa partie 5' une séquence correspondant à la quasi intégralité du satD, et en 3' il possède deux parties du

génomique du TCV : une petite partie de la séquence de la CP, suivie d'une séquence similaire à la partie 3' terminale du génome (Sun and Simon, 2003).

3.2.2. Réplication

L'association des satellites avec des virus assistants suggère qu'ils utilisent le mécanisme de réplication du virus associé. Pourtant il a été montré que des différences existent. En effet, les séquences 3' terminales ressemblent à celles du virus assistant par leur séquence et par leur structure en tiges-boucles multiples mais ne sont pas entièrement échangeables. Le remplacement des séquences 3' et/ou 5' du satBaMV avec celles du génome du BaMV (*Bamboo mosaic potexvirus*) induit une diminution drastique de la production du satellite, indiquant que malgré la conservation de structure et de séquence, le mécanisme de réplication diffère (Huang *et al.*, 2009).

Le satC du TCV contient une région 3'UTR de 100 nts, très similaire en structure et en nts à celle du TCV (**figure III.12.B**). Les structures incluent trois pseudonœuds et sont supposées être conservées entre le TCV et le satC (analyse M-fold). Seules 8 régions de quelques nts sont dissemblables. Pourtant, un mutant du satC contenant la région 3'UTR du TCV ne se réplique qu'à 15% du satC sauvage (Zhang *et al.*, 2006b). La région 3'UTR du satC peut adopter deux formes : une forme "pré-active" issue de la transcription, et une forme active pour la réplication (Zhang *et al.*, 2006a). La région 3' du TCV, quant à elle, peut se conformer différemment pour la traduction et la réplication (Yuan *et al.*, 2009). Une étude d'évolution *in vitro* (SELEX) a montré que ces structures peuvent être remplacées par d'autres, situées ailleurs sur l'ARN, et assurer les mêmes fonctions (Guo *et al.*, 2009). Ces résultats démontrent donc que le mécanisme de réplication des ARN satellites et des virus assistants, bien qu'utilisant la même réplicase, n'est pas forcément identique.

3.2.3. Virulence

Trois types de modulations des symptômes peuvent apparaître lorsqu'un ARN satellite est retrouvé avec un virus assistant : une atténuation, une exacerbation ou aucun effet significatif. L'effet le plus couramment rencontré est l'atténuation des symptômes, souvent corrélée à la diminution de l'accumulation et de la réplication du virus assistant. Cependant, les mécanismes impliqués sont encore peu compris. L'hypothèse selon laquelle les satRNA interfèrent avec le virus assistant par compétition pour les protéines de réplication semble erronée. En effet, la coinfection d'un satellite du CMV avec le ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) induit une augmentation de l'accumulation du satellite et de l'ARN viral, indiquant bien qu'il n'y a pas de compétition entre les deux partenaires (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003).

La pathogénicité des satRNA dépend donc de beaucoup de paramètres, variables en fonction des satellites étudiés, de l'hôte, du virus assistant, de la séquence et de la structure du satRNA, et des

protéines virales. L'implication du mécanisme d'ARN silencing dans la pathogénicité a aussi été décrite.

a) Influence de l'hôte et du virus assistant

Bien que la majorité des satRNA du CMV induit une atténuation des symptômes du virus assistant, quelques variants pathogènes sont capables d'induire des nécroses ou des chloroses sur *N. tabacum*, *N. benthamiana* ou la tomate (Simon *et al.*, 2004). De plus, la pathogénicité dépend aussi du virus assistant : un variant B5 des satRNA du CMV cause des chloroses avec un virus du groupe II, alors que ce même satellite atténue les symptômes avec un virus du groupe I.

b) Influence des séquences et des structures

Comme la majorité des ARN satellites ne sont pas codants, la séquence d'ARN elle-même, est impliquée dans la symptomatologie. Des structures secondaires, par le biais d'interactions intramoléculaires, sont toujours retrouvées. Dans le cas du CMV, la mutation d'un seul nt dans le domaine impliqué dans la chlorose altère la spécificité d'hôte et l'induction de la maladie. L'effet nécrogène du satRNA D4 du CMV serait induit par une boucle de 8 nts localisée à l'extrémité d'une tige présente dans la partie 5' du brin (-). Il a été montré que le brin (-) (non encapsidé) est responsable des lésions nécrotiques provoquées par le satRNA D4 du CMV, et que le ratio de brin (-) par rapport au brin (+) augmente au cours de l'infection. Une structure secondaire conservée en 3' du brin (+) de ce satRNA serait impliquée dans la promotion de la transcription du brin (-), et donc dans la pathogénicité (Xu and Roossinck, 2000).

Dans le cas du satBaMV, il a été montré que ce sont les séquences 5' qui sont impliquées dans la diminution de la quantité du virus assistant BaMV (Chen *et al.*, 2007).

c) Influence des protéines virales et de l'ARN silencing

Les protéines codées par le virus assistant sont impliquées dans la pathogénicité de quelques ARN satellites. Les symptômes associés au satC peuvent être modulés par mutation de la RdRp du TCV. En effet, la mutation d'un seul acide aminé en position 1025 ou 1144 de la protéine p88 est suffisante pour passer de symptômes légers à des symptômes sévères en présence de satRNA. Mais les mécanismes intimes ne sont pas pour autant expliqués. De plus, la virulence du satC et la diminution du taux d'ARN viral du TCV sont corrélées à une diminution de la production de virions encapsidés, et donc à une quantité de protéine de capsid libre supérieure. La CP du TCV étant un suppresseur de silencing, celui-ci serait directement impliqué dans la pathogénicité des ARN satellites. En effet, les protéines cellulaires DCL2 et DCL4 permettent la suraccumulation de satC en absence de CP alors qu'une CP fonctionnelle inhibe ce phénomène. Cela suggère que le mécanisme de silencing de l'hôte accroît la production de satC au lieu de la diminuer, et que la CP freine ce processus (Manfre and Simon, 2008).

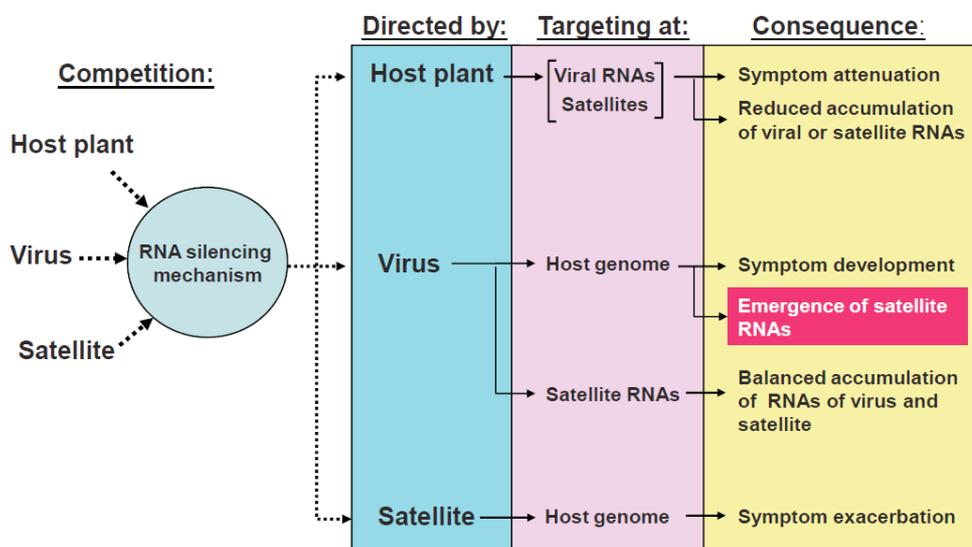


Figure III.13. : Rôle central de l'ARN silencing dans la modulation des symptômes médiés par les ARN satellites (Hu *et al.*, 2009). Les trois protagonistes entrent en compétition pour l'utilisation de l'ARN silencing. Le plus adapté (bleu) peut utiliser l'ARN silencing à son profit pour dégrader la cible (violet), et ainsi moduler les symptômes (jaune).

La virulence du satellite Y-sat du CMV est aussi reliée au mécanisme de silencing. En effet, une étude a montré que des plants de tabac exprimant la protéine de potyvirus Hc-Pro, suppresseur de PTGS, ne présentaient plus de symptômes spécifiques du CMV Y-sat, alors que les ARN du satellite sont toujours présents en grande quantité (Wang *et al.*, 2004). Un modèle de l'implication du silencing est proposé : la forme répliquative double-brin du satellite serait clivée par Dicer en siRNA. Ces siRNA seraient capables de cibler des messagers cellulaires, ce qui provoquerait l'apparition des symptômes. La forte structure secondaire des satellites les protégerait du mécanisme de silencing. Une telle hypothèse est également formulée pour la pathogénicité d'agents subviraux, les viroïdes.

Un tableau récapitulatif des interactions entre ARN satellites, virus et hôte par l'utilisation de l'ARN silencing a été proposé par Hu *et al.* (2009) (**figure III.13.**). Il montre que les trois protagonistes sont en compétition pour l'utilisation du mécanisme de l'ARN silencing à leur profit. Le plus adapté des trois peut cibler et dégrader un ARN précis, menant à sa survie et à la modulation des symptômes.

La diversité des ARN viraux non génomiques semble illimitée. Nous avons vu que les virus produisent des ARN subgénomiques par des mécanismes variés. Ils produisent également des ARN non codants, qui présentent des rôles importants dans l'infection virale. Certains sont clivés par des protéines virales, d'autres par des protéines cellulaires. De plus, des ARN subviraux dont le mode de synthèse est encore mal compris sont également souvent retrouvés en association avec des virus assistants. La production *de novo* d'ARN satellites sous pression de l'ARN silencing a récemment été proposée (Hajimorad *et al.*, 2009).

Les études à effectuer pour découvrir l'intégralité de l'inventivité des virus sont encore nombreuses. Ce chapitre de ma thèse portera sur l'étude du petit ARN-3 du BNYVV. Son mode d'expression, et son rôle au cours de l'infection virale ont été étudiés par différentes techniques, *in vivo* et *in vitro*.

II. Résultats : étude du mécanisme d'expression et du rôle du petit ARN-3 du BNYVV

2.1. Détection d'un ARN colinéaire à l'extrémité 3' de l'ARN-3 en contexte viral

Trois ARN subgénomiques colinéaires à l'extrémité 3' de l'ARN-2 du BNYVV ont été décrits (Gilmer *et al.*, 1992) : l'ARN-2 sub_a permet l'expression de la protéine de mouvement TGBp1 (triple gene block protein) ou p42, l'ARN-2 sub_b code pour les protéines TGBp2 (p13) et TGBp3 (p15), et enfin l'ARN-2 sub_c assure l'expression du suppresseur d'ARN silencing p14. Le mode de synthèse de ces ARN subgénomiques n'a pas encore été étudié.

L'ARN-3 quant à lui contient trois cadres de lecture : le premier permet l'expression de la protéine p25, un facteur de virulence traduit à partir de l'ARN génomique, et les deux autres sont des ORF putatifs codant potentiellement pour les protéines p6,8 (N) et p4,6 (S). Bien que les protéines N et S n'aient jamais été détectées, la surexpression de N dans un vecteur d'expression induit des nécroses, suggérant que N pourrait être une protéine fonctionnelle, mais qui n'est pas ou peu exprimée lors de l'infection virale naturelle (Jupin *et al.*, 1992). Son inactivation est sans conséquence sur l'infection locale et systémique. En revanche, la protéine S ne semble pas avoir de rôle particulier. L'introduction d'un codon stop prématuré ne modifie pas les symptômes, ni le mouvement à longue distance (Lauber *et al.*, 1998). Il semble donc que la protéine S ne soit pas exprimée lors de l'infection virale.

L'infection de feuilles de *C. quinoa*, *B. macrocarpa*, *B. vulgaris* ou *N. benthamiana* par un inoculum composé des ARN-1, -2 et -3 conduit à la détection par hybridation moléculaire d'un ARN colinéaire à l'extrémité 3' de l'ARN-3. Son extrémité 5' a été déterminée par "run-off transcription" : il comprend les 544 derniers nts de l'ARN-3 (1232 à 1776). Sa séquence contient l'intégralité de l'ORF de la protéine S et lui permettrait donc d'exprimer potentiellement cette protéine qui n'a jamais été détectée. Le rôle de cet ARN-3 subgénomique (ARN-3sub) n'est toujours pas compris.

Des analyses avaient été effectuées pour caractériser le promoteur putatif de cet ARN subgénomique. Une délétion de la séquence de 332 nts autour du +1 de transcription, de -87 à +245, réinsérée en amont dans l'ARN-3 provoque la disparition de l'ARN-3sub de taille sauvage, et induit la production d'un ARN-3sub de taille supérieure, correspondant à la taille d'un ARN dont le +1 de transcription serait placé précisément en amont. Cette séquence de 332 nts a donc été caractérisée comme promoteur de l'ARN-3sub (Balmori *et al.*, 1993).

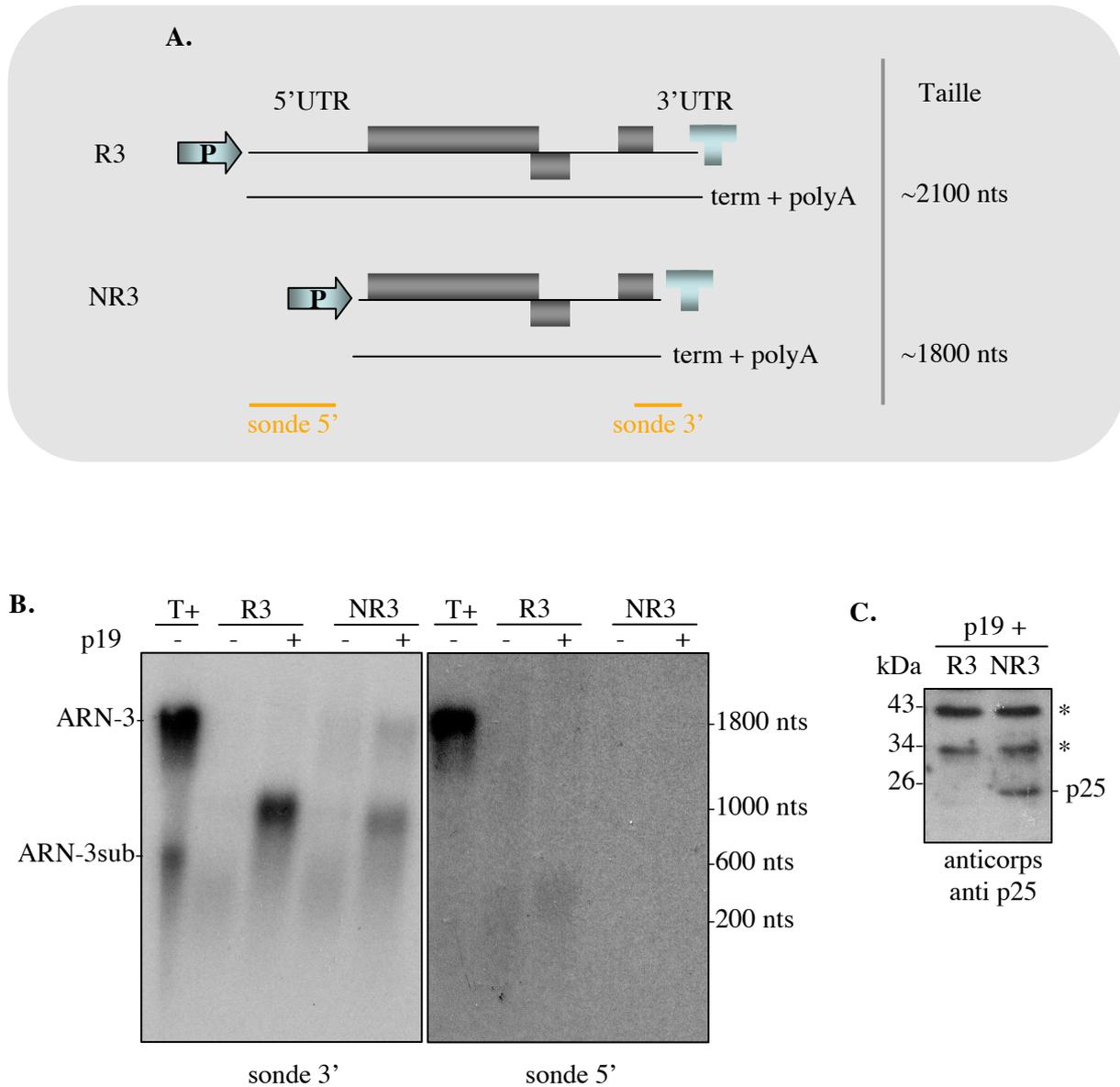


Figure III.14. : Expression transitoire des constructions R3 et NR3. **A.** Représentation schématique des constructions utilisées. Les rectangles représentent les cadres de lecture. P : promoteur ; TERM : terminateur ; polyA : queue polyadénylée. Sous les constructions, les traits indiquent les ARN transcrits. Leurs tailles respectives sont indiquées à droite. **B.** Analyse par northern blot des ARN totaux de feuilles infiltrées par les agrobactéries exprimant les constructions présentées en A en présence (+) ou en absence (-) de protéine p19. A gauche, la membrane est hybridée à l'aide d'une sonde ciblant la partie 3' de l'ARN-3, à droite, la sonde utilisée cible la séquence 5' UTR. **C.** Recherche par western-blot à l'aide d'un anticorps polyclonal de la protéine p25 dans les protéines totales de feuilles infiltrées par p19 additionné des constructions R3 ou NR3. Les quantités de protéines déposées sont identiques comme l'indiquent les bandes aspécifiques * correspondant à du bruit de fond.

Si le rôle de l'ARN-3sub n'est pas d'exprimer une protéine, la question est de savoir quel est son rôle ? De plus, rien n'indique que le mode d'expression est bien une initiation interne de la transcription (voir paragraphe I.1.2.1). Nous nous sommes alors intéressés à la compréhension du mécanisme de production de cet ARN-3sub.

2.2. L'expression transitoire de l'ARN-3 permet la synthèse de l'ARN-3sub

2.2.1. Analyse par northern-blot de l'ARN-3 exprimé transitoirement

Des vecteurs binaires permettant l'expression transitoire de l'ARN-3 entier (R3 pour répliatif), et de l'ARN-3 privé des séquences 5' (293 nts) et 3' (49 nts) UTR (NR3 pour non répliatif) ont été construits. L'agroinfiltration de ces constructions a été réalisée sur feuille de *N. benthamiana*, en présence ou en absence de la protéine p19, un suppresseur de silencing, afin d'améliorer l'expression des transgènes. Les ARN totaux extraits ont été analysés par northern blot, en utilisant des sondes spécifiques de la région 5' ou de la région 3' de l'ARN-3. Des ARN totaux extraits de lésions de *C. quinoa* infecté par les ARN-1, -2 et -3 du BNYVV ont également été déposés sur gel, et servent de marqueurs de position.

Les tailles attendues des ARN exprimés transitoirement sont supérieures à celles de l'ARN-3 viral sauvage, car les ARN correspondent à la séquence virale additionnée de la séquence terminateur de la transcription du vecteur d'expression (211 nts), et ont une queue polyadénylée supplémentaire. Ainsi, R3 et NR3 possèdent respectivement une taille théorique d'environ 2100 nts et 1800 nts, alors que l'ARN-3 viral sauvage a une taille d'environ 1800 nts, en incluant la séquence 3' polyadénylée (**figure III.14.A.**).

L'utilisation d'une sonde 5' révèle un signal correspondant à l'ARN-3 exprimé en contexte viral (**figure III.14.B.**). Aucun signal n'est détecté pour l'ARN-3sub, puisque la sonde 5' ne le cible pas. En ce qui concerne l'expression transitoire des ARN, aucun signal fort n'est détecté. On remarque toutefois de faibles bandes d'environ 200 nts dans le cas de R3 en présence ou en absence de p19. Dans le cas de NR3, la sonde utilisée ne permet pas de révéler l'ARN tronqué de la partie 5'.

En utilisant une sonde 3', qui révèle à la fois l'ARN-3 génomique mais également l'ARN-3sub, de forts signaux apparaissent pour R3 et NR3 en présence de p19 (**figure III.14, gauche**). Pour NR3 une bande co-migre avec l'ARN-3 génomique viral, d'environ 1800 nts, pouvant correspondre à l'ARN entier NR3. Dans le cas de R3, aucune bande à 2100 nts n'est détectée, indiquant que R3 entier n'est pas présent.

D'autre part, les protéines extraites des feuilles infiltrées ont également été analysées par western-blot à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine p25 du BNYVV. Alors que la construction NR3 permet l'expression de p25, la protéine n'est pas détectée avec la construction R3. Cela peut

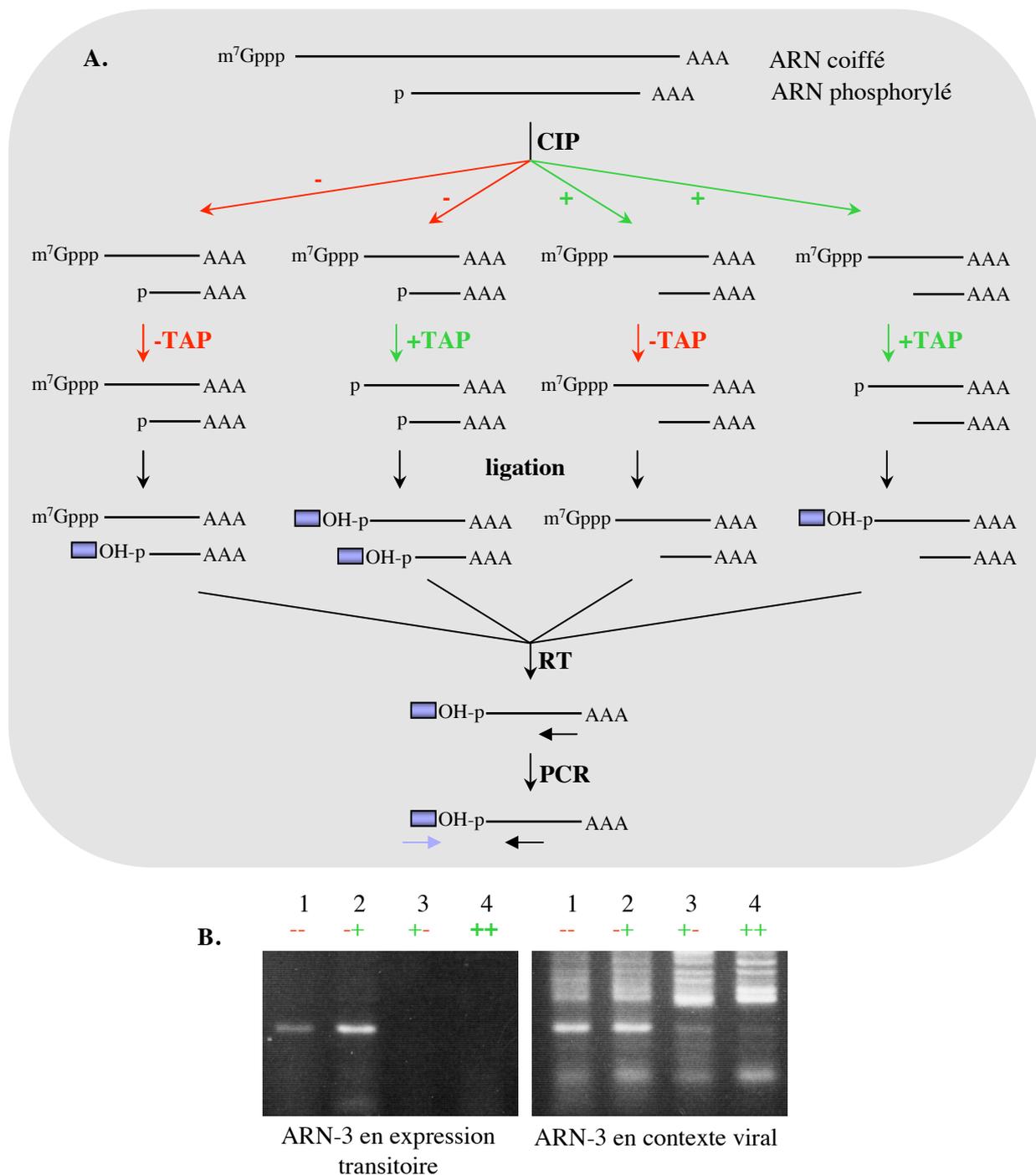


Figure III.15. : Utilisation de la technique du 5'RACE (Rapid Amplification cDNA End) pour caractériser les extrémités 5' d'ARN. **A.** Représentation schématique des réactions de 5'RACE attendues selon le traitement préalable des ARN avant réverse-transcription et amplification par PCR. Les quatre combinaisons de traitement CIP et TAP mènent à la production de différentes molécules dont l'extrémité 5' peut être ou non accessible à la ligation du linker. **B.** Résultats du 5'RACE obtenus après RT-PCR sur les ARN produits en expression transitoire (gauche) ou en contexte viral (droite). Les quatre pistes --, +-, +-, et ++ correspondent aux quatre combinaisons de la partie A. de la figure.

s'expliquer par la présence de l'ARN NR3 entier, alors que l'ARN R3 entier codant pour p25 n'est pas retrouvé.

Curieusement, des bandes d'environ 900 nts sont détectées pour R3 et NR3 en présence de p19. Ces signaux pourraient correspondre à des ARN-3sub possédant la séquence terminatrice de transcription exprimés à partir des ARN R3 et NR3 (respectivement 870 et 820 nts). L'ARN-3sub serait-il alors exprimé en contexte transitoire, sans l'aide des partenaires viraux impliqués dans la réplication ?

2.2.2. Caractérisation de l'extrémité 5' du fragment 3'

Afin de valider l'hypothèse de l'expression de l'ARN-3sub en contexte transitoire, nous avons voulu déterminer la position exacte du nt 5' terminal. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de 5'RACE, ou Rapid Amplification cDNA End. Cette méthode consiste en la ligation d'un oligoribonucléotide de séquence connue, appelé linker, en 5' d'un ARN. Une transcription inverse est réalisée en utilisant un oligonucléotide de séquence complémentaire à l'ARN d'intérêt. Des PCR sont ensuite réalisées, avec des oligonucléotides s'hybridant à la séquence complémentaire du linker, et à notre séquence d'intérêt (**figure III.15.**). Les produits de PCR sont alors clonés, séquencés et analysés. La séquence retrouvée directement en aval de la séquence du linker correspond à l'extrémité 5' de l'ARN.

La première étape, impliquant une ligation, ne fonctionne que sur un ARN muni d'une extrémité 5' phosphorylée. Une coiffe empêche la ligation du linker et ne permet pas l'amplification ultérieure. L'utilisation successive de deux enzymes permet une caractérisation plus fine de l'extrémité 5' : la CIP (Calf Intestinal alkaline Phosphatase) est capable de déphosphoryler l'extrémité 5', et la TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) peut cliver la coiffe des ARN. L'utilisation de différentes combinaisons de traitements avant l'étape de ligation du linker nous a permis de caractériser l'extrémité 5' des molécules, en indiquant d'une part leurs positions, et d'autre part si elles sont accessibles (coiffée ou non). La **figure III.15.A.** résume l'ensemble de ces étapes de caractérisation d'extrémités 5'.

Nous avons testé les échantillons d'ARN extraits des *N. benthamiana* infiltrées par R3 et des *C. quinoa* infectées par les ARN-1, -2 et -3. Ces échantillons ont été soumis aux quatre combinaisons de traitements (**figure III.15.A.**) : 1) sans CIP et sans TAP, 2) sans CIP et avec TAP, 3) avec CIP et sans TAP, et enfin 4) avec CIP et avec TAP. Si les ARN ne sont pas coiffés, les deux premières combinaisons permettront la ligation et donc des produits d'amplification après RT-PCR, alors que les deux dernières ne le permettront pas. Si l'extrémité 5' de l'ARN est coiffée, seules les combinaisons 2) et 4) permettront la ligation. Après ces traitements, la ligation et les étapes de transcription inverse et de PCR ont été réalisés à l'aide des oligonucléotides décrits en **figure III.16.** Les produits de PCR ont été analysés sur gel d'agarose (**figure III.15.B.**).

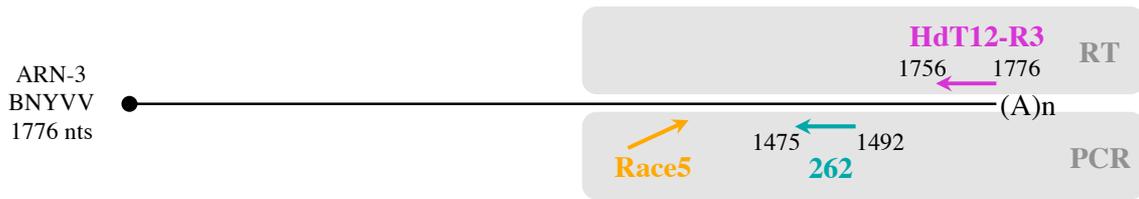


Figure III.16. : Oligonucléotides utilisés pour le 5'RACE ciblant l'ARN-3. Le trait noir représente l'ARN-3 du BNYVV. Les flèches rose et bleues correspondent aux oligonucléotides utilisés pour la reverse-transcription et la PCR respectivement. Les tailles et les positions d'hybridation sont indiquées. La flèche orange correspond à l'oligonucléotide de séquence identique au linker ARN ligué en 5' des ARN et qui sert à amplifier les ADNc obtenus.

5'RACE ARN-3 wt		
Position	Séquence	Nombre
1045	5'GUUUUAGAUGUGGAUAAUAAU...	1x
1061	5'AUAUGUUAUUCAGCCCCUG...	1x
1064	5'AUGUUAUUCAGCCCCUGACG...	1x
1070	5'UUCAAGCCCCUGACGUGUUG...	1x
1232	5'UCGUCCGAAGACGUUAAACU...	18x
1233	5'CGUCCGAAGACGUUAAACUA...	2x
1236	5'CCGAAGACGUUAAACUACAC...	1x
1282	5'AUUGUUUAACGGUGUCACGUU...	1x

5'RACE pBin R3		
Position	Séquence	Nombre
1231	5'AUCGUCCGAAGACGUUAAAC...	1x
1232	5'UCGUCCGAAGACGUUAAACU...	5x
1233	5'CGUCCGAAGACGUUAAACUA...	1x

Tableau III.1. : Séquences 5' terminales des ARN caractérisées par 5'RACE ciblant l'ARN-3 sur les ARN en contexte viral ou en expression transitoire. La position du premier nucléotide est indiquée. La séquence 5' terminale sur l'ARN-3 du BNYVV et le nombre de clones obtenus correspondant à ces positions sont précisés.

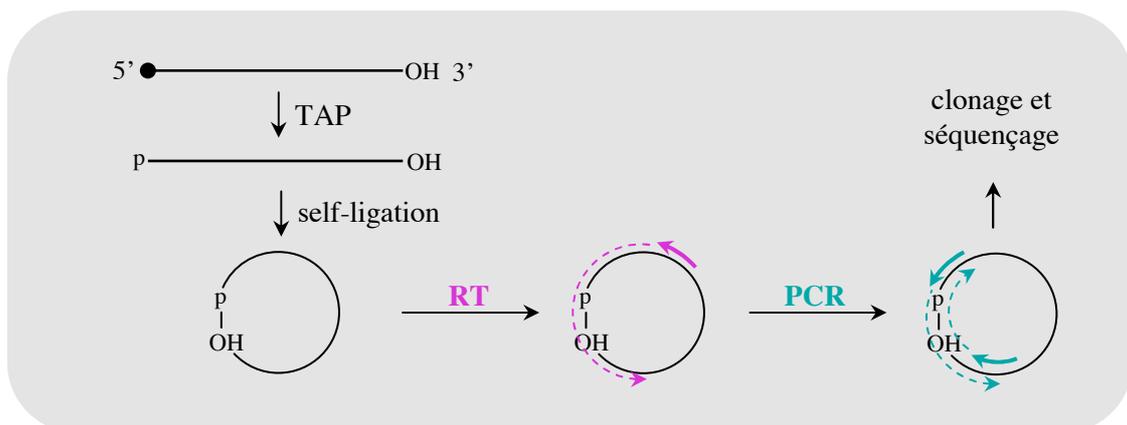


Figure III.17. : Technique de la cRT-PCR pour caractériser les extrémités 3' d'ARN. Les ARN totaux sont traités à la TAP afin d'éliminer la coiffe. L'étape ultérieure de ligation s'effectue dans des concentrations faibles en ARN afin de favoriser la circularisation des molécules. Une reverse-transcription est ensuite réalisée sur l'ARN circularisé, suivie d'une amplification par PCR. Les oligonucléotides utilisés sont spécifiques des séquences d'intérêt. Les produits d'amplification sont alors clonés et séquencés.

En contexte transitoire, une seule et même bande a été détectée dans les échantillons ayant subi les traitements 1) et 2), alors qu'aucun signal n'est visible pour les traitements 3) et 4) (**figure III.15.B. gauche**). Ce résultat indique que l'ARN n'est pas pourvu d'une coiffe à son extrémité 5'.

En contexte viral, une multitude de bandes apparaissent dans les 4 traitements. Pourtant, une bande est majoritaire dans les pistes 1) et 2) (**figure III.15.B. droite**). Cette bande présente une taille identique aux bandes retrouvées en contexte transitoire, suggérant une même origine. Tout comme en expression transitoire, ces ARN ne sont pas coiffés en 5'.

Les bandes ont été découpées sur gel, et clonées dans un vecteur pGEM-T pour être ensuite séquencées. L'analyse de 36 séquences de l'ARN-3 en contexte viral indique qu'il existe plusieurs populations différentes d'extrémité 5' dont une majoritaire, retrouvées entre les positions 1045 et 1282 (**tableau III.1.**): les positions 1045, 1061, 1064, 1070, 1236 et 1242 sont retrouvées une seule fois. L'extrémité 5' de l'ARN-3sub a également été retrouvée pour deux clones en position 1233. Toutefois, la population majoritaire correspond à une extrémité 5' située en position 1232 de l'ARN-3 et retrouvée 18 fois (**tableau III.1.**) dont un fragment cloné renferme également une séquence hétérologue très proche de l'ARN ribosomique 18S de *Coffea arabica* (analyse par blast). Cette séquence a pu s'insérer entre le linker et l'extrémité de l'ARN lors de l'étape de ligation, et constitue vraisemblablement un artefact.

En expression transitoire, sept clones ont été analysés : l'extrémité 5' majoritaire est retrouvée en position 1232 pour cinq d'entre eux, et deux autres clones correspondent aux positions 1231 et 1233.

En contexte viral, comme en expression transitoire, nous avons retrouvé des ARN dérivés de l'ARN-3 qui possèdent une extrémité 5' similaire dans les deux cas. Un tel résultat confirme que l'expression de l'ARN-3sub est possible hors contexte viral. Pourtant, l'expression des ARN subgénomiques nécessite des facteurs viraux : la réplicase virale doit être présente pour synthétiser à la fois le brin (-) ou une partie du brin (-) de l'ARN génomique, qui servira de matrice à la synthèse de l'ARN subgénomique (voir introduction). De plus, un tel ARN subgénomique synthétisé par la réplicase virale devrait porter une coiffe à son extrémité 5', à l'image des ARN génomiques du BNYVV.

Comment expliquer la détection de l'ARN-3sub non coiffé hors contexte viral en absence de réplicase virale ? Nous avons supposé que l'ARN-3 subissait un clivage, suivi d'une stabilisation du fragment 3'. Le site de clivage est inconnu, mais nous pouvons supposer qu'il ait lieu en amont de l'extrémité de l'ARN-3sub. En effet, nous avons certes détecté un site majoritaire de l'extrémité 5' de l'ARN-3sub, mais également d'autres positions. Cela indique que le clivage ne se produit pas en un site spécifique entre deux nts précis comme le ferait une endonucléase spécifique, mais plutôt en amont. Le fragment 3' précurseur potentiel de l'ARN-3sub pourrait ensuite être dégradé progressivement jusqu'à la position préférentielle 1232 qui serait stabilisée.

Le fragment 5' issu du clivage et dont la taille hypothétique serait de 1232 nts n'est pas retrouvé par northern blot, et serait donc dégradé. Rappelons que nous avons détecté un fragment 5' d'environ

cRT-PCR ARN-3 wt		
Position	Séquence	Nombre
89	...GCCUGUTGGGUUCCUGACC-3'	1x
94	...UUGGGUUUCCUGACCGACCA-3'+CCG	1x
96	...GGGUUCCUGACCGACCAAA-3'	1x
97	...GGUUUCCUGACCGACCAAAU-3'+AG	1x
97	...GGUUUCCUGACCGACCAAAU-3'+G	1x
100	...UCCUGACCGACCAAAUCCA-3'	1x
100	...UCCUGACCGACCAAAUCCA-3'+G	1x
101	...UCCUGACCGACCAAAUCCA-3'	3x
102	...CCUGACCGACCAAAUCCAAG-3'	1x
103	...CUGACCGACCAAAUCCAAGC-3'	1x
110	...ACCAAUCCAAGCGAGCUUA-3'+G	1x
212	...UAGACAUUUACGAACGCUU-3'+G	1x

cRT-PCR pBin R3		
Position	Séquence	Nombre
91	...CUGUUGGGUUUCCUGACCGA-3'	2x
96	...GGGUUCCUGACCGACCAAA-3'	1x
97	...GGUUUCCUGACCGACCAAAU-3'	1x
101	...UCCUGACCGACCAAAUCCA-3'	1x
106	...ACCGACCAAAUCCAAGCGAG-3'	1x
108	...CGACCAAAUCCAAGCGAGCU-3'	2x
109	...GACCAAAUCCAAGCGAGCUU-3'	1x
111	...CCAAUCCAAGCGAGCUUAA-3'	1x
112	...CAAUCCAAGCGAGCUUAAU-3'	1x
115	...AUCCAAGCGAGCUUAAUCCA-3'	1x
116	...UCCAAGCGAGCUUAAUCCA-3'	1x
122	...CGAGCUUAAUCCAAGUACCU-3'	1x
162	...GUGAAUAGCAUAGUGACUC-3'	1x
163	...UGAAUAGCAUAGUGACUCC-3'	1x
172	...AUAGUGACUCCAUCGUUUA-3'	2x
182	...CAUCGUUUCAGGGUAGUUGA-3'	3x
185	...CGUUCAGGGUAGUUGACGG-3'	1x
186	...GUUCAGGGUAGUUGACGGC-3'	1x
190	...CAGGGUAGUUGACGGCUAUU-3'	1x
192	...GGGUAGUUGACGGCUAUUAA-3'	1x
193	...GGUAGUUGACGGCUAUUAAU-3'	2x
194	...GUAGUUGACGGCUAUUAAUA-3'	1x
196	...AGUUGACGGCUAUUAAUAGA-3'	1x
197	...GUUGACGGCUAUUAAUAGAC-3'	1x
198	...UUGACGGCUAUUAAUAGACA-3'	1x
214	...GACAUUUACGAACGCUUCU-3'	1x
303	...UUUUGAAUUCUAUUCUUCG-3'	1x

Tableau III.2. : Résultats des analyses des séquences obtenues après amplification PCR de fragments issus d'ADNc produits suite à la reverse-transcription d'ARN circulaires (cRT-PCR) obtenus en contexte viral (ARN-3 wt) ou transitoire (pBin R3). La position sur l'ARN-3 du dernier nucléotide détecté est indiquée. Les séquences 3' terminales des fragments et le nombre de clones correspondant à ces positions sont précisés.

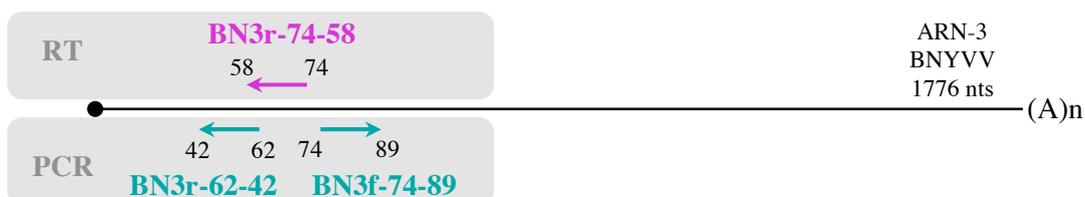


Figure III.18. : Oligonucléotides utilisés pour la cRT-PCR ciblant l'ARN-3. Le trait noir représente l'ARN-3 du BNYVV. Les flèches rose et bleues correspondent aux oligonucléotides utilisés pour la reverse-transcription et la PCR respectivement. Leur orientation et les positions d'hybridation sont précisées par rapport à la séquence de l'ARN-3.

200 nts par northern blot dans le cas de R3+p19, qui pourrait correspondre à une dégradation du fragment 5' produit suite au clivage de l'ARN-3 (**figure III.14.B.**).

2.2.3. Recherche des fragments 5' putatifs par cRT-PCR

Afin de valider notre hypothèse, nous avons procédé à la recherche du fragment 5' par transcription réverse d'ARN circularisé et amplification par PCR (cRT-PCR) (**figure III.17.**). La technique de cRT-PCR permet de caractériser les extrémités 3' des ARN. Elle consiste en la circularisation des ARN par ligation des extrémités 3' et 5' d'un même brin. Une transcription inverse est réalisée en utilisant un oligonucléotide complémentaire à la région 5' de l'ARN qui se prolonge ainsi sur la partie 3' du fragment circularisé. Une amplification par PCR est ensuite effectuée en utilisant des oligonucléotides correspondant aux séquences 5' et 3' de l'ARN en orientation opposée (dans le cas de l'ARN-3, les oligonucléotides utilisés sont décrits en **figure III.18.**). Les produits d'amplification sont déposés sur gel, clonés et séquencés.

La caractérisation de fragments 5' d'ARN-3 présents en contexte viral indique dix positions différentes d'extrémités 3', retrouvées entre les positions 89 et 212 (**tableau III.2.**). Les positions 89, 94, 96, 102, 103, 110 et 212 ne sont retrouvées qu'une seule fois. Les sites 97 et 100 sont retrouvés deux fois, et la position 101 est détectée 3 fois. Étonnamment, des séquences additionnelles sont parfois détectées, entre les extrémités 3' et 5'. Il s'agit de petits motifs CCG, AG, ou G. Si des enzymes sont capables d'ajouter des nts en 3' d'ARN aberrants, il s'agit principalement de polyadénylations (Lange *et al.*, 2009). Toutefois, les mécanismes de la dégradation des ARN aberrants ne sont pas complètement élucidés. Les nts additionnels retrouvés dans cette expérience pourraient diriger les ARN vers une nouvelle voie de dégradation.

La même expérience a été menée pour l'ARN-3 exprimé transitoirement dans les feuilles de *N. benthamiana*. Vingt-sept positions différentes ont été retrouvées (**tableau III.2.**), dont trois sont redondantes avec celles retrouvées sur l'ARN-3 en contexte viral (96, 97 et 101). La majorité des positions n'est retrouvée qu'une fois, mais les sites 91, 108, 172 et 193 sont détectés deux fois, et la position 182 est retrouvée trois fois. Comme dans le cas de l'ARN-3 en contexte viral, aucune position majoritaire n'est retrouvée quand l'ARN-3 est exprimé transitoirement. Il faut noter ici qu'aucun nt additionnel n'est retrouvé.

Ces résultats indiquent que l'ARN-3 exprimé transitoirement se comporte de la même manière que l'ARN-3 en contexte viral. Dans les deux cas, les fragments 5' retrouvés peuvent être des produits de dégradation de l'ARN-3, ou des produits de synthèse inachevée. Cependant, ces deux populations impliquent des ARN polymérases différentes. En contexte viral, c'est la RdRp virale qui produit l'ARN-3 au niveau du cytoplasme, alors qu'en expression transitoire c'est l'ARN polymérase II cellulaire qui effectue cette fonction mais au niveau nucléaire.

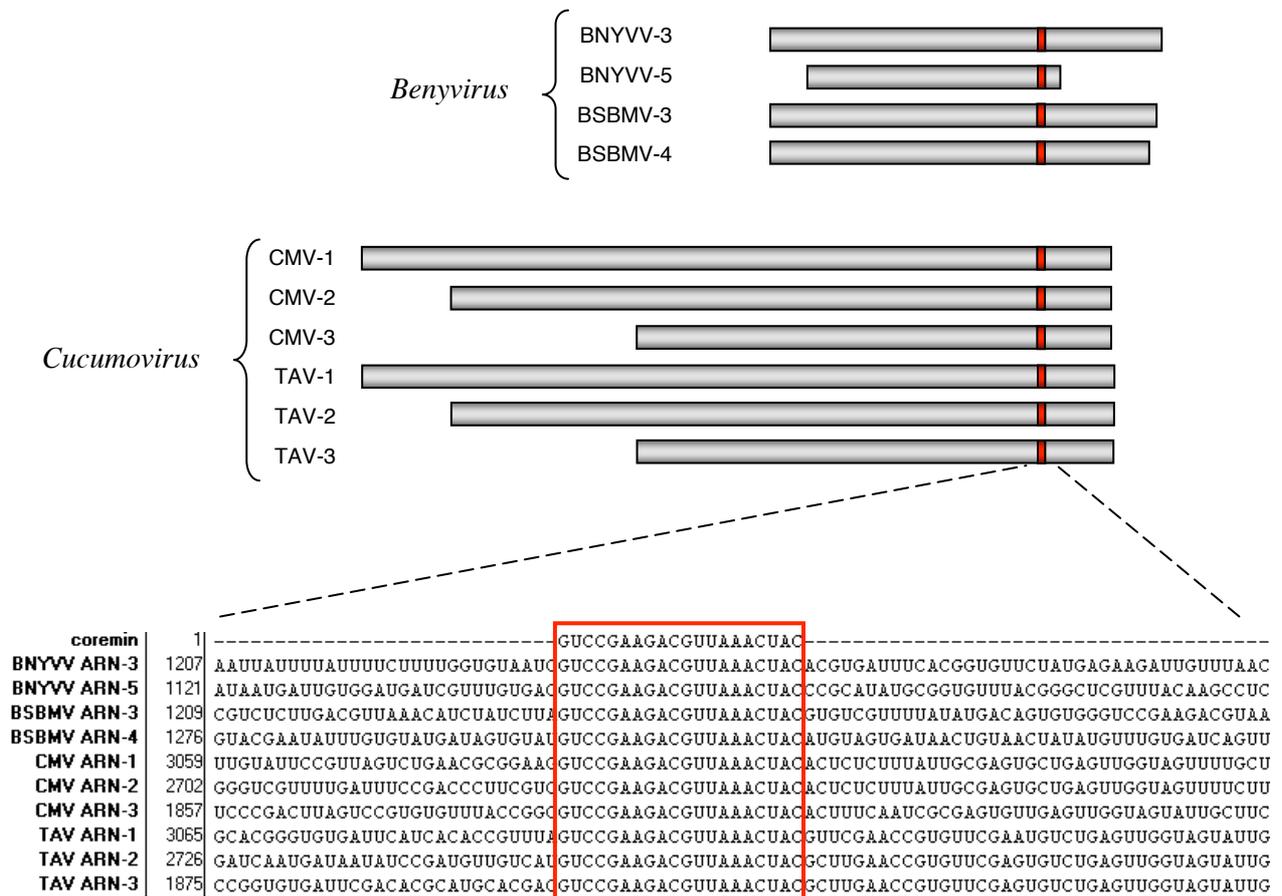


Figure III.19. : Conservation de la séquence coremin sur le génome de plusieurs virus. La position de la séquence coremin sur chaque ARN génomique viral (rectangle gris) est indiquée par un trait rouge. Les séquences coremin sont encadrées en rouge.

Ces résultats vont dans le sens de notre hypothèse de départ, à savoir une dégradation de l'ARN-3 jusqu'à une position stable produisant l'ARN-3sub. Cette dégradation peut se produire à partir de l'extrémité 5' ou suite à un clivage interne suivi de l'action d'exonucléases 5'→3' et 3'→5' pouvant expliquer la présence des petits ARN. Si les résultats sont proches dans les deux cas, les exonucléases impliquées peuvent différer puisque la localisation cellulaire en contexte viral est supposée être cytoplasmique, alors que l'ARN exprimé en contexte transitoire peut être nucléaire.

2.3. Séquence coremin : une séquence multifonctions

2.3.1. Conservation d'une séquence de 20 nucléotides en amont de l'extrémité 5' de l'ARN-3sub, appelée coremin

Nous avons montré que l'ARN-3sub n'est pas coiffé et précisé son extrémité exacte en position 1232. Cette position diffère du site initialement identifié situé en position 1230 (Balmori *et al.*, 1993). La position 1232 est localisée deux nts en amont d'une séquence conservée nommée "coremin", et dont la séquence ribonucléotidique est la suivante : 5'-GUCCGAAGACGUUAAACUAC-3'. Coremin est retrouvée dans la séquence 3'UTR d'un autre ARN du BNYVV, l'ARN-5, en position 1149 à 1168. Un autre membre du genre Benyvirus, le BSBMV (*Beet soil borne mosaic virus*), comporte également cette séquence sur les ARN-3 et -4, en position 1237 à 1256 et en position 1304 à 1323, respectivement. Enfin, coremin est également retrouvée sur les ARN-1, -2 et -3, (en positions 3087-3106, 2730-2749, et 1885-1904, respectivement) des CMV de groupe II, et d'un autre cucumovirus, le TAV (en positions 3093-3112, 2754-2773, 1903-1922, respectivement) (**figure III.19**).

Parallèlement à mon travail de thèse, d'autres laboratoires se sont intéressés à cette séquence particulière sur le génome du CMV (de Wispelaere and Rao, 2009). Les CMV de groupe II synthétisent un ARN-5 considéré comme un ARN subgénomique. En réalité, l'ARN-5 comprend une population d'ARN contenant les séquences des ARN-1, -2 et -3, indiquant qu'il dérive de ces trois ARN génomiques. Des études ont permis de montrer que la séquence box1 du CMV (= coremin), est impliquée dans l'accumulation de l'ARN-5 du CMV (de Wispelaere and Rao, 2009). L'analyse des séquences de l'ARN-5 a révélé que son extrémité 5' est positionnée deux nts en amont de la séquence box1. De plus, une étude structurale en solution et des analyses bioinformatiques ont permis de déterminer que les 12 premiers nts de box1 sont impliqués dans la formation d'une structure secondaire en tige-boucle (Thompson *et al.*, 2008).

Cette conservation de séquence entre genres distincts de virus nous a poussés à rechercher une fonction particulière de ce motif. Chez le BNYVV, la séquence coremin est située à la fois dans le "promoteur" putatif de l'ARN-3 (1147-1479) (Balmori *et al.*, 1993), mais également dans la région de

5'RACE ARN-5 BNYVV		
Position	Séquence	Nombre
1146	5'-ACGUCCGAAGACGUUAAAACU	8x
1147	5'-CGUCCGAAGACGUUAAAACUA	1x
1162	5'-AACUACCCGCAUAUGCGGUG	1x

5'RACE ARN-3 BSBMV		
Position	Séquence	Nombre
1234	5'-UAGUCCGAAGACGUUAAAACU	5x
1235	5'-AGUCCGAAGACGUUAAAACUA	2x
1239	5'-CGAAGACGUUAAAACUACGUG	1x
1260	5'-CGUUUUUAUGACAGUGUGG	1x
1261	5'-GUUUUAUUAUGACAGUGUGG	1x
1267	5'-UAUGACAGUGUGGUGCCGAA	1x
1279	5'-GGUCCGAAGACGUAAAACUA	1x

cRT-PCR ARN-5 BNYVV		
Position	Séquence	Nombre
119	...GUACUUUUUCGACUACCUCA-3'+GG	1x
120	...UACUUUUUCGACUACCUCAA-3'	1x
121	...ACUUUUUCGACUACCUCAAU-3'	1x
122	...CCUUUUUCGACUACCUCAAUU-3'	1x
123	...CUUUUCGACUACCUCAAUUU-3'	1x
124	...UUUUCGACUACCUCAAUUUG-3'+G	1x
125	...UUUCGACUACCUCAAUUUGA-3'+G	1x
134	...CCUCAAUUUGAAAACGAGUG-3'+G	1x
142	...UGAAAACGAGUGUAAAAGUAA-3'+G	1x
143	...GAAAACGAGUGUAAAAGUAAA-3'+GG	1x
177	...ACAAAAUAGCCCUCAUAC-3'+G	1x
188	...CCUCAUACGGUACGAUUUA-3'	2x
190	...UCCAUACGGUACGAUUUAUA-3'+GG	1x
195	...ACGGUACGAUUUAUAUCAU-3'	1x

cRT-PCR ARN-3 BSBMV		
Position	Séquence	Nombre
195	...GGGUAGUUGAGCGUUUUGC-3'	1x
196	...GGUAGUUGAGCGUUUUGCA-3'	2x
199	...AGUUGAGCGUUUUGCAUCA-3'	1x
204	...AGCGUUUUGCAUCAAGUUA-3'	2x
204	...AGCGUUUUGCAUCAAGUUA-3'+G	1x
205	...GCGUUUUGCAUCAAGUUAU-3'	1x
206	...CGUUUUGCAUCAAGUUAUU-3'	1x
207	...GCUUUUGCAUCAAGUUAUA-3'	1x

Tableau III.3. : Séquences 5' et 3' terminales des ARN caractérisées par 5'RACE et par cRT-PCR, ciblant l'ARN-5 du BNYVV et l'ARN-3 du BSBMV en contexte viral. Pour le 5'RACE, la position du premier nucléotide est indiquée. La séquence 5' terminale sur l'ARN et le nombre de clones obtenus correspondant à ces positions sont précisés. Pour la cRT-PCR, la position sur l'ARN du dernier nucléotide détecté est indiquée. Les séquences 3' terminales des fragments et le nombre de clones correspondant à ces positions sont précisés.

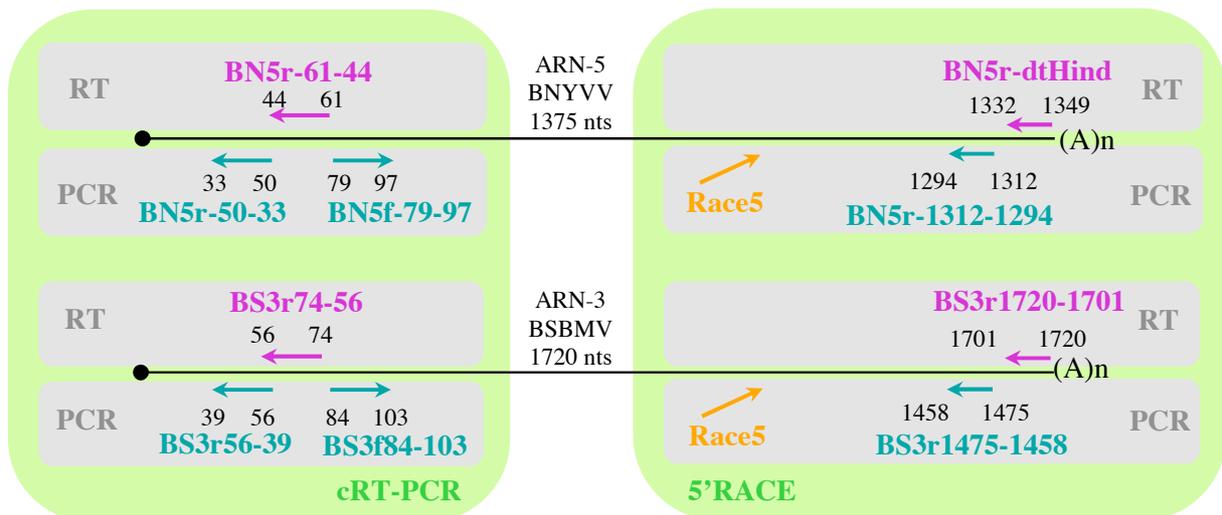


Figure III.20. : Oligonucléotides utilisés pour les 5'RACE et les cRT-PCR ciblant l'ARN-5 du BNYVV et l'ARN-3 du BSBMV. Le trait noir représente l'ARN. Les flèches rose et bleues correspondent aux oligonucléotides utilisés pour la réverse-transcription et la PCR respectivement. Leur orientation et les positions d'hybridation sont précisées par rapport à la séquence des ARN. Les flèches orange correspondent à l'oligonucléotide de séquence identique au linker ARN ligué en 5' des ARN et qui sert à amplifier les ADNc obtenus.

l'ARN-3 impliquée dans le mouvement à longue distance du BNYVV sur *B. macrocarpa* (1033-1266) (Lauber *et al.*, 1998).

2.3.2. La séquence coremin des ARN-5 du BNYVV et ARN-3 du BSBMV

Les ARN-5 du BNYVV et l'ARN-3 du BSBMV portent tous les deux la séquence conservée coremin. Les isolats disponibles au laboratoire ont permis de mener des infections virales sur feuille de *C. quinoa* : les ARN-1, -2 du BNYVV ont été coinoculés avec d'une part l'ARN-5 du BNYVV, et d'autre part l'ARN-3 du BSBMV (Ratti *et al.*, 2009). Les ARN totaux issus de lésions locales ont été extraits et analysés par 5'RACE à l'aide des oligonucléotides décrits en **figure III.20.** Seuls des fragments non coiffés ont pu être amplifiés. Ces fragments ont été clonés et séquencés. Les séquences 5'RACE correspondent à des fragments 3' de l'ARN-5 positionnés à partir des nts 1146 (8 clones), 1147 (1 clone) et 1162 (1 clone) (**tableau III.3.**). Ici encore, la position retrouvée majoritairement est localisée deux nts en amont de la séquence coremin. Ainsi nous avons pu montrer que l'ARN-5 produit lui aussi un ARN non codant de 229 nts dont l'extrémité 5' contient la séquence coremin.

La même approche a été conduite sur l'ARN-3 du BSBMV. Le séquençage de douze clones a révélé l'existence de sept extrémités 5' situées entre les nts 1234 et 1279 (**tableau III.3.**). La position 1234 est la plus représentée (retrouvée 5 fois) et se situe également à deux nts en amont de la séquence coremin de l'ARN-3 du BSBMV (1236-1255).

Des expériences de cRT-PCR ont ensuite été réalisées sur les mêmes échantillons d'ARN, à l'aide des oligonucléotides décrits en **figure III.20.** Dans le cas de l'ARN-5 du BNYVV, 14 extrémités 3' ont été détectées de 119 à 195. Pour l'ARN-3 du BSBMV, huit sites différents sont retrouvés, de 195 à 207 sans aucune position majoritaire.

Ces résultats rappellent ceux obtenus avec l'ARN-3 du BNYVV et nous laissent envisager un mode de production identique de ces petits ARN non codants, qui impliquerait un clivage de l'ARN viral et sa dégradation par des exonucléases jusqu'à des sites de stabilisation.

Dans le laboratoire, des tests de complémentation fonctionnels entre le BNYVV et le BSBMV avaient été réalisés. La coinoculation des ARN-1 et -2 du BNYVV et de l'ARN-3 du BSBMV complémente à 70% le mouvement à longue distance du virus sur *B. macrocarpa* (Ratti *et al.*, 2009). Ainsi, un ARN distinct de l'ARN-3 du BNYVV portant la séquence coremin, et pris en charge par la réplicase du BNYVV, est capable de compléter le mouvement à longue distance médié habituellement par l'ARN-3, et en particulier par la séquence 1033-1266. Si les ARN-3 du BSBMV et du BNYVV possèdent des extrémités 5' et 3' similaires, seule la séquence coremin est conservée dans la région interne. En effet, les séquences de l'ARN-3 du BSBMV et de sa protéine p29 sont plus proches des séquences de l'ARN-5 du BNYVV et de sa protéine p26 que de l'ARN-3.

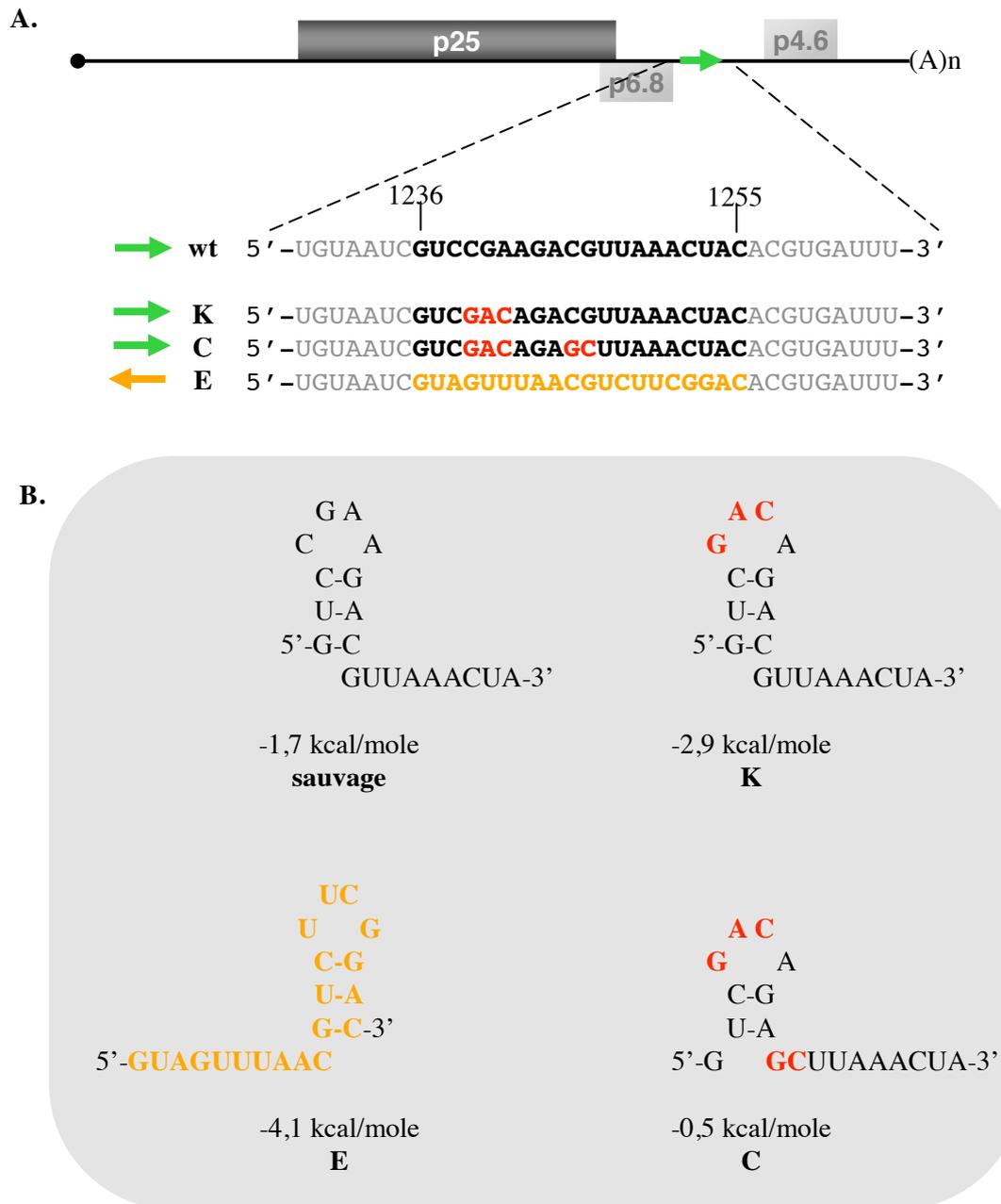


Figure III.21. : Mutations introduites dans la séquence coremin de l'ARN-3. **A.** Seules les séquences du motif coremin et des nucléotides proches sont montrées. Les positions 5' et 3' de la séquence coremin sont précisées. Les nucléotides conservés dans la séquence coremin par rapport à l'ARN sauvage sont représentés en noir. Les mutations sont indiquées en rouge. Les nucléotides en orange correspondent au reverse-complément de la séquence coremin. Les flèches indiquent l'orientation de la séquence coremin. **B.** Structure prédite par M-fold des séquences coremin des ARN mutants. Les énergies libres ΔG (kcal/mole) sont indiquées.

Nous avons également pu montrer que l'ARN-5 du BNYVV ajouté aux ARN-1 et -2 du même virus permet un mouvement systémique effectif dans moins de 5% des cas (résultat non montré).

Les trois ARN des benyvirus comportant la séquence coremin permettent l'accumulation de fragments d'ARN 3', dont l'extrémité est située deux nts en amont de ladite séquence coremin. De plus, ils permettent le mouvement à longue distance du virus, avec plus ou moins d'efficacité. Dans le cas de l'ARN-3 du CMV, les résultats décrits par Thompson *et al.* montrent qu'une mutation qui affecte la structure de la séquence box1 retarde l'infection du CMV sur *N. tabacum* et pourrait agir sur la pathogénicité du CMV (Thompson *et al.*, 2008). Il faut rappeler que deux autres motifs box1 sont présents sur les ARN génomiques -1 et -2, et qu'ils peuvent avoir des rôles redondants. Nous avons donc émis l'hypothèse que la séquence coremin pourrait être impliquée dans le mouvement à longue distance des benyvirus sur l'hôte naturel. Afin de confirmer l'implication de la séquence coremin dans ce processus, nous avons effectué une mutagenèse de la séquence coremin de l'ARN-3 du BNYVV.

2.3.3. Mutagenèse de la séquence coremin sur l'ARN-3 du BNYVV

La séquence coremin est située dans une région non-traduite. Les mutations que nous avons choisi d'introduire n'affectent que l'ARN. En nous basant sur les analyses M-fold de la séquence box1 (coremin) et de la structure publiée (Thompson *et al.*, 2008), nous avons créé trois mutants affectant plus ou moins fortement la tige-boucle (**figure III.21.**). Le mutant K comporte trois mutations dans la boucle (CGA→GAC), conduisant à une énergie libre ΔG de -2,9 kcal/mole, plus forte que le sauvage (-1,7 kcal/mole). Le mutant C possède également cette mutation, additionnée de deux substitutions (CG→GC) qui déstabilisent la tige et diminue l'énergie ΔG à -0,5 kcal/mole. Enfin, le mutant E comporte la séquence reverse complémentaire à la séquence coremin, qui se retrouve alors sur le brin antigénomique de l'ARN-3. La séquence reverse de coremin peut toujours adopter une structure en tige-boucle très stable (-4,1 kcal/mole) mais qui se trouve cependant décalée sur la séquence car ce sont les nts 3' de coremin qui sont impliqués. La séquence de la tige-boucle E est également différente de celle du sauvage.

a) Rôle de coremin sur l'accumulation de la protéine p25

L'ARN-3 sauvage et ses trois formes mutées ont été inoculés en présence des ARN-1 et -2 sur feuille de *C. quinoa*. L'observation visuelle des lésions n'a pas révélé de différence significative des symptômes sept jours post-infection (non montré), suggérant que l'expression de la protéine p25 avait toujours lieu. Comme nous le verrons plus loin, les mutations introduites n'affectent pas l'accumulation de l'ARN-3. L'analyse moléculaire des protéines a été réalisée sur des lésions locales individuelles. Chaque piste des gels représente une lésion unique (**figure III.22.**). Les quantités de protéines totales déposées sont identiques (**figure III.22.A. panneau du bas à droite**), tout comme

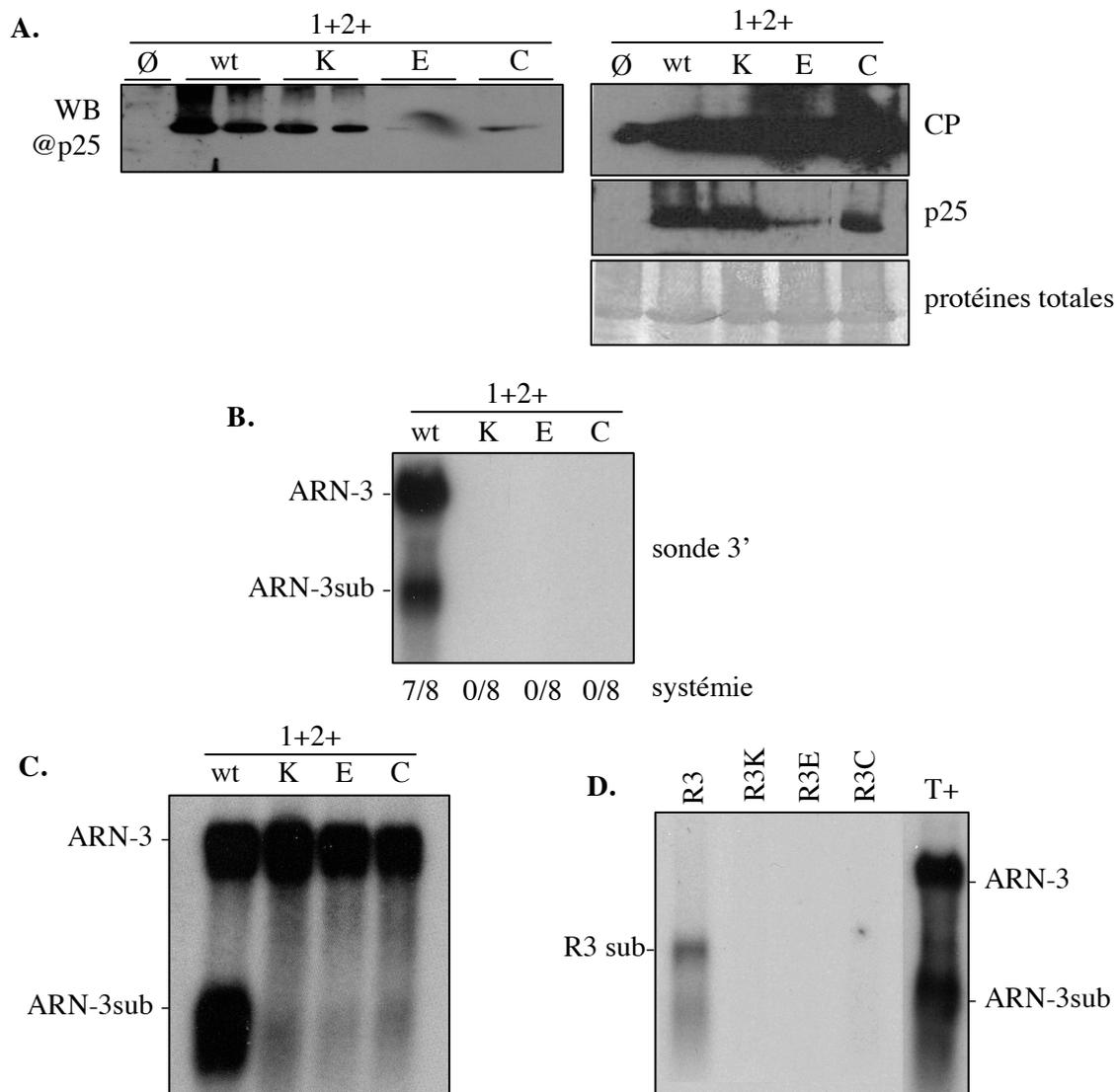


Figure III.22. : Effet des mutations de la séquence coremin de l'ARN-3 sur l'infection virale.
A. Western blot anti p25 sur les protéines extraites des feuilles de *C. quinoa* infectées par les ARN-1, -2 et -3 sauvage et mutés. Chaque piste représente une lésion locale. **B.** Analyse par northern-blot à l'aide d'une sonde 3' des ARN extraits des feuilles supérieures de *B. macrocarpa* infectées par les ARN-1, -2 et -3 sauvage et mutés. Le nombre de plantes présentant des symptômes de systémie est indiqué sous la photo. **C.** Analyse par northern-blot des ARN extraits des lésions de *C. quinoa* infectées par les ARN-1, -2 et -3 sauvage et mutés (sonde 3'). **D.** Analyse par northern-blot des ARN extraits des *N. benthamiana* infiltrées par les constructions R3, R3K, R3E et R3C. Des ARN de feuille de *C. quinoa* infectées par les ARN-1, -2 et -3 servent de témoin de taille.

l'accumulation de la protéine CP codée par l'ARN-2 (**figure III.22.A. panneau du milieu à droite**), ce qui signifie que les échantillons sont comparables l'un à l'autre. Nous avons ainsi pu constater que les mutations E et C induisaient une forte diminution de la quantité de protéine p25 synthétisée (**figure III.22.A. panneau gauche et haut à droite**). Par contre, la mutation K, qui affecte uniquement la boucle de coremin, est sans effet puisque la protéine p25 est détectée à des taux comparables au sauvage. Ces résultats suggèrent que les nts situés dans la boucle ne sont pas importants pour l'accumulation efficace de la protéine p25, mais que la stabilité de l'hélice tout comme sa position sont essentiels. La séquence coremin serait donc nécessaire à la bonne expression de la protéine p25, par régulation de la synthèse ou de la stabilité de la protéine. Il faut cependant rappeler que la protéine p25 est efficacement exprimée dans un système réplicon, en absence de séquence coremin en aval de l'ORF. La stabilité de la protéine p25 n'est donc pas dépendante de coremin. En revanche, la traduction de la protéine p25 dans le contexte sauvage de l'ARN-3 semble nécessiter une structure impliquant l'hélice de coremin. De telles séquences ribonucléotidiques 3' régulatrices, appelées TPP riboswitch (thiamine pyrophosphate) ont été décrites comme capables de réguler l'expression d'ORF situées en amont chez les plantes (Bocobza and Aharoni, 2008). Enfin, l'absence de différences de symptômes sur feuilles de *C. quinoa* suggère que seule une faible expression de la protéine p25 suffit à induire des chloroses jaunes.

b) Rôle de coremin sur le mouvement systémique viral

L'ARN-3 et la séquence core renfermant coremin jouent un rôle dans le mouvement à longue distance du BNYVV. Afin d'analyser le rôle de coremin sur le mouvement systémique, nous avons infecté des plantes *B. macrocarpa*, qui, rappelons-le permettent une infection généralisée par le BNYVV en présence d'ARN-3. Chaque mutant associé aux ARN-1 et -2 a été inoculé à huit plantes. Les symptômes ont été observés 21 jours après l'inoculation. En présence de l'ARN-3 sauvage, les symptômes caractéristiques de systémie sont visibles sur 7 des 8 plantes inoculées. Aucune plante présentant des symptômes de systémie n'a été obtenue suite à l'infection des mutants de l'ARN-3 (0/8) (**figure III.22.B.**). L'absence de symptômes pouvant s'expliquer par la faible expression de la protéine p25, nous avons recherché les ARN viraux dans les feuilles supérieures par hybridation moléculaire. Si l'ARN-3 et l'ARN-3sub sont détectés dans les feuilles supérieures des plantes inoculées par l'ARN-3 sauvage, aucun ARN viral n'est détecté dans les plantes infectées par les ARN-3 mutés (**figure III.22.B.**). Seule la mutation de trois nts dans la boucle suffit à prévenir le mouvement à longue distance. Ces résultats indiquent que l'intégrité de la séquence coremin est requise pour assurer le mouvement à longue distance du virus.

c) Rôle de coremin sur l'accumulation de l'ARN-3sub

Nous avons bien entendu analysé l'effet des mutations introduites sur l'accumulation de l'ARN-3sub. Les ARN totaux issus des lésions locales de *C. quinoa* infectées par les ARN-3 sauvages et mutés ont

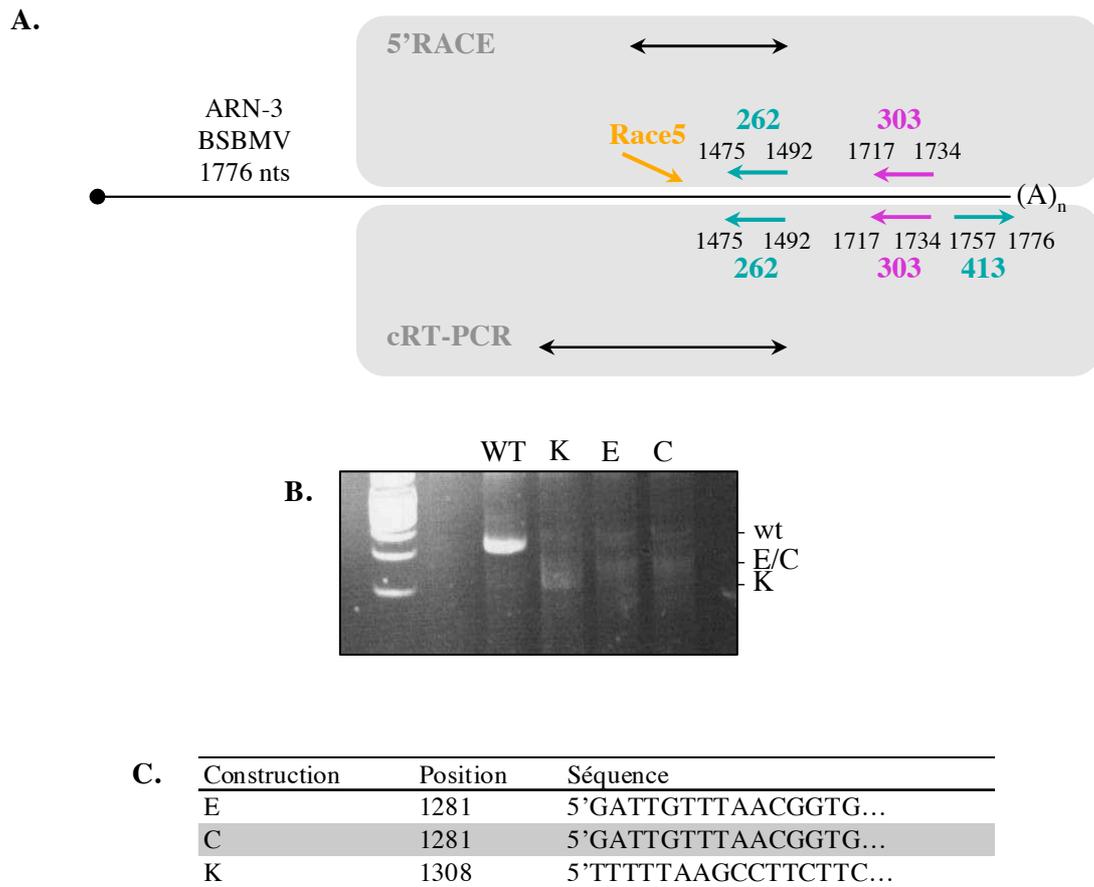


Figure III.23. : cRT-PCR effectuée sur les ARN mutés K, E et C. A. Oligonucléotides utilisés pour les cRT-PCR et 5'RACE ciblant l'ARN-3 (sauvage et mutés) du BNYVV. Le trait noir représente l'ARN viral. Les flèches rose et bleues correspondent aux oligonucléotides utilisés pour la reverse-transcription et la PCR respectivement, et leur orientation. Les tailles et les positions d'hybridation sont indiquées. Les doubles-flèches représentent la taille des amplicons suivant la méthode utilisée. **B.** Produits d'amplification obtenus après cRT-PCR et analysés sur gel d'agarose coloré au BET. **C.** Tableau représentant les positions préférentielles des extrémités 5' terminales obtenues par cRT-PCR.

été analysés par northern blot à l'aide d'une sonde ciblant la région 3' de l'ARN-3. Dans tous les cas, l'ARN-3 génomique est détecté en quantité équivalente, indiquant une répllication similaire des ARN-3 mutés et sauvages (**figure III.22.C.**). En revanche, l'ARN-3sub n'est pas détecté pour les trois mutants K, E et C, et seul un smear correspondant à des produits 3' plus courts apparaît. Ce résultat nous a conduit à émettre deux hypothèses : soit l'ARN-3sub n'est pas produit dans le cas des mutants, soit il est dégradé plus efficacement que l'ARN-3sub sauvage. Les ARN-3 génomiques sauvage ou mutés s'accumulent en quantités similaires. Nous avons donc privilégié la deuxième hypothèse : en effet, en conditions non saturantes, l'absence de clivage devrait aboutir à une accumulation plus forte des ARN génomiques mutés.

Afin de se soustraire à l'amplification des ARN viraux, les trois formes mutées de l'ARN-3 ont été introduites dans un vecteur binaire. Des plantes *N. benthamiana* ont été agroinfiltrées par ces constructions. Cinq jours plus tard, les ARN totaux extraits des feuilles infiltrées ont été analysés par hybridation moléculaire. Comme précédemment, nous avons retrouvé l'ARN-3sub dans les tissus infiltrés par la construction exprimant l'ARN-3 sauvage. Aucune bande n'est détectée dans les tissus exprimant les constructions des ARN-3 mutés (**figure III.22.D.**). Ce résultat suggère que les ARN-3 mutés sont également clivés, et que le fragment 3' n'est pas stabilisé.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons procédé à une analyse 5'RACE sur les ARN extraits des plantes infectées par les ARN-3 sauvages et mutants en utilisant les mêmes oligonucléotides que précédemment. Aucun produit de PCR n'a pu être obtenu dans le cas des mutants. Afin de favoriser les chances d'obtenir des amplicons, nous avons procédé à une analyse cRT-PCR sur les fragments 3'. Cette technique permet d'inclure la séquence 3' terminale polyadénylée dans l'amplicon, et permet donc l'amplification de fragments plus grands (**figure III.23.A.**). Les amplicons ont été déposés sur gel d'agarose et colorés au BET (**figure III.23.B.**) : le fragment le plus grand est retrouvé dans la piste correspondant à l'ARN sauvage. Les ARN mutés donnent des profils moins nets, avec des bandes de taille plus faible que le sauvage. Nous avons directement séquencé l'ADN amplifié, sans procéder au clonage des fragments PCR. Alors que l'ARN-3 sauvage présente une séquence unique avec une extrémité 5' identique à la première expérience (1232), plusieurs séquences sont superposées mais lisibles dans le cas des trois mutants. L'apparition de séquences polyadénylées dans la séquence indique la position de la ligation avec la queue 3' de l'ARN-3. Le nt en amont de la séquence polyadénylée correspond donc au premier nt 5' du fragment le plus court retrouvé. Pour le mutant K, la première position retrouvée est située en 1308 de l'ARN (**figure III.23.C.**). Pour les deux autres mutants E et C, la position retrouvée est identique et correspond au nt 1281. Ces sites sont situés en aval de la position retrouvée pour l'ARN-3 sauvage.

Ces résultats étayent l'hypothèse d'un clivage en amont de la séquence coremin, suivi d'une dégradation 5'→3' du fragment 3'. La séquence coremin stabiliserait le fragment 3' non-codant car sa mutation conduit à l'apparition de fragments d'ARN plus courts, difficilement amplifiés par 5'RACE et faiblement visualisés par northern-blot (**figure III.22.C., pistes K, E et C**).

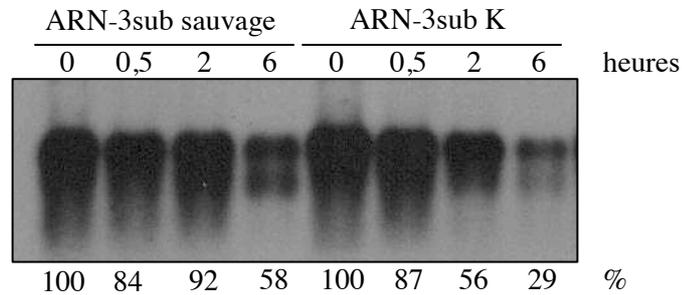


Figure III.24. : Analyse par northern-blot de la stabilité en solution des ARN-3sub sauvage et muté synthétisés *in vitro*. Les ARN ont été incubés *in vitro* dans des extraits de germes de blé purifiés. Des fractions aliquotes prélevées à différents temps ont été analysées par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde 3'. La quantité résiduelle d'ARN par rapport au t0 a été déterminée à l'aide du logiciel ImageJ et est indiquée en pourcentage sous chaque piste.

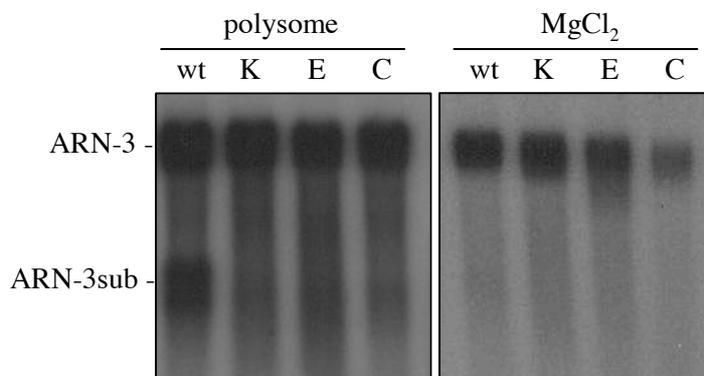


Figure III.25. : Analyse de l'encapsidation des ARN-3 mutants. Les ARN totaux extraits des lésions à l'aide du tampon polysome (gauche) et à l'aide d'un tampon Tris-MgCl₂ suivi d'une incubation de 30 min à 37°C (droite) sont analysés par northern-blot. La sonde cible la partie 3' de l'ARN-3. L'extraction 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.

2.3.4. Analyse de la stabilité de l'ARN-3sub

Nous avons cherché à déterminer si une modification de la séquence coremin pouvait affecter la stabilité de l'ARN *in vitro*. Pour cela nous avons cloné les différentes séquences correspondant aux ARN-3sub sous contrôle d'un promoteur T7 et réalisé la transcription *in vitro* de l'ARN-3sub sauvage et de l'ARN-3sub portant la mutation K. Des quantités identiques d'ARN ont été incubées dans des extraits de germes de blé purifiés au phénol-chloroforme et nous avons mesuré par hybridation moléculaire la quantité d'ARN-3 résiduelle après 30 min, 2 et 6 heures d'incubation à 25°C. Les résultats sont présentés sur la **figure III.24.** Comme on peut le voir, l'ARN-3sub K disparaît plus rapidement que l'ARN-3sub sauvage. En effet, après 6h d'incubation, si 50% des ARN-3sub ont été dégradés, plus de 70% des formes mutées ont disparu. Cette déstabilisation *in vitro* n'est bien sûr pas comparable à celle observée sur plante où l'ARN-3sub K disparaît "totalement", et pourrait être due à la présence de 3 G supplémentaires ou du triphosphate en 5' des ARN transcrits *in vitro*.

2.3.5. Test d'encapsidation des ARN mutants K, E, et C

Puisque les trois mutants de l'ARN-3 K, E et C ne permettent pas de mouvement à longue distance, nous avons cherché à savoir s'ils étaient toutefois encapsidés. Ainsi, des lésions locales ont été prélevées de plantes infectées par les ARN-1, -2 et -3 sauvage ou muté. Les ARN ont été extraits de ces lésions par deux méthodes d'extraction décrits par Gilmer *et al.* (1992) : 1) une extraction au tampon polysome qui permet l'extraction des ARN totaux, 2) une extraction au Tris-MgCl₂ suivie d'une incubation de 30 min à 37°C, qui permet la dégradation des ARN non protégés par la protéine de capsid. Les ARN ont été analysés par northern-blot à l'aide d'une sonde ciblant la partie 3' de l'ARN-3 (**figure III.25.**). Les ARN génomiques sauvages et mutés sont détectés dans les deux méthodes d'extraction, indiquant que les ARN mutants sont capables d'être encapsidés aussi bien que l'ARN-3 sauvage. L'ARN-3sub quant à lui n'est présent que dans l'échantillon extrait au tampon polysome. Le contrôle interne de cette expérience repose sur la disparition de l'ARN-3sub après incubation 30 min à 37°C puisqu'il n'est pas encapsidé (Gilmer *et al.*, 1992). Ces résultats indiquent que l'absence de mouvement systémique n'est pas reliée à un défaut d'encapsidation des ARN mutants.

2.3.6. Analyse de mutants de délétion et d'insertion de coremin

Les travaux de Balmori *et al.* (1993) avaient permis de montrer qu'il était possible de déplacer la séquence core "promotrice" de l'ARN-3sub pour produire un ARN-3 subgénomique plus grand. Nous avons réutilisé certaines des constructions et produit deux nouveaux variants de l'ARN-3 possédant deux séquences core (**figure III.26.A.**).

La construction pAΔB est délétée de la séquence 1320 à 1580 et ne possède donc plus la séquence coremin. Dans le mutant pAStu12, la séquence 1150 à 1480 a été délétée et réinsérée en amont en

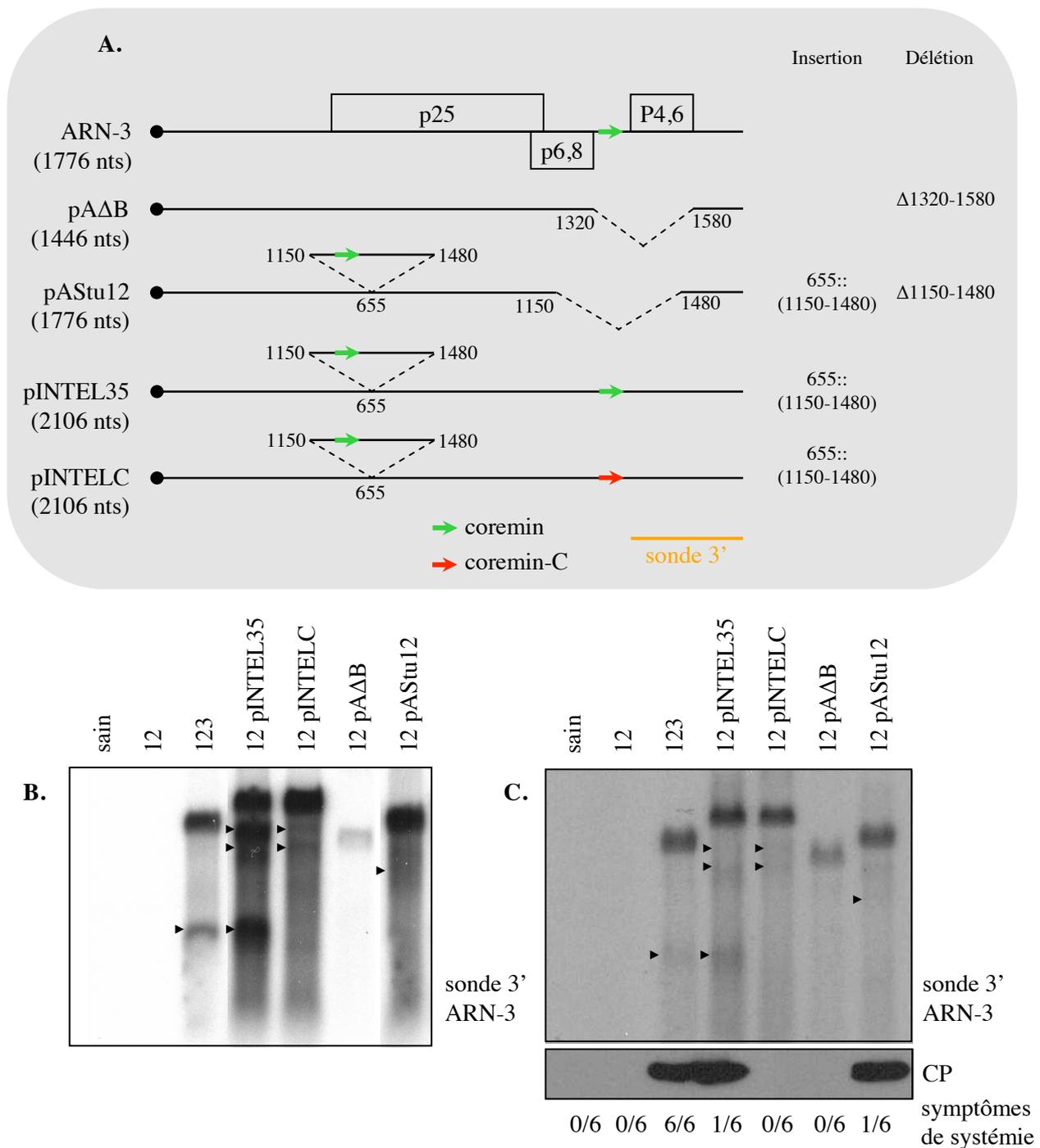


Figure III.26. : Mutants de délétion et d'insertion de la séquence core dans l'ARN-3. **A.** Les différentes constructions obtenues par délétion et insertion, utilisées pour des infections sur plantes hôtes. Les délétions et insertions sont indiquées par des traits pointillés et leur taille est précisée à droite. Les flèches verte et rouge indiquent respectivement la séquence coremin sauvage, et la séquence coremin correspondant au mutant C. **B.** Infection de *C. quinoa* par les constructions additionnées des ARN-1 et -2 du BNYVV. **C.** Infection de *B. macrocarpa* par les ARN-1 et -2 supplémentés des mêmes constructions. Les ARN sont révélés avec une sonde ciblant la partie 3' de l'ARN-3 (trait orange). Les chiffres sous la photo indiquent le nombre de plantes montrant des symptômes de systémie 21 jours après infection. Les triangles facilitent la visualisation des bandes observées.

position 655. Une telle réinsertion a été reproduite dans les clones complets de l'ARN-3 sauvage et dans le mutant C pour produire les vecteurs pINTEL35 et pINTELC, respectivement et qui possèdent ainsi deux séquences core. Ainsi, la construction pINTEL35 possède deux motifs coremin sauvages. La construction pINTELC, qui dérive du mutant C, possède un motif coremin sauvage dans la région insérée, et une séquence coremin possédant cinq mutations (voir paragraphe 3.3.). Les transcrits provenant de toutes ces constructions ont été inoculés en présence des ARN génomiques -1 et -2 sur des plantes de *C. quinoa* et de *B. macrocarpa* afin de rechercher respectivement la présence de produits de clivage et leur effet sur le mouvement à longue distance. Sept jours après inoculation, les ARN totaux ont été extraits de 5 lésions locales de *C. quinoa* pour chaque construction. Les résultats de l'analyse par northern blot indiquent que tous les ARN mutants sont répliqués puisqu'ils sont retrouvés dans les lésions locales (**figure III.26.B.**). Alors que l'ARN-3sub est détecté en présence d'ARN-3 sauvage, la construction pAΔB ne permet pas son accumulation. La construction pAStu12 conduit à l'apparition d'un fragment de taille supérieure (environ 1041 nts), comme décrit précédemment (Balmori *et al.*, 1993). La construction pINTEL35, qui contient deux motifs coremin, permet l'accumulation de quatre fragments d'ARN : 1) un ARN qui correspond à l'ARN-3sub, 2) deux ARN de taille supérieure, qui correspondraient à la taille de fragments d'environ 1371 nts, potentiellement produits *via* la séquence coremin amont, et 3) un fragment plus grand, correspondant à l'ARN-3 génomique recombinant. La construction pINTELC permet l'accumulation des trois fragments les plus grands détectés pour pINTEL35, mais en plus faible quantité. Aucun fragment correspondant à l'ARN-3sub C n'est retrouvé.

Ces résultats indiquent que l'insertion d'une séquence coremin supplémentaire permet l'accumulation d'une nouvelle population de fragments, dont la taille correspond à la partie 3' de l'ARN située en aval de coremin.

L'efficacité de la mise en place du mouvement à longue distance par ces ARN-3 mutés a été testée en infectant des *B. macrocarpa* par chacune des constructions en présence des ARN-1 et -2. L'analyse par northern-blot des ARN extraits des *B. macrocarpa* confirme ceux obtenus sur des feuilles de *C. quinoa* infectées par les mêmes constructions (**figure III.26.C.**). Les symptômes de systémie ont été recherchés 21 jours post-infection (**figure III.26.C., sous les photos**). L'absence d'expression de la protéine p25, due à une insertion dans sa séquence codante, permet toutefois l'apparition de symptômes légers caractéristiques (Tamada *et al.*, 1999). Les plantes infectées par l'ARN-3 sauvage montrent toutes (6/6) des jaunissements des feuilles supérieures qui sont également recourbées (non montré). Les constructions pAΔB et pINTELC ne montrent aucun symptôme caractéristique. Les constructions pINTEL35 et pAStu12 induisent de faibles symptômes des feuilles supérieures sur 1 des 6 plantes infectées. L'analyse par western-blot des protéines totales extraites de patchs prélevés sur les feuilles supérieures présentant des symptômes confirme la présence de CP dans les plantes infectées par les constructions pINTEL35 et pAStu12 (**figure III.26.C., panneau bas**). Nous n'avons pas pu

détecter de CP dans les feuilles supérieures des plantes infectées par les constructions p Δ B et pINTELC. Cependant, l'absence de symptômes nous a conduits à prélever aléatoirement des patchs et nous ne pouvons donc pas exclure la présence de CP dans des feuilles non analysées.

Si la séquence coremin est essentielle au mouvement à longue distance, au vu de ces résultats il semble que sa position sur l'ARN est également un facteur important. En effet, l'absence de séquence coremin du mutant p Δ B ne permet pas de mouvement systémique. La réinsertion d'une séquence coremin en amont dans les constructions où la séquence coremin en position 1234 est absente (pAS_{tu12}) ou mutée (pINTELC) ne restaure que très peu efficacement le mouvement à longue distance. Il est intéressant de noter que le mutant pINTELC35 ne permet pas un mouvement à longue distance efficace, alors qu'il possède la séquence coremin dans son contexte sauvage. Ces résultats indiquent que la séquence coremin seule n'est pas suffisante pour permettre la systémie. Son contexte structural est sans doute essentiel à son bon fonctionnement dans la systémie.

De plus, nous pouvons donc conclure que la production de l'ARN-3_{sub} n'est pas corrélée à la mise en place du mouvement à longue distance. Le mutant pINTELC35 produit l'ARN-3_{sub}, mais ne permet pas un mouvement à longue distance efficace.

Nous avons vu que le clivage est total dans le cas de l'expression transitoire de l'ARN-3 sur feuille de *N. benthamiana* puisque seul l'ARN-3_{sub} est retrouvé. En contexte viral, le clivage n'est que partiel car à la fois l'ARN-3 génomique et l'ARN-3_{sub} sont présents. Un facteur viral pourrait alors être impliqué dans la régulation du clivage, qui permettrait la protection de l'ARN-3 génomique contre sa dégradation. Nous nous sommes alors intéressés au mécanisme de clivage de l'ARN-3.

2.4. Etude du mécanisme de clivage de l'ARN-3

2.4.1. Rôle de l'ARN silencing

La séquence coremin est constituée d'un motif de 20 nts. Il était naturel de penser que cette séquence pouvait être reconnue par le mécanisme de silencing et être la cible d'un clivage par un miRNA ou un siRNA cellulaire. Afin de répondre à cette question, nous avons recherché la présence de petits ARN de séquence complémentaire à la séquence coremin dans les ARN totaux de plantes hôtes et non hôtes. Ainsi, des petits ARN de *N. benthamiana*, d'*A. thaliana*, *B. vulgaris*, *C. quinoa* et *B. macrocarpa* ont été purifiés et analysés par northern blot, à l'aide d'une sonde coremin radiomarquée. Puisque la population de petits ARN peut être modifiée en conditions de stress comme par exemple lors d'une infection virale ou d'une agroinfiltration, les petits ARN de *C. quinoa* infectée par les ARN-1 et -2 du BNYVV ont aussi été analysés. Des siRNA issus de la dégradation de l'ARN-3 pouvant être produits par le mécanisme de PTGS, nous n'avons pas inclus l'ARN-3 dans nos expériences. Quelle que soit la

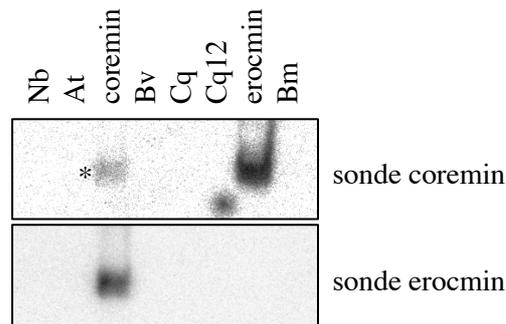


Figure III.27. : Recherche des petits ARN homologues ou complémentaires à la séquence coremin par northern blot. ARN de plantes saines utilisés : Nb (*N. benthamiana*) ; At (*A. thaliana*) ; Bv : (*B. vulgaris*) ; Cq (*C. quinoa*) ; Bm (*B. macrocarpa*). ARN de plante infectées utilisés : Cq12 (*C. quinoa* infectée par les ARN-1 et -2 du BNYVV). Oligonucléotides utilisés comme témoin : coremin (oligonucléotide de séquence coremin) et erocmin (oligonucléotide de séquence complémentaire à coremin). La membrane a été hybridée une première fois avec la sonde erocmin, puis réhybridée avec la sonde coremin. * correspond au marquage résiduel de la première hybridation.

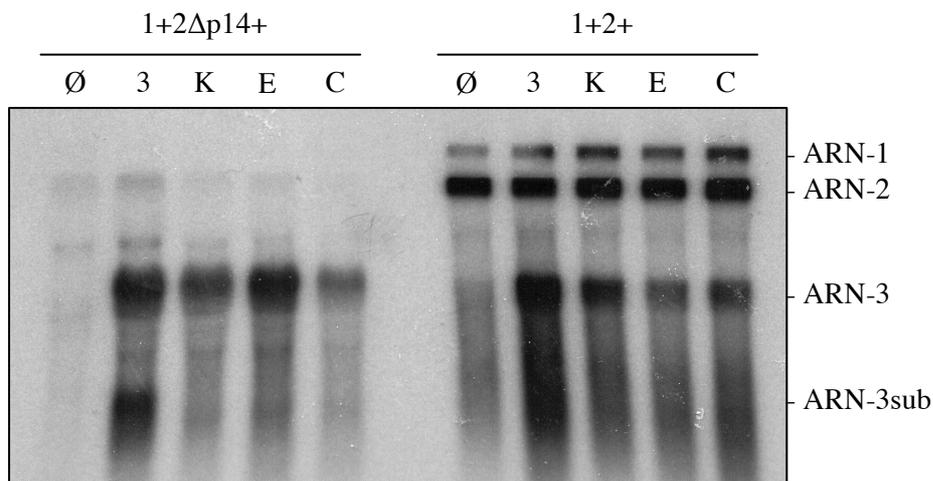


Figure III.28. : Analyse par northern-blot des ARN totaux extraits des lésions de plantes infectées par les ARN-1, -2 et -3 privés ou non de la protéine p14, et mutés ou non dans la séquence coremin. Les sondes utilisées ciblent les parties 5' des ARN-1 et -2, et la partie 3' de l'ARN-3.

plante utilisée, hôte ou non hôte, saine ou infectée, aucune accumulation de petits ARN de séquence complémentaire à coremin n'a pu être détectée (**figure III.27., panneau haut**).

Nous avons aussi recherché la présence dans ces mêmes extraits de petits ARN de séquence identique à la séquence coremin. Pour cela, une sonde nommée erocmin a alors été utilisée. Là encore, aucun petit ARN de séquence attendue n'a pu être détecté (**figure III.27., panneau bas**).

Ces résultats indiquent que les plantes n'expriment pas (ou trop faiblement pour être détectés) spontanément, ou en condition de stress, des petits ARN pouvant cibler la séquence coremin sur l'ARN génomique, ni la séquence complémentaire sur l'ARN antigénomique. Un tel résultat était prévisible puisque nous avons précédemment vu que l'ARN-3sub résultait probablement d'un clivage de l'ARN-3 suivi d'une dégradation 5'→3'. De plus, l'ARN-3sub s'accumule en expression transitoire en présence de protéine p19, suppresseur de silencing. Si l'ARN-3 était clivé par un miRNA, la protéine p19, piège à miRNA, aurait probablement inhibé le clivage.

Au laboratoire, Kamal Hleibieh a pu montrer l'interaction entre la protéine p14 et la séquence coremin *in vivo* dans un système triple-hybride, et *in vitro* par gel retard. Nous avons alors voulu savoir si la protéine p14, suppresseur faible d'ARN silencing, pouvait interférer dans le clivage de l'ARN-3 ou favoriser sa stabilisation. Pour cela, nous avons utilisé un inoculum n'exprimant pas la protéine p14, composé des ARN-1, -2Δp14 (Gilmer *et al.*, 1992) et -3 et comparé les résultats obtenus lors de l'infection avec les ARN-1, -2 et -3 sauvages. Six jours après infection, les ARN totaux des lésions locales ont été extraits et leur contenu a été analysé par northern-blot. Les résultats sont présentés sur la **figure III.28.** et révèlent qu'en absence de protéine p14, le clivage a toujours lieu, tout comme l'accumulation de l'ARN-3sub sauvage. Dans le cas des mutants K, E et C, les ARN-3sub ne semblent pas s'accumuler. Ainsi, la protéine p14 n'est pas impliquée dans la production de l'ARN-3sub, ni dans sa stabilisation.

2.4.2. Les extraits de germes de blé permettent le clivage de l'ARN-3

L'ARN-3 est clivé par un facteur inconnu : très probablement cellulaire, et de nature nucléique (ribozyme) et/ou protéique. Afin d'étudier le clivage dans un système simple où nous pouvons contrôler davantage de paramètres, nous avons voulu savoir si l'ARN-3 pouvait être clivé dans un système acellulaire de germes de blé. Ces extraits contiennent l'ensemble des facteurs nécessaires à la traduction, et sont majoritairement privés de nucléases qui dégraderaient les ARN incubés pour les expériences de traduction *in vitro*. Nous avons incubé des transcrits coiffés de l'ARN-3 et des ARN mutants K, E et C dans des extraits de germes de blé. Après deux heures d'incubation, les ARN ont été analysés par northern-blot (**figure III.29.**). Des quantités identiques de milieu réactionnel ont été déposées dans chaque piste. Nous avons pu constater que la quantité d'ARN-3 génomique diminue entre le temps T_0 et le temps T_{120} , pour chacun des ARN testés. Un petit ARN de la taille de l'ARN-

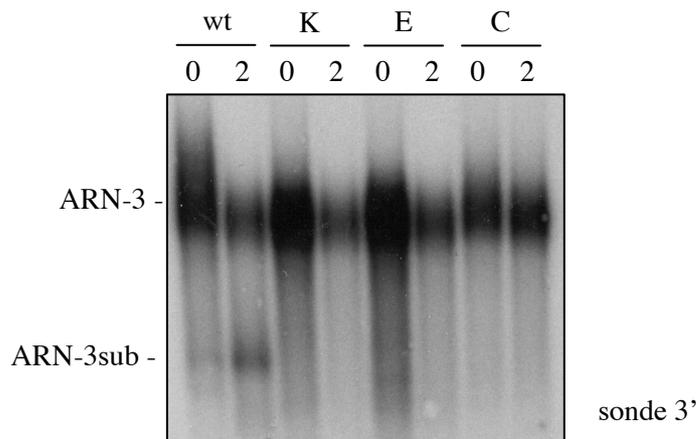


Figure III.29. : Analyse par northern blot des transcrits de l'ARN-3 sauvage et mutés soumis à une cinétique d'incubation dans des extraits de germes de blé. Les échantillons prélevés à 0 et 2 h d'incubation, ont été analysés grâce à une sonde ciblant la partie 3' de l'ARN-3.

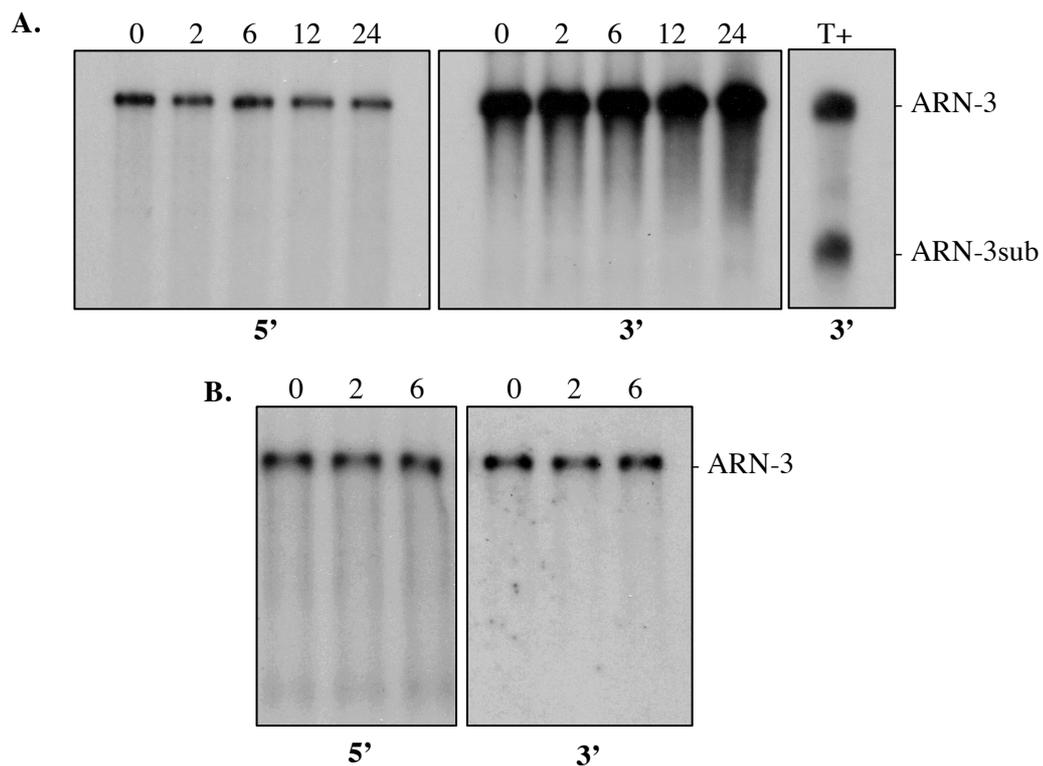


Figure III.30. : Incubation des transcrits de l'ARN-3 sauvage en présence de tampon (A) ou d'ARN totaux d'extrait de germes de blé hautement purifiés (B). **A.** Analyse par northern blot des transcrits de l'ARN-3 incubés en présence de tampon, prélevés après 0, 2, 6, 12 et 24 h d'incubation. A gauche, utilisation d'une sonde 5' et à droite d'une sonde 3'. Les ARN extraits de feuille infectée servent de témoin positif. **B.** Analyse par northern blot des transcrits de l'ARN-3 incubés en présence d'extraits de germes de blé purifiés au phénol puis au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). Les ARN ont été prélevés après 0, 2, et 6 h d'incubation. A gauche, utilisation d'une sonde 5' et à droite d'une sonde 3'.

3sub est détecté lorsque l'ARN-3 sauvage est utilisé et pas dans les extraits contenant les ARN-3 mutés. Cette expérience indique que tous les ARN testés sont soumis à une dégradation progressive et que seul l'ARN-3 sauvage permet la stabilisation d'un fragment 3', comme cela a été montré lors des expériences d'expression transitoire et dans les tissus infectés. Ainsi, le système acellulaire de germes de blé semble contenir des facteurs impliqués dans le mécanisme de clivage similaires à ceux mis en évidence *in planta*.

2.4.3. Le clivage n'est pas la conséquence d'un ribozyme (*cis* ou *trans*)

Puisque des ARN sont capables de s'autoclivrer (ribozymes, pour revue voir Talini *et al.*, 2009), nous avons testé si le clivage de l'ARN-3 pouvait se produire en *cis*. Pour cela, nous avons incubé des transcrits de l'ARN-3 dans un tampon contenant des ions Mg^{2+} pendant 24 heures à 25°C. L'analyse des ARN par northern blot à l'aide de sondes 5' et 3' ne nous a pas permis de révéler de clivage dans ces conditions. En effet, seule une bande correspondant à l'ARN-3 entier est visible, et aucune bande de taille inférieure n'apparaît au bout de 24 heures d'incubation (**figure III.30.A.**). Ces résultats indiquent que l'ARN-3 n'est pas un *cis*-ribozyme, ou que la réaction ne peut pas se faire dans ces conditions.

Les ribozymes peuvent aussi agir en *trans* : dans ce cas, un ARN permet le clivage d'un autre ARN. Puisque les extraits de germes de blé contiennent les facteurs nécessaires au clivage, nous avons voulu tester si ces ARN pouvaient permettre le clivage en *trans* de l'ARN-3. Des transcrits de l'ARN-3 ont donc été soumis à une incubation dans le même tampon que précédemment, mais en ajoutant des ARN de germes de blé purifiés par extraction au phénol puis au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). L'analyse des ARN par northern blot avec des sondes ciblant les extrémités 5' et 3' de l'ARN-3 révèle une bande unique correspondant à l'ARN-3 entier (**figure III.30.B.**). Aucun clivage n'a pu être mis en évidence.

Ces deux résultats indiquent qu'un ribozyme n'est probablement pas responsable du clivage de l'ARN-3, ni en *cis* ni en *trans*, ou qu'il ne peut pas se produire dans de telles conditions. Le clivage nécessiterait donc un facteur protéique, ou ribonucléoprotéique.

2.4.4. Un facteur protéique est impliqué dans le clivage

Les transcrits de l'ARN-3 ont ensuite été incubés en présence d'extraits de germes de blé partiellement purifiés au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). Ces extraits partiellement purifiés contiennent donc des acides nucléiques, mais également des protéines. L'ARN-3 a été incubé dans cet extrait partiellement purifié et des quantités identiques de milieu réactionnel ont été prélevées après deux et six heures d'incubation et analysées par northern blot (**figure III.31.**). L'utilisation d'une sonde 5' (nts 1 à 380) révèle l'apparition de plusieurs bandes, dont une de poids moléculaire faible qui

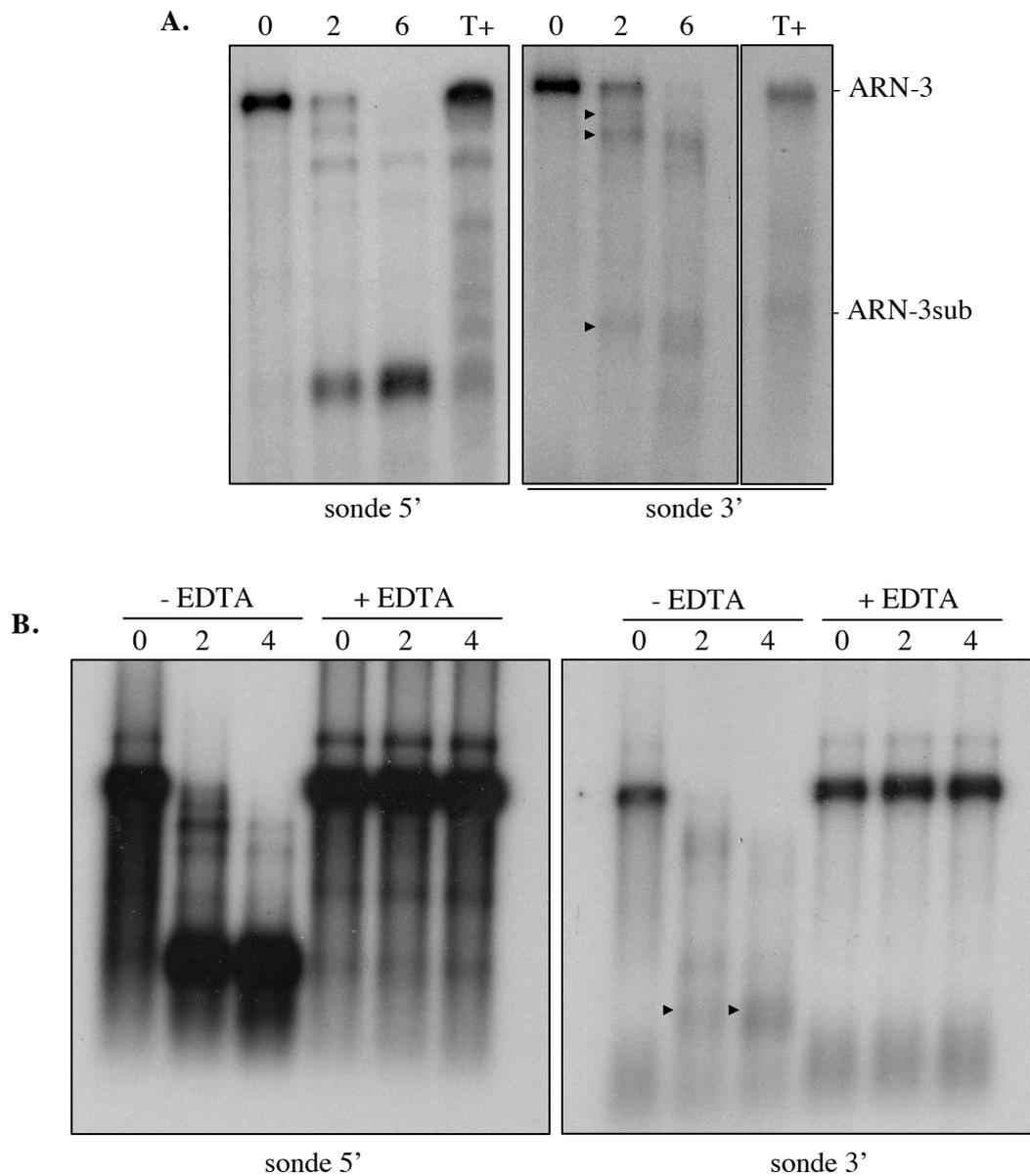


Figure III.31. : Incubation des transcrits de l'ARN-3 en présence de germes de blé faiblement purifiés. **A.** Les transcrits de l'ARN-3 ont été incubés dans les germes de blé faiblement purifiés, et analysés à l'aide de sondes ciblant les parties 5' et 3' de l'ARN-3. **B.** Effet de l'EDTA : les transcrits de l'ARN-3 ont été incubés en présence ou en absence de 10 mM EDTA, pendant 4 heures. Les prélèvements effectués à 0, 2 et 4 heures ont été analysés par northern blot à l'aide des sondes 5' et 3' ciblant l'ARN-3. Les bandes d'intérêt sont indiquées par des flèches.

s'accumule majoritairement. Cette bande pourrait correspondre aux fragments 5' détectés par cRT-PCR dans les ARN extraits de plantes infectées. L'ARN-3 entier quant à lui disparaît après 6h d'incubation. Des bandes de haut poids moléculaires sont également détectées, indiquant qu'une dégradation s'opère également à partir de l'extrémité 3'. D'autres bandes de tailles intermédiaires sont retrouvées et correspondent à celles présentes dans l'échantillon témoin contenant les ARN totaux de feuille infectée, indiquant une dégradation similaire de l'ARN-3 en contexte viral sur feuille, et en incubation *in vitro* avec un extrait de germes de blé.

Une sonde 3' montre également l'accumulation de trois bandes de tailles inférieures, et la disparition de l'ARN-3 génomique après 6 heures d'incubation. Les molécules de grande taille qui s'accumulent lors de la cinétique ne sont pas retrouvées dans les ARN extraits de feuille infectée. Elles correspondent à des intermédiaires de dégradation s'opérant en 5' de l'ARN-3, et qui ne sont pas stabilisés *in vivo* (paragraphe 2.2.2.). En revanche, on observe l'apparition d'un fragment de taille similaire à l'ARN-3sub. Ces résultats indiquent que l'ARN-3 est dégradé *in vitro* de façon similaire à celle décrite *in vivo*.

Cependant, des bandes supplémentaires à celles retrouvées lors d'incubation en extrait de germes de blé apparaissent. L'extraction au phénol-chloroforme a pu libérer des nucléases. L'ajout d'un inhibiteur de nucléases (RNaseOUT™) dans le milieu permet de limiter l'action des nucléases de type RNase A, RNase B et RNase C, mais pas des nucléases de type RNase 1, RNase T1, RNase T2, nucléase S1 et RNase H. Ainsi, des nucléases additionnelles à celle réellement impliquée dans le clivage sont probablement responsables de l'apparition des fragments supplémentaires. Une autre explication pourrait être que les facteurs impliqués dans la stabilisation de fragments spécifiques sont absents de l'extrait purifié.

Des tests d'incubations des transcrits ont également été réalisés dans les mêmes conditions mais les extraits ont été additionnés de 10 mM d'EDTA. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure III.31.B.** Ils montrent qu'en présence de ce chélateur d'ions divalents, le clivage n'a plus lieu puisque les ARN restent entiers après 4h d'incubation. Le facteur impliqué dans le clivage nécessite donc pour son action la présence d'ions divalents dans le milieu qui agissent soit comme cofacteur protéique soit comme stabilisateur de structures de l'ARN.

L'extrait partiellement purifié de germes de blé pourrait contenir un facteur protéique ou ribonucléoprotéique impliqué dans la dégradation. Bien sûr, les facteurs présents dans cet extraits et les conditions physiologiques ne sont pas les mêmes qu'*in vivo* (protéines, ARN, pH, ions ...), et les phénomènes que l'on observe ne sont pas réellement identiques à ceux observés *in vivo*. Cependant, la recherche d'un facteur impliqué dans le clivage de l'ARN-3 n'est pas aisée. Puisque nous supposons maintenant qu'il s'agirait d'un facteur protéique ou ribonucléoprotéique, nous avons voulu tenter de déterminer la ou les protéines impliquées dans le clivage.

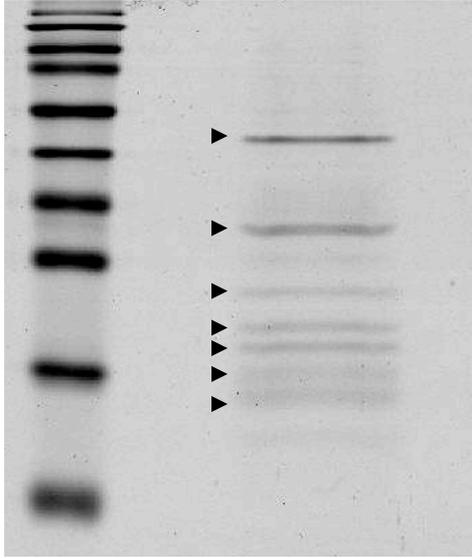


Figure III.32. : Gel coloré au bleu colloïdal des protéines purifiées à partir d'extrait de germes de blé. La piste à gauche correspond au marqueur de poids moléculaire. Les flèches indiquent les bandes prélevées et analysées par MS-MS.

Identification	Nb peptides	Peptides	N°d'accès	% recouvrement	C
ribosomal protein L3-B2 [<i>Triticum aestivum</i>]	1	HGSLGFLPR	118152402	29	
Os04g0349500 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] 40S ribosomal protein S8	1	TLDSHIEEQFGSGR	115457852	6	
ribosomal protein L2 [<i>Glycine max</i>]	1	GVVTDVIHDPGR	12054507	4	
ribosomal protein L13a [<i>Triticum aestivum</i>]	2	AYEGVPPPYDR EVGWNYADTIR	57471706	10	
60S ribosomal protein L17-1 [<i>Hordeum vulgare</i>]	2	YLEDVLAHK RYLEDVLAHK	464639	5	
Os04g0502300 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] 40S ribosomal protein S11	2	HSNIPAHISPCFR VKEGDHVIIGQCRPLSK	115459270	18	
ribosomal protein l34 [<i>Triticum aestivum</i>]	2	IQGIPHLRPTEYK TVNRPYGGVLSGPAVR	57471712	24	
60S ribosomal protein L23 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1	ECADLWPR	730536	5	

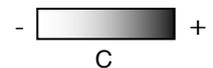


Tableau III.4. : Protéines de germes de blé analysées par MS-MS. C correspond à l'indice de confiance de l'identification. Le nom des protéines, le nombre de peptides obtenus, le numéro d'accès, le pourcentage de recouvrement et l'indice de confiance sont indiqués.

2.4.5. Identification des protéines présentes dans les germes de blé partiellement purifiés

Les protéines présentes dans les germes de blé partiellement purifiés ont été analysées. Un échantillon a été déposé sur un gel SDS-PAGE. Après migration, le gel a subi une coloration au bleu colloïdal (**figure III.32.**). Les bandes détectées ont été prélevées et les protéines en ont été extraites puis analysées par la technique de MS-MS. Sept protéines ont pu être identifiées et sont décrites dans le **tableau III.4.** Toutes les protéines identifiées correspondent à des protéines ribosomiques : L3-B2 de *Triticum aestivum*, S8 de *Oryza sativa*, L2 de *Glycine max*, L13a de *Triticum aestivum*, L17-1 de *Hordeum vulgare*, S11 de *Oryza sativa*, I34 de *Triticum aestivum*, et L23 de *N. tabacum*. Les protéines ribosomiques sont les protéines les plus représentées dans la cellule. Cette analyse nous conduit à penser que la méthode de purification employée n'est pas adéquate puisqu'elle ne révèle que des protéines présentes en grandes quantités. Cependant, nous n'avons encore aucune indication sur le rôle de l'une d'entre elles dans le clivage, ou encore, si une autre protéine, non détectée car présente en trop faible concentration, pourrait être responsable du clivage. Afin de répondre à ces questions, la purification et l'analyse de l'effet des protéines ribosomiques identifiées sur le clivage serait intéressantes. En revanche, si la protéine impliquée n'a pas pu être caractérisée par cette technique de purification, il faudrait alors procéder à une analyse comparative (par gel bidimensionnel) des protéines présentes dans un extrait capable de cliver l'ARN à un autre extrait qui en est incapable.

2.4.6. Rôle de la protéine NbXRN4 dans l'accumulation de l'ARN-3sub

Les ARN viraux du TBSV, du CNV et du WNV subissent une dégradation 5'→3', effectuée par la protéine XRN4 ou un homologue (voir paragraphe 2.2.). Nous nous sommes donc intéressés à cette protéine afin de savoir si elle pouvait également être impliquée dans la dégradation de l'ARN-3 du BNYVV, menant à la production de l'ARN-3sub.

La famille des protéines XRN chez *A. thaliana* est exprimée dans tous les organes principaux de la plante (racines, feuilles, tiges, fleurs) (Kastenmayer and Green, 2000). Elles fonctionnent comme des 5'→3' exonucléases dont l'activité est bloquée par des séquences polyG lorsqu'elles sont exprimées dans la levure, à l'image de la protéine de levure Xrn1p. La famille des protéines AtXRN ressemble structurellement davantage à Xrn2p/Rat1p qui possède une localisation nucléaire, qu'à Xrn1p qui se localise dans le cytoplasme. Pourtant AtXRN4-GFP est cytoplasmique et ne complémente pas la fonction du mutant *rat1-1^{ts}*. XRN4 est impliquée dans la dégradation des produits 3' non coiffés issus d'un clivage par un miRNA (Souret *et al.*, 2004). La protéine est également considérée comme un suppresseur d'ARN silencing puisque les mutants *xrn4* présentent une augmentation globale du mécanisme d'ARN silencing. Cette activité peut être reliée au fait que les transgènes aberrants sont moins dégradés et peuvent induire l'ARN silencing (Gazzani *et al.*, 2004). AtXRN4 a également un

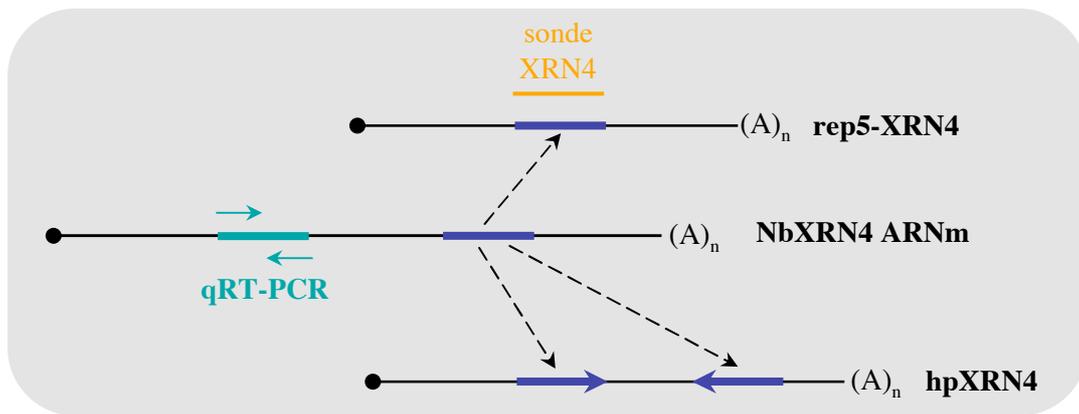


Figure III.33. : Constructions utilisées pour la mise en place du silencing dirigé contre XRN4. La construction rep5-XRN4 contient un fragment de l'ARNm de NbXRN4. La construction hpXRN4 possède la même séquence, doublée et inversement-répétée de part et d'autre d'un intron. Les quantifications par qRT-PCR ciblent l'ARN messager endogène uniquement.

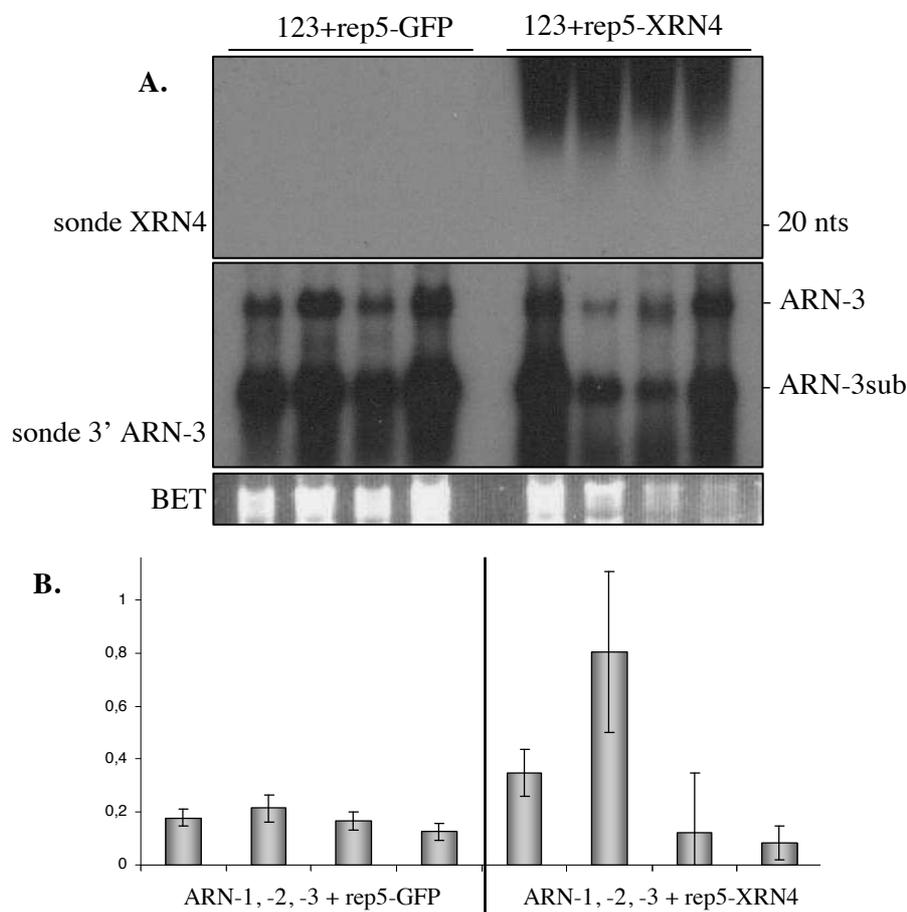


Figure III.34. : Effets de la construction rep5-XRN4 sur l'accumulation de siRNA spécifiques, de l'ARN-3 viral et du messager endogène de XRN4 dans des *N. benthamiana* infectées par les ARN-1, -2 et -3 supplémentés de rep5-XRN4 ou rep5-GFP. A. Recherche de siRNA spécifiques de XRN4 par northern-blot à l'aide d'une sonde dirigée contre la partie du messager de XRN4 cloné (panneau du haut), et analyse par northern-blot des effets sur l'accumulation d'ARN-3 et d'ARN-3sub (panneau du bas). La quantité d'ARN totaux déposée dans chaque piste est visualisée par coloration au BET. Chaque piste représente une plante individuelle. B. Analyse du taux de messagers de XRN4 endogènes par qRT-PCR dans des plantes individuelles infectées par les ARN-1, -2, -3 et rep5-GFP, et par les ARN-1, -2, -3 et rep5-XRN4.

rôle dans la voie de l'éthylène, en inhibant l'action de la protéine à F-box EBF1/2 dont la fonction est de dégrader EIN3 (Potuschak *et al.*, 2006).

Nous avons cloné une partie du gène de la protéine NbXRN4 dans le vecteur d'expression viral rep5 (**figure III.33.**). Ce vecteur d'expression, ou réplicon, est issu de l'ARN-5 du BNYVV (Schmidlin *et al.*, 2005). L'ARN est répliqué par la RdRp du BNYVV, et permet l'expression des protéines clonées. Dans notre cas, nous voulions savoir si le rep5 pouvait constituer un vecteur de VIGS (virus induced gene silencing) efficace pouvant cibler l'ARN messager du gène NbXRN4 endogène. Pour cela, nous avons donc infecté des plantes *N. benthamiana* avec les ARN-1, -2 et -3, supplémentés des transcrits rep5-XRN4. Nous avons recherché les marqueurs de l'ARN silencing et la présence de l'ARN-3 viral dans les feuilles infectées sept jours après inoculation. A l'aide d'une sonde ciblant la séquence de XRN4, nous obtenons de forts signaux au niveau des ARN de haut poids moléculaire dans les pistes contenant le rep5-XRN4, mais nous n'avons pas pu observer de siRNA spécifiques, suggérant l'absence de l'ARN silencing ou son contournement par le BNYVV (**figure III.34.A.**). Nous avons toutefois voulu savoir si l'expression du gène était affectée. Nous avons procédé à la quantification de l'expression endogène du gène NbXRN4 par RT-PCR quantitative sur les ARN de 4 plantes infectées par les ARN-1, -2, -3 et rep5-GFP et 4 plantes infectées par les ARN-1, -2, -3 et rep5-XRN4. Les résultats sont présentés dans la **figure III.34.B.** Comme on peut le voir, une variabilité de la quantité du messager de XRN4 est observée dans les plantes infectées par les constructions exprimant rep5-XRN4 mais pas rep5-GFP. Il est alors difficile de comparer les données. Toutefois, le fait qu'il n'y ait pas de différence significative entre les plantes infectées avec le rep5-GFP et le rep5-XRN4 n'est pas étonnant puisqu'on ne détectait pas de siRNA spécifiques de XRN4. L'implication de la protéine p14, suppresseur de silencing, dans ce phénomène est probable. Ainsi, le vecteur rep5 ne peut pas être utilisé comme vecteur efficace de VIGS.

Nous avons tout de même analysé l'accumulation de l'ARN-3 et de l'ARN-3sub par northern-blot (**figure III.34.A.**). Si les ARN-3 génomiques et subgénomiques sont détectés en présence de rep5-XRN4 et de rep5-GFP, aucune corrélation ne peut être établie entre le taux de XRN4 endogène et l'accumulation des ARN viraux.

Nous avons alors décidé de créer un hairpin permettant la production de siRNA dirigeant l'inactivation de l'ARN messager de XRN4 cette fois-ci en expression transitoire (**figure III.33., hpXRN4**). L'efficacité de l'hairpin, nommée hpXRN4, à produire des siRNA a été testée : des agrobactéries contenant la construction hpXRN4 ont été infiltrées dans des feuilles de *N. benthamiana*. Les siRNA dirigés contre XRN4 ont été recherchés dans ces plantes. Alors que les plantes infiltrées par hpXRN4 montrent des siRNA spécifiques, aucun signal n'est observé dans les plantes infiltrées par le vecteur vide pFGC (**figure III.35.A.**). Une analyse par qRT-PCR a permis de quantifier

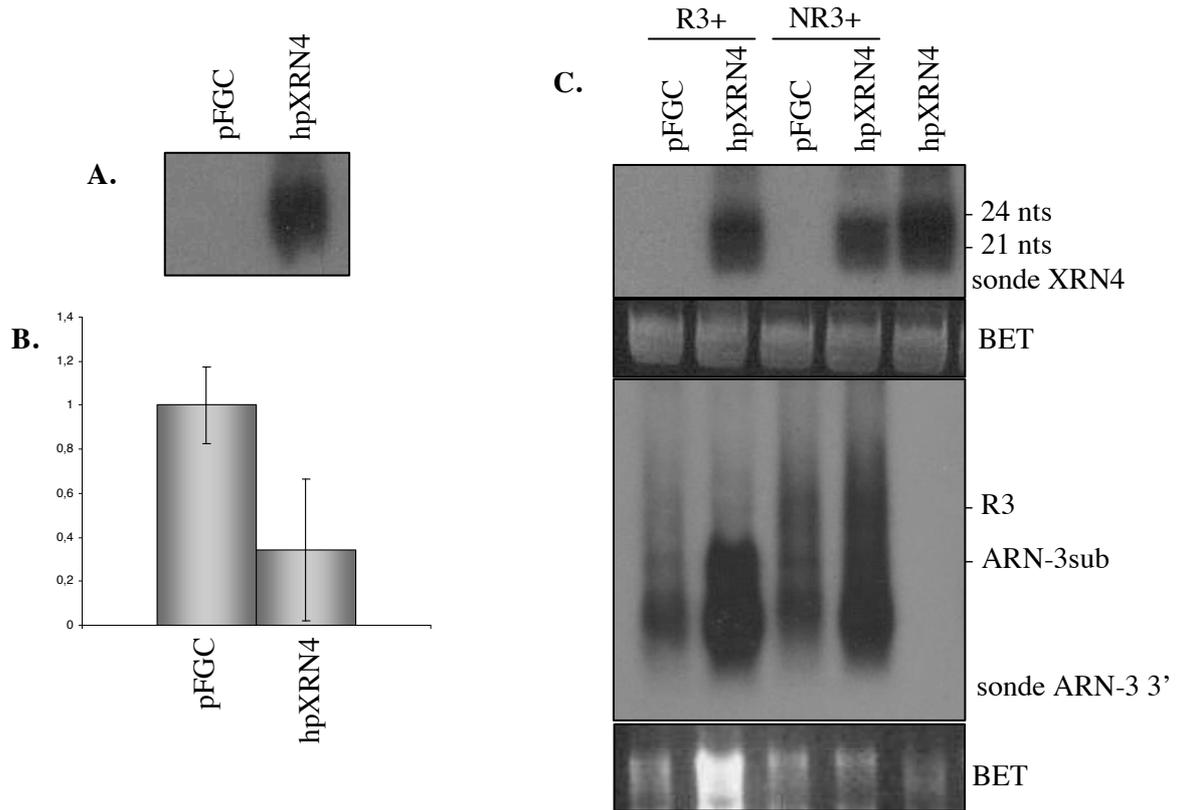


Figure III.35. : Effet de hpXRN4 sur l'accumulation de XRN4 et sur l'accumulation de l'ARN-3sub. **A.** Recherche des siRNA spécifiques de XRN4 par northern-blot. **B.** Analyse par qRT-PCR du taux de messagers de XRN4 endogènes (graphique). **C.** Effet de hpXRN4 sur l'accumulation de l'ARN-3sub en co-expression transitoire. Les ARN des plantes co-infiltrées ont été analysés par northern-blot à l'aide d'une sonde dirigée contre XRN4 (panneau du haut) et contre la partie 3' de l'ARN-3 (panneau du bas). La quantité d'ARN chargée peut être visualisée par coloration au BET (sous les deux panneaux).

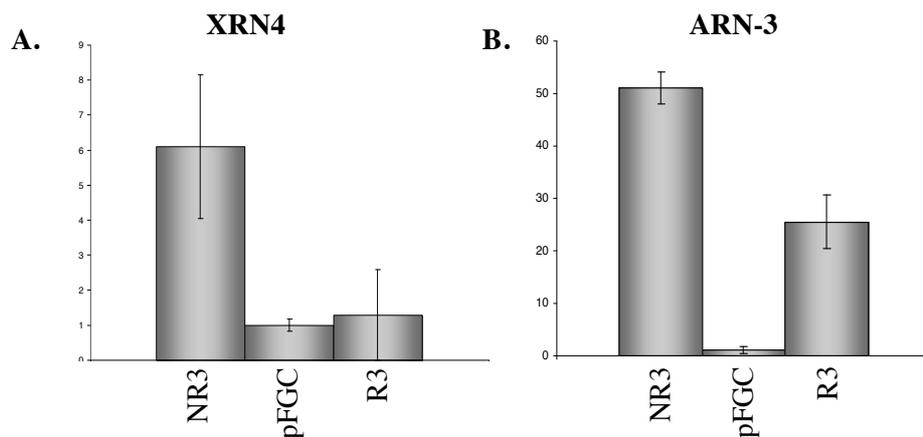


Figure III.36. : Effet des constructions NR3 et R3 sur le taux de XRN4. **A.** Quantification relative par qRT-PCR du taux de XRN4 endogène dans les plantes infiltrées par les constructions R3, NR3 et pFGC. **B.** Quantification relative par qRT-PCR du taux d'ARN-3 dans les mêmes plantes.

l'expression du gène de XRN4 : le taux de XRN4 est divisé par trois dans les plantes infiltrées par hpXRN4, comparé aux plantes infiltrées par le contrôle pFGC (**figure III.35.B.**).

Sachant que la construction hpXRN4 est fonctionnelle et permet la diminution de l'expression de XRN4, nous avons voulu savoir si la coinfiltration de hpXRN4 avec les constructions R3 et NR3 (voir p.129) pouvait avoir un effet sur le clivage. Si la protéine XRN4 est impliquée dans le clivage de l'ARN-3 et dans l'accumulation de l'ARN-3sub, une plus faible expression de la protéine mènera à une plus faible accumulation de l'ARN-3sub, et à une augmentation de l'accumulation de l'ARN-3 entier. La recherche des siRNA dans les plantes coinfiltrées montre que le silencing est mis en place dans les plantes coinfiltrées avec la construction hpXRN4 (**figure III.35.C., panneau du haut**). L'analyse par northern-blot des ARN extraits des feuilles infiltrées indique une accumulation plus importante de l'ARN-3sub dans les plantes infiltrées par R3 et hpXRN4 que dans les plantes infiltrées par R3 et pFGC (**figure III.35.C., panneau du bas**). L'ARN-3 entier n'est pas retrouvé, indiquant que le clivage peut toujours se produire. Les plantes coinfiltrées par NR3 et hpXRN4 présentent davantage d'ARN-3sub et d'ARN-3 entier (NR3) que les plantes coinfiltrées par NR3 et pFGC. Ces résultats montrent que la protéine XRN4 est impliquée dans la dégradation de l'ARN-3sub et de l'ARN-3 entier. Ce phénomène ne correspond pas au mécanisme de clivage recherché. La protéine XRN4 ne semble donc pas impliquée dans le clivage de l'ARN-3.

Le taux d'expression de XRN4 a été quantifié par RT-PCR quantitative dans les plantes infiltrées uniquement par les constructions R3, NR3 et pFGC. Si les taux d'expression du messenger de XRN4 est comparable entre les plantes infiltrées par R3 et pFGC, l'expression de XRN4 dans les plantes infiltrées par NR3 est presque 6 fois supérieure (**figure III.36.A.**). Cette surexpression pourrait être expliquée par l'expression de la protéine p25, puisqu'elle est uniquement détectée lorsque la construction NR3 est infiltrée (voir paragraphe 2.2.1). Toutefois, aucune surexpression du messenger de XRN4 n'est détectée dans les *A. thaliana* exprimant p25. Une autre possibilité pourrait consister en l'activation de l'expression de XRN4 par l'ARN NR3 qui serait plus stable que l'ARN viral et forcerait l'expression de XRN4 pour favoriser sa dégradation.

Afin de déterminer l'effet de XRN4 lors de l'infection virale, nous avons préalablement infiltré les feuilles de *N. benthamiana* avec la construction NR3, qui induit l'expression de XRN4, la construction hpXRN4 qui diminue l'expression de XRN4, ainsi que les constructions témoin R3 et pFGC. La recherche de siRNA avant infection et après infection indique que le silencing est mis en place, mais que l'expression des siRNA est inhibée lors de l'infection virale puisque plus aucun siRNA spécifique n'est détecté par une sonde XRN4 (**figure III.37.A.**).

L'analyse des ARN totaux extraits des feuilles infiltrées puis infectées a été effectuée sept jours après inoculation. L'ARN-3 viral a été recherché par northern-blot à l'aide d'une sonde 3' (**figure III.37.B. panneau du haut**). Si l'ARN-3 et l'ARN-3sub sont détectés dans les 4 échantillons, on peut noter que

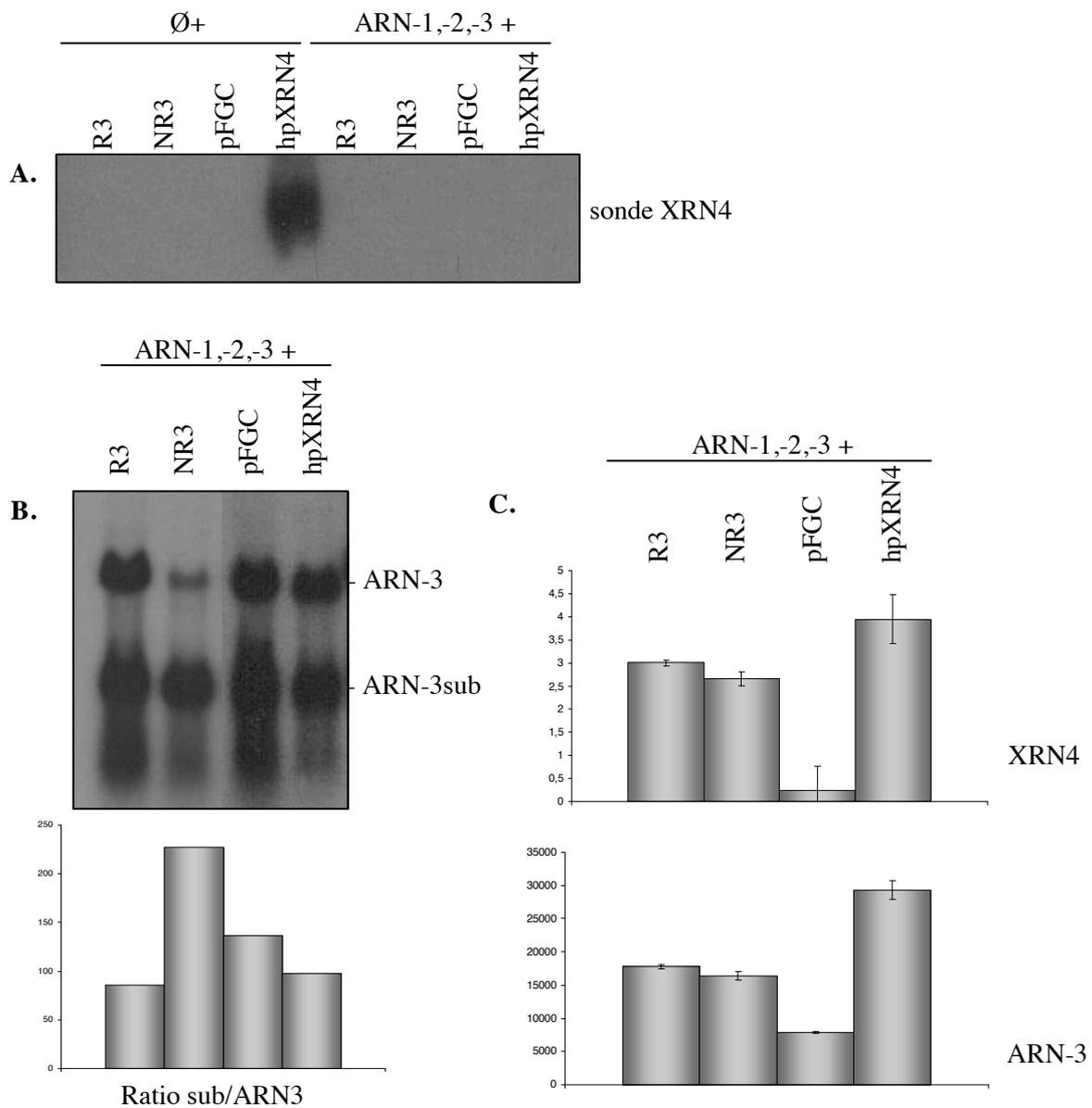


Figure III.37. : Effet des constructions NR3 et R3 sur l'infection virale. A. Recherche des siRNA spécifiques de XRN4 par northern-blot dans les plantes infiltrées et/ou infectées. **B.** Analyse des ARN extraits des feuilles infiltrées puis infectées. Une sonde ciblant la partie 3' de l'ARN-3 a été utilisée. Le graphique représente le ratio ARN-3sub/ARN-3 dans chaque piste. **C.** Graphiques représentant la quantification par qRT-PCR du taux de XRN4 endogène et d'ARN-3.

la quantité d'ARN-3 génomique semble diminuée dans la feuille infiltrée avec NR3 par rapport au taux d'ARN-3sub. Nous avons donc quantifié (ImageJ) les signaux correspondant à l'ARN-3 et à l'ARN-3sub dans les quatre pistes. Le ratio ARN-3sub/ARN-3 est voisin de 100 dans le cas de R3, pFGC et hpXRN4 (86, 136 et 98 respectivement) (**figure III.37.B., panneau du bas**). En ce qui concerne NR3, le ratio est proche du double (228). La quantité d'ARN-3sub est donc significativement supérieure dans la feuille préalablement infiltrée avec NR3.

Afin de savoir si ce phénomène est lié à une expression plus importante de XRN4, nous avons quantifié le messenger de XRN4 par qRT-PCR dans les feuilles infectées (**figure III.37.C., panneau du haut**). La quantité de XRN4 n'est pas diminuée dans les feuilles infiltrées par hpXRN4 et infectées, ce qui est cohérent avec l'absence de siRNA. Par contre, la quantité de messagers de XRN4 est plus faible dans les plantes infiltrées par pFGC. Toutefois, si l'on compare l'accumulation de l'ARN-3 avec le taux de XRN4 par qRT-PCR dans ces mêmes échantillons, on observe que les variations sont similaires (**figure III.37.C., panneau du bas**). Cela indique une corrélation entre le taux d'infection par le BNYVV et la quantité du messenger de XRN4. Ainsi, en condition virale, plus l'ARN-3 est présent en grande quantité, plus l'expression de XRN4 est élevée.

Cela montre aussi que le taux de XRN4 n'est pas corrélé à la suraccumulation d'ARN-3sub par rapport à l'ARN-3 génomique. Cependant, l'expression préalable de NR3 avant l'infection a permis de suraccumuler l'ARN-3sub. Ce phénomène peut s'expliquer par la surexpression de XRN4 avant l'infection. Même si le taux de XRN4 est ensuite comparable dans les feuilles infiltrées par R3 et NR3 après infection, XRN4 a pu déréguler l'expression d'autres facteurs impliqués dans le clivage qui sont alors déjà activés au moment de l'infection virale.

Ces résultats sont préliminaires et ne permettent pas de conclure quant à la réelle implication de XRN4 sur la dégradation de l'ARN-3 après clivage. Cependant, le fait que l'infiltration de NR3 induit une suraccumulation du messenger de XRN4 est intéressant. Afin de connaître l'implication de l'ARN-3 ou de la protéine p25 dans ce phénomène, des expériences complémentaires seront nécessaires.

III. Discussion

3.1. Nature de l'ARN-3sub

Nous avons vu que l'ARN-3sub peut être produit après expression transitoire de l'ARN-3, et qu'il n'est donc pas un ARN subgénomique comme admis jusqu'à présent. Cette hypothèse a été confirmée par la caractérisation de l'extrémité 5' du fragment en contexte viral et en expression transitoire. L'extrémité n'est pas coiffée et correspond à la position 1232 de l'ARN-3. Habituellement, les ARN subgénomiques possèdent la même protection de l'extrémité 5' que celle portée par les ARN génomiques du virus. Ce résultat constitue le premier élément indiquant que l'ARN-3sub n'est probablement pas un ARN subgénomique. De plus, puisqu'en expression transitoire la RdRp virale n'est pas présente, l'ARN-3sub ne peut pas être issu d'une néosynthèse comme le sont habituellement les ARN subgénomiques. Il ne s'agit pas non plus ici d'un ARN satellite ou d'un ARN DI. Ces deux familles d'ARN sont associés à des virus, mais ne sont retrouvés que sporadiquement. Or l'ARN-3sub est systématiquement retrouvé conjointement avec le BNYVV dès lors que l'ARN-3 sauvage est présent dans l'inoculum. De plus, la séquence de l'ARN-3sub est entièrement identique à celle de la partie 3' de l'ARN-3, ce qui n'est jamais le cas, ou du moins qu'en partie, des satellites ou des ARN DI.

Si l'ARN-3sub n'est pas un ARN subgénomique, quelle est donc sa nature ? Nous avons supposé que le mode de synthèse de l'ARN-3sub serait un clivage et/ou une dégradation de l'ARN-3 génomique. Cette hypothèse a été validée par l'incubation des transcrits de l'ARN-3 *in vitro* dans un système acellulaire de germes de blé. L'apparition d'une bande similaire à l'ARN-3sub correspond à la disparition de l'ARN-3 génomique, et indique bien que l'ARN-3sub provient d'un clivage suivi d'une dégradation de l'ARN-3.

3.2. Rôle de la séquence coremin

Comme nous l'avons vu, des modifications de la séquence coremin induisent de multiples phénomènes : diminution de l'accumulation de la protéine p25, absence de mouvement systémique du virus chez *B. macrocarpa*, et perte de l'accumulation de l'ARN-3sub. Le mécanisme de l'implication de coremin dans ces différents phénomènes n'a pas pu être élucidé par nos études.

En ce qui concerne l'accumulation de la protéine p25, nos études ont permis de montrer que l'hélice de la séquence coremin est indispensable à la bonne expression de p25. En effet, des mutations dans l'hélice réduisent considérablement l'accumulation de p25, alors que les mutations affectant la boucle n'ont pas d'effet. Il s'agit là d'un mécanisme original de régulation de la traduction puisque la région régulatrice est située en aval du gène et non pas en amont. On peut aussi se demander quel est l'intérêt d'une telle régulation ?

Nous avons vu que des ARN-3 porteurs de mutations dans coremin sont clivés de la même manière que le sauvage puisque 1) les ARN-3 sauvage et mutés s'accumulent à des taux équivalents, 2) les ARN-3 sauvage et mutés ne sont pas détectés en expression transitoire, 3) les ARN-3 sauvage et mutés sont clivés et dégradés lors d'incubation dans les germes de blé, mais seul l'ARN-3 sauvage permet l'accumulation de l'ARN-3sub. Nous pouvons alors déduire que l'ARN-3sub produit dans le cas des mutants n'est pas stabilisé puisqu'il n'est jamais détecté, que ce soit en contexte d'infection virale sur feuille, en expression transitoire ou en incubation dans les germes de blé. De plus, des fragments 3' plus courts ont été détectés par cRT-PCR dans le cas des mutants, indiquant qu'une exonucléase dégrade progressivement l'ARN-3 pour produire l'ARN-3sub sauvage, et poursuit la dégradation de l'ARN-3sub muté dans la séquence coremin. La stabilité des ARN-3 mutés serait donc plus faible que l'ARN-3 sauvage ? Nous avons alors étudié les ΔG des séquences coremin sauvage et mutées, et nous avons vu que les formes les plus stables sont celles du mutant E, suivi du mutant K, du sauvage et enfin du mutant C. En ce qui concerne les structures des ARN-3sub sauvage et mutés, leur ΔG est très proche et est compris entre -153,91 (E) et -159,95 (C). Un test de stabilité des ARN-3sub sauvage et K en extraits de germes de blé a permis de montrer que le mutant est légèrement plus stable que le sauvage, mais à une toute autre échelle que lorsque l'ARN-3 entier est incubé dans les mêmes conditions : dans ce cas, l'ARN-3sub n'est pas du tout retrouvé après deux heures d'incubation des ARN-3 mutés. L'ARN-3sub transcrit directement pourrait adopter une autre conformation que lorsque l'ARN-3 est transcrit puis clivé, lui donnant une structure plus stable. Une autre hypothèse pourrait être que le substrat de l'endonucléase et/ou de l'exonucléase 5'→3' qui dégrade l'ARN-3 n'est présent que sur l'ARN-3 entier, ce qui provoque une inactivité de l'exonucléase sur l'ARN-3sub déjà présent dans le milieu. Si l'implication de XRN4 n'est pas encore totalement confirmée dans la dégradation de l'ARN-3, nous avons vu que l'action de cette enzyme est bloquée par des répétitions de G. Or les transcrits non coiffés des ARN-3sub sauvage et muté ont été placés sous contrôle d'un promoteur T7 pour permettre leur synthèse *in vitro*. Lors de la transcription, trois G sont incorporés à partir de la position +1 du promoteur. Ces trois G pourraient expliquer les différences observées entre contexte viral et *in vitro*.

Si la séquence coremin permet la stabilisation de l'ARN-3sub, et que cela n'est pas dû à une structure particulièrement stable, il est probable qu'un facteur protéique intervienne dans la stabilisation par reconnaissance spécifique du motif. Nous savons que la protéine virale p14 interagit spécifiquement avec coremin. Ici, le facteur stabilisateur serait plutôt cellulaire puisqu'aucune protéine virale n'est présente lors de l'expression transitoire des constructions R3 et NR3, où l'ARN-3sub est détecté.

Il est difficile de conclure quant à l'implication de la séquence elle-même sur les rôles cités précédemment. En effet, les mutants que nous avons obtenus possèdent une séquence coremin mutée, et ne produisent pas d'ARN-3sub. Quel est alors le rôle attribué à la séquence coremin et quel est celui

attribué à l'ARN-3sub dans la mise en place de la systémie ? Il semblerait que coremin soit actif uniquement dans un contexte structural favorable. En effet, le mutant pAStu12 a permis de montrer que le déplacement de la séquence coremin à une autre position sur l'ARN-3 ne permet pas de restaurer efficacement la systémie. De plus, le mutant pINTEL35 qui contient deux séquences coremin sauvages et qui est donc capable de synthétiser l'ARN-3sub n'est pas non plus très efficace à induire le mouvement à longue distance. Il semblerait donc que l'ARN-3sub ne soit pas impliqué dans la systémie, mais que ce soit plutôt la séquence coremin. Cela est confirmé par le fait que l'ARN-5 du BNYVV et l'ARN-3 du BSBMV qui contiennent la séquence coremin permettent également la mise en place du mouvement à longue distance.

Un tel rôle pour une séquence ribonucléotidique a déjà été montré à l'image des viroïdes. Ces entités composées de petits ARN simple-brin circulaires (de 246 à 401 nts) sont autonomes, non codants, et utilisent les ARN polymérase de la cellule pour se répliquer. Ils sont capables de passer au travers des plasmodesmes pour le mouvement de cellule à cellule, et d'utiliser le système vasculaire pour se propager à l'ensemble de la plante. Une séquence d'ARN est donc suffisante pour induire le mouvement systémique des viroïdes (Zhong *et al.*, 2007). Le mouvement systémique des virus quant à eux est encore largement méconnu. Les virus utilisent deux stratégies pour leur mouvement au sein de la plante : ils peuvent être transportés sous forme de particule virale, ou indépendamment de la protéine de capsid. Pour le BMV, il a été montré que l'ARN-3 infiltré dans une feuille inférieure peut être transporté vers une feuille supérieure où les ARN-1 et -2 sont présents (Gopinath and Kao, 2007). Ce mouvement ne nécessite pas de protéine virale et utilise le phloème dans la direction du flux des photoassimilats.

Si le mouvement systémique n'a pas été analysé plus profondément dans cette étude, l'implication d'une seule séquence dans le mouvement systémique est un fait intéressant.

3.3. Facteur cellulaire associé au clivage

L'ARN-3sub retrouvé en expression transitoire permet d'affirmer qu'un facteur cellulaire, et non viral, est impliqué dans le clivage. Nos recherches nous ont menés à utiliser un système plus simple qu'un système *in planta*. Les plantes hôtes que nous pouvons utiliser pour une infection virale sont entre autres *C. quinoa*, *B. macrocarpa*, *N. benthamiana*, mais aucun de leur génome n'est actuellement séquencé. En effet, le BNYVV n'infecte pas la plante modèle *A. thaliana* qui est aisée à manipuler. Afin d'essayer de caractériser le ou les facteurs impliqués dans le clivage de l'ARN-3 nous nous sommes alors tournés vers les extraits de germes de blé. Ces extraits contiennent tous les facteurs nécessaires à la traduction (ARN de transfert, ribosomes, et facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison) puisqu'ils sont commercialisés dans le but de faire de la traduction *in vitro*. Nous avons pu constater l'apparition de l'ARN-3sub lors d'une incubation de transcrits d'ARN-3 dans ces extraits. Il semblerait donc qu'un facteur impliqué dans le clivage de l'ARN-3 soit présent dans l'extrait. S'il ne

s'agit pas du même facteur qu'*in planta*, il pourrait en être un homologue. Nous avons montré que le facteur en question n'est pas de nature nucléique, mais plutôt protéique ou nucléoprotéique. Toutefois, malgré nos efforts, nous n'avons pas pu l'identifier.

Nous avons pu montrer que la diminution du taux de XRN4 ne permet pas d'inhiber le clivage de l'ARN-3 exprimé transitoirement, indiquant que XRN4 ne semble pas impliqué directement dans le clivage ou la dégradation de l'ARN-3. D'autre part, nous avons pu montrer que NR3 permet la suraccumulation de XRN4, ce qui conduit, après une semaine, à une suraccumulation d'ARN-3sub. Le taux de XRN4 n'est pourtant pas supérieur au moment où le taux d'ARN-3sub a été mesuré. Ainsi, la protéine XRN4 pourrait avoir dérégulé un certain nombre de gènes, menant à l'augmentation du clivage de l'ARN-3. Le mécanisme de ce phénomène n'a pas pu être élucidé. Cependant, le fait que XRN4 soit impliqué dans la dégradation des ARN génomiques du TBSV, du CNV et du WNV est intrigant.

Afin de continuer les études dans ce sens, il serait utile d'infecter des plantes KO ou silencées pour des gènes de nucléases et d'observer les effets sur l'accumulation de l'ARN-3sub. Malheureusement, les mutants disponibles de *N. benthamiana* ne sont pas nombreux. Nous avons utilisé la technique d'expression transitoire de siRNA dirigés contre XRN4. Les résultats ne sont pas reproductibles d'une plante à l'autre puisque les insertions du transgène dans le génome sont multiples et peuvent moduler les résultats. L'expression constitutive des siRNA par transformation stable de plantes serait un meilleur moyen d'identifier les facteurs impliqués. Toutefois, cette technique est assez longue, et ne permet pas de cibler beaucoup de gènes.

Nous pourrions transformer des *A. thaliana* mutées dans les gènes de nucléases (Li *et al.*, 2009) avec l'ARN-3. Les effets sur l'accumulation de l'ARN-3 pourraient être testés.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les résultats présentés dans ce mémoire concernent l'analyse du rôle de la protéine p25 et des séquences non codantes de l'ARN-3 du BNYVV dans la pathogénicité virale. Les études antérieures à ce travail de thèse avaient montré que le produit du gène codé par l'ARN-3, la protéine p25 est responsable des symptômes foliaires et racinaires, et que l'ARN-3 porte une séquence nucléotidique impliquée dans la mise en place du mouvement à longue distance du virus. Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires de ces événements, nous avons soulevé plusieurs questions auxquelles nous avons tenté d'apporter des réponses :

- 1) le ciblage de l'ARN-3 par l'utilisation d'hairpins permet-il la mise en place de la résistance des plantes face au BNYVV ?
- 2) comment la protéine p25 permet-elle l'induction des symptômes caractéristiques de la rhizomanie ?
- 3) quelle est l'origine et quel est le rôle du petit ARN colinéaire à la partie 3' de l'ARN-3 et toujours retrouvé lors de l'infection virale en présence d'ARN-3 ?

En premier lieu, nous avons voulu apporter une nouvelle source de résistance au BNYVV par la construction et l'expression d'hairpins dirigées contre la séquence de l'ARN-3. En effet, bien que des plantes naturellement résistantes et des plantes transgéniques développées dans notre laboratoire permettent d'enrayer la maladie et d'empêcher la propagation du virus, il est préférable de multiplier les sources de résistance afin de palier un éventuel contournement. Nous avons vu dans les chapitres II et III que l'ARN-3 est un des piliers de l'infection virale puisqu'il aggrave les symptômes et permet le mouvement systémique. La dégradation ciblée de l'ARN-3 permettrait de restreindre fortement les

effets néfastes de l'infection sur la plante. Les différentes expériences menées lors de cette étude démontrent que certaines des hairpins confèrent une faible résistance puisque les ARN viraux s'accumulent en plus faible quantité, et sont moins efficacement transportés vers les feuilles supérieures. Cependant, les études n'ont pas été réalisées dans les conditions naturelles d'infection par le vecteur au niveau des racines. Ce paramètre peut entrer en compte dans l'efficacité des hairpins à dégrader l'ARN-3. L'efficacité des constructions hairpin devront donc être testées en infectant de façon naturelle des *B. vulgaris* transgéniques exprimant les meilleures constructions obtenues dans cette étude.

Pourquoi la présence des hairpins n'est-elle pas suffisante pour la dégradation complète de l'ARN-3 ? Les siRNA détectés démontrent que l'ARN silencing se met en place dans la plante, mais il n'est pas suffisamment efficace pour dégrader l'ARN totalement. Il se pourrait que l'ARN soit protégé d'une manière ou d'une autre du mécanisme de défense de la plante. Nous avons en effet montré que la protéine suppresseur p14 est impliquée dans cette protection, mais elle n'en est pas le seul acteur puisque l'ARN-3 est toujours détecté en son absence. L'ARN-3 pourrait être protégé par la présence d'un autre facteur viral, ou par sa structure secondaire et tertiaire. En effet, dans les chapitres suivants nous avons montré que la séquence nucléotidique de l'ARN est elle-même probablement reconnue par des protéines virales et cellulaires, ces dernières pourraient lui conférer cette protection.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes de la mise en place de la pathogénicité par la protéine p25. Si des données sont déjà publiées sur les propriétés de cette protéine, les mécanismes permettant l'induction des symptômes étaient encore mal connus lors de mon arrivée au laboratoire. Nous avons orienté nos études sur l'utilisation d'une stratégie de transgénèse de différentes plantes hôtes et non hôtes du BNYVV. Les *A. thaliana* exprimant constitutivement la protéine p25 ont été caractérisées : ces plantes présentent un phénotype de croissance accélérée, de prolifération racinaire et leur contenu hormonal, tout comme de nombreux gènes cellulaires, est fortement dérégulé. Le taux d'auxine est supérieur au contrôle à la fois chez *A. thaliana 35S::p25* et dans les betteraves rhizomaniées, indiquant des similarités d'action de la protéine dans les deux espèces, à l'image de la prolifération racinaire qui rappelle les symptômes de rhizomanie. Ces données indiquent que la protéine virale induit une perturbation physiologique globale. Des lignées de *N. tabacum* exprimant différenciellement p25 ont également été obtenues, mais dans cette espèce la protéine p25 semble avoir une action différente puisque la taille des plantes est inversement proportionnelle à la quantité de p25. Il est intéressant de noter que la tentative de transgénèse de plantes *N. benthamiana* et de *B. vulgaris* n'a pas permis d'obtenir des lignées exprimant la protéine virale, suggérant le caractère létal de la protéine p25 dans ces espèces. Ainsi, si la protéine p25 affecte différenciellement la physiologie des plantes, elle semble avoir un effet

particulièrement néfaste sur les plantes hôtes du BNYVV. Il est ainsi difficile de corrélérer les résultats obtenus sur *A. thaliana* à l'organisme d'intérêt, la betterave sucrière.

Comment peut-on expliquer les différences observées entre les plantes testées dans notre étude ? La protéine p25 pourrait avoir plusieurs fonctions lors de l'infection, à l'instar de nombreuses protéines virales. Un rôle de la protéine p25 pourrait être d'activer directement la transcription. Toutefois l'interaction entre la protéine p25 et l'ADN chromatinien n'a malheureusement pas pu être démontrée par nos expériences. La protéine p25 pourrait également être reconnue comme un produit de gène de virulence, ou d'avirulence, selon la composition en acides aminés de la tétrade de la protéine par un facteur cellulaire spécifique. Suivant la plante, la présence du récepteur et de l'interaction induirait ou non la cascade de signalisation conduisant à l'ensemble des symptômes observés en contexte d'infection naturelle. Nous pouvons supposer que les plantes que nous avons étudiées, *A. thaliana*, *N. tabacum*, *N. benthamiana* et *B. vulgaris* possèdent des différences dans leur transcriptome et leur protéome, expliquant les différences de reconnaissance de la protéine p25. Si les études récentes ont montré que la protéine p25 interagit, entre autres, avec une protéine cellulaire à domaine F-box, rien n'indique que l'interaction soit biologiquement significative en contexte d'infection puisque les résultats sont issus de plantes résistantes *Rz2*. Néanmoins, la protéine caractérisée pourrait servir de récepteur à la protéine p25, qui entraînerait la cascade de dérégulations transcriptomiques que nous avons décrite. Au laboratoire, les études sont en cours pour poursuivre l'élucidation de ces mécanismes.

Dans le dernier chapitre, nous avons abordé le mécanisme de production de l'ARN-3sub toujours conjointement retrouvé avec les ARN viraux génomiques. Nous avons pu montrer que l'ARN-3sub n'est pas un ARN subgénomique conventionnel. En effet, il n'est pas issu d'une néosynthèse par la réplicase virale, mais d'un clivage suivi d'une dégradation par une ou plusieurs protéines cellulaires. Si nous n'avons pas pu identifier les facteurs cellulaires impliqués dans ce processus, nous avons toutefois montré que la séquence ribonucléotidique "coremin" est nécessaire à l'accumulation de l'ARN-3sub. Il semblerait que cette séquence de 20 nts soit impliquée dans la protection de l'ARN contre une dégradation 5'→3', probablement grâce à l'interaction avec une protéine cellulaire encore non caractérisée. L'intégrité de coremin est également nécessaire au mouvement à longue distance du virus.

La séquence coremin est donc, avec p25, le deuxième facteur important porté par l'ARN-3. De plus, le taux d'accumulation de la protéine p25 est également dépendant de la séquence coremin. Il pourrait s'agir d'une régulation de la traduction de l'ORF, mais rien n'exclut une régulation post-traductionnelle, bien que cela paraîsse moins plausible. Quoi qu'il en soit, coremin est donc directement impliquée dans la régulation de l'infectivité *via* la régulation de la protéine p25.

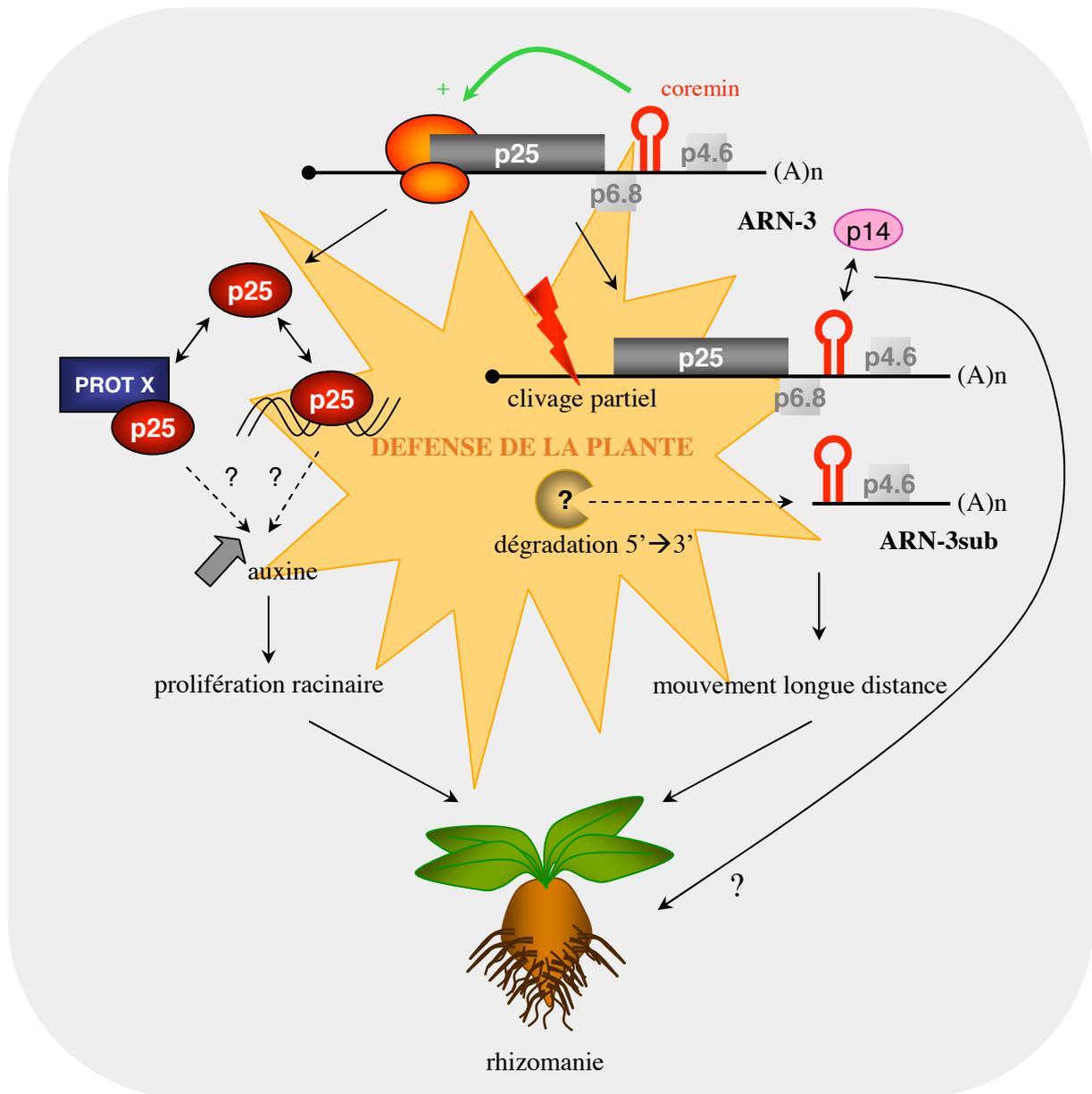


Figure CG.1. : Modèle de la mise en place des symptômes de rhizomanie. La séquence coremin (boucle rouge) permet d'augmenter l'accumulation de protéine p25, probablement par régulation de la traduction du gène. La protéine p25 interagit avec une protéine cellulaire (Thiel *et al.*, 2009), ou active la transcription de gènes cellulaires. Ces interactions spécifiques induisent alors une dérégulation transcriptomique et hormonale globale, menant à la prolifération racinaire de la betterave infectée. L'ARN-3 subit une dégradation 5'→3' par un facteur cellulaire inconnu, jusqu'au niveau de la séquence coremin. La séquence coremin de l'ARN-3sub entraîne le mouvement systémique du virus par un mécanisme non élucidé. Le mécanisme de défense de la plante intervient vraisemblablement à de nombreux niveaux pour tenter de contourner les mécanismes de la pathogénicité virale, mais il est également utilisé par le virus pour aboutir à une meilleure infectivité. Le rôle de l'interaction de la protéine p14 avec la séquence coremin est inconnu.

La séquence coremin est conservée dans d'autres espèces virales comme le BSBMV et le CMV. Ces séquences semblent avoir les mêmes caractéristiques que celle portée par l'ARN-3 du BNYVV : elle semble impliquée dans la pathogénicité (CMV) et dans le mouvement systémique (ARN-3 du BSBMV, ARN-5 du BNYVV).

Les résultats que nous avons obtenus permettent de mieux comprendre les mécanismes menant à la mise en place de la pathogénicité liée à l'ARN-3 du BNYVV. En guise de conclusion à mon travail de thèse, je propose un modèle résumant le rôle de l'ARN-3 et des facteurs associés, menant aux symptômes de rhizomanie (**figure CG.1.**). La séquence et/ou la structure de coremin permet la stabilisation de l'ARN-3sub et le mouvement à longue distance du virus. Cette séquence permet également la régulation de l'accumulation de la protéine p25, menant au désordre hormonal et à la prolifération racinaire. L'ARN-3 est donc impliqué dans la pathogénicité grâce à au moins deux facteurs : la séquence coremin et la protéine p25. Le rôle de l'interaction entre la séquence coremin et la protéine suppresseur de silencing p14 est inconnu. Les mécanismes de défense de la plante interfèrent probablement à différents niveaux pour limiter l'action de l'ARN-3. Ces mécanismes peuvent être contournés par le virus, qui peut même les utiliser à son profit pour favoriser son infectivité. Ainsi, la dégradation partielle de l'ARN-3 permet l'accumulation de l'ARN-3sub, menant à une conformation de la séquence coremin favorable au mouvement systémique. De plus, les interactions spécifiques entre la protéine p25 et des facteurs de l'hôte (ADN chromatinien ou protéine cellulaire) induisent des dérégulations hormonales propices à l'infectivité virale. C'est donc l'action conjointe des facteurs viraux et cellulaires qui permet la mise en place des symptômes de rhizomanie.

De nombreux points restent néanmoins obscurs, et il me semble judicieux de poursuivre ce travail de thèse par la réalisation de plusieurs expériences qui pourront, je l'espère, répondre à nos interrogations.

Comment la protéine p25 mène-t-elle à de telles perturbations physiologiques ? Une expérience de ChIP pourrait être effectuée sur des *A. thaliana* exprimant constitutivement la protéine p25 étiquetée HA. Nous avons obtenu des lignées où la protéine virale recombinante est détectée. Les protocoles de ChIP étant adaptés à cette plante, l'expérience sera certainement plus fructueuse. Toutefois, si aucune séquence d'ADN n'est immunoprécipitée, cela pourrait signifier que la protéine p25 agit de façon indirecte. L'immunoprécipitation de protéines cellulaires à partir de fractions cytoplasmiques et nucléaires pourra éventuellement nous permettre d'identifier une cible potentielle de p25. Il serait également intéressant de comparer des lignées d'*A. thaliana* exprimant chacune des protéines p25 comportant des motifs de tétrade différents. Ainsi, il serait possible de corréler les variations de la

séquence de la tétrade à d'éventuelles modulations du contenu hormonal, notamment au taux d'auxine, afin de déterminer si la pathogénicité de p25 liée à la tétrade est impliquée dans la régulation de cette hormone.

Comment l'accumulation de la protéine p25 est-elle régulée par la présence de la séquence coremin ? L'utilisation de mutants ponctuels de la séquence coremin permettrait de déterminer les nts réellement impliqués dans cette régulation. Nous avons déjà cloné la séquence coremin et les séquences coremin mutées utilisées dans mes travaux de thèse en aval d'un gène rapporteur, et nous n'avons pas observé une différence d'expression en système de traduction *in vitro* aussi nette qu'*in vivo*, même si les résultats sont préliminaires. L'ajout des séquences 5' et/ou 3' UTR de l'ARN-3 au système rapporteur apportera des informations complémentaires sur les mécanismes moléculaires de la traduction de l'ARN-3. Il est aussi possible qu'un autre facteur, absent du système *in vitro*, soit impliqué dans une telle régulation, ou que l'ARN lui-même n'adopte pas la conformation adéquate. Il sera aussi intéressant de vérifier l'influence de la séquence coremin sur l'accumulation des protéines codées par les ARN viraux qui la contiennent (CMV, BSBMV).

Quel est le facteur cellulaire qui entraîne la dégradation de l'ARN-3 ? Afin de répondre à cette question, nous pouvons là encore utiliser le système *A. thaliana*. En effet, de nombreux mutants d'insertion de T-DNA sont disponibles. La transformation de telles plantes par nos constructions binaires exprimant l'ARN-3 permettrait de visualiser si l'ARN-3 reste ou non intègre et accumule l'ARN-3sub dans ces fonds génétiques, et de déterminer quelles nucléases sont impliquées dans le clivage et la dégradation de l'ARN-3.

Comment la séquence coremin permet-elle la stabilisation de l'ARN-3sub ? L'analyse de nos résultats indique que la séquence coremin ne semble pas être l'unique facteur empêchant la dégradation complète de l'ARN-3. En effet, la détermination thermodynamique *in silico* de la stabilité de coremin ne permet pas d'expliquer la résistance de la séquence à la dégradation. Il est donc possible qu'un facteur protéique intervienne dans la reconnaissance de coremin pour stopper la dégradation. Une analyse par triple-hybride a été initiée dans notre laboratoire, afin de caractériser les partenaires viraux de cette séquence. Si la protéine virale p14 interagit avec coremin, elle ne peut pas être responsable de la stabilisation de l'ARN-3sub lors de nos expériences de clivage en extraits de germes de blé puisqu'elle n'est pas présente. Il serait intéressant de cribler une banque d'ADNc cellulaire, afin de caractériser une protéine cellulaire reconnaissant spécifiquement la séquence coremin.

Comment la séquence ribonucléotidique de l'ARN-3 entraîne-t-elle le mouvement systémique du virus ? Puisque p14 interagit avec la séquence coremin, elle constitue un bon candidat pour assister l'ARN dans la mise en place du mouvement à longue distance du virus. Il n'est pourtant pas possible

de déterminer directement l'effet de l'absence de la protéine p14 sur l'infection systémique puisqu'elle est nécessaire à la formation de lésions locales, et que son absence entraîne des infections restreintes. Son action de suppression d'ARN silencing est impliquée dans la mise en place d'une infection durable, puisque le remplacement de p14 par un autre suppresseur rétablit une infection normale (Guilley *et al.*, 2009). Si l'infection systémique n'a pas lieu sur *B. macrocarpa* en présence d'un autre suppresseur, alors la protéine p14 serait impliquée dans la systémie. Nous pourrions également insérer la séquence coremin dans le génome d'un autre virus induisant des infections locales sur *B. macrocarpa* afin d'étudier les effets sur la systémie du virus sur cette plante.

Nos résultats ont permis de mieux appréhender les mécanismes moléculaires complexes liés aux rôles de l'ARN-3 et de la protéine p25 du BNYVV. La poursuite de ces recherches permettra de disséquer davantage ces processus afin de découvrir les mécanismes intimes mis en place lors de l'infection virale. Selon les facteurs cellulaires impliqués, il sera possible ou non d'imaginer de nouvelles stratégies de résistance vis-à-vis de l'infection des plantes par des virus possédant la séquence coremin.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. MATERIEL VEGETAL

1.1. Les plantes hôtes du BNYVV

1.1.1. *Beta vulgaris* (betterave sucrière)

Appartenant à la famille des Chenopodiaceae, la betterave sucrière (*B. vulgaris* ssp.vulgaris cultivar Altissima) est cultivée pour sa racine charnue qui contient 15 à 18% de saccharose. Cette plante est l'hôte naturel du BNYVV, transmis aux racines par un protozoaire du sol virulifère *Polymyxa betae*. L'infection cause des symptômes caractéristiques tels un jaunissement des feuilles qui flétrissent aux heures chaudes de la journée, ainsi qu'une réduction de la taille du pivot et une prolifération des racines entraînant une diminution drastique du rendement en sucre.

Au laboratoire, les feuilles peuvent être inoculées mécaniquement avec une suspension virale, qui induit l'apparition de lésions locales sur feuilles environ 7 jours après l'infection. Sauf cas particulier, le virus ne se propage pas à l'ensemble de la plante.

1.1.2. *Beta macrocarpa* (betterave sauvage)

Cette plante est une dicotylédone faisant partie de la famille des Chénopodiaceae qui est utilisée pour l'étude du mouvement à longue distance (systémie) du BNYVV : l'inoculation mécanique du virus, composé des ARN-1, -2 et -3 sur feuille permet le mouvement à longue distance environ une semaine après apparition des lésions locales, alors que l'inoculation des seuls ARN-1 et -2 provoque une infection qui reste localisée.

1.1.3. *Chenopodium quinoa*

Cette plante herbacée annuelle de la famille des Chenopodiacées est généralement utilisée au laboratoire pour effectuer des infections virales sur feuille. Le BNYVV provoque l'apparition de lésions locales sur les feuilles inoculées, mais son mouvement à longue distance est bloqué. Des lésions caractéristiques apparaissent en fonction de la présence ou non des petits ARN génomiques du BNYVV.

1.1.4. *Nicotiana benthamiana*

Cette Solanacée est fréquemment utilisée en laboratoire car elle est sensible à de nombreuses infections virales (TMV, PVX...). *N. benthamiana* est un hôte du BNYVV qui permet le mouvement systémique viral même en absence de l'ARN-3. Cette plante est relativement facile à manipuler génétiquement grâce à *Agrobacterium tumefaciens* : ses feuilles peuvent être infiltrées ce qui permet la transformation transitoire des tissus, mais aussi la transformation stable de nouveaux descendants par callogenèse.

1.2. Autres plantes utilisées au laboratoire

1.2.1. *Arabidopsis thaliana* (arabette des dames)

Cette Brassicacée a un cycle de vie relativement court (2 mois environ), produit une descendance abondante par autofécondation, possède un génome diploïde relativement petit (125.10^6 pb) réparti sur 5 chromosomes entièrement séquencés. L'arabette représente donc un organisme modèle en biologie végétale. Elle est facile à transformer et de nombreux mutants sont disponibles.

1.2.2. *Nicotiana tabacum* (le tabac)

N. tabacum est une plante de la famille des Solanacées, largement cultivée de par le monde pour ses feuilles qui, une fois séchées, serviront à la confection de tabac à fumer. Le tabac est l'hôte naturel du premier virus découvert, le virus de la mosaïque du tabac, mais peut être également infecté par d'autres virus. Le tabac n'est pas hôte du BNYVV.

1.3. Culture des plantes

1.3.1. Culture de plantules *in vitro*

Un volume d'environ 100 μ l de graines est stérilisé par une solution d'éthanol 85% contenant du chlore actif à 0,45 g/100 ml (javel) pendant 5 à 10 min sous agitation continue. Cette solution est

éliminée par simple retournement du tube où les graines stagnent au fond, puis par deux brefs lavages successifs à l'éthanol 95% éliminé de la même façon. Les graines sont mises à sécher sous hotte à flux laminaire, puis semées sur un milieu stérile MS (Murashige and Skoog) M0255 (Duchefa) additionné de saccharose 1% et d'agar 0,7%, ajusté à pH 5,8. Après une vernalisation des graines 48h à 4°C et à l'obscurité, les boîtes de pétri sont placées en conditions de 16h/j de lumière (8000 lux), 70% humidité et à températures de 21°C jour et 17°C nuit.

Selon les expérimentations, les boîtes peuvent être placées horizontalement ou verticalement.

Pour sélectionner les plantes transgéniques, 50 µg/ml de kanamycine ou d'hygromycine, selon le vecteur binaire utilisé pour la transformation, sont ajoutés au milieu gélosé après autoclavage.

L'expression des gènes sous dépendance du promoteur inductible à l'œstradiol est effectuée par apport dans le milieu de culture de 10 µM d'œstradiol dilué dans du DMSO (œstradiol 100 mM).

1.3.2. Culture de plantes en terre

Après environ 20 jours de culture *in vitro*, les plantules peuvent être repiquées en terre dans du terreau composé à 82% de tourbe blonde et à 18% d'argile volcanique, à un pH voisin de 6. Elles sont laissées une semaine en jours courts (12h/j) en mini-serre afin de les protéger dans une atmosphère confinée. Suivant les expériences, les plantes sont ensuite transférées en logette de jours courts (12h/j) pour favoriser la croissance foliaire, ou en jours longs (16h/j) pour stimuler la floraison.

1.4. Transformation des plantes

1.4.1. Transformation d'*A. thaliana* par floral dip (Clough and Bent, 1998)

Le principe de cette méthode repose sur l'infection de fleurs autofécondées d'*Arabidopsis thaliana* par des agrobactéries (*Agrobacterium tumefaciens*) permettant le transfert du T-DNA vers le génome des cellules végétales afin d'obtenir des graines dont le génome renferme le transgène.

Les agrobactéries transformées par le vecteur binaire d'intérêt sont mises en culture dans 500 ml de LB additionné de rifampicine (100 µg/ml) et de kanamycine (50 µg/ml), pendant 18h à 28°C, jusqu'à une DO_{600nm} voisine de 1. Les bactéries sont sédimentées à 1500 g à température ambiante et le culot est repris dans une solution contenant ½ milieu MS M0255 (Duchefa) supplémenté de 5% saccharose, 0,05% de Silwet L-77 et 200 µM d'acétosyringone.

Les hampes florales d'*Arabidopsis thaliana* sont plongées 1 min dans la suspension bactérienne et les plantes sont ensuite placées à l'obscurité pendant 48h dans des mini-serres fermées. L'arrosage est stoppé dès l'apparition des graines, qui seront récoltées après séchage des plantes.

1.4.2. Transformation de *N. tabacum* ou *N. benthamiana*

Des feuilles stérilisées de plantes sont coupées en fines lamelles et plongées 30 s dans une suspension d'agrobactéries (*Agrobacterium tumefaciens*) ajustée à une DO de 1 dans du MgSO₄ 10 mM. L'excédent de solution est enlevé puis les lanières sont mises en culture 48h à 25°C sur des boîtes de coculture (MS 0237 Duchefa ; 6-benzylaminopurine 2 mg/L ; acide 1-naphtalène acétique 0,05 mg/L ; 3% saccharose ; 0,8% agar ; pH 5,8). Les lamelles sont lavées dans du milieu de coculture liquide, puis déposées sur milieu de sélection où seules les cellules végétales transformées vont pousser (milieu de coculture + antibiotiques appropriés). Des repiquages sont effectués régulièrement et des cals apparaissent après deux semaines. Les jeunes pousses sont transférées sur un milieu d'enracinement (1/2 MS 0237 Duchefa ; 1,5% saccharose ; 0,8% agar ; pH 5,8 ; antibiotiques), puis repiquées en terre où elles sont cultivées en serre.

1.4.3. Expression transitoire par infiltration d'agrobactéries dans des feuilles

Les agrobactéries (*Agrobacterium tumefaciens*) sont cultivées pendant 18h 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 3h. Les plantes au stade de croissance 2 feuilles sont incisées légèrement au scalpel sur la face inférieure des feuilles, puis infiltrées de la suspension bactérienne à l'aide d'une seringue sans aiguille. Le maximum d'expression est généralement atteint 4 à 5 jours post-infiltration, où les feuilles peuvent être récoltées pour analyse.

1.5. Infections virales

1.5.1. 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 ARN-1 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 microblessures 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 ARN-1 et -2 du BNYVV étant nécessaires et suffisants pour permettre la répllication 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 synthétisés par transcription *in vitro*.

1.5.2. Inoculation mécanique d'ARN viraux

Les ARN viraux issus d'une transcription *in vitro* et additionnés d'un tampon d'inoculation (Stras12 ; macaloïde 0,05% ; KH_2PO_4 50 mM) sont appliqués à l'aide d'un doigt ganté sur feuille de plante hôte, à raison de 10 à 30 μl en fonction de la taille de la feuille. Le saupoudrage préalable de célite sur la feuille permet de favoriser les blessures mécaniques et de faire pénétrer les ARN viraux dans les cellules.

II. ARN

2.1. Extraction des ARN à partir de matériel végétal

2.1.1. 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 1ml 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.

2.1.2. 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 ; MgCl_2 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 30 μl d'eau stérile.

2.1.3. Extraction d'ARN double-brin

Les feuilles infectées de *N. benthamiana* sont récoltées 8 jours post-inoculation et congelées instantanément dans de l'azote liquide. Au moins 5 g de matériel végétal sont broyés dans 10 ml de tampon STE_{x2} (STE : 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7) additionné de 1% bentonite (p/v), 1% SDS (p/v), 1% polyvinylpyrrolidone MM 25000 (p/v) et 0,1% β-mercaptoéthanol (v/v). Le mélange est ensuite extrait avec 1,5 ml de phénol saturé au STE et 0,75 ml de chloroforme-alcool isoamylique (24 :1, v/v) par gramme de feuille. La phase aqueuse obtenue après centrifugation de 10 min à 10000g est ajustée à une concentration de 15% d'éthanol. Des colonnes de cellulose Whatman CF-11 en suspension dans du STE+15% éthanol sont coulées dans des seringues de 20 ml stériles bouchées par un filtre Miracloth. La solution d'ARN est soumise à deux étapes de chromatographie sur ces colonnes. Chaque cycle consiste à charger la solution sur la colonne, puis effectuer un lavage par 150 ml de STE+15% éthanol. L'élution des ARN double-brins est réalisée par ajout de 10 ml de STE. Après la deuxième chromatographie, les ARN double-brins sont concentrés par une précipitation de 12h à -20°C avec 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,6, et deux volumes d'éthanol. Après centrifugation d'1h à 8000g, le culot est repris dans 800 µl de STE et disposé dans des microtubes. Les ARN sont à nouveau précipités 15 min avec 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,6 et deux volumes d'éthanol à -20°C. Après centrifugation et lavage du culot à l'éthanol 70%, le culot est repris dans 50 µl d'eau stérile et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

Les ARN double-brin sont soumis à un traitement à la RNase A avant d'être analysés sur gel d'agarose. La réaction s'effectue dans du SSC_{x2} (SSC_{x1} : NaCl 150 mM ; Citrate de Na 15 mM) en présence de 0,1 µg/ml de RNase A pendant 20 min à température ambiante. Puis, 1 mg/ml de protéinase K et 1% de SDS sont ajoutés au milieu réactionnel afin de dégrader la RNase A. Après 1h à 50°C, les ARN sont purifiés par trois étapes successives au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). Les ARN sont précipités comme précédemment par ajout d'un volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,6 et deux volumes d'éthanol. Le culot est ensuite repris dans de l'eau stérile et analysé sur gel d'agarose.

2.1.4. 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 (voir paragraphe 2.1.2.), 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 tampon Tris-MgCl₂ (Tris 100 mM ; MgCl₂ 10 mM ; pH 7,5). Le broyat est incubé à 37°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 μ l d'acétate de sodium 3 M pH 5,6, laissé 30 min à -20°C et vortexé. Après centrifugation 30 min à 4°C à 13000 rpm, le culot est lavé à l'éthanol 70%. Les ARN peuvent ensuite être analysés par northern-blot.

2.2. Tests de clivage *in vitro*

2.2.1. Transcription *in vitro* d'ARN

Un plasmide linéarisé en aval de la séquence à transcrire est utilisé comme matrice. La réaction de polymérisation s'effectue dans les conditions suivantes décrites par RiboMax® : 1 μ g d'ADN linéarisé incubé à 37°C en présence de : 80 mM HEPES-KOH pH 7.5 ; 24 mM MgCl₂ ; 2 mM spermidine ; 40 mM DTT ; 7,5 mM rATP ; 7,5 mM rCTP ; 7,5 mM rTTP ; 0,3 mM rGTP ; 3 mM analogue de coiffe m7G ; 2U/ μ l RNaseOUT™ ; enzyme mix (T7 ARN Polymérase, Recombinant RNasin® Ribonuclease, Inhibitor and Recombinant Inorganic Pyrophosphatase). Après 30 min d'incubation à 37°C pour favoriser l'incorporation de la coiffe, le rGTP est ajusté à 7,5 mM comme les autres dNTPs, permettant l'élongation des brins néosynthétisés pendant 2 à 4 heures. L'ADN matrice peut être spécifiquement dégradé par un traitement à la DNase (0,1 U/ μ l) de 30 min à 37°C. Les transcrits sont ensuite purifiés et précipités à l'acétate de sodium avant d'être analysés sur gel d'agarose.

2.2.2. Cinétique d'incubation de transcrits dans des extraits acellulaires végétaux

1 μ g de transcrit purifié est incubé dans un volume final de 25 μ l comprenant soit :

- 1) dans le cas d'une incubation dans du tampon seul : 12,5 μ l de tampon (100 mM acétate de potassium ; 4,3 mM acétate de magnésium ; 10 mM DTT ; 1 mM CaCl₂ ; 1 mM spermidine ; 24 mM HEPES pH 7,6) ; 0,5 μ l RNaseOUT™ (Invitrogen) ; eau stérile.
- 2) lors d'une incubation dans des extraits de germe de blé : 12,5 μ l d'extrait de germe de blé (Promega) ; 2 μ l d'un mélange d'acides aminés (1 mM) privé de méthionine ; 1,5 μ l méthionine (10 μ M) ; 0,5 μ l RNaseOUT™ (Invitrogen) ; eau stérile.
- 3) dans le cas d'incubation des transcrits en présence d'ARN provenant d'extraits de germes de blé : 12,5 μ l de tampon (100 mM acétate de potassium ; 4,3 mM acétate de magnésium ; 10 mM DTT ; 1 mM CaCl₂ ; 1 mM spermidine ; 24 mM HEPES pH 7,6) ; 8 μ l d'ARN de germe de blé ; 0,5 μ l de RNaseOUT™ (Invitrogen) ; eau stérile.

Les ARN totaux issus de germes de blé ont été hautement ou partiellement purifiés par des étapes de traitement au phénol puis au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1), ou uniquement au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1), respectivement.

L'incubation se fait à 25°C pendant une durée prédéfinie en fonction de l'expérience. Les prélèvements de 1 µl à chaque temps de la cinétique sont mélangés à 20 µl d'une solution d'urée 8 M. 5 µl peuvent ensuite être analysés par northern-blot.

2.3. Analyse des ARN par hybridation moléculaire

2.3.1. 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°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 SSCx20 (SSCx1 : NaCl 150 mM ; citrate de sodium 15 mM) pendant toute la nuit. Les ARN sont ensuite fixés par irradiation aux UV (254 nm, 120 µJ/cm²) sur la membrane dans un appareil Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene). La membrane placée dans un cylindre est pré-hybridée dans un four à 60°C avec 10 ml d'un tampon d'hybridation pour ribosonde (formamide 50% ; SSCx5 ; Denhardt 0,16% ; tampon phosphate 50 mM pH 6,5 ; SDS 0,1% ; ADN 250 µg/ml ; ARN 500 µg/ml) ou désoxyribosonde (PerfectHyb™ Plus, Sigma). La sonde est ajoutée une heure après, et l'hybridation est conduite pendant une nuit à 55°C. Des séries de trois lavages sont effectuées en utilisant des solutions de stringence croissante (SSCx2 ; SDS 0,1% puis SSCx0,2 ; SDS 0,1%) à une température de 65°C. La membrane est séchée puis la radioactivité est détectée par autoradiographie ou par phosphorimaging.

2.3.2. Analyse d'ARN de faible poids moléculaire par northern-blot

La solution d'ARN est resuspendue dans 0,3 volume de tampon de charge (Tris-HCl 50 mM pH 7,7 ; EDTA 5 mM ; glycérol 50% ; bleu de bromophénol 0,03% ; BET 0,01%). Les ARN sont dénaturés par chauffage à 95°C 4 min et refroidissement instantané, puis sont déposés sur un gel dénaturant d'acrylamide-bisacrylamide (urée 7 M ; acrylamide-bisacrylamide 19:1 17,5% ; TBEx0,5 ; persulfate d'ammonium 0,05% ; TEMED 0,05%). La séparation des brins s'effectue dans un tampon TBEx0,5 à 80 V pendant 3 à 4h. Les petits ARN sont transférés activement du gel sur membrane Hybond-NX™ dans du tampon TBEx0,5 à 80 V pendant 1h. L'efficacité du transfert peut être constatée par observation des ARN sous lumière UV. Les ARN sont ensuite fixés sur la membrane par irradiation aux UV (254 nm, 120 µJ/cm²) dans un appareil Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene). La membrane est pré-hybridée dans du tampon PerfectHyb™ Plus (Sigma) à 42°C pendant 1h, avant d'être hybridée avec une sonde radioactive pendant une nuit à la même température. Les lavages sont

réalisés à 50°C dans des tampons de stringence croissante (SSCx2 ; SDS 2% puis SSCx1 ; SDS 1%) afin de défaire les appariements aspécifiques. La radioactivité est ensuite révélée par autoradiographie ou par phosphorimaging.

2.3.3. Synthèse d'une sonde ADN marquée au [α -³²P] 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 (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 -³²P] 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 1h à température ambiante, puis est arrêtée par chauffage de 2 min à 100°C. La sonde est purifiée sur colonne Microcon® YM-30 (Millipore) et ajoutée au tampon d'hybridation de la membrane.

2.3.4. Synthèse de sondes ribonucléiques marquées au [α -³²P] 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 radiomarqué. 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 d'ATP, CTP et GTP (12,5 mM) ; 1 μ l d'UTP (0,5 mM) ; 2 μ l de [α -³²P] 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 1h, 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 en présence d'acétate d'ammonium 2 M final, et resolubilisée dans 50 μ l d'eau stérile.

2.3.5. Marquage d'oligonucléotide au [γ -³²P]ATP

La T4 polynucléotide kinase permet le transfert d'ATP en 5'OH d'ADN ou d'ARN. La réaction se fait dans les conditions suivantes : 2,5 μ l d'un oligonucléotide (10 μ M) ; 2 μ l de tampon (Tris-HCl 500 mM pH 7.6 ; MgCl₂ 100 mM ; DTT 50 mM ; spermidine 1 mM ; 1 mM EDTA) ; 1 μ l de polynucléotide kinase (10 U/ μ l) ; 2,5 μ l de [γ -³²P]ATP ; eau stérile qsp 20 μ l. Après incubation à 37°C pendant 1 h, la sonde est purifiée sur colonne Microcon® YM-30 (Millipore).

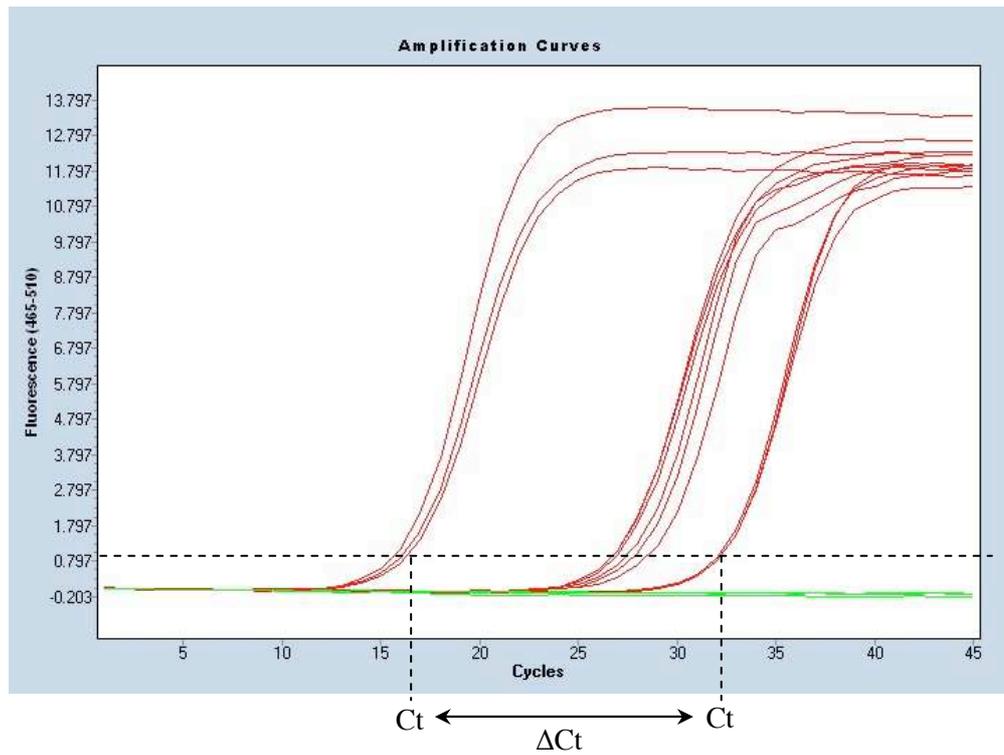


Figure MM.1. : Courbes obtenues en fin de réaction de RT-PCR quantitative. Les courbes rouges correspondent chacune à la quantité de fluorescence observée dans une réaction en fonction du nombre de cycles. Le début de la phase exponentielle correspond à la Ct (threshold cycle ou cycle seuil). La quantité relative est représentée par le $\Delta\Delta Ct$, calculé par comparaison des Ct entre les échantillons et entre les gènes variables et constants. Les courbes vertes représentent le bruit de fond de la fluorescence.

2.4. Analyse transcriptomique par qRT-PCR

2.4.1. Transcription inverse

Cette technique consiste en la production d'un ADNc à partir d'ARN. Dans un volume de 5 μ l, 1 μ g d'ARN total et 0,5 μ g d'oligonucléotide sont dénaturés 10 min à 70°C et refroidis instantanément dans la glace. L'oligonucléotide utilisé peut être spécifique d'une séquence choisie, ou cibler tous les ARN messagers en utilisant un oligonucléotide (dT)₁₀ s'hybrisant sur les queues polyadénylées. La solution d'ARN est soumise à la réaction de transcription inverse qui s'effectue dans un volume total de 20 μ l contenant : 4 μ l de tampon ImProm-II™ 5x ; MgCl₂ 1,5 mM ; dNTP 0,5 mM ; RNaseOUT™ 20 U ; DTT 5 mM ; transcriptase inverse 10 U. Le mélange est placé dans un thermocycleur et les conditions suivantes sont utilisées : 5 min à 25°C favorisent l'hybridation de l'oligonucléotide, 42°C pendant 1h permet l'élongation, et finalement à 70°C 15 min inactivent la transcriptase inverse. Après la réaction, 30 μ l d'eau sont ajoutés pour diluer l'ADNc qui peut être utilisé directement pour une PCR sans purification préalable.

2.4.2. RT-PCR quantitative

La technique de RT-PCR quantitative (qRT-PCR) permet de mesurer la quantité relative d'un ARN messager d'intérêt par rapport à un messager contrôle dont la quantité ne varie pas. Lors de la PCR, le fluorophore SYBR Green s'intercale dans l'ADN double-brin, ce qui induit sa fluorescence. La fluorescence observée en phase exponentielle est donc proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé, elle-même proportionnelle à la quantité de matrice de départ. Pour chaque réaction, un cycle seuil (Ct) est attribué, correspondant au cycle où le signal fluorescent passe au dessus du bruit de fond (**figure MM.1.**).

La réaction s'effectue en présence de LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit (Roche), d'un couple d'oligonucléotides à 0,5 μ M, et d'ADNc en quantité adaptée en fonction de l'expression du gène d'intérêt. Chaque échantillon est déposé en triplicat dans une plaque de 96 puits, soumise à 95°C pendant 10 min, puis à 45 cycles à 95°C 15 s, 60°C 20 s, et 72°C 40 s. Afin de vérifier l'efficacité des oligonucléotides utilisés, une courbe de fusion est effectuée de 95°C à 50°C par diminution d'1°C à chaque cycle. Le niveau d'expression de chaque ARN est normalisé par rapport à un ARN messager constant en comparant les $\Delta\Delta$ Ct.

2.5. Caractérisation des extrémités 5' et 3' des ARN

2.5.1. La technique du 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA End)

Cette technique permet de déterminer la position exacte de l'extrémité 5' d'un ARN grâce à la ligation d'un oligoribonucléotide de séquence connue, ou linker, à l'extrémité 5' phosphorylée d'un ARN. Les échantillons sont préalablement soumis ou non à des traitements enzymatiques qui modifieront les extrémités 5' des ARN. Tous les échantillons sont traités dans les mêmes conditions de réaction, en présence ou en absence d'enzyme. La technique est schématisée sur la **figure III.15** du chapitre III.

a) Traitement à la CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)

Les ARN totaux sont déphosphorylés par un traitement à la CIP dans les conditions suivantes : 5 µg d'ARN, 5 µl de tampon 10x (0.5 M Tris-HCl pH 9.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 10 mM spermidine), 2 mM de DTT, 40 U de RNasine, 20 U de CIP, dans un volume final de 50 µl. La réaction s'effectue pendant 30 min à 37°C. Les ARN traités sont ensuite purifiés au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1 ; v/v), et précipités avec 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,6 et deux volumes d'éthanol absolu.

b) Traitement à la TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase)

Ce traitement a pour but de cliver la coiffe ou les deux phosphates terminaux et conduit à la production d'ARN monophosphorylé. Les ARN obtenus sont traités ensuite à la TAP: 5 µg d'ARN totaux sont incubés 1h à 37°C en présence d'1 µl de tampon 10x (500 mM acétate de sodium pH 6,0, 10 mM EDTA, 1% beta-mercaptoéthanol, 0,1% Triton X-100), et d'1 µl de TAP dans un volume total de 10 µl. A la suite du traitement, les ARN sont à nouveau purifiés et précipités.

c) Ligation par la T4 RNA ligase

La ligation d'un oligoribonucléotide en 5' d'un ARN ne peut s'effectuer que si l'extrémité 5' de l'ARN est phosphorylée. Une coiffe ou une absence de phosphate empêche la ligation. Les ARN traités précédemment sont soumis à cette étape de ligation dans les conditions suivantes : 5µg d'ARN totaux, 50 nM d'ARN linker, 2 µl de tampon 10x (500 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT), 1 mM d'ATP, 80 U de RNasine, 50 U de T4 RNA ligase dans un volume final de 20 µl. La réaction s'effectue pendant 1h à 37°C, puis les ARN sont purifiés et précipités à l'acétate de sodium et dissous dans 5 µl d'H₂O stérile.

d) Transcription inverse et amplification par PCR

Le produit de ligation purifié est soumis à une transcription inverse dans les conditions décrites précédemment, en utilisant un oligodésoxyribonucléotide s'hybridant à une séquence située en 3' de

Nom	Séquence
262	5'-CACGATGCCGCCGTCAAG-3'
303	5'-TTCACACCCAGTCAGTAC-3'
413	5'-CTTTGTCAGTATATTGAC-3'
BN3f-74-89	5'-GTTGGGTTTCCTGACC-3'
BN3r-62-42	5'-CTCACATATATCACCAACTGA-3'
BN3r-74-58	5'-CAGGCTAGCGTCCTCAC-3'
BN5f-79-97	5'-TGGATGCAGTAATTTATCGA-3'
BN5r-1312-1294	5'-CATTTCACATCCAGTCAGT-3'
BN5r-50-33	5'-CACTTAGAACAGCGGTAC-3'
BN5r-61-44	5'-TCCACTTACGTCAGTTAG-3'
BN5r-dtHind	5'-TTAAGCTTTTTTTTTTTTGTCAATACACTGACAGA-3'
BS3f84-103	5'-GACCGACCTCAATCCAAGCG-3'
BS3r1475-1458	5'-ACACGCCATACACGTTTG-3'
BS3r1720-1701	5'-CTTCAATATACTGAAGGTAC-3'
BS3r56-39	5'-CAAAAGTGTCTAGAGACG-3'
BS3r74-56	5'-GCGGGCTAGCGCACGCTAC-3'
HdT12-R3	5'-AAAAGCTTTTTTTTTTTTGTCAATATACTGACAAAGAACCCTACAAGG-3'
Race5	5'-GAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'
rRACE-5	5'-GAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA-3'

Tableau MM.1. : Séquence des oligonucléotides utilisés pour les expériences de 5'RACE et de cRT-PCR. Le nom des oligonucléotides ainsi que leur séquence de 5' en 3' sont indiqués. Leur rôle est précisé sur les figures correspondant aux expériences dans le chapitre III.

l'ARN dont on veut déterminer l'extrémité 5'. Une PCR est ensuite effectuée en utilisant un oligonucléotide de séquence identique à la séquence du linker, et un antisens complémentaire à la séquence d'intérêt dans des conditions normales de PCR, en faisant une élongation supplémentaire de 5 min à 72°C en fin de réaction, afin que la polymérase rajoute des A protrudants aux extrémités. Les produits obtenus sont purifiés puis précipités avec 200 mM de NaCl et deux volumes d'éthanol absolu.

e) Clonage et séquençage des produits d'amplification obtenus

Les produits de PCR sont ensuite clonés dans le vecteur pGEM-T grâce aux extrémités A sortantes. Les bactéries transformées par le vecteur recombinant sont mises en culture afin d'amplifier le vecteur et de l'extraire pour le séquencer.

2.5.2. La technique de cRT-PCR

La technique de cRT-PCR permet de déterminer l'extrémité 3' d'un ARN. Cette technique consiste en la ligation sur elle-même d'une molécule d'ARN d'intérêt, provoquant ainsi sa circularisation. Les extrémités 5' et 3' sont donc liées l'une à l'autre, et peuvent être matrices d'une reverse transcription suivie d'une amplification par PCR grâce à des oligonucléotides spécifiques. L'amplicon obtenu est un hybride des extrémités 5' et 3' de l'ARN d'intérêt. La technique est schématisée dans le chapitre III en **figure III.17.**

a) Circularisation des ARN

Les échantillons sont traités à la CIP et/ou à la TAP comme décrit précédemment (cf chapitre 2.5.1). Puis les ARN sont circularisés par ligation de leurs extrémités 5' et 3' à la RNA ligase dans les conditions suivantes : 5 µg d'ARN totaux, 4 µl de tampon 10x (500 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT), 1 mM d'ATP, 80 U de RNasine, 50 U de T4 RNA ligase dans un volume final de 40 µl, pendant 1h à 37°C.

b) Transcription inverse et amplification par PCR

Le produit de ligation purifié est soumis à une transcription inverse dans les conditions décrites précédemment, en utilisant un oligodésoxyribonucléotide s'hybridant à une séquence proche de l'extrémité 5' de l'ARN d'intérêt. Une PCR est ensuite effectuée en utilisant un oligonucléotide antisens complémentaire à la séquence 5', et un oligo renfermant une séquence à la séquence 3' de l'ARN d'intérêt dans des conditions normales de PCR. Les produits obtenus sont analysés après clonage comme décrit dans le paragraphe 2.5.1.e).

Les oligonucléotides utilisés pour les expériences de 5'RACE et de cRT-PCR sont représentés dans le **tableau MM.1.**

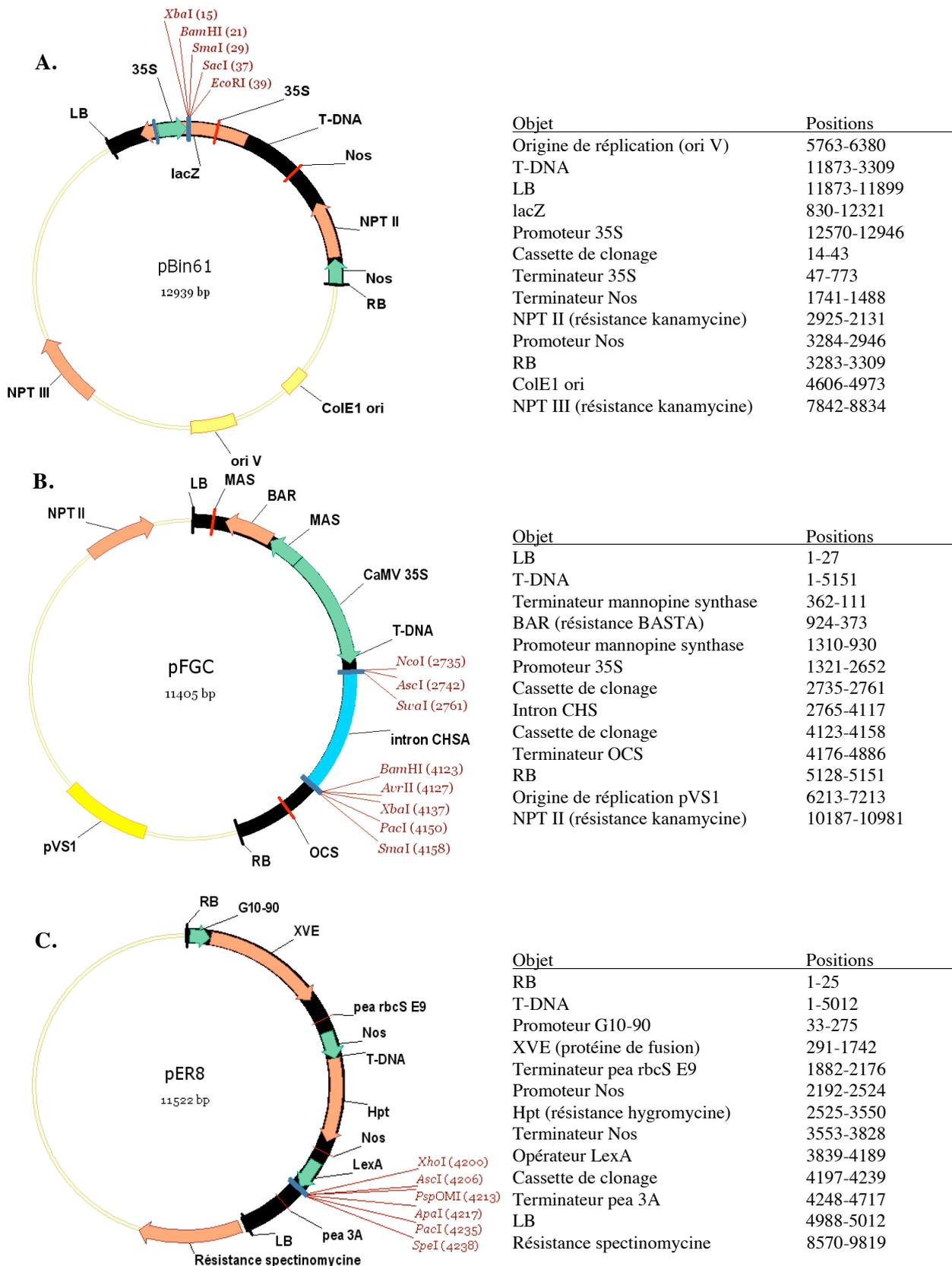


Figure MM.2. : Représentation schématique des vecteurs binaires. A. Le vecteur pBin61. **B.** Le vecteur pFGC. **C.** Le vecteur pER8. Les différentes séquences d'intérêt sont représentées sur le schéma et leurs positions sont indiquées dans le tableau.

Flèche verte : promoteur ; flèche orange : cadre de lecture ; trait rouge : termineur ; rectangle jaune : origine de réplication ; RB et LB : bordures gauches et droites du T-DNA, respectivement.

III. ADN

3.1. Vecteurs de clonage

3.1.1. Le plasmide 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 répllication bactérienne, un gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de répllication du phage f1 et les séquences promotrices T7 et SP6 de part et d'autre de la cassette de clonage.

3.1.2. Le plasmide pBS (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 et 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 infectieux. Il faut noter que l'ARN-5 sous contrôle d'un promoteur T7 a été cloné dans le vecteur pUC19 (Link *et al.*, 2005).

3.1.3. Le plasmide binaire pBin 61

Dérivé du pBin19, le vecteur pBin 61 (**figure MM.2.A.**) contient une origine de répllication (*ori V*) reconnue à la fois par *E. coli* et par *A. tumefaciens*. Les agrobactéries peuvent transférer une partie du vecteur (T-DNA) à la plante sous forme d'ADN simple brin qui sera intégré au génome cellulaire (pour revue voir Tzfira *et al.*, 2004 ; Lee and Gelvin, 2008). Le T-DNA renferme le gène de résistance à la kanamycine (NPT II), et une cassette de clonage bordée des promoteurs et terminateurs 35S du CaMV. Le T-DNA est délimité par les bordures RB et LB.

3.1.4. Le plasmide binaire pFGC5941

Le plasmide binaire pFGC5941 (**figure MM.2.B.**) contient un T-DNA renfermant un gène de sélection des plantes par l'herbicide Basta (BAR), deux cassettes de clonages de part et d'autre de l'intron de la chalcone synthase. Ce vecteur permet l'expression d'un ARN sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur OCS (octopine synthase). L'insertion de deux séquences en reverse complément dans chacune des cassettes de clonage permet l'expression d'un ARN en tige-boucle, et

l'activation du mécanisme d'ARN silencing dans les plantes. La sélection du vecteur dans les agrobactéries se fait sur milieu kanamycine puisque le gène NPT II en confère une résistance.

3.1.5. Le plasmide binaire pER8

Ce plasmide (**figure MM.2.C.**) est capable de se répliquer dans les bactéries et les agrobactéries, et peut être transmis à la plante par agrotransfection. L'ADN-T délimité par les bordures gauche (LB) et droites (RB) renferme : 1) un promoteur constitutif synthétique et le terminateur TE9 qui contrôlent la transcription du gène de fusion XVE, constituée du domaine de liaison à l'ADN de LexA, de la région activatrice de transcription de VP16 et du domaine régulateur du récepteur humain de l'œstrogène (hER), 2) le gène de l'hygromycine phosphotransférase II (Hpt), sous contrôle du promoteur et du terminateur NOS, et qui permet la sélection des plantes transgéniques, 3) la cassette de clonage où le gène d'intérêt peut être cloné entre OLexA constitué de huit copies de l'opérateur LexA, associé à la région minimale du promoteur 35S (-46), et le terminateur T34. La protéine chimérique XVE est exprimée de façon constitutive dans les cellules de la plante mais ne devient transcriptionnellement active qu'en présence d'œstradiol. Ainsi, l'expression du gène d'intérêt peut être contrôlée par la présence d'œstradiol dans le milieu de culture de la plante.

3.2. Techniques de clonage

L'ensemble des approches que j'ai utilisées sont largement décrites dans la thèse, et par (Sambrook *et al.*, 1989). Je ne détaillerai donc pas les méthodes "universelles" employées dans la majorité des laboratoires de biologie moléculaire.

3.3. Mutagenèse par PCR "mega-primer"

Des oligonucléotides sens et antisens renfermant la mutation à introduire suivie de la séquence aval sont dessinés. Ces oligonucléotides sont utilisés conjointement avec des primers aval, afin de produire par PCR deux amplicons, contenant chacun la séquence mutée. Ces produits d'amplification, appelés "mega-primer" vont ensuite être mélangés pour servir à la fois de matrice et de primer lors d'une réaction de PCR dite "mega-primer". La réaction est réalisée dans les conditions suivantes : 100 ng de chaque mega-primer, 15 μ l de Mix HiFi (Fermentas®) dans un volume total de 30 μ l, soumis à 94°C 1 min, puis 5 cycles de 30 s à 94°C, 45 s à 49°C et 1 min à 72°C. La matrice ainsi synthétisée est soumise à une nouvelle amplification avec les oligonucléotides aval qui s'hybrident de part et d'autre de la séquence mutagénisée. Le produit final est ensuite digéré par des enzymes de restriction adéquates, et cloné en remplacement d'un fragment de restriction excisé de la séquence sauvage.

3.4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

3.4.1. Préparation du matériel végétal

Des feuilles de plantes virosées (1,5 g) sont récoltées, découpées au scalpel et infiltrées sous vide par une solution de formaldéhyde 1% afin de fixer les tissus. Les feuilles sont à nouveau infiltrées par la même solution, additionnée de glycine 2 M pour neutraliser le formaldéhyde. Après des lavages à l'eau, les feuilles sont congelées et broyées dans l'azote liquide.

3.4.2. Préparation de la chromatine

La poudre obtenue est mise dans 30 ml de tampon d'extraction 1 (sucrose 0,4 M ; Tris-HCl 10 mM pH 8 ; MgCl₂ 10 mM ; β-mercaptoéthanol 5 mM ; inhibiteurs de protéase EDTA-free 1 pastille pour 50 ml). La solution obtenue est filtrée deux fois à l'aide de papier Miracloth. Après centrifugation 20 min à 2900 g, le culot est repris dans 1 ml de tampon d'extraction 2 (sucrose 0,25 M ; Tris-HCl 10 mM pH 8 ; MgCl₂ 10 mM ; Triton X-100 1% ; β-mercaptoéthanol 5 mM ; inhibiteur de protéase EDTA-free). La solution est à nouveau centrifugée 10 min à 13000 rpm, et le culot est repris dans 300 μl de tampon d'extraction 2. La solution obtenue est déposée sur 300 μl de tampon d'extraction 3 (sucrose 1,7 M ; Tris-HCl 10 mM pH 8 ; MgCl₂ 2 mM ; Triton X-100 0,15% ; β-mercaptoéthanol 5 mM ; inhibiteur de protéase EDTA-free) préparé dans un nouveau tube. Le tout est centrifugé à 13000 rpm pendant 1 h. Le culot est repris dans 500 μl de tampon de lyse nucléaire (Tris-HCl 50 mM pH 8 ; EDTA 10 mM ; SDS 1%, inhibiteur de protéase). La solution est soumise à sonication 4x10 s et conservée dans la glace entre chaque étape. Après centrifugation 10 min à 13000 rpm, le surnageant obtenu constitue la chromatine.

3.4.3. Immunoprécipitation de la chromatine

Afin d'éviter les interactions aspécifiques, une étape d'épuisement est menée. Un volume de 150 μl de chromatine est mis en présence de 40 μl de billes d'agarose et de 1350 μl de tampon de dilution (Triton X-100 1,1% ; EDTA 1,2 mM ; Tris-HCl 16,7 mM pH 8 ; NaCl 167 mM), sous agitation à 4°C pendant 1h. Les billes sont éliminées par centrifugation de 30 s à 13000 rpm. La moitié de la chromatine est alors incubée en présence d'anticorps spécifiques (anti HA), et l'autre moitié sans anticorps, sous agitation à 4°C toute la nuit. Les billes d'agarose sont conditionnées par trois lavages successifs dans du tampon de dilution. Chaque immunoprécipitation est incubée en présence de 40 μl de billes 1h sous agitation à 4°C. Les billes sont lavées successivement par du tampon low salt (NaCl 150 mM ; SDS 0,1% ; Triton X-100 1% ; EDTA 2 mM ; Tris-HCl 20 mM pH 8), par du tampon high salt (NaCl 500 mM ; SDS 0,1% ; Triton X-100 1% ; EDTA 2 mM ; Tris-HCl 20 mM pH 8), et enfin par du tampon au LiCl (LiCl 0,25 M ; Nonidet P-40 1% ; sodium deoxycholate 1% ; EDTA 1 mM ;

Tris-HCl 10 mM pH 8). L'éluion du complexe est effectuée par deux étapes successives d'ajout de tampon d'éluion (SDS 1% ; NaHCO₃ 0,1 M). Les deux éluats sont regroupés et additionnés de 20 μ l de NaCl 5 M, puis laissés à 65°C toute la nuit.

3.4.4. Récupération de la chromatine

Les éluats sont supplémentés de 10 μ l d'EDTA 0,5 M, de 20 μ l de Tris-HCl 1M pH 6,5, et 2 μ l de protéinase K 10 mg/ml, puis laissés 1h à 45°C. Les échantillons sont soumis à une purification au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1), puis précipités à l'éthanol. Les fragments d'ADN obtenus sont ensuite clonés selon les méthodes habituelles, puis séquencés.

IV. PROTEINES

4.1. Analyse des protéines par Western-blot

4.1.1. Extraction des protéines

Les protéines extraites par broyage de 1 à 10 mg de matériel végétal dans 150 μ l d'un tampon de dissociation (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 5% ; glycérol 20% ; β -mercaptoéthanol 5% ; bleu de bromophénol 0,005%) à l'aide d'un microbroyeur, sont ensuite séparées des débris par centrifugation à 13000g pendant 5 min, puis dénaturées par chauffage de 5 min à 95°C.

4.1.2. 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 heures.

4.1.3. 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 Immobilon™ (Millipore™) est effectué dans un système Mini-Protean/Trans-Blot (Bio-Rad®) à 80 V pendant 1h30 à 4°C dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glycine 192 mM. La membrane est ensuite pré-incubée 1 heure 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 15 min avec du PBS-Tween 1%, puis incubée 2 heures dans le tampon d'incubation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation se fait après lavages, par autoradiographie grâce au kit Lumi-light (Roche®).

4.2. Analyse des protéines par MS-MS

Les protéines à analyser sont déposées sur un gel de polyacrylamide comme décrit aux paragraphes 4.1.1 et 4.1.2. 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.

Bibliographie

Bibliographie

- Abe H, Tamada T** (1986) Association of Beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* keskin. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **52**: 235-247
- Acosta-Leal R, Bryan BK, Smith JT, Rush CM** (2010) 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
- Acosta-Leal R, Fawley MW, Rush CM** (2008) Changes in the inraisolate genetic structure of Beet necrotic yellow vein virus populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* **376**: 60-68
- Adkins S, Siegel RW, Sun JH, Kao CC** (1997) Minimal templates directing accurate initiation of subgenomic RNA synthesis in vitro by the brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Rna* **3**: 634-647
- Adkins S, Stawicki SS, Faurote G, Siegel RW, Kao CC** (1998) Mechanistic analysis of RNA synthesis by RNA-dependent RNA polymerase from two promoters reveals similarities to DNA-dependent RNA polymerase. *Rna* **4**: 455-470
- Ahlquist P** (1992) Bromovirus RNA replication and transcription. *Curr Opin Genet Dev* **2**: 71-76
- Ahola T, Ahlquist P** (1999) Putative RNA capping activities encoded by brome mosaic virus: methylation and covalent binding of guanylate by replicase protein 1a. *J Virol* **73**: 10061-10069
- Ameres SL, Martinez J, Schroeder R** (2007) Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* **130**: 101-112
- Andika IB, Kondo H, Tamada T** (2005) Evidence that RNA silencing-mediated resistance to beet necrotic yellow vein virus is less effective in roots than in leaves. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 194-204
- Aparicio O, Carnero E, Abad X, Razquin N, Guruceaga E, Segura V, Fortes P** (2009) Adenovirus VA RNA-derived miRNAs target cellular genes involved in cell growth, gene expression and DNA repair. *Nucleic Acids Res* **38**: 750-763
- Asurmendi S, Berg RH, Smith TJ, Bendahmane M, Beachy RN** (2007) Aggregation of TMV CP plays a role in CP functions and in coat-protein-mediated resistance. *Virology* **366**: 98-106
- 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
- Baulcombe DC** (1996) Mechanisms of Pathogen-

- Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *Plant Cell* **8**: 1833-1844
- Baulcombe DC, Molnar A** (2004) Crystal structure of p19--a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem Sci* **29**: 279-281
- Baumberger N, Baulcombe DC** (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
- Beachy RN, Loesch-Fries S, Tumer NE** (1990) Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Ann. Rev. Phytopathol* **28**: 451-474
- Bendahmane M, Chen I, Asurmendi S, Bazzini AA, Szecsi J, Beachy RN** (2007) Coat protein-mediated resistance to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by coat protein. *Virology* **366**: 107-116
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366
- Biancardi E, Lewellen RT, Biaggi MD, Erichsen AW, Stevanato P** (2002) The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* **127**: 383-397
- Blair A, Zahm SH** (1995) Agricultural exposures and cancer. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 8**: 205-208
- Blanchard CL, Boyce PM, Anderson BJ** (1996) Cucumber mosaic virus RNA 5 is a mixed population derived from the conserved 3'-terminal regions of genomic RNAs 2 and 3. *Virology* **217**: 598-601
- Boccard F, Baulcombe D** (1993) Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus. *Virology* **193**: 563-578
- Bocobza SE, Aharoni A** (2008) Switching the light on plant riboswitches. *Trends Plant Sci* **13**: 526-533
- 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. *J Gen Virol* **72 (Pt 2)**: 259-266
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorkach J** (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499-1510
- Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti I, Vitale RL, Mathieu M, De Francesco R, Rey FA** (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13034-13039
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O** (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**: 1185-1190
- Brodersen P, Voinnet O** (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* **22**: 268-280
- Bucher E, Lohuis D, van Poppel PM, Geerts-Dimitriadou C, Goldbach R, Prins M** (2006) Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *J Gen Virol* **87**: 3697-3701
- Campbell RN** (1996) Fungal transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **34**: 87-108
- Canova A** (1959) Appunti di patologia della barbatietola. *Informatore Fitopatologico* **9**: 390-396
- Celix A, Rodriguez-Cerezo E, Garcia-Arenal F** (1997) New satellite RNAs, but no DI RNAs, are found in natural populations of tomato bushy stunt tobravirus. *Virology* **239**: 277-284
- Chen HC, Hsu YH, Lin NS** (2007) Downregulation of Bamboo mosaic virus replication requires the 5' apical hairpin stem loop structure and sequence of satellite RNA. *Virology* **365**: 271-284
- Chen J, MacFarlane SA, Wilson TM** (1994) Detection and sequence analysis of a spontaneous deletion mutant of soil-borne wheat mosaic virus RNA2 associated with increased symptom severity. *Virology* **202**: 921-929
- Chen MH, Roossinck MJ, Kao CC** (2000)

- Efficient and specific initiation of subgenomic RNA synthesis by cucumber mosaic virus replicase in vitro requires an upstream RNA stem-loop. *J Virol* **74**: 11201-11209
- Chen YK, Lohuis D, Goldbach R, Prins M** (2004) High frequency induction of RNA-mediated resistance against *Cucumber mosaic virus* using inverted repeat constructs. *Molecular breeding* **14**: 215-226
- Cheng CP, Jaag HM, Jonczyk M, Serviene E, Nagy PD** (2007) Expression of the *Arabidopsis* Xrn4p 5'-3' exoribonuclease facilitates degradation of tombusvirus RNA and promotes rapid emergence of viral variants in plants. *Virology* **368**: 238-248
- Cheng CP, Serviene E, Nagy PD** (2006) Suppression of viral RNA recombination by a host exoribonuclease. *J Virol* **80**: 2631-2640
- Chiba S, Miyanishi M, Andika IB, 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
- Choi IR, Ostrovsky M, Zhang G, White KA** (2001) Regulatory activity of distal and core RNA elements in Tombusvirus subgenomic mRNA2 transcription. *J Biol Chem* **276**: 41761-41768
- Choi IR, White KA** (2002) An RNA activator of subgenomic mRNA1 transcription in tomato bushy stunt virus. *J Biol Chem* **277**: 3760-3766
- Choi KH, Groarke JM, Young DC, Kuhn RJ, Smith JL, Pevear DC, Rossmann MG** (2004) The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhoea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4425-4430
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Cooper B, Lapidot M, Heick JA, Dodds JA, Beachy RN** (1995) A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* **206**: 307-313
- de Wispelaere M, Gaubert S, Trouilloud S, Belin C, Tepfer M** (2005) A map of the diversity of RNA3 recombinants appearing in plants infected with Cucumber mosaic virus and Tomato aspermy virus. *Virology* **331**: 117-127
- de Wispelaere M, Rao AL** (2009) Production of cucumber mosaic virus RNA5 and its role in recombination. *Virology* **384**: 179-191
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O** (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**: 68-71
- Di Nicola-Negri E, Brunetti A, Tavazza M, Ilardi V** (2005) Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Res* **14**: 989-994
- Dinesh-Kumar SP, Brault V, Miller WA** (1992) Precise mapping and in vitro translation of a trifunctional subgenomic RNA of barley yellow dwarf virus. *Virology* **187**: 711-722
- Domingo E, Escarmis C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, Novella IS, Holland JJ** (1996) Basic concepts in RNA virus evolution. *Faseb J* **10**: 859-864
- Doubly JA, Flor HH, Clagett CO** (1960) Relation of Antigens of *Melampsora lini* and *Linum usitatissimum* to Resistance and Susceptibility. *Science* **131**: 229
- Duan CG, Wang CH, Fang RX, Guo HS** (2008) Artificial MicroRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants. *J Virol* **82**: 11084-11095
- Dunoyer P** (2009) [The battle of Silence : action and inhibition of RNA silencing during plant/virus interactions]. *Med Sci (Paris)* **25**: 505-511
- Dunoyer P, Voinnet O** (2009) Movement of RNA silencing between plant cells: is the question now behind us? *Trends Plant Sci* **14**: 643-644
- Dzianott A, Rauffer-Bruyere N, Bujarski JJ** (2001) Studies on functional interaction

- between brome mosaic virus replicase proteins during RNA recombination, using combined mutants in vivo and in vitro. *Virology* **289**: 137-149
- Eckerle LD, Albarino CG, Ball LA** (2003) Flock House virus subgenomic RNA3 is replicated and its replication correlates with transactivation of RNA2. *Virology* **317**: 95-108
- Eckerle LD, Ball LA** (2002) Replication of the RNA segments of a bipartite viral genome is coordinated by a transactivating subgenomic RNA. *Virology* **296**: 165-176
- Esteban R, Vega L, Fujimura T** (2008) 20S RNA narnavirus defies the antiviral activity of SKI1/XRN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **283**: 25812-25820
- Fecker LF, Koenig R, Obermeier C** (1997) Nicotiana benthamiana plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Arch Virol* **142**: 1857-1863
- Ferrer-Orta C, Arias A, Escarmis C, Verdaguer N** (2006) A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* **16**: 27-34
- Fuentes A, Ramos PL, Fiallo E, Callard D, Sanchez Y, Peral R, Rodriguez R, Pujol M** (2006) Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* **15**: 291-304
- Galiakparov N, Goszczynski DE, Che X, Batuman O, Bar-Joseph M, Mawassi M** (2003) Two classes of subgenomic RNA of grapevine virus A produced by internal controller elements. *Virology* **312**: 434-448
- Gazzani S, Lawrenson T, Woodward C, Headon D, Sablowski R** (2004) A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* **306**: 1046-1048
- German S, Candresse T, Le Gall O, Lanneau M, Dunez J** (1992) Analysis of the dsRNAs of apple chlorotic leaf spot virus. *J Gen Virol* **73**: 767-773
- 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, Bouzoubaa S, Hehn A, Guilley H, Richards K, 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
- Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberte JF, Roberts L** (2005) Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* **6**: 968-972
- Gopinath K, Kao CC** (2007) Replication-independent long-distance trafficking by viral RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **19**: 1179-1191
- Gowda S, Ayllon MA, Satyanarayana T, Bar-Joseph M, Dawson WO** (2003) Transcription strategy in a Closterovirus: a novel 5'-proximal controller element of Citrus Tristeza Virus produces 5'- and 3'-terminal subgenomic RNAs and differs from 3' open reading frame controller elements. *J Virol* **77**: 340-352
- Gowda S, Tatineni S, Folimonova SY, Hilf ME, Dawson WO** (2009) Accumulation of a 5' proximal subgenomic RNA of Citrus tristeza virus is correlated with encapsidation by the minor coat protein. *Virology* **389**: 122-131
- Graves MV, Pogany J, Romero J** (1996) Defective interfering RNAs and defective viruses associated with multipartite RNA viruses of plants. *Seminars in virology* **7**: 399-408
- Grimmer MK, Kraft T, Francis SA, Asher MJ** (2008) QTL mapping of BNYVV resistance from the WB258 source in sugar beet. *Plant Breeding* **127**: 650-652
- Grimmer MK, Trybush S, Hanley S, Francis SA, Karp A, Asher MJ** (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

- Guilley H, Bortolamiol D, Jonard G, Bouzoubaa S, 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
- Guo R, Lin W, Zhang J, Simon AE, Kushner DB** (2009) Structural plasticity and rapid evolution in a viral RNA revealed by in vivo genetic selection. *J Virol* **83**: 927-939
- Haasnoot PC, Brederode FT, Olsthoorn RC, Bol JF** (2000) A conserved hairpin structure in Alfamovirus and Bromovirus subgenomic promoters is required for efficient RNA synthesis in vitro. *Rna* **6**: 708-716
- Hajimorad MR, Ghabrial SA, Roossinck MJ** (2009) De novo emergence of a novel satellite RNA of cucumber mosaic virus following serial passages of the virus derived from RNA transcripts. *Arch Virol* **154**: 137-140
- Hamilton AJ, Baulcombe DC** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952
- Hansen JL, Long AM, Schultz SC** (1997) Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**: 1109-1122
- Hehn A, Bouzoubaa S, Jonard G, Guilley H, Richards KE** (1994) Artificial defective interfering RNAs derived from RNA 2 of beet necrotic yellow vein virus. *Arch Virol* **135**: 143-151
- Heijbroek W** (1985) De betekenis van rhizomanie voor de bieteteelt. *Gewasbescherming* **17**: 17-18
- Heijbroek W** (1987) Dissemination of rhizomania by soil, beet seeds and stable manure. *Neth. J. Pl. Path.* **94**: 9-15
- Hillman BI, Carrington JC, Morris TJ** (1987) A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* **51**: 427-433
- Hleibieh K, Peltier C, Klein E, Schirmer A, Schmidlin L, Covelli L, Ratti C, Legreve A, Bragard C, Gilmer D** (2007) Etiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière. *Virologie* **11**: 409-421
- Hu CC, Hsu YH, Lin NS** (2009) Satellite RNAs and Satellite Viruses of Plants. *Viruses* **1**: 1325-1350
- Huang YW, Hu CC, Lin CA, Liu YP, Tsai CH, Lin NS, Hsu YH** (2009) Structural and functional analyses of the 3' untranslated region of Bamboo mosaic virus satellite RNA. *Virology* **386**: 139-153
- Iwakawa HO, Mizumoto H, Nagano H, Imoto Y, Takigawa K, Sarawaneeyaruk S, Kaido M, Mise K, 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
- Iwakiri D, Zhou L, Samanta M, Matsumoto M, Ebihara T, Seya T, Imai S, Fujieda M, Kawa K, Takada K** (2009) Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med* **206**: 2091-2099
- Johansson E** (1985) Rhizomania in sugar beet - a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding. *Sveriges Ustadesforenings Tidskrift* **95**: 115-121
- Johnston JC, Rochon DM** (1995) Deletion analysis of the promoter for the cucumber necrosis virus 0.9-kb subgenomic RNA. *Virology* **214**: 100-109
- Jones RW, Jackson AO, Morris TJ** (1990) Defective-interfering RNAs and elevated temperatures inhibit replication of tomato bushy stunt virus in inoculated protoplasts. *Virology* **176**: 539-545
- Jupin I, Bouzoubaa S, Richards K, Jonard G, 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
- 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. *Embo J* **11**: 479-488
- Kastenmayer JP, Green PJ** (2000) Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: evidence that AtXRN4, one of several

- orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13985-13990
- Khan MA, Miyoshi H, Gallie DR, Goss DJ** (2008) Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ in vitro translation: interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F. *J Biol Chem* **283**: 1340-1349
- 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, Kastirr U, Holtschulte B, Deml G, 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, 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
- Koev G, Miller WA** (2000) A positive-strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promoters. *J Virol* **74**: 5988-5996
- Koev G, Mohan BR, Miller WA** (1999) Primary and secondary structural elements required for synthesis of barley yellow dwarf virus subgenomic RNA1. *J Virol* **73**: 2876-2885
- Kong F, Sivakumaran K, Kao C** (1999) The N-terminal half of the brome mosaic virus 1a protein has RNA capping-associated activities: specificity for GTP and S-adenosylmethionine. *Virology* **259**: 200-210
- Koonin EV** (1991) The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* **72**: 2197-2206
- Kozak M** (1989) The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**: 229-241
- Lange H, Sement FM, Canaday J, Gagliardi D** (2009) Polyadenylation-assisted RNA degradation processes in plants. *Trends Plant Sci* **14**: 497-504
- LaStarza MW, Lemm JA, Rice CM** (1994) Genetic analysis of the nsP3 region of Sindbis virus: evidence for roles in minus-strand and subgenomic RNA synthesis. *J Virol* **68**: 5781-5791
- 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. *J Gen Virol* **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 Res* **10**: 293-302
- Lee LY, Gelvin SB** (2008) T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol* **146**: 325-332
- Lennefors BL** (2006) dsRNA-mediated resistance to Beet necrotic yellow vein virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L.ssp.vulgaris). *Mol. 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 Res* **17**: 219-228
- Levis R, Schlesinger S, Huang HV** (1990) Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription. *J Virol* **64**: 1726-1733
- Li HP, Huang P, Park S, Lai MM** (1999) Polypyrimidine tract-binding protein binds to the leader RNA of mouse hepatitis virus and serves as a regulator of viral transcription. *J Virol* **73**: 772-777
- Li M, Liu T, Wang B, Han C, Li D, Yu J** (2008) Phylogenetic analysis of Beet necrotic yellow vein virus isolates from China. *Virus Genes* **36**: 429-432
- Li ML, Stollar V** (2004) Identification of the

- amino acid sequence in Sindbis virus nsP4 that binds to the promoter for the synthesis of the subgenomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9429-9434
- Li ML, Stollar V** (2007) Distinct sites on the Sindbis virus RNA-dependent RNA polymerase for binding to the promoters for the synthesis of genomic and subgenomic RNA. *J Virol* **81**: 4371-4373
- Li WM, Barnes T, Lee CH** (2009) Endoribonucleases - enzymes gaining spotlight in mRNA metabolism. *Febs J* **277**: 627-641
- Li XH, Heaton LA, Morris TJ, Simon AE** (1989) Turnip crinkle virus defective interfering RNAs intensify viral symptoms and are generated de novo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9173-9177
- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG** (1993) Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *Plant Cell* **5**: 1749-1759
- Link D** (2004) Etude de la variabilité moléculaire et du pouvoir pathogène d'isolats naturels du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave : caractérisation des protéines codées par les ARN-3 et -5 de différents isolats. Université Louis Pasteur, Strasbourg
- 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 HY, Sears JL, Lewellen RT** (2005) Occurrence of resistance-breaking Beet necrotic yellow vein virus of sugar beet. *Plant Dis.* **89**: 464-468
- Llamas S, Sandoval C, Babin M, Pogany J, Bujarski JJ, Romero J** (2004) Effect of the Host and Temperature on the Formation of Defective RNAs Associated with Broad bean mottle virus Infection. *Phytopathology* **94**: 69-75
- Lommel SA, Kendall TL, Xiong Z, Nutter RC** (1991) Identification of the maize chlorotic mottle virus capsid protein cistron and characterization of its subgenomic messenger RNA. *Virology* **181**: 382-385
- MacBeth KJ, Patterson JL** (1995a) The short transcript of Leishmania RNA virus is generated by RNA cleavage. *J Virol* **69**: 3458-3464
- MacBeth KJ, Patterson JL** (1995b) Single-site cleavage in the 5'-untranslated region of Leishmaniavirus RNA is mediated by the viral capsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8994-8998
- Manfre AJ, Simon AE** (2008) Importance of coat protein and RNA silencing in satellite RNA/virus interactions. *Virology* **379**: 161-167
- Mannerlöf M, Lennefors BL, P T** (1996) Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. *Euphytica* **90**: 293-299
- Marsh LE, Hall TC** (1987) Evidence implicating a tRNA heritage for the promoters of positive-strand RNA synthesis in brome mosaic and related viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**: 331-341
- Masters PS** (2006) The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **66**: 193-292
- McGinnis K, Chandler V, Cone K, Kaeppler H, Kaeppler S, Kerschen A, Pikaard C, Richards E, Sidorenko L, Smith T, Springer N, Wulan T** (2005) Transgene-induced RNA interference as a tool for plant functional genomics. *Methods Enzymol* **392**: 1-24
- McGrann GR, Grimmer MK, Mutasa-Gottgens ES, Stevens M** (2009) Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Mol Plant Pathol* **10**: 129-141
- Mi S, Durbin R, Huang HV, Rice CM, Stollar V** (1989) Association of the Sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsP1. *Virology* **170**: 385-391
- Miller WA, Dreher TW, Hall TC** (1985) Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (-)-sense genomic RNA. *Nature* **313**: 68-70

- Miller WA, Koev G** (1998) Getting a handle on RNA virus recombination. *Trends Microbiol* **6**: 421-423
- Miller WA, Koev G** (2000) Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* **273**: 1-8
- Moissiard G, Voinnet O** (2006) RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19593-19598
- Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC** (2008) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* **133**: 128-141
- Moore MJ, Proudfoot NJ** (2009) Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* **136**: 688-700
- Mueller E, Gilbert JE, Davenport G, Brigneti G, Baulcombe DC** (1995) Homology-dependant resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependant gene silencing. *Plant J* **7**: 1001-1013
- Nagy PD, Simon AE** (1997) New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* **235**: 1-9
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436-439
- Nejdat A, Beachy RN** (1990) Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. *Mol Plant Microbe Interact* **3**: 247-251
- Ng KK, Arnold JJ, Cameron CE** (2008) Structure-function relationships among RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Top Microbiol Immunol* **320**: 137-156
- Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, Chua NH** (2006) Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance. *Nat Biotechnol* **24**: 1420-1428
- Ogino T, Banerjee AK** (2008) Formation of guanosine(5')tetraphospho(5')adenosine cap structure by an unconventional mRNA capping enzyme of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **82**: 7729-7734
- Otsuka Y, Kedersha NL, Schoenberg DR** (2009) Identification of a cytoplasmic complex that adds a cap onto 5'-monophosphate RNA. *Mol Cell Biol* **29**: 2155-2167
- Padmanabhan MS, Kramer SR, Wang X, Culver JN** (2008) Tobacco mosaic virus replicase-auxin/indole acetic acid protein interactions: reprogramming the auxin response pathway to enhance virus infection. *J Virol* **82**: 2477-2485
- Palukaitis P, Garcia-Arenal F** (2003) Cucumoviruses. *Adv Virus Res* **62**: 241-323
- Pantaleo V, Burgyan J** (2008) Cymbidium ringspot virus harnesses RNA silencing to control the accumulation of virus parasite satellite RNA. *J Virol* **82**: 11851-11858
- Pasternak AO, van den Born E, Spaan WJ, Snijder EJ** (2001) Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *Embo J* **20**: 7220-7228
- Paul AV, Cao X, Harris KS, Lama J, Wimmer E** (1994) Studies with poliovirus polymerase 3Dpol. Stimulation of poly(U) synthesis in vitro by purified poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem* **269**: 29173-29181
- Pavli OI, Panopoulos NJ, Goldbach R, Skaracis GN** (2010) BNYVV-derived dsRNA confers resistance to rhizomania disease of sugar beet as evidenced by a novel transgenic hairy root approach. *Transgenic Res* DOI: 10.1007/s11248-010-9364-y
- Peltier C, Hleibieh K, Thiel H, Klein E, Bragard C, Gilmer D** (2008) Molecular biology of the Beet necrotic yellow vein virus. *Plant Viruses* **2**: 14-24
- Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T** (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**: 734-736
- Pijlman GP, Funk A, Kondratieva N, Leung J,**

- Torres S, van der Aa L, Liu WJ, Palmenberg AC, Shi PY, Hall RA, Khromykh AA** (2008) A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* **4**: 579-591
- Piolanti G, Lanzoni L, Bongiovanni GC** (1957) Osservazioni sul fenomeno dei bassi titoli delle bietole in alcune province venete. *Giornale del Bieticoltore* **12**: 2
- Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N** (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* **8**: 3867-3874
- Pogany J, Romero J, Huang Q, Sgro JY, Shang H, Bujarski JJ** (1995) De novo generation of defective interfering-like RNAs in broad bean mottle bromovirus. *Virology* **212**: 574-586
- Pollini C, Masia A, Giunchedi L** (1990) Free indole-3-acetic acid in sugarbeet root of rhizomania-susceptible and moderately resistant cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* **29**: 191-195
- Potuschak T, Vansiri A, Binder BM, Lechner E, Vierstra RD, Genschik P** (2006) The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3047-3057
- Powell PA, Sanders PR, Tumer N, Fraley RT, Beachy RN** (1990) Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* **175**: 124-130
- Powell-Abel P, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN** (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**: 738-743.
- Price BD, Roeder M, Ahlquist P** (2000) DNA-Directed expression of functional flock house virus RNA1 derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, heterologous gene expression, and selective effects on subgenomic mRNA synthesis. *J Virol* **74**: 11724-11733
- Prins M, Laimer M, Noris E, Schubert J, Wassenegger M, Tepfer M** (2008) Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol Plant Pathol* **9**: 73-83
- Qi Y, He X, Wang XJ, Kohany O, Jurka J, Hannon GJ** (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **443**: 1008-1012
- Qu F, Ren T, Morris TJ** (2003) The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* **77**: 511-522
- Qu J, Ye J, Fang R** (2007) Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J Virol* **81**: 6690-6699
- 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. *J Gen Virol* **88**: 1611-1619
- Ratti C, Hleibieh K, Bianchi L, Schirmer A, Autonell CR, 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
- Register JC, 3rd, Beachy RN** (1988) Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* **166**: 524-532
- Revell PA, Davidson AD, Wright PJ** (1999) Identification of a subgenomic mRNA encoding the capsid protein of mushroom bacilliform virus, a single-stranded RNA mycovirus. *Virology* **260**: 273-276
- Richard-Molard MS** (1985) Rhizomania : a world-wide danger to sugar beet. *Span* **28**: 92-94
- Rico P, Hernandez C** (2009) Characterization of the subgenomic RNAs produced by Pelargonium flower break virus: Identification of two novel RNAs species. *Virus Res* **142**: 100-107
- Rochon DM, Johnston JC** (1991) Infectious transcripts from cloned cucumber necrosis virus cDNA: evidence for a bifunctional subgenomic mRNA. *Virology* **181**: 656-665

- Romero J, Huang Q, Pogany J, Bujarski JJ** (1993) Characterization of defective interfering RNA components that increase symptom severity of broad bean mottle virus infections. *Virology* **194**: 576-584
- Rush CM** (2003) Ecology and epidemiology of benyvirus and plasmodiophorid vectors. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 567-592
- Sabanadzovic S, Ghanem-Sabanadzovic NA, Gorbalenya AE** (2009) Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virus. *Virology* **394**: 1-7
- Sacristan S, Garcia-Arenal F** (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol Plant Pathol* **9**: 369-384
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory
- Sandoval C, Pogany J, Bujarski J, Romero J** (2008) Use of a defective RNA of broad bean mottle bromovirus for stable gene expression in legumes. *Arch Virol* **153**: 1755-1758
- Sanford JC, Johnston SA** (1985) The concept of pathogen derived resistance. *J. Theor. Biol.* **113**: 395-405
- Savenkov EI, Valkonen JP** (2001) Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J Gen Virol* **82**: 2275-2278
- Sawicki SG, Sawicki DL** (1998) A new model for coronavirus transcription. *Adv Exp Med Biol* **440**: 215-219
- Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG** (2007) A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol* **81**: 20-29
- 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** (2005) Etude moléculaire des facteurs cellulaires et viraux responsables de la prolifération racinaire observée sur plante infectées par le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (BNYVV). Université Louis Pasteur, Strasbourg
- Schmidlin L, E DEB, Weyens G, Lefebvre M, Gilmer D** (2008) Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease. *Mol Plant Pathol* **9**: 741-751
- 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
- Schoenberg DR, Maquat LE** (2009) Re-capping the message. *Trends Biochem Sci* **34**: 435-442
- 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. *Theor Appl Genet* **99**: 740-746
- Scholten OE, Lange W** (2000) Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. *Euphytica* **112**: 219-231
- Scholthof KB, Scholthof HB, Jackson AO** (1995) The effect of defective interfering RNAs on the accumulation of tomato bushy stunt virus proteins and implications for disease attenuation. *Virology* **211**: 324-328
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD** (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**: 199-208
- Shen R, Rakotondrafara AM, Miller WA** (2006) trans regulation of cap-independent translation by a viral subgenomic RNA. *J Virol* **80**: 10045-10054
- Shi BJ, Symons RH, Palukaitis P** (2008) The cucumovirus 2b gene drives selection of inter-viral recombinants affecting the crossover site, the acceptor RNA and the rate of selection. *Nucleic Acids Res* **36**: 1057-1071
- Siegel RW, Adkins S, Kao CC** (1997) Sequence-specific recognition of a subgenomic RNA promoter by a viral RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11238-11243

- Simon AE, Roossinck MJ, Havelda Z** (2004) Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 415-437
- Sit TL, Vaewhongs AA, Lommel SA** (1998) RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science* **281**: 829-832
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM** (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**: 319-320
- Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ** (2004) AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* **15**: 173-183
- Stawicki SS, Kao CC** (1999) Spatial perturbations within an RNA promoter specifically recognized by a viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) reveal that RdRp can adjust its promoter binding sites. *J Virol* **73**: 198-204
- Sullivan ML, Ahlquist P** (1997) cis-Acting Signals in Bromovirus RNA Replication and Gene Expression: Networking with Viral Proteins and Host Factors. *Seminars in virology* **8**: 221-230
- Sun X, Simon AE** (2003) Fitness of a turnip crinkle virus satellite RNA correlates with a sequence-nonspecific hairpin and flanking sequences that enhance replication and repress the accumulation of virions. *J Virol* **77**: 7880-7889
- Suopanki J, Sawicki DL, Sawicki SG, Kaariainen L** (1998) Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J Gen Virol* **79**: 309-319
- Suzuki M, Hibi T, Masuta C** (2003) RNA recombination between cucumoviruses: possible role of predicted stem-loop structures and an internal subgenomic promoter-like motif. *Virology* **306**: 77-86
- Szittya G, Molnar A, Silhavy D, Hornyik C, Burgyan J** (2002) Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* **14**: 359-372
- Talini G, Gallori E, Maurel MC** (2009) Natural and unnatural ribozymes: back to the primordial RNA world. *Res Microbiol* **160**: 457-465
- Tamada T, Kusume T** (1991) Evidence that the 75K readthrough protein of beet necrotic yellow vein virus RNA-2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J Gen Virol* **72**: 1497-1504
- Tamada T, 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
- Tatineni S, Afunian MR, Gowda S, Hilf ME, Bar-Joseph M, Dawson WO** (2009) Characterization of the 5'- and 3'-terminal subgenomic RNAs produced by a capillovirus: Evidence for a CP subgenomic RNA. *Virology* **385**: 521-528
- Thiel H, 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
- Thompson JR, 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
- Tijms MA, Nedialkova DD, Zevenhoven-Dobbe JC, Gorbalenya AE, Snijder EJ** (2007) Arterivirus subgenomic mRNA synthesis and virion biogenesis depend on the multifunctional nsp1 autoprotease. *J Virol* **81**: 10496-10505
- Treder K, Kneller EL, Allen EM, Wang Z, Browning KS, Miller WA** (2008) The 3' cap-independent translation element of Barley yellow dwarf virus binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation. *Rna* **14**: 134-147
- Tzfira T, Li J, Lacroix B, Citovsky V** (2004) Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet* **20**: 375-383
- van der Kuyl AC, Langereis K, Houwing CJ, Jaspars EM, Bol JF** (1990) cis-acting elements involved in replication of alfalfa

- mosaic virus RNAs in vitro. *Virology* **176**: 346-354
- van der Vossen EA, Notenboom T, Bol JF** (1995) Characterization of sequences controlling the synthesis of alfalfa mosaic virus subgenomic RNA in vivo. *Virology* **212**: 663-672
- van Dijk AA, Makeyev EV, Bamford DH** (2004) Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *J Gen Virol* **85**: 1077-1093
- van Marle G, Dobbe JC, Gultyaev AP, Luytjes W, Spaan WJ, Snijder EJ** (1999a) Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12056-12061
- van Marle G, van Dinten LC, Spaan WJ, Luytjes W, Snijder EJ** (1999b) Characterization of an equine arteritis virus replicase mutant defective in subgenomic mRNA synthesis. *J Virol* **73**: 5274-5281
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA** (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**: 1931-1934
- Vetter G, Hily JM, Klein E, Schmidlin L, Haas M, Merkle T, Gilmer D** (2004) Nucleocytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol* **85**: 2459-2469
- Vitushkina MV, Rogozin IB, Jelkmann W, Koonin EV, Agranovsky AA** (2007) Completion of the mapping of transcription start sites for the five-gene block subgenomic RNAs of Beet yellows Closterovirus and identification of putative subgenomic promoters. *Virus Res* **128**: 153-158
- Vives MC, Galipienso L, Navarro L, Moreno P, Guerri J** (2002) Characterization of two kinds of subgenomic RNAs produced by citrus leaf blotch virus. *Virology* **295**: 328-336
- Voinnet O** (2008) Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci* **13**: 317-328
- Wang J, Carpenter CD, Simon AE** (1999) Minimal sequence and structural requirements of a subgenomic RNA promoter for turnip crinkle virus. *Virology* **253**: 327-336
- Wang J, Simon AE** (1997) Analysis of the two subgenomic RNA promoters for turnip crinkle virus in vivo and in vitro. *Virology* **232**: 174-186
- Wang M-B, Abbott DC, Waterhouse PM** (2000) A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol Plant Pathol* **1**: 347-356
- Wang MB, Bian XY, Wu LM, Liu LX, Smith NA, Isenegger D, Wu RM, Masuta C, Vance VB, Watson JM, Rezaian A, Dennis ES, Waterhouse PM** (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3275-3280
- Wang S, Mortazavi L, White KA** (2008) Higher-order RNA structural requirements and small-molecule induction of tombusvirus subgenomic mRNA transcription. *J Virol* **82**: 3864-3871
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB** (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
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**: 581-590
- White KA** (1996) Formation and evolution of Tombusvirus defective interfering RNAs. *Seminars in virology* **7**: 409-416
- White KA** (2002) The premature termination model: a possible third mechanism for subgenomic mRNA transcription in (+)-strand RNA viruses. *Virology* **304**: 147-154
- White KA, Nagy PD** (2004) Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and

- recombination. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**: 187-226
- Wielgosz MM, Huang HV** (1997) A novel viral RNA species in Sindbis virus-infected cells. *J Virol* **71**: 9108-9117
- Wierzchoslawski R, Dzianott A, Kunimalayan S, Bujarski JJ** (2003) A transcriptionally active subgenomic promoter supports homologous crossovers in a plus-strand RNA virus. *J Virol* **77**: 6769-6776
- Wierzchoslawski R, Urbanowicz A, Dzianott A, Figlerowicz M, Bujarski JJ** (2006) Characterization of a novel 5' subgenomic RNA3a derived from RNA3 of Brome mosaic bromovirus. *J Virol* **80**: 12357-12366
- Wu B, White KA** (2007) Uncoupling RNA virus replication from transcription via the polymerase: functional and evolutionary insights. *Embo J* **26**: 5120-5130
- Xu N, Gkountela S, Saeed K, Akusjarvi G** (2009) The 5'-end heterogeneity of adenovirus virus-associated RNAI contributes to the asymmetric guide strand incorporation into the RNA-induced silencing complex. *Nucleic Acids Res* **37**: 6950-6959
- Xu N, Segerman B, Zhou X, Akusjarvi G** (2007) Adenovirus virus-associated RNAII-derived small RNAs are efficiently incorporated into the rna-induced silencing complex and associate with polyribosomes. *J Virol* **81**: 10540-10549
- Xu P, Roossinck MJ** (2000) Cucumber mosaic virus D satellite RNA-induced programmed cell death in tomato. *Plant Cell* **12**: 1079-1092
- Yuan X, Shi K, Meskauskas A, Simon AE** (2009) The 3' end of Turnip crinkle virus contains a highly interactive structure including a translational enhancer that is disrupted by binding to the RNA-dependent RNA polymerase. *Rna* **15**: 1849-1864
- Zavriev SK, Hickey CM, Lommel SA** (1996) Mapping of the red clover necrotic mosaic virus subgenomic RNA. *Virology* **216**: 407-410
- Zhang G, Slowinski V, White KA** (1999) Subgenomic mRNA regulation by a distal RNA element in a (+)-strand RNA virus. *Rna* **5**: 550-561
- Zhang G, Zhang J, George AT, Baumstark T, Simon AE** (2006a) Conformational changes involved in initiation of minus-strand synthesis of a virus-associated RNA. *Rna* **12**: 147-162
- Zhang J, Zhang G, McCormack JC, Simon AE** (2006b) Evolution of virus-derived sequences for high-level replication of a subviral RNA. *Virology* **351**: 476-488
- Zhang X, Lai MM** (1995) Interactions between the cytoplasmic proteins and the intergenic (promoter) sequence of mouse hepatitis virus RNA: correlation with the amounts of subgenomic mRNA transcribed. *J Virol* **69**: 1637-1644
- Zhang X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH** (2006c) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* **20**: 3255-3268
- Zhong W, Rueckert RR** (1993) Flock house virus: down-regulation of subgenomic RNA3 synthesis does not involve coat protein and is targeted to synthesis of its positive strand. *J Virol* **67**: 2716-2722
- Zhong X, Tao X, Stombaugh J, Leontis N, Ding B** (2007) Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *Embo J* **26**: 3836-3846
- Zhou H, Jackson AO** (1996) Expression of the barley stripe mosaic virus RNA beta "triple gene block". *Virology* **216**: 367-379
- Ziegler-Graff V, Guilford PJ, Baulcombe DC** (1991) Tobacco rattle virus RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology* **182**: 145-155
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-760
- Zuo J, Niu QW, Chua NH** (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* **24**: 265-273

Annexe

Annexe

Étiologie 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) : 409-21

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

Étiologie de la rhizomanie de la betterave sucrière

K. Hleibieh¹
 C. Peltier¹
 E. Klein¹
 A. Schirmer¹
 L. Schmidlin^{1,2}
 L. Covelli¹
 C. Ratti³
 A. Legrève⁴
 C. Bragard⁴
 D. 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 racines, *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

revue

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-

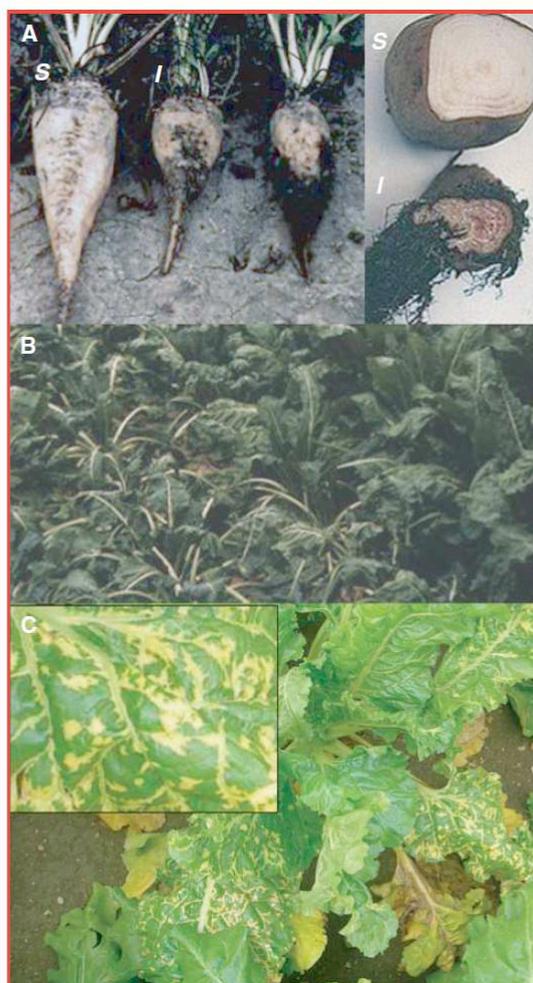


Figure 1. Caractéristiques symptomatologiques de la rhizomanie de la betterave sucrière : **A)** Symptômes racinaires caractéristiques de la rhizomanie : les pivots de plantes infectées (I) sont plus courts, en forme de verre à pied ; ils possèdent un chevelu racinaire anormalement développé comparé 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 $6 \cdot 10^4$ 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>Rz1</i> , <i>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

revue

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 capsidate par répétition axiale de 4 tours, chaque sous-unité protéique interagissant avec 4 bases de l'ARN [22]. La protéine mineure de capsidate obtenue par translecture du codon ambre du gène CP, est retrouvée à l'une des extrémités des particules virales et participe à la morpho-

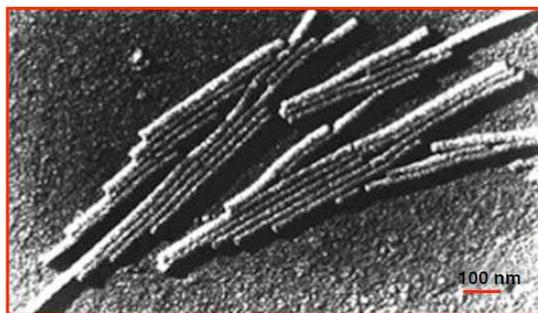


Figure 2. Particules virales de BNYVV purifiées visualisées en microscopie électronique après ombrage. Barre d'échelle : 100 nm. Photo : Inra Colmar.

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 tronçatures 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 capsidate 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 événe-

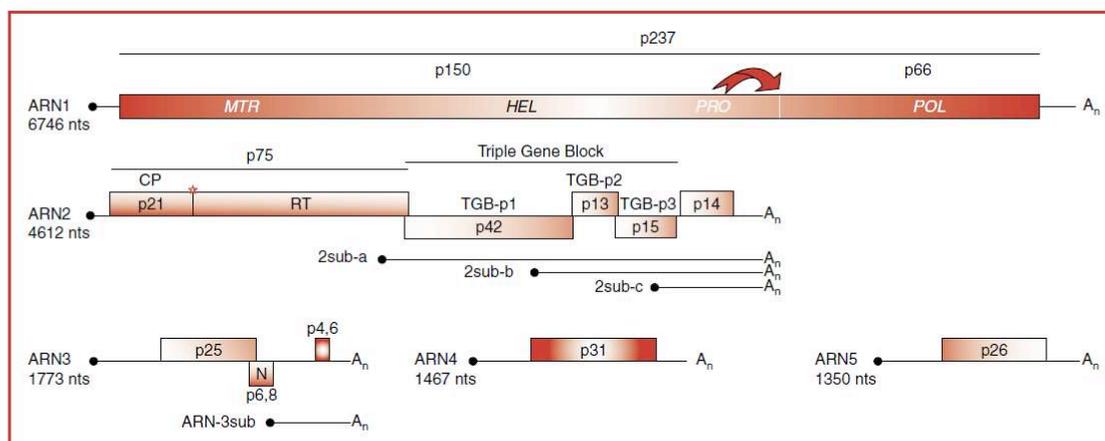


Figure 3. Représentation schématique de l'organisation génomique du BNYVV. La taille des différents ARN est précisée sous leur nom. La sphère noire représente la coiffe et A_n correspond à la séquence polyadénylée. Les rectangles représentent les cadres ouverts de lecture. La flèche représente l'événement de clivage en cis de la polyprotéine p237 libérant les protéines p150 et p66. L'étoile correspond à la suppression du codon stop 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 $Fx_3FRGPGNx_2L$ 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 ($_{57}KRIRFR_{62}$), localisée dans le domaine N-terminal basique de la protéine [46]. Une

revue

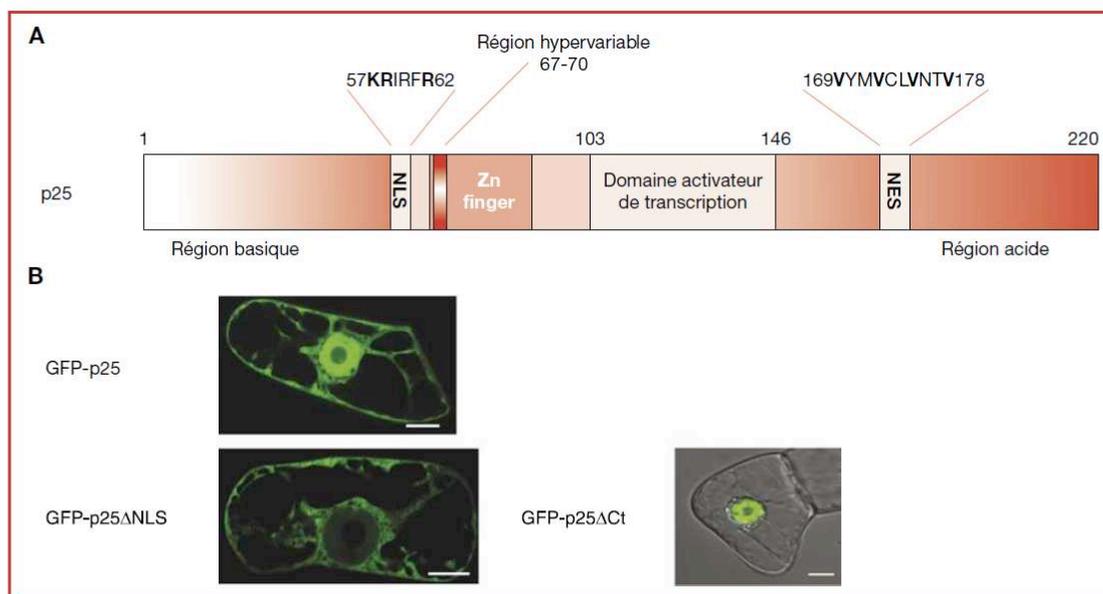


Figure 4. Caractéristiques de la protéine p25 codée par l'ARN3 de BNYVV : **A**) Représentation schématique de la protéine p25 et de ses domaines fonctionnels connus. La protéine est constituée d'un domaine N-terminal basique renfermant une séquence NLS, (séquence de localisation nucléaire), la région 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 sauvages 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 I [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 subgénomique (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

revue

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-

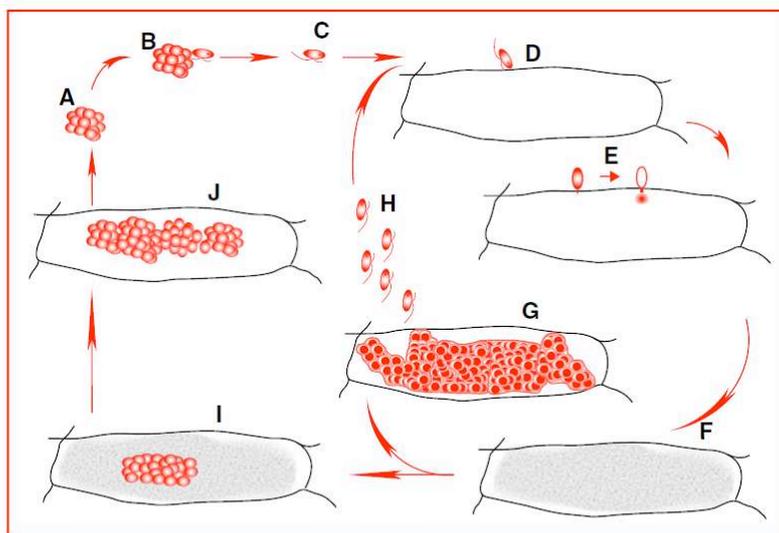


Figure 5. Illustrations du cycle de vie et des différents stades de développement de *Polymyxa betae* ; A) sporosore = amas de spores de survie ; B) germination d'une zoospore primaire ; C) zoospore nageant vers une cellule (D) épidermique ou corticale d'une racine ; E) enkystement de la zoospore sur 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 lactophénoï 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

revue

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 (résistantes 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 sugar-beet 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, Lennfors 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.
- Lennfors 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.

revue

37. Morozov SY, Solov'yev 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, Jarasch 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 furovirus 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, Haeberle 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 zoospores of its vector *Polymyxa betae* BNYVV infects *P. betae*. *Virology* 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, Korniyukhin 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.