



**HAL**  
open science

# Identification et étude fonctionnelle de protéines virales impliquées dans la suppression de l'extinction post-transcriptionnelle de gènes ou PTGS

Sébastien Pfeffer

► **To cite this version:**

Sébastien Pfeffer. Identification et étude fonctionnelle de protéines virales impliquées dans la suppression de l'extinction post-transcriptionnelle de gènes ou PTGS. Biochimie [q-bio.BM]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2002. Français. NNT : . tel-00007938

**HAL Id: tel-00007938**

**<https://theses.hal.science/tel-00007938>**

Submitted on 7 Jan 2005

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR  
STRASBOURG I  
2002**

# **THÈSE**

présentée à la

**FACULTÉ DES SCIENCES DE LA VIE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR**  
**Domaine : BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

par

**Sébastien PFEFFER**

**IDENTIFICATION ET ÉTUDE FONCTIONNELLE DE PROTÉINES  
VIRALES IMPLIQUÉES DANS LA SUPPRESSION DE L'EXTINCTION  
POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE GÈNES OU PTGS**

Soutenue le 3 octobre 2002 devant la Commission d'Examen :

**M. Serge POTIER  
M. Hervé VAUCHERET  
M. Thierry CANDRESSE  
M. Jean-Luc IMLER  
M. Ken RICHARDS**

**RAPPORTEUR INTERNE  
RAPPORTEUR EXTERNE  
RAPPORTEUR EXTERNE  
EXAMINATEUR  
DIRECTEUR DE THÈSE**

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

## SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>5</b>
Abréviations de virus	5
Abréviations générales	6
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>8</b>
<b>I. La plante face à son environnement</b>	<b>8</b>
<b>II. L'extinction de gènes!: un mécanisme conservé à travers l'évolution</b>	<b>10</b>
1. Initiation du PTGS	12
a. Rôle et reconnaissance du RNA "indésirable"	13
b. Dégradation du RNAdb	14
c. Ciblage du mRNA homologue	16
d. Synthèse de RNAdb dans les plantes	17
2. Propagation du PTGS dans l'organisme	18
a. L'extinction de gène systémique	18
b. L'amplification du PTGS	20
3. Maintenance de l'extinction de gènes	22
4. Dissection génétique du PTGS	24
a. Les RNA polymérases RNA dépendantes	24
b. Les RNases	25
c. Les hélicases	25
d. Homologues de facteur d'initiation de la traduction	25
e. Protéines impliquées dans les modifications du DNA	25
f. Gènes de fonction inconnue	26
5. Modèle général du PTGS	26
<b>III. Rôles de l'extinction de gènes</b>	<b>27</b>
1. Régulation de la transposition et rôle dans le développement	27
2. Mécanisme de protection contre les virus de plantes	28
3. Les virus contre-attaquent	29
4. Différents mécanismes de suppression par les protéines virales	30
a. La protéine HC-Pro des <i>potyvirus</i>	31
b. La protéine 2b des <i>cucumovirus</i>	32
c. La protéine P25 du PVX	33
<b>IV. Virus étudiés</b>	<b>34</b>
1. Le PCV	35
2. Le BNYVV	37
3. Le BWYV	40
<b>CHAPITRE I : SUPPRESSION DU PTGS PAR DEUX PROTÉINES VIRALES RICHES EN CYSTÉINE : LA PROTÉINE P15 DU PCV ET LA PROTÉINE P14 DU BNYVV</b>	<b>44</b>
<b>I. Les techniques d'étude de la suppression du PTGS</b>	<b>44</b>
1. Visualisation de la mise en place du PTGS	44
2. Techniques d'étude de la suppression du PTGS	45

<b>II. Identification et quelques propriétés d'un nouveau suppresseur de PTGS, la protéine P15 du PCV</b>	<b>46</b>
1. Rôle de la protéine P15	46
2. Propriétés de la protéine P15	47
<b>Identification and Some Properties of a Cysteine-Rich Suppressor of Gene Silencing Encoded by Peanut Clump Virus (2002). Publié dans <i>Plant Journal</i>, 29 (5), 555-567.</b>	<b>47</b>
3. La famille de protéines "cysteine-rich"	59
<b>III. Identification de la protéine P14 du BNYVV comme suppresseur de PTGS</b>	<b>60</b>
1. Le BNYVV code pour un suppresseur de PTGS	61
2. La protéine P14 du BNYVV est un suppresseur de PTGS	61
3. Propriétés de la protéine P14	63
a. Rôle des cystéines impliquées dans la formation du doigt de zinc	63
b. Localisation subcellulaire de la protéine P14	64
<b>IV. Conclusions</b>	<b>65</b>
<b>CHAPITRE II : ÉTUDE DE LA SUPPRESSION DU PTGS PAR LES <i>LUTEOVIRIDAE</i></b>	<b>69</b>
<b>I. Suppression du PTGS par la protéine P0 du BWYV</b>	<b>69</b>
1. Rôle de la protéine P0	69
<b>P0 of Beet Western Yellows Virus Is a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing (2002). Publié dans <i>Journal of Virology</i>, Vol 76 n°13, 6815-6824.</b>	<b>71</b>
2. Recherche de facteurs régulant l'expression de la protéine P0	82
3. Localisation subcellulaire de la protéine P0	83
<b>II. Suppression du PTGS par le BYDV, un <i>luteovirus</i></b>	<b>84</b>
1. Rôle des protéines P4 et P6	85
2. Comparaison entre les protéines P4 du BYDV et du BWYV	86
<b>III. Conclusions</b>	<b>86</b>
<b>CHAPITRE III : RÉSISTANCE DU BWYV AU PTGS DIRIGÉ CONTRE LE GÈNE CODANT POUR LA PROTÉINE MINEURE DE CAPSIDE (OU PROTÉINE RT)</b>	<b>90</b>
<b>I. Utilisation du PTGS comme moyen de lutte anti-virale</b>	<b>90</b>
<b>II. VIGS dans des plantes exprimant la protéine mineure de capsid (ou protéine RT) du BWYV</b>	<b>91</b>
<b>Virus-Induced Gene Silencing in Transgenic Plants Expressing the Minor Capsid protein of Beet Western Yellows Virus (2002). Sous presse dans <i>Molecular Plant Microbe Interactions</i>.</b>	<b>91</b>
<b>III. Conclusions</b>	<b>101</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>104</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>109</b>
<b>I. Multiplication et purification du BNYVV, du PCV et du BWYV</b>	<b>109</b>
1. Virus et plantes hôtes	109
a. Le BNYVV	109
b. Le PCV	109
c. Le BWYV	109

d. Plantes hôtes	109
2. Purification du BNYVV et du PCV	110
3. Purification du BWYV	110
<b>II. Infection de plantes et de protoplastes</b>	<b>111</b>
1. Inoculation mécanique (PCV et BNYVV)	111
2. Inoculation par puceron (BWYV)	112
a. Acquisition sur feuille:	112
b. Acquisition sur membrane à partir d'une solution de virus purifié	112
3. Inoculation par agro-infiltration (BWYV)	113
4. Préparation et infection de protoplastes de tabacs BY-2	113
a. Culture des cellules de tabac BY-2	113
b. Préparation des protoplastes de cellules de tabac BY-2	113
c. Inoculation des protoplastes par électroporation et mise en culture	114
<b>III. Souches bactériennes, vecteurs de clonage et milieux de culture</b>	<b>114</b>
1. Souches bactériennes	114
a. NM522	114
b. DH5 $\alpha$	114
c. BL21 (DE3) pLysS (Studier <i>et al.</i> , 1990)	115
d. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	115
2. Vecteurs de clonage et vecteurs d'expression	116
a. Vecteurs de clonage	116
b. Vecteurs d'expression	116
3. Milieux de cultures	117
a. Milieu LB	117
b. Milieu ZB	117
c. Milieu YEB	117
<b>IV. Étude du PTGS</b>	<b>118</b>
1. Préparation des agrobactéries	118
2. Obtention de plantes silencées	118
3. Co agro-infiltration ou patch-test	119
<b>V. Techniques de clonage</b>	<b>119</b>
1. Amplification d'un fragment de DNA par PCR (Polymerase Chain Reaction)	119
2. Digestion par les enzymes de restriction	120
3. Déphosphorylation d'un vecteur	121
4. Phosphorylation d'un oligonucléotide	121
5. Création d'extrémités franches à partir des extrémités 5' sortantes d'un fragment de DNA	121
6. Analyse des fragments de DNA par électrophorèse en gel d'agarose	122
7. Purification de fragments de DNA à partir d'un gel d'agarose LMP	122
8. Ligation	123
a. Ligation des fragments de DNA dans l'agarose LMP	123
b. Ligation de fragments de DNA purifiés	123
9. Transformation de bactéries par la technique d'électroporation	124
a. Préparation des bactéries compétentes	124
b. Électrotransformation	124
10. Analyse et purification des clones recombinants	124
a. Analyse des clones	124
b. Purification du DNA plasmidique (maxipréparation)	125
<b>VI. Extraction et analyse des acides nucléiques</b>	<b>125</b>
1. Extraction et analyse du DNA génomique de plante	126
a. Extraction du DNA génomique	126
b. Analyse du DNA génomique de plante (Southern Blot)	126
2. Transcription <i>in vitro</i>	126
a. Synthèse de RNA artificiels cappés	127
b. Synthèse de sondes ribonucléiques	127
3. Analyse des RNA en gel d'agarose en conditions dénaturantes	127

---

4. Détection des RNA par la technique de Northern-blot	128
5. Extraction et analyse des siRNA	128
6. Analyse de l'état transcriptionnel d'un gène (Run-off transcription)	129
a. Extraction de noyaux de <i>N. benthamiana</i>	129
b. Run-off transcription	130
<b>VII. Préparation et analyse des protéines</b>	<b>131</b>
1. Préparation des protéines	131
a. Traduction <i>in vitro</i>	131
b. Protéines de plantes et de protoplastes	131
2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes	131
3. Immunodétection (Western-blot)	132
a. Principe	132
b. Transfert sur Immobilon™ -P	132
c. Immunorévélation	132
4. Test d'interaction protéine-protéine	133
<b>VIII. Localisation subcellulaire des protéines virales</b>	<b>133</b>
1. Transformation de cellules BY-2 par bombardement	133
a. Principe de la transformation avec le canon à particules	133
b. Préparation des cellules pour le bombardement	134
c. Précipitation de l'ADN plasmidique sur les particules de tungstène	134
2. Observations en microscopie à épifluorescence ou confocale	134
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>136</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

### Abréviations de virus

ACMV :	African Cassava Mosaic Virus <i>geminivirus</i>
BNYVV :	beet necrotic yellow vein virus <i>benyvirus</i>
BSMV :	barley stripe mosaic virus <i>hordéivirus</i>
BWYV :	beet western yellows virus <i>polerovirus</i>
BYDV :	barley yellow dwarf virus <i>luteovirus</i>
CABYV :	cucurbit aphid-borne yellows virus <i>polerovirus</i>
CaMV :	cauliflower mosaic virus <i>caulimovirus</i>
CMV :	cucumber mosaic virus <i>cucumovirus</i>
CPMV :	cowpea mosaic virus <i>comovirus</i>
CtRLV :	carrot red leaf virus <i>Luteoviridae, genre non attribué</i>
CymRSV :	cymbidium ringspot virus <i>tombusvirus</i>
FHV :	flockhouse virus <i>nodavirus</i>
GFLV :	grapevine fanleaf virus <i>népovirus</i>
LRSV :	lychnis ringspot virus <i>hordeivirus</i>
PCV :	peanut clump virus <i>pecluvirus</i>
PhMCV :	physalis mild chlorosis virus <i>Luteoviridae, genre non attribué</i>
PLRV :	potato leafroll virus <i>polerovirus</i>
PMTV :	potato mop-top virus <i>pomovirus</i>
PSLV :	poa semilatifolius virus <i>hordeivirus</i>
PVX :	potato virus X <i>potexvirus</i>
PVY :	potato virus Y <i>potyvirus</i>
RYMV :	rice yellow mottle virus <i>sobemovirus</i>
SbDV :	soybean dwarf virus <i>Luteoviridae, genre non attribué</i>
TAV :	tomato aspermy virus <i>cucumovirus</i>
TBRV :	tomato black ring virus <i>népovirus</i>
TBSV :	tomato bushy stunt virus <i>tombusvirus</i>
TCV :	turnip crinkle virus <i>carmovirus</i>
TEV :	tobacco etch virus <i>potyvirus</i>
TMV :	tobacco mosaic virus <i>tobamovirus</i>
TNDV :	tobacco necrotic dwarf virus <i>Luteoviridae, genre non attribué</i>
TRV :	tobacco rattle virus <i>tobravirus</i>
TSWV :	tomato spotted wilt virus <i>tospovirus</i>
TuMV :	turnip mosaic virus <i>potyvirus</i>

TYMV : turnip yellow mosaic virus *tymovirus*

### Abréviations générales

BBP : bleu de bromophénol  
BET : bromure d'éthidium  
BSA : sérum albumine bovine  
BSAc : sérum albumine bovine acétylé  
BY-2 : Bright Yellow-2  
CP : protéine de capsid  
DEA : diéthanol amine  
dpi : days post-infection  
dNTP : désoxyribonucléotides 5'-triphosphate  
DTT : dithiothréitol  
EDTA : éthylène diamine tétraacétate de sodium  
EGTA : éthylène glycol tétraacétate de sodium  
GFP : green fluorescent protein  
HEPES : acide N-2 hydroxy éthyl piperazine N'-2 éthane sulfonique  
hpi : hours post-infection  
IPTG : isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
LMP : low melting point  
MES : 4-morpholino-ethane-sulfonate  
NTP : ribonucléotides 5'-triphosphate  
ORF : open reading frame  
PBS : phosphate buffer saline  
PCR : polymerase chain reaction  
PEG : polyéthylène glycol  
PIPES : acide 1,4-Piperazine diéthane sulfonique  
PTGS : post-transcriptional gene silencing  
PTS : Peroxisomal targeting sequence  
PVP : polyvinyl pyrrolidone  
RdRp : RNA directed RNA-polymerase  
RFP : red fluorescent protein  
RT-PCR : Reverse transcriptase- Polymerase Chain Reaction  
SDS : dodécyl sulfate de sodium  
TEMED : NNN'N' tétraméthyl éthylène diamine  
TGB : triple gene block  
UV : ultraviolet



VIGS : virus-induced gene silencing

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### I. La plante face à son environnement

Les plantes sont soumises en permanence à des agressions de l'environnement et ont su évoluer pour pouvoir réagir très rapidement au moindre changement du milieu extérieur. L'activation ou l'inhibition spécifique de gènes en réponse à un changement de luminosité, par exemple, peut se faire en quelques minutes (Hansen *et al.*, 2001). Parmi les autres stimuli déclenchant une réponse rapide et directe, on peut citer le taux d'humidité (sécheresse, inondation), la chaleur, la salinité (Scandalios, 1990). Outre ces facteurs environnementaux, l'attaque par des pathogènes est également un défi important pour la survie de la plante dans son milieu. Là encore, les réponses permettant aux végétaux de se prémunir contre ces infections sont nombreuses et variées.

Parmi les pathogènes qui infectent les plantes, les virus sont nombreux et représentent donc un intérêt majeur ne serait ce que d'un point de vue économique. En effet, chaque année, les pertes occasionnées par les virus sur les récoltes se chiffrent en millions d'euros. Hormis cet aspect économique, la compréhension des mécanismes mis en œuvre par le virus pour infecter la plante et l'étude de la réponse de la plante face à cette agression représentent un enjeu important au niveau fondamental. Dans cette optique, l'un des atouts principaux des virus réside dans la petite taille de leur génome comparée à celle d'organismes procaryotes ou eucaryotes. En effet, les quelques kilobases des génomes viraux sont très faciles à manipuler et permettent d'obtenir rapidement des mutants dans le gène étudié.

Les mécanismes développés par la plante pour se protéger des virus sont variés. On peut citer entre autres, les réactions d'hypersensibilité conduisant à une résistance acquise

locale (LAR) et systémique (SAR) (Lam *et al.*, 2001). Ce type de résistance est basé sur des interactions gène pour gène et implique la reconnaissance du produit d'un gène d'avirulence du pathogène par le produit d'un gène de résistance de la plante (Van der Biezen and Jones, 1998). En ce qui nous concerne, nous nous focaliserons essentiellement sur un autre type de réponse, qui fait l'objet de cette thèse et qui est basé sur la résistance médiée par le RNA. Ce mode de résistance, identifié très récemment et qui intéresse plus particulièrement les virus à RNA simple brin de polarité positive (les plus nombreux), est basé sur la reconnaissance d'intermédiaires de réplication RNA double brin (db). Ce RNA double brin est la molécule-clé qui sera reconnue par la plante et qui va alors initier les réactions conduisant à la dégradation de toutes les molécules de RNA partageant une homologie de séquence suffisamment importante avec ce RNA db. Les découvertes qui ont conduit à l'identification de ce nouveau mécanisme de défense de la plante, connu sous le nom de PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing), remontent à quelques dizaines d'années et se sont accélérées de façon exponentielle au cours des dernières années. Ainsi, en 1929, Mc Kinney décrit pour la première fois une protection croisée entre virus dans des plantes doublement inoculées. De façon plus précise, il observe en fait que des plants de tabacs infectés par une souche modérée sont prémunis contre une surinfection par une souche plus sévère. Suite à ce travail, les chercheurs ont beaucoup étudié les phénomènes de protection croisée ou au contraire de synergie entre virus, et ce n'est que récemment, que le mécanisme moléculaire sous-jacent a pu être en partie élucidé.

Ainsi, Dougherty *et al.* (1994) montrèrent que des plantes transgéniques exprimant une forme non traductible de la protéine de capsid du TEV pouvaient "récupérer" de l'infection par ce virus, un phénomène connu sous le nom de "recovery" (récupération). En effet, on voit apparaître dans des plantes infectées par le TBRV ou le CaMV, des feuilles apicales ne

présentant plus de symptômes ce qui traduit donc un mécanisme de blocage de la progression du virus, c'est à dire de l'infection systémique (Covey et al., 1997; Ratcliff et al., 1997).

Avant de présenter les modèles utilisés au laboratoire pour la mise en œuvre de ce travail, nous allons détailler dans cette introduction les différentes découvertes qui ont conduit aux connaissances actuelles sur l'extinction de gènes puis nous verrons plus spécifiquement de quelle manière PTGS et virus sont liés.

## **II. L'extinction de gènes!: un mécanisme conservé à travers l'évolution**

Suite à la découverte de la transformation des plantes à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, on a assisté à une vague de transgénèse dans les années 80. En effet, l'utilisation du plasmide Ti d'*Agrobacterium* comme vecteur de transfert dans la cellule (Zambryski *et al.*, 1980), permet d'introduire dans le génome de la plante des gènes conférant à celles-ci un intérêt du point de vue agronomique. Néanmoins, le taux de transformants lors d'une expérience de transgénèse n'est jamais de 100 %. De plus, parmi les plantes ayant intégré le gène étranger, une certaine proportion d'individus n'expriment pas le produit de ce gène. Jusqu'à récemment, cela restera considéré comme un artefact de la transgénèse et personne ne s'intéressera au phénomène. Il a fallu attendre 1990 et un travail publié simultanément par deux équipes pour que ce phénomène soit décrit sous le nom de co-suppression (Napoli *et al.*, 1990 ; van der Krol *et al.*, 1990). Dans ce travail pionnier, le but était de surexprimer dans des pétunias le gène codant pour la chalcone synthase. Le produit de ce gène est une enzyme impliquée dans la synthèse des pigments flavonoïdes qui donnent leur couleur aux pétales des fleurs. En surexprimant ce gène, les chercheurs espéraient pouvoir obtenir des fleurs présentant une couleur plus intense que le cultivar sauvage. Néanmoins, une proportion non négligeable des transformants montra un phénotype très différent de celui attendu : les fleurs

présentaient des secteurs blancs de surface plus ou moins étendue d'une plante à l'autre (cf. figure In-1). En analysant les plantes qui ont un tel phénotype, Napoli *et al.* (1990) montrèrent que les RNA messagers du transgène de la chalcone synthase et du gène cellulaire homologue s'accumulaient en quantités plus faibles dans les secteurs blancs que dans les secteurs colorés. On parla alors de cosuppression du transgène et du gène cellulaire homologue.

Suite à ce travail, les chercheurs ont commencé à s'intéresser de plus près à ce qu'on appellera rapidement l'extinction de gène homologie dépendante (HDGS : Homology Dependent Gene Silencing). Des observations similaires seront faites dans des tabacs transformés avec le gène de la  $\beta$  (1,3) glucanase : les plantes transgéniques hémizygotés montrent une expression très élevée du produit de ce gène, alors que les plantes homozygotés présentent une cosuppression du transgène et du gène cellulaire homologue (de Carvalho *et al.*, 1992). Rapidement, on s'est rendu compte que ce phénomène semblait universel chez les plantes et deux grands types d'inactivation génique ont ainsi été révélés et étudiés :

- Le premier type d'extinction de gènes se produit au niveau transcriptionnel (TGS : Transcriptional Gene Silencing). Des homologies de séquences dans les régions promotrices pourraient permettre des interactions DNA-DNA qui dirigeraient alors la méthylation des cytosines dans ces régions homologues. Ces régions hyper méthylées seront alors reconnues par des protéines induisant la condensation du DNA sous forme de chromatine ce qui va entraîner le blocage de la transcription (Vaucheret and Fagard, 2001). L'autre hypothèse, formulée par Mette *et al.*, serait que la méthylation des régions promotrices pourrait être médiée par le RNA. En effet, l'introduction dans la plante de RNA double-brin homologue à une région promotrice entraîne le TGS du gène visé (Mette *et al.*, 2000). Récemment, un gène (*DDMI*) indispensable pour la mise en place du TGS a été identifié (Morel *et al.*, 2000) ; il

code pour une protéine apparentée à SNF2 et SWI2 qui sont des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine chez la levure (Jeddeloh et al., 1999). Le gène *MET1*, codant pour la DNA méthyltransférase majeure de la cellule est également requis pour le TGS (Jones et al., 2001 ; Morel et al., 2000).

- Le second type d'inactivation génétique, le PTGS, a lieu au niveau post-transcriptionnel. Dans ce cas, la transcription du gène ciblé n'est pas affectée, mais la stabilité du RNA messenger correspondant est réduite. Contrairement au TGS qui impliquerait des homologies de séquence dans la région promotrice, le PTGS nécessite des homologies dans la partie codante des gènes concernés et une méthylation du DNA codant est souvent observée (Sijen and Kooter, 2000 ; (Vance and Vaucheret, 2001) ; Voinnet, 2001 ; Waterhouse et al., 2001).

Le mode d'action du PTGS commence à être élucidé, mais il subsiste encore quelques zones d'ombre. En effet, on connaît à présent les mécanismes biochimiques qui conduisent à la dégradation séquence spécifique d'un RNA donné, mais on ne connaît pas encore la totalité des gènes impliqués dans la mise en place du PTGS.

L'étude du mécanisme conduisant au PTGS a révélé 3 phases distinctes : l'initiation du PTGS au niveau cellulaire, la propagation et la maintenance du PTGS dans l'organisme entier (Sijen and Kooter, 2000 ; (Vance and Vaucheret, 2001) ; Voinnet, 2001 ; Waterhouse et al., 2001).

### **1. Initiation du PTGS**

La phase d'initiation du PTGS à l'échelle cellulaire peut à son tour être divisée en trois étapes bien distinctes: une étape de reconnaissance du RNA "indésirable", une étape de dégradation de ce RNA et enfin une étape de ciblage des RNA homologues.

### a. Rôle et reconnaissance du RNA "indésirable"

L'une des caractéristiques majeures du PTGS est sa grande spécificité!: seules les molécules de RNA partageant une homologie suffisante seront ciblées et dégradées. Il doit donc exister un facteur ou une macromolécule permettant la reconnaissance d'une séquence spécifique. Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer cette reconnaissance : il a été proposé initialement que le nombre élevé de molécules de RNA produites par le transgène pourrait activer le système lorsqu'un certain seuil de concentration est atteint (Dehio and Schell, 1994 ; Dougherty and Parks, 1995 ; Lindbo and Dougherty, 1992) ; puis, il fut proposé que la méthylation du transgène pourrait entraîner la production de molécules de RNA aberrantes, sans que l'on sache exactement quelle était la nature de cette aberration (une des hypothèses étant une terminaison précoce) (English et al., 1996).

Par la suite, de nouvelles données permettront de montrer que la molécule-clé pour l'activation du PTGS semble être un RNA double brin. En effet, le PTGS se met plus facilement en place dans deux cas!: soit lorsque le taux de transcription du transgène est élevé (Elmayan and Vaucheret, 1996), soit lorsqu'une insertion du transgène en répétition inverse a lieu (Que and Jorgensen, 1998 ; Stam, 1997 ; Van Blokland *et al.*, 1994). Ces dernières observations suggèrent la formation d'un duplex RNA fait directement suite à la transcription de RNA sens et antisens (Baulcombe, 1996). L'hypothèse du rôle du RNAdb sera confirmée grâce à l'obtention de plantes transgéniques avec une construction en répétition inverse. Dans ces plantes, le PTGS du gène homologue à la construction inversement répétée peut atteindre 95!% (Waterhouse *et al.*, 1998 ; Wesley *et al.*, 2001).

Une confirmation du rôle du RNAdb vient des travaux récents réalisés chez les animaux et qui montrent que la micro-injection dans l'organisme de RNA db obtenu *in vitro* conduit à l'extinction du gène cellulaire homologue chez des organismes aussi variés que le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998), la drosophile *Drosophila melanogaster*

(Kennerdell and Carthew, 1998 ; Kennerdell and Carthew, 2000), le planaire (Sanchez Alvarado and Newmark, 1999), l'hydre (Lohmann *et al.*, 1999), le poisson-zèbre (Li *et al.*, 2000) et même des embryons de souris pré-implantés (Wianny and Zernicka-Goetz, 2000). Dans tous ces exemples, ce phénomène a été baptisé RNAi pour "RNA interference". Depuis peu, on est également capable d'induire le RNAi dans des cellules humaines en culture et dans des souris adultes (Elbashir *et al.*, 2001 ; Lewis *et al.*, 2002).

### b. Dégradation du RNAdb

*Comment est déclenché le système de dégradation suite à la perception du RNA db?*

Le fait que le RNA messenger homologue soit dégradé suppose qu'il doit y avoir intervention d'une molécule de RNA antisens pour conférer la spécificité. Or, toutes les tentatives pour isoler une telle molécule de haut poids moléculaire ont échoué. En 1999, l'équipe de D. Baulcombe publie la mise en évidence dans les plantes «!silencées!» de molécules de RNA antisens d'une taille d'environ 25 nucléotides (Hamilton and Baulcombe, 1999). Ces petits RNA antisens se retrouvent dans tous les exemples de PTGS mis en place dans les plantes. Cependant, on détecte aussi en quantités identiques des molécules de RNA sens d'environ 25 nucléotides, ce qui suggère que ces petits RNA résultent de la dégradation d'un RNA db (Hamilton and Baulcombe, 1999).

Par la suite, le lien entre PTGS et RNAi sera renforcé par la découverte de molécules de RNA de 25nt dans les organismes animaux qui montrent le phénomène de RNAi (Elbashir *et al.*, 2001a ; Sharp, 1999), suggérant ainsi un mécanisme conservé d'un règne à l'autre.

La découverte du phénomène de RNAi chez les animaux a permis de progresser très rapidement dans la compréhension du mécanisme biochimique du PTGS. Récemment, la mise au point d'un système d'étude du RNAi *in vitro*, à partir de lysat de cellules Schneider 2



de drosophile, a permis d'étudier de façon rapide et extensive le mécanisme de dégradation du RNA (Tuschl *et al.*, 1999). Les résultats obtenus grâce à ce système d'étude *in vitro* montrent qu'une molécule de RNAdb de 500 pb introduite dans le lysat de cellules est dégradée en fragments de 21-23 nt et que le RNA messenger homologue est dégradé de la même manière en petits RNA de même taille (Tuschl *et al.*, 1999 ; Zamore *et al.*, 2000). Par ailleurs, le système requiert de l'ATP pour fonctionner et est indépendant de la traduction du mRNA (Zamore *et al.*, 2000). Enfin, la dégradation du mRNA se fait en quelques minutes suite à l'introduction du RNAdb dans le milieu. Il semblerait donc que les petits fragments de RNA provenant de la dégradation du RNAdb servent à cibler la dégradation du mRNA. Un tel mécanisme peut également être imaginé chez les plantes en l'absence de données expérimentales plus nombreuses.

*Quelle est l'enzyme responsable du clivage du RNAdb en fragments de 21-23nt!?*

Rappelons tout d'abord qu'il existe, chez *E. coli*, une enzyme, la RNase III qui dégrade spécifiquement le RNAdb (Chen *et al.*, 1990). Or, les caractéristiques des petits fragments de RNA db de 21-23nt sont celles d'un produit de dégradation par la RNase III!: un fragment de 19-21 pb, phosphorylé en 5' et possédant 2 nucléotides non appariés en 3'. En se penchant sur le génome de la drosophile, les chercheurs ont identifié 3 homologues de la RNase III!codés par les gènes *homeless*, *drosha* et *dicer* (Bernstein *et al.*, 2001). Des tests d'activité avec les produits de ces 3 gènes ont montré que seul Dicer est capable de dégrader *in vitro* du RNAdb en fragments de 21-23nt (Bernstein *et al.*, 2001 ; Hammond *et al.*, 2000!). Il est intéressant de noter qu'on trouve des homologues de Dicer chez tous les eucaryotes, en particulier chez l'homme et chez la plante. Toutefois, il n'a pas encore été fait de lien direct entre les homologues de Dicer chez *Arabidopsis thaliana* (CAF!: Cappel Factory (Jacobsen *et al.*, 1999)) et le PTGS. Dicer est une protéine possédant un domaine hélicase, deux domaines

RNase III (RIIIa et RIIIb), un domaine de fixation au RNAdb et un domaine conservé appelé PAZ (Cerutti et al., 2000) (abréviation pour Piwi, Argonaute, Zwillig) (Bernstein *et al.*, 2001) (cf. figure In-2).

### c. Ciblage du mRNA homologue

Après avoir vu comment était déclenché le PTGS et de quelle manière et par quelle enzyme était dégradé le RNAdb, la question du ciblage du mRNA homologue reste posée. Nous avons vu que l'introduction de RNAdb dans le lysat de cellule de drosophile, puis sa dégradation en fragments de 21-23nt entraîne le clivage du mRNA homologue. Il semble donc que ce sont les petits RNA de 21-23nt qui sont responsables du ciblage du mRNA. Récemment, un complexe multiprotéique a été isolé à partir de cellules S2 de drosophile transfectées avec du RNAdb (Hammond *et al.*, 2001). Ce complexe multiprotéique, d'une taille d'environ 500 kDa, et baptisé RISC (RNA Induced Silencing Complex), co-précipite avec les petits RNAs de 21-23 nt suggérant ainsi une association et éventuellement un rôle de guide pour ces petits RNA dans le ciblage du complexe RISC au mRNA. Ce rôle de guide semble se confirmer suite à l'identification de l'un des composants du complexe RISC. En effet, chez *D. melanogaster*, la fraction active de ce complexe renferme une protéine, AGO-2, membre de la famille Argonaute, également essentielle pour l'extinction de gènes chez *C. elegans* (RDE1), *Neurospora crassa* (QDE2) et *Arabidopsis thaliana* (AGO1) (cf. figure In-2). De plus, on retrouve dans AGO-2, le domaine PAZ conservé chez Dicer. Cette observation suggère que Dicer et AGO-2 puissent interagir physiquement, via ce domaine PAZ, permettant ainsi le transfert de la molécule de RNA de 21-23 nt de l'un à l'autre (Hammond *et al.*, 2001). On peut ainsi imaginer un modèle d'interaction pour la mise en place du PTGS!: dans ce modèle, le RNA db est reconnu et clivé en fragments de 21-23nt par Dicer qui va ensuite interagir avec RISC via AGO-2, «léchangeant!» les petits fragments de

21-23 nt. Cette hypothèse est confortée par des travaux réalisés chez *N. crassa* qui montrent que QDE2 (l'homologue d'AGO-2) est complexé aux petits RNA de 21-23nt (Catalanotto et al., 2002). RISC peut ensuite cibler le mRNA homologue en séquence et le dégrader par l'intermédiaire d'une activité nucléasique encore inconnue associée à ce complexe multimérique (cf. figure In-3). Suite à ces découvertes les petits fragments de RNA seront baptisés siRNA (short interfering RNA) (Elbashir *et al.*, 2001a).

#### d. Synthèse de RNAdb dans les plantes

Toutes ces données montrent comment est initié le PTGS à partir de la perception de RNA db dans la cellule. Cependant, il peut y avoir PTGS dans des plantes transgéniques où le transgène est inséré en un seul locus et en une seule copie. Comment est initié le PTGS à partir d'un transgène sens!?

Chez le champignon *Neurospora crassa*, Cogoni et Macino ont isolé en 1997 des mutants défectifs dans le quelling ("étouffement", l'équivalent du PTGS), c'est-à-dire des mutants "*qde*" (quelling defective) (Cogoni and Macino, 1997). Parmi ces mutants, les auteurs ont cloné en 1999 le gène *qde-1*, un gène homologue à la RNA polymérase RNA dépendante (RdRp ou RNA directed RNA polymerase) de tomate (Cogoni and Macino, 1999b). L'activité de cette RNA polymérase RNA dépendante avait été identifiée depuis trois décennies chez les plantes (Astier-Manifacier and Cornuet, 1971), et l'un des homologues correspondant a été cloné récemment chez la tomate (Schiebel *et al.*, 1998), mais son rôle exact n'était pas connu.

Peu après l'identification du rôle de la RNA polymérase RNA dépendante dans le quelling chez le champignon, deux publications simultanées, décrivent le même type de résultats chez *Arabidopsis thaliana*. L'équipe de H. Vaucheret isole des mutants *sgs* (suppressor of gene silencing), parmi lesquels le mutant *sgs 2* qui est affecté dans un gène

homologue de la RdRp de tomate (Mourrain *et al.*, 2000). Parallèlement, l'équipe de D. Baulcombe rapporte l'isolement de mutants *sde* (silencing defective) également chez *A. thaliana*. L'une des lignées mutantes est affectée dans un gène appelé *SDE1* qui est en fait le gène *SGS2* (Dalmay *et al.*, 2000). Les données de ces différents auteurs montrent que la présence d'une activité RdRp est nécessaire pour la mise en place du PTGS à partir d'un transgène sens. Pour servir de substrat à la RdRp, il faut imaginer que les transcrits du transgène contiennent un signal anormal pour pouvoir être sélectionnés parmi tous les RNA messagers de la cellule. Le fait que le PTGS induit par la réplication d'un virus soit indépendant de *SDE1* (Dalmay *et al.*, 2000) va dans le sens de cette hypothèse : en effet le génome viral code pour sa propre RdRp et lors de sa réplication il passe par un intermédiaire RNAdb qui pourra déclencher le PTGS indépendamment de l'obtention de RNAdb par la RdRp de la plante. De même le PTGS induit par une construction transgénique en répétition inverse qui va donc être transcrite en un ARN en tige-boucle est indépendant de *SDE1/SGS2* (Beclin *et al.*, 2002).

Chez le nématode *C. elegans*, il est intéressant de noter que le gène *EGO1*, un homologue de la RdRp de tomate, est également nécessaire pour la mise en place du RNAi (Smardon *et al.*, 2000). De plus, le gène *RRF-1*, l'homologue de *SDE1/SGS2* chez *C. elegans*, est également requis pour le RNAi (Sijen *et al.*, 2001).

## **2. Propagation du PTGS dans l'organisme**

### **a. L'extinction de gène systémique**

Nous avons vu comment le PTGS était initié à l'échelle de la cellule ; cependant le PTGS possède la propriété de ne pas rester localisé au niveau de la cellule. Les premières indications sur l'aspect systémique du PTGS viennent d'observations réalisées sur des tabacs contenant le transgène codant pour la S-adenosyl-L-méthionine-transférase (SAM-S). Dans

les feuilles inférieures des plantes silencées, le phénotype correspondant au PTGS du gène est limité aux veines. Puis, dans les feuilles supérieures, la surface des tissus affectés augmente jusqu'à occuper la feuille entière (Boerjan *et al.*, 1994). De façon identique, des tabacs transgéniques portant une construction 35S-*NIA* (Nitrate réductase) montrent un phénotype d'extinction du gène *NIA*, caractérisé par une nécrose foliaire, localisé dans des zones ponctuées au niveau des feuilles inférieures, puis se propageant dans les parties supérieures de la plante (Palauqui *et al.*, 1996).

L'existence d'une composante systémique du PTGS sera finalement démontrée de façon élégante grâce à l'utilisation de greffes. L'équipe de H. Vaucheret montre que l'on peut transmettre par greffe le PTGS du gène *UID-A*, codant pour la glucuronidase, à des tabacs transgéniques *UID-A* (Palauqui *et al.*, 1997). Les résultats obtenus montrent que la transmission est unidirectionnelle du porte-greffe au greffon et qu'elle peut aussi avoir lieu quand le porte-greffe «!silencé!» et le greffon sont physiquement séparés par 30 cm de tige d'une plante non transgénique. Il doit donc exister un agent diffusible, permettant le mouvement du PTGS à travers la plante. De la même manière, l'induction locale du PTGS d'un transgène GFP (par bombardement ou agro-infiltration d'une construction GFP) aboutit à une extinction systémique du transgène GFP dans la plante entière (Voinnet *et al.*, 1998). La mise en place du PTGS systémique dans la plante suit de façon frappante le trajet emprunté par un virus ou par un colorant transporté par le phloème (Citovsky and Zambryski, 2000 ; Roberts *et al.*, 1997). Il est donc logique de penser que le mouvement de cellule à cellule se fait en empruntant les plasmodesmes, à plus forte raison, lorsqu'on voit que les cellules de garde, dépourvues de plasmodesmes, sont les seules cellules à ne pas subir le PTGS dans des plantes GFP silencées (Voinnet *et al.*, 1998).

Des observations similaires sur l'aspect systémique de l'extinction de gènes ont été faites chez les animaux lorsqu'on induit le RNAi d'un gène. La micro-injection de quelques

molécules de RNAdb dans les gonades ou l'intestin du nématode *C. elegans* suffit pour éteindre l'expression du gène visé dans tout l'organisme (Bosher and Labouesse, 2000 ; Fire *et al.*, 1998). Les caractéristiques de l'extinction de gène systémique chez *C. elegans* commencent à être élucidées!: très récemment, un gène nécessaire à la mise en place du RNAi systémique a été identifié. Le produit du gène *SIDI* (systemic RNA interference deficient) est une protéine transmembranaire putative contenant 11 domaines transmembranaires et se localise à la périphérie de la cellule. Elle pourrait donc former un canal permettant le passage du RNAdb, des siRNA ou d'un signal encore inconnu (Winston *et al.*, 2002). Il ne semble pas exister d'homologue du gène *SIDI* chez la drosophile, ce qui est en accord avec l'absence de RNAi systémique dans cet organisme.

À l'heure actuelle, et quel que soit l'organisme étudié, la nature exacte du signal n'est pas encore connue, mais il doit nécessairement contenir une composante acide nucléique permettant la dégradation séquence-spécifique, ce signal étant composé soit de petits RNA de 21-23 nt, soit d'une molécule de RNA db plus longue ou bien encore d'un complexe ARN-protéine (cf. figure In-4).

#### b. L'amplification du PTGS

Pour expliquer l'aspect systémique du PTGS il faut admettre une amplification du phénomène afin qu'il puisse se propager à travers tout l'organisme. En effet, l'introduction de quelques molécules de RNA db dans quelques cellules d'un nématode suffit pour éteindre l'expression du gène visé dans tout l'organisme (Fire *et al.*, 1998). Or, même si les molécules de RNA db sont dégradées en plusieurs siRNA, il est difficilement concevable que ces quelques molécules de siRNA soient suffisantes pour cibler la dégradation de tous les mRNA homologues dans l'organisme. Cette question a également été soulevée dans le cadre des travaux de l'équipe de D. Baulcombe : en effet, là aussi, l'introduction par biolistique d'un

transgène GFP dans quelques cellules d'une plante transgénique GFP suffit pour éteindre le transgène GFP dans la plante entière (Voinnet *et al.*, 1998).

La démonstration de l'amplification du RNAi sera faite à l'aide du système *in vitro* mis au point chez la drosophile. En utilisant ce système, il a été montré que les siRNA de 21-23 nt peuvent servir d'amorce pour synthétiser du RNAdb à partir du mRNA, cet RNAdb nouvellement synthétisé pouvant à son tour être dégradé pour générer de nouveaux siRNA (Lipardi *et al.*, 2001). Cependant, l'absence d'homologue de RdRp chez la drosophile rend difficile l'interprétation de ces observations. Des résultats comparables ont été obtenus chez le nématode soumis au RNAi: l'injection de RNAdb dans le ver conduit à l'obtention de siRNA suite à la dégradation de cet RNAdb, et l'on retrouve également des siRNA secondaires provenant d'un RNAdb néo-synthétisé à partir du mRNA du gène visé (Sijen *et al.*, 2001). On peut donc parler d'une amplification par PCR à partir du RNA, ce qui augmente le nombre de siRNA permettant de cibler les mRNA pour les dégrader.

Cette découverte complique un peu le schéma général du RNAi, les siRNA peuvent donc servir à la fois de guide pour permettre la fixation du complexe RISC puis la dégradation du mRNA et d'amorce à une RdRp pour copier le mRNA en RNAdb (cf. figure In-4).

Ces données obtenues dans les systèmes animaux ont également été observées chez les plantes. En effet, Vaistij *et al.* (2002) montrent que, pour induire le silencing d'un transgène GFP, l'utilisation de la partie 3' de ce dernier est suffisante pour entraîner l'apparition de siRNA couvrant toute la séquence du transgène et également la méthylation de toute la séquence codante. De plus, cette amplification du signal par "propagation" sur le RNA cible nécessite la présence de la RdRp SDE1/SGS2, ce qui est en accord avec les résultats obtenus chez les animaux. Contrairement à ce que l'on observe chez les animaux,

l'amplification sur le RNA chez les plantes se fait dans les deux sens (5' vers 3' et 3' vers 5'), il doit donc y avoir intervention d'une autre enzyme.

### 3. Maintenance de l'extinction de gènes

Une fois initié, amplifié et propagé dans l'organisme, le PTGS reste généralement établi et ne disparaît pas au cours du temps. Cette maintenance du PTGS reste l'un des aspects les plus complexes à étudier. En effet, suivant le type de PTGS dirigé contre un transgène ou un gène cellulaire, la maintenance du phénomène n'est pas la même lorsqu'on supprime l'inducteur du PTGS. Palauqui et Vaucheret (1998) montrent en utilisant des tabacs porte-greffes transgéniques *NIA+* (nitrate réductase) silencés ainsi que des greffons transgéniques *NIA+*, qu'il y a différentes classes de transgènes. En effet, lorsqu'on retire le greffon du porte-greffe transgénique silencé pour le greffer sur un porte-greffe sauvage, on peut distinguer différents résultats. Dans les lignées de classe I, qui n'initient pas spontanément le PTGS, celui-ci n'est pas maintenu après "dé-greffage". Par contre, le silencing est maintenu dans les lignées de classe II, qui peuvent initier spontanément le PTGS. Il semble donc y avoir un lien entre capacité à initier le PTGS et capacité à le maintenir (Palauqui and Vaucheret, 1998!; Vaucheret *et al.*, 2001). La possibilité pour une lignée transgénique de reproduire le signal de silencing systémique (ce qui est corrélé à sa maintenance) peut dépendre de la localisation ou de la structure du transgène. Les modifications chimiques (comme la méthylation du DNA ou la déacétylation des histones) pourraient agir comme un marquage épigénétique permettant la maintenance du PTGS.

L'hypothèse d'un rôle du type de transgène dans la maintenance du PTGS est renforcée par des expériences utilisant l'extinction de gène induite par un virus (Kumagai et al., 1995) (VIGS!: Virus Induced Gene Silencing). Des expériences menées dans l'équipe de D. Baulcombe montrent que l'on peut éteindre l'expression d'un gène cellulaire comme la



phytoène désaturase (*PDS*) ou d'un transgène GFP en infectant une plante avec un virus recombinant capable d'exprimer le gène correspondant (Ruiz *et al.*, 1998). Par contre, suivant le type de gène visé, on obtient des résultats un peu différents!: dans le cas du gène cellulaire *PDS*, les mRNA du gène sont dégradés, mais pas les RNA viraux recombinants renfermant la séquence *PDS* ; à l'inverse avec le transgène GFP, on observe une dégradation des mRNA du transgène et des RNA viraux recombinants GFP. De plus, dans les plantes GFP, le PTGS du transgène GFP reste en place, même après dégradation totale du virus recombinant. L'initiation du VIGS semble donc similaire dans les deux cas!: la présence du virus est nécessaire pour que l'extinction puisse se mettre en place. Par contre, la maintenance du VIGS semble être indépendante du virus dans le cas du transgène GFP ; là aussi, des modifications épigénétiques pourraient expliquer le fait que le transgène puisse continuer à maintenir le PTGS même en l'absence de l'inducteur.

Une indication de l'importance des modifications épigénétiques pour la maintenance du PTGS viendra d'expériences faites par Morel *et al.* (2000) sur des mutants d'*A. thaliana* affectés dans un composant de la chromatine SWI2/SNF2 (*ddm1*) ou dans la DNA méthyltransférase majeure (*met1*). En croisant des plantes GUS silencées au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel avec les mutants *ddm1* et *met1*, les auteurs montrent que les produits de ces deux gènes sont importants pour le TGS mais également pour le PTGS, le gène *DDM1* étant impliqué dans les phases précoces du PTGS alors que le gène *MET1* serait plutôt impliqué dans sa maintenance. On peut donc dire qu'il existe une composante nucléaire entraînant la méthylation du transgène et que celle-ci est importante pour le maintien de l'extinction de gènes, au moins dans le système utilisé ici.

Néanmoins, l'implication de la méthylation dans le maintien du PTGS reste encore controversée. En effet, des organismes comme la drosophile ou le nématode ne présentent pas de méthylation du DNA, ce qui n'empêche pas l'établissement du RNAi (Wassenegger,

2000). De plus, des résultats en contradiction avec ceux obtenus par Morel *et al.* (2000), montrent que MET1 n'est pas requis pour la maintenance de la méthylation dans des expériences de VIGS d'un transgène GFP (Jones *et al.*, 2001). Il doit donc y avoir intervention d'autres méthylases importantes pour maintenir le transgène méthylé dans certaines conditions.

#### **4. Dissection génétique du PTGS**

Ces dernières années, la compréhension des mécanismes du RNAi ou du PTGS est passée par une analyse biochimique poussée mais également par une approche menée en parallèle par plusieurs groupes et consistant à identifier les déterminants génétiques nécessaires à la mise en place du PTGS. D'un organisme à l'autre, les homologies entre gènes impliqués dans le mécanisme d'extinction de gènes sont importantes, ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'un mécanisme apparu avant la différenciation entre plantes et animaux. Cette dissection génétique du phénomène dans de nombreux organismes a permis d'isoler et de caractériser un certain nombre d'enzymes que l'on peut classer en différents groupes (cf. figure In-5).

##### a. Les RNA polymérase RNA dépendantes

Nous avons déjà mentionné le rôle des RdRp dans la mise en place du PTGS chez plusieurs organismes, que ce soit EGO1 et RRF1 chez *C. elegans* (Sardon *et al.*, 2000 ; (Sijen *et al.*, 2001)), QDE1 chez *N. crassa* (Cogoni and Macino, 1999a) ou qu'il s'agisse de SDE1/SGS2 chez *A. thaliana* (Dalmay *et al.*, 2000!; Mourrain *et al.*, 2000). Ces polymérase semblent nécessaires à plusieurs niveaux!: pour convertir les RNA aberrants en RNAdb et de façon plus générale pour amplifier le PTGS en synthétisant du RNAdb à partir du mRNA et des siRNA utilisés comme amorce.

### b. Les RNases

Identifiée chez *D. melanogaster* (Hammond *et al.*, 2000) et chez *C. elegans* (Knight and Bass, 2001), Dicer est une RNase double-brin spécifique qui clive les RNAb en fragments de 21-23nt. Cette enzyme possède un domaine hélicase et deux domaines RNase III. Chez *A. thaliana*, le rôle de l'homologue de Dicer, CAF1, n'a pas encore été démontré.

### c. Les hélicases

Identifiées chez de nombreux organismes, les hélicases de type DEAH, RecQ ou Upf1p, telles que SDE3 ou QDE3, jouent également un rôle dans le PTGS (Cogoni and Macino, 1999b; Dalmay *et al.*, 2001!; Domeier *et al.*, 2000!; Ketting *et al.*, 1999!; Wu-Scharf *et al.*, 2000). Leur rôle exact dans le PTGS reste à définir, mais il doit être distinct de celui de Dicer qui possède également un domaine hélicase. Néanmoins, on sait que ces enzymes ont d'autres fonctions dans la cellule : ainsi chez *C. elegans*, SMG2 intervient dans la dégradation des RNA non-sens, qui ont un codon STOP prématuré dans leur séquence (Domeier *et al.*, 2000).

### d. Homologues de facteur d'initiation de la traduction

Également conservées entre la drosophile, les plantes et les nématodes, les protéines homologues au facteur d'initiation de la traduction eIF2C, à savoir AGO-1, AGO-2, RDE-1 et QDE-2 ont la particularité de posséder un domaine PAZ qui pourrait leur permettre d'interagir avec Dicer (Fagard *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001!). Le lien avec la traduction n'a pas encore été établi, mais il est intéressant de noter, là encore, la conservation à travers les espèces.

### e. Protéines impliquées dans les modifications du DNA

Nous avons également mentionné précédemment, les protéines MET-1 et DDM-1 qui interviennent respectivement dans la méthylation du DNA et dans le repliement de la chromatine (Morel *et al.*, 2000). Les études faites sur ces deux protéines suggèrent

l'importance de la méthylation du DNA dans la maintenance du PTGS et une conservation des mécanismes entre TGS et PTGS.

#### f. Gènes de fonction inconnue

Parmi les gènes identifiés en criblant des banques de mutants défectifs dans le PTGS ou le RNAi, certains n'ont pas encore de fonction associée et leur rôle n'est pas très bien défini. Il s'agit des gènes *SGS3* chez *A. thaliana* (Mourrain *et al.*, 2000) dont on sait seulement que la protéine possède un domaine coiled-coil en C terminal et des gènes *RDE-2* et *3*, *MUT-2* chez *C. elegans* qui jouent un rôle dans la régulation des évènements de transposition.

### **5. Modèle général du PTGS**

Pour résumer les découvertes biochimiques et génétiques associées au mécanisme de PTGS chez les plantes, un schéma général à deux branches peut être proposé (cf. figure In-6) (Béclin *et al.*, 2002!; Vaucheret *et al.*, 2001).

La première branche dépend d'un ensemble de gènes *SDE1/SGS2* (codant pour une RdRp cellulaire), *SGS3* (dont le produit est de fonction inconnue), *SDE3* (codant pour une hélicase) et *AGO1* (codant pour un homologue du facteur d'initiation de la traduction eIF2C). Cette voie est induite à partir d'un RNA aberrant transcrit à partir d'un transgène modifié épigénétiquement par DDM1 et MET1 (Morel *et al.*, 2000). Ce RNA aberrant va être reconnu par les gènes cités plus haut et copié pour donner un RNA db (Dalmay *et al.*, 2000).

Quant à la deuxième branche, elle est indépendante des gènes codant pour *SDE1/SGS2*, *SDE3*, *SGS3* et *AGO1* : dans ce cas, le PTGS est induit par un RNA double-brin provenant soit directement d'un transgène en répétition inverse, soit d'un virus à RNA qui passe par un intermédiaire de réplication double-brin.

Quelle que soit l'origine de ce RNA double-brin, il est ensuite reconnu par une nucléase spécifique, nommée Dicer chez *D. melanogaster* (Bernstein *et al.*, 2001) et qui pourrait être CAF1 chez *A. thaliana*. Dicer va dégrader le RNAdb en fragments de 21-23 nt, appelés siRNA, et ceci en commençant par les deux extrémités (Elbashir *et al.*, 2001a). Ces siRNA peuvent ensuite avoir deux destinées!: d'une part, ils peuvent servir d'amorce pour synthétiser du RNAdb à partir du RNA homologue cible (Sijen *et al.*, 2001!; Vaistij *et al.*, 2002)!; d'autre part, ils peuvent être transférés à un complexe nommé RISC (RNA Induced Silencing Complex) via un composant AGO2 possédant le même domaine PAZ que Dicer (Hammond *et al.*, 2001). Le complexe RISC chargé en siRNA va ensuite être entraîné sur le RNA homologue et le dégrader (Elbashir *et al.*, 2001b!; Tuschl *et al.*, 1999).

### III. Rôles de l'extinction de gènes

#### 1. Régulation de la transposition et rôle dans le développement

Parmi les gènes impliqués dans la mise en place du PTGS, certains interviennent dans la régulation des évènements de transposition que ce soit chez le nématode *C. elegans* ou chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (Ketting *et al.*, 1999!; Wu-Scharf *et al.*, 2000). Un des rôles du PTGS peut donc être de prémunir l'organisme contre des évènements de transposition trop nombreux, ce qui pourrait être délétère pour le génome.

Un autre rôle proposé pour le PTGS est d'intervenir dans le développement de l'organisme. En effet, les mutations dans certains gènes nécessaires au PTGS ou au RNAi entraînent souvent des aberrations phénotypiques et un développement perturbé (Fagard *et al.*, 2000; Ketting *et al.*, 2001 ). Néanmoins, le lien entre RNAi et développement chez les animaux a été un peu controversé récemment suite aux travaux conjoints de plusieurs équipes visant à isoler des siRNA dans des organismes sains. On a effectivement pu isoler des RNA

d'une vingtaine de nucléotides, mais aucun n'avait la morphologie des siRNA (voir Grosshans and Slack, 2002 et Pasquinelli, 2002 pour revue). Ces petits RNA, baptisés micro-RNA possèdent la particularité d'être en partie complémentaire à la séquence 3' non codante de certains messagers et de pouvoir bloquer la traduction de ceux-ci en s'y appariant (Lagos-Quintana *et al.*, 2001), ceci de manière similaire aux stRNA (Small Temporal RNA) chez *C. elegans* (Rougvie, 2001). Il existe cependant un lien avec le RNAi puisque ces micro-RNA dérivent d'un précurseur plus long, structuré en tige-boucle et qui est clivé par Dicer en RNA de 21 nt (Hutvagner *et al.*, 2001!; Ketting *et al.*, 2001).

Il semble donc y avoir deux types d'interférence par le RNA au niveau post-transcriptionnel : une dégradation du RNA messager ou un blocage de la traduction par hybridation à la partie 3' non codante du RNA messager. La différence entre les deux vient de la spécificité de l'appariement! : les siRNA s'hybrident parfaitement au mRNA alors que les hybrides micro-RNA/mRNA présentent toujours un ou plusieurs mésappariements (Pasquinelli, 2002) (cf. figure In-7).

## **2. Mécanisme de protection contre les virus de plantes**

L'hypothèse d'un rôle du PTGS dans la protection contre les virus de plante est basée sur plusieurs observations. La première observation concerne la notion de récupération (recovery) dans certaines plantes infectées, c'est-à-dire l'émergence de feuilles apicales exemptes de symptômes et donc de virus. Par ailleurs, les résultats obtenus par les chercheurs tentant d'obtenir des plantes transgéniques résistantes aux virus sont également en faveur de l'intervention du PTGS. Ainsi, l'expression de la protéine de capsid du TMV dans des tabacs retarde l'apparition des symptômes suite à l'infection par le virus, sans que le mécanisme exact ne soit encore pleinement compris (Abel *et al.*, 1986). Plus surprenant encore, la transformation de plantes avec le gène de la CP du TEV non traductible confère également

une immunité contre le virus (Lindbo and Dougherty, 1992). De même, on peut obtenir une protection croisée entre 2 virus portant une séquence homologue!: ainsi une plante infectée par un virus recombinant TRV-GUS est résistante à une surinfection par un virus recombinant PVX-GUS (Ratcliff *et al.*, 1999). De plus, des plantes transgéniques GUS, PG (poly-galacturonase) ou NPT (Néomycine Phosphotransferase) montrant un PTGS de ces transgènes sont résistantes à un virus recombinant renfermant les séquences GUS, PG ou NPT (English *et al.*, 1996). Par ailleurs, les virus sont de très bons inducteurs de PTGS (VIGS : Virus Induced Gene Silencing) (Ruiz *et al.*, 1998) et des plantes mutées dans des gènes nécessaires à la mise en place du PTGS (*SDE1/SGS2*, *SGS3*, *SDE3* ou *AGO1*) montrent une hypersensibilité à certains virus, comme le CMV, ce qui renforce encore le lien entre PTGS et défense antivirale (Dalmay *et al.*, 2001; Morel *et al.*, 2002 ; Mourrain *et al.*, 2000 ).

Le fait que les virus à RNA puissent être à la fois inducteurs et cibles du PTGS est lié à leur mode de multiplication : en effet, lors de la réplication de leur génome, les virus à RNA copient la molécule de RNA<sup>+</sup> en molécule de RNA<sup>-</sup> ; cette molécule RNA<sup>-</sup> sert ensuite de matrice pour la synthèse de nombreuses molécules de RNA<sup>+</sup>. Durant cette étape d'amplification, il se forme des intermédiaires de réplication qui sont partiellement sous forme double brin (Hull, 2002) et les virus sont donc naturellement reconnus par la plante sous cette forme RNAdb.

### **3. Les virus contre-attaquent**

Bien que le PTGS semble être dirigé contre les virus, ce mécanisme n'empêche pas l'infection virale de se développer dans un certain nombre de cas. Il doit donc y avoir compétition entre la plante et le virus pour la mise en place de l'infection. La démonstration indirecte du rôle anti-viral du PTGS chez les plantes viendra de la découverte des stratégies mises en place par les virus pour contrecarrer l'extinction de gènes. Cette hypothèse a été

initialement proposée à partir des observations du phénomène de synergie pouvant exister entre deux virus!; ainsi la co-infection de *N. benthamiana* par le PVX, un potexvirus, et par le TEV, un potyvirus, provoque des symptômes fortement aggravés comparés à l'infection par le PVX seul (Pruss *et al.*, 1997). Le facteur viral responsable de cette augmentation de pathogénicité a été identifié dans un premier temps comme étant le produit P1/HCPro du domaine N terminal de la polyprotéine de TEV (Pruss *et al.*, 1997). Par la suite, on a démontré que seule la protéine HCPro était responsable de la suppression du PTGS par les potyvirus (Anandalakshmi *et al.*, 1998 ; Brigneti *et al.*, 1998 ; Kasschau and Carrington, 1998).

#### **4. Différents mécanismes de suppression par les protéines virales**

On s'est rendu compte assez rapidement que la suppression du PTGS semblait être une caractéristique commune à beaucoup de virus, si ce n'est à tous les virus. Suite à l'identification de la protéine HC-Pro chez les potyvirus, on identifiera la protéine 2b des cucumovirus comme étant également un supprimeur de PTGS (Brigneti *et al.*, 1998). L'infection de plantes GFP silencées par un vecteur viral PVX contenant différentes protéines virales permettra par la suite d'identifier de nombreux autres supprimeurs chez des virus tels que les *geminivirus*, les *sobemovirus* et les *tombusvirus* (Voinnet *et al.*, 1999). Ces protéines virales ne possèdent aucune homologie de séquence ou de structure entre elles, ce qui suggère que les différentes familles de virus aient évolué indépendamment pour développer une contre-stratégie envers le PTGS. À l'heure actuelle trois supprimeurs viraux sont étudiés de façon intensive.



### a. La protéine HC-Pro des *potyvirus*

De nombreuses fonctions ont été attribuées à la protéine HC-Pro des *potyvirus* (Atreya and Pirone, 1993). Elle possède un domaine protéinase à cystéine qui catalyse le clivage de HC-Pro à partir de la polyprotéine (Carrington *et al.*, 1989). Elle est également requise pour la transmission du virus par son vecteur (Lopez-Moya *et al.*, 1995). Par ailleurs, elle est nécessaire au mouvement à longue distance et pour la maintenance de l'amplification du génome viral (Kasschau *et al.*, 1997). Les mutants dans le domaine central de HC-Pro restent limités aux sites d'infection et sont perturbés au niveau de la multiplication virale. Ces propriétés pourraient être des conséquences indirectes de la fonction de suppression de HC-Pro.

La protéine HC-Pro supprime le PTGS dans tous les tissus de plantes GFP précédemment silencées (Brigneti *et al.*, 1998 ; Voinnet *et al.*, 1999). De plus, d'autres travaux montrent que l'expression transitoire de la protéine HC-Pro peut supprimer le PTGS d'un transgène GUS dans des tabacs (Llave *et al.*, 2000). En présence de la protéine HC-Pro, on constate une très forte diminution de l'accumulation des petits RNA de 21-23 nt dans des plantes GUS silencées (Llave *et al.*, 2000 ; Mallory *et al.*, 2001). Par contre, HC-Pro n'a pas d'effet sur la méthylation du transgène et ne bloque pas la production et le passage du signal du silencing systémique (Mallory *et al.*, 2001). Toutes ces données suggèrent que la protéine HC-Pro agirait au niveau de la maintenance du PTGS en empêchant la dégradation des RNA cibles en siRNA. Néanmoins, son action a lieu en aval de la production du signal systémique.

Le mode d'action exact n'est pas encore connu, mais il se pourrait que la suppression du PTGS par HC-Pro passe par une interaction avec une protéine de l'hôte. En effet, il a été montré que la protéine HC-Pro interagissait en double-hybride avec une protéine apparentée à la calmoduline, rgs-CaM (regulator of gene silencing Calmodulin). Il est intéressant de noter que cette protéine rgs-CaM semble être un suppresseur cellulaire de PTGS, car l'expression

de cette protéine à partir d'un vecteur viral peut entraîner une suppression du PTGS similaire à celle de HC-Pro (Anandalakshmi *et al.*, 2000). La protéine HC-Pro pourrait donc agir de façon indirecte en activant un supprimeur cellulaire de PTGS dans la plante.

Les protéines P1 du RYMV (Rice Yellow Mottle Virus) et AC2 de l'ACMV (African Cassava Mosaic Virus) suppriment également le PTGS dans tous les tissus de la plante et pourraient agir de façon similaire à HCPro (Voinnet *et al.*, 1999).

#### b. La protéine 2b des cucumovirus

Comme la protéine HCPro, la protéine 2b est également requise pour le mouvement à longue distance du virus dans la plante. Néanmoins, la nécessité de la protéine 2b dans l'établissement de l'infection systémique est plus ou moins importante suivant l'hôte (Ding *et al.*, 1995). Il s'avère que cette protéine facilite le mouvement à longue distance en interférant avec un mécanisme de défense de la plante, la résistance médiée par l'acide salicylique (Ji and Ding, 2001).

L'infection de plantes GFP silencées par le CMV ou par un PVX exprimant la protéine 2b montre un profil de suppression différent de la protéine HC-Pro! l'expression de la GFP suite à la suppression du PTGS se fait uniquement dans les jeunes feuilles ayant poussé après la mise en place de l'infection, mais pas dans les tissus où le PTGS est déjà établi (Brigneti *et al.*, 1998).

Par opposition aux protéines HC-Pro, P1 et AC2, ce second type de supprimeur ne semble donc pas capable de supprimer le PTGS une fois qu'il est établi ; il doit donc intervenir à une étape plus précoce du PTGS (Li and Ding, 2001). Le fait que le PTGS ne puisse pas se mettre en place dans les tissus émergents suggère que la protéine 2b empêche soit l'initiation du PTGS dans les tissus jeunes, soit le passage ou la perception du signal de silencing systémique. Cette dernière hypothèse a été confirmée récemment par des

expériences de greffe. La greffe d'une plante GUS sur une plante GUS silencée entraîne le PTGS du greffon ; par contre lorsqu'on greffe une plante GUS sur une plante issue d'un croisement d'une plante GUS silencée avec une plante exprimant la protéine 2b, il n'y a pas de mise en place du PTGS dans le greffon. De même, en faisant une triple greffe dans laquelle on intercale une plante 2b entre le porte-greffe GUS silencé et le greffon GUS, le signal du PTGS est bloqué (Guo and Ding, 2002). La protéine 2b pourrait donc interagir avec le signal du PTGS pour empêcher sa diffusion dans le phloème et donc sa mise en place dans les tissus méristématiques où il n'est pas pré-établi (Beclin et al., 1998).

Néanmoins, il est également possible que le rôle de la protéine 2b dans le blocage du signal soit plus indirect. En effet, dans les plantes GUS silencées croisées avec les plantes 2b, la méthylation du transgène est fortement diminuée, ce qui pourrait être une conséquence de la localisation nucléaire de la protéine 2b (Lucy *et al.*, 2000). Cela signifie que le signal nucléaire induisant la méthylation serait également bloqué par la protéine 2b.

L'introduction des protéines 2b du TAV (Tomato Aspermy Virus) ou P19 du TBSV (Tomato Bushy Stunt Virus) dans des plantes silencées provoque un modèle de suppression comparable à la protéine 2b du CMV, à savoir une suppression uniquement dans les tissus émergents (Li *et al.*, 1999 ; Voinnet *et al.*, 1999).

### c. La protéine P25 du PVX

La protéine P25 du PVX est l'une des trois protéines codées par le Triple Gene Block (TGB) et nécessaires au mouvement de ce virus de cellule à cellule. Les premières expériences ont tout d'abord écarté l'idée de la présence d'un supprimeur dans le génome du PVX! : en effet, celui-ci ne montre pas d'activité de suppression du silencing lorsqu'il infecte des plantes GFP silencées (Brigneti *et al.*, 1998). Cependant, lorsqu'on utilise le système d'expression transitoire par co-infiltration (Johansen and Carrington, 2001) de plantes GFP, la

protéine P25 exprimée par une construction 35S-P25 est capable de supprimer localement le PTGS induit par une construction 35S-GFP, mais pas le PTGS induit par une construction PVX-GFP (Voinnet *et al.*, 2000). Par ailleurs, la protéine P25 bloque le silencing systémique, que l'inducteur soit un transgène ou un virus. De plus, seul un virus PVX délété du gène codant la CP et muté dans le gène codant pour la protéine p25 est capable d'induire le VIGS systémique d'un transgène GFP ou d'un gène cellulaire phytoène désaturase (*PDS*) (Voinnet *et al.*, 2000). Ces résultats tendent à montrer que la protéine p25 du PVX interfère avec le signal du silencing systémique dans la plante. De plus, le fait qu'elle supprime uniquement le PTGS induit par un transgène laisse supposer que la protéine P25 agirait au niveau de la branche SDE1/SG2-dépendante du PTGS (voir plus haut, section II 5 et figure In-6). Cela suggère également que le signal systémique du PTGS dérive de la branche SDE1/SGS2.

La figure In-8 résume les connaissances actuelles sur le mode d'action des différents supresseurs viraux de PTGS. La protéine HCPro semble agir au niveau de la dégradation du RNAdb en siRNA ; la protéine 2b agirait sur le mouvement du signal alors que la protéine P25 interviendrait sur la branche SDE1-dépendante du PTGS. Il est également intéressant de noter que les supresseurs HCPro ou 2b jouent un rôle dans le mouvement à longue distance du virus alors que le supresseur P25 intervient dans le mouvement à courte distance.

En conclusion, il semble donc qu'un certain nombre de phytovirus aient développé une stratégie pour supprimer le mécanisme de PTGS. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris des travaux visant à identifier les protéines impliquées dans la suppression chez les virus étudiés au laboratoire et à comprendre leur mode d'action.

#### **IV. Virus étudiés**

## 1. Le PCV

Parmi les virus étudiés au laboratoire, nous nous sommes intéressés au virus du rabougrissement de l'arachide ou peanut clump virus (PCV) (Thouvenel and Fauquet, 1988). Le PCV est l'agent pathogène responsable de la maladie du rabougrissement de l'arachide qui fut décrite pour la première fois en Afrique de l'ouest (Trochain, 1931).

Le symptôme caractéristique de la maladie est un rabougrissement généralisé de la plante. Sur l'arachide, les feuilles ont une taille réduite et prennent une couleur vert foncé inhabituelle et les pétioles des feuilles sont raccourcis; les tiges sont plus fines et les distances inter-nodales réduites (cf. figure In-9). Le système racinaire est également touché et présente moins de racines secondaires. De plus, la maladie réduit le nombre et la taille des fleurs et bloque la maturation des fruits. Elle provoque une malformation des gousses qui ne contiendront plus qu'une à deux graines au maximum. Les pertes consécutives à l'infection par le PCV peuvent entraîner des baisses de rendement de récolte allant de 40 à 70 %.

Le spectre d'hôte du PCV est très large puisque le virus peut infecter au moins 39 espèces de plantes appartenant à huit familles différentes. Il infecte entre autres, le sorgho, fréquemment cultivé en alternance avec l'arachide.

La maladie se manifeste en foyers délimités et réapparaît régulièrement aux mêmes endroits, à chaque nouveau semis, ce qui s'explique par le mode de transmission du PCV. En effet, ce dernier est naturellement transmis par un champignon du sol, *Polymyxa graminis*, de la famille des Plasmodiophoromycètes, de l'ordre des Plasmodiophorales (Thouvenel and Fauquet, 1981). C'est un champignon intracellulaire ne provoquant aucun symptôme externe chez son hôte et qui infecte les cellules superficielles des racines, notamment des graminées, grâce à sa forme de dissémination, la zoospore. Au contact d'un poil absorbant des radicelles de l'hôte, la zoospore perce la paroi végétale et déverse son contenu cellulaire dans le tissu racinaire. C'est à ce stade que le virus peut être transmis à la plante par le vecteur. Si le

champignon n'a pas pu, à l'heure actuelle, être observé dans les racines des arachides, plusieurs formes correspondant à des stades de développement variés ont été trouvées dans le sorgho (Thouvenel and Fauquet, 1980). Le PCV peut également être transmis par la graine mais uniquement dans le cas de l'arachide dans des proportions variant de 4 à 14 % en conditions naturelles (Thouvenel *et al.*, 1978).

Le PCV est constitué de deux types de particules de symétrie hélicoïdale de 21 nm de diamètre et de longueurs 245 et 190 nm (cf. figure In-10). Chaque particule contient l'une des deux molécules de RNA simple brin de polarité positive constituant le génome viral. Les deux RNA sont cappés en 5' et leur extrémité 3' présente une structure mimant un tRNA qui peut être aminoacylé par la valine (Goodwin and Dreher, 1998).

Le RNA-1, d'une taille de 5897 nt comporte trois phases ouvertes de lectures (Herzog *et al.*, 1994). La première ORF code pour une protéine de 131 kDa (P131) qui possède un domaine méthyltransférase et un domaine «NTP-binding!» caractéristique des hélicases. Grâce à un mécanisme de translecture du codon STOP UGA de cette première ORF, on obtient une protéine de 191 kDa (P191) qui renferme dans sa région C-terminale le motif "GDD" caractéristique d'une activité RNA polymérase-RNA dépendante. L'ORF 3' proximale code pour une protéine de 15 kDa (P15) exprimée par l'intermédiaire d'un RNA subgénomique. La fonction exacte de cette protéine n'était pas connue jusqu'aux travaux présentés ici, mais Herzog *et al.* (1998) avaient suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle dans la réplication virale. Le RNA-1 porte donc l'ensemble des informations nécessaires à la réplication.

Le RNA-2 (4504 nt) possède une organisation génétique plus complexe avec la présence de cinq ORF (Manohar *et al.*, 1993). L'ORF 5' terminale code pour la protéine de capsid ou CP (23 kDa). La deuxième ORF, exprimée par un mécanisme de «leaky scanning!» (Herzog *et al.*, 1995), code pour une protéine de 39 kDa qui intervient très

probablement dans la transmission du virus par le champignon vecteur. Les trois ORF suivantes constituent le «triple gene block!» ou TGB et codent pour des protéines de 51, 14 et 17 kDa, qui interviennent dans le mouvement de cellule à cellule (Erhardt *et al.*, 1999 ; Lauber *et al.*, 1998).

## 2. Le BNYVV

Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave ou BNYVV (Beet Necrotic Yellow Vein Virus) est l'agent pathogène responsable de la rhizomanie de la betterave sucrière. Cette maladie a été mise en évidence pour la première fois en Italie en 1959 et a ensuite été décrite dans les pays du continent européen (Allemagne, France, Grèce, Yougoslavie), au Japon et plus récemment aux États-Unis. Les symptômes caractéristiques de la maladie sont un nanisme général de la plante, accompagné d'une prolifération anarchique des radicelles. Une nécrose de couleur brune est également observée au niveau du pivot des racines. On observe quelquefois, en plus de ces symptômes racinaires, un jaunissement et une nécrose au niveau des nervures des feuilles (cf. figure In-11). Le BNYVV infecte principalement les plantes de la famille des Chenopodiacees. Chez la betterave *Beta vulgaris*, hôte naturel du virus, l'infection est principalement restreinte aux racines secondaires. Dans de rares cas, l'infection peut se propager à l'ensemble de la plante, comme par exemple chez *Beta macrocarpa* (betterave sauvage) ou chez *Nicotiana benthamiana*.

Le BNYVV est transmis de manière obligatoire et persistante par un champignon du sol *Polymyxa betae* appartenant à la classe des Plasmodiophoromycètes. Ce parasite colonise les cellules superficielles des radicelles de Chenopodiacees grâce à sa forme de dissémination, la zoospore. Cependant, le champignon est également capable de prendre une forme de résistance, la cystosore, responsable de la persistance de la maladie dans les sols

rhizomaniés pendant plusieurs années ce qui conduit à l'abandon des cultures betteravières sur les terres infectées.

Le BNYVV, de par son mode de transmission, sa morphologie et son organisation génomique, est assez proche du PCV. Les particules virales ont une symétrie hélicoïdale d'un diamètre constant de 20 nm et une longueur variable de 89 à 390 nm (Putz, 1977). Chaque type de particule (de 4 à 5 suivant les isolats) renferme un des RNA de polarité positive constituant le génome du virus (Koenig *et al.*, 1997 ; Putz, 1977 ; Richards *et al.*, 1985 ; Tamada, 1975), coiffés à leur extrémité 5' et polyadénylés en 3' (Putz *et al.*, 1983) (cf. figure In-12).

Le RNA-1 (6746 nt) comporte une seule phase ouverte de lecture codant pour une polyprotéine de 237 kDa (P237). Cette protéine renferme des séquences consensus méthyltransférase, hélicase et polymérase (Bouzoubaa *et al.*, 1987) caractéristiques des répliques des virus appartenant au groupe «Sindbis-like» (Goldbach and Wellink, 1988). La protéine P237 contient également une séquence caractéristique des protéases de type papaïne (Rozanov *et al.*, 1995); son clivage auto-catalytique en une protéine d'environ 60 kDa contenant le domaine polymérase a été démontré (Hehn *et al.*, 1997). Ce RNA1 est capable de s'autorépliquer dans les protoplastes de *C. quinoa* (Gilmer *et al.*, 1992).

L'organisation génétique du RNA-2 (4612 nt) est plus complexe avec la présence de six ORF. L'ORF1 code pour la protéine de capsid (CP) d'une taille de 21 kDa qui est présente principalement dans le cytoplasme des cellules infectées (Haeberle and Stussi-Garaud, 1995). La présence de cette protéine est requise pour le mouvement à longue distance du virus (Quillet *et al.*, 1989). Le produit de l'ORF2 est exprimé par un mécanisme de translecture du codon STOP de l'ORF1. Les études menées sur cette protéine de 75 kDa ont montré que la région C terminale intervient dans la transmission par le champignon vecteur (Tamada *et al.*, 1996). Les ORF 3, 4 et 5, exprimées à partir des RNA subgénomiques



2sub<sub>a</sub> et 2sub<sub>b</sub>, sont partiellement chevauchantes et font partie du Triple Gene Block (TGB). Ces trois ORF codent respectivement pour des protéines de 42, 13 et 15 kDa, impliquées dans le mouvement de cellule à cellule du BNYVV (Gilmer *et al.*, 1992). L'ORF6 code pour une protéine de 14 kDa exprimée à partir du RNA 2sub<sub>c</sub> (Gilmer *et al.*, 1992). Cette protéine riche en cystéine, qui possède une structure potentielle en «doigt de zinc!», montre une affinité pour le Zn<sup>2+</sup> *in vitro* (Niesbach-Klosgen *et al.*, 1990). Son rôle exact n'était pas connu avant l'étude présentée dans cette thèse, mais des travaux avaient montré qu'elle semblait intervenir dans la régulation de l'infection virale (Hehn *et al.*, 1995).

Le RNA-3 (1774 nt) code potentiellement pour trois protéines. La première, la protéine P25, est responsable de l'apparition des symptômes de la rhizomanie ainsi que de l'amplification des RNA viraux au niveau des racines secondaires de *B. vulgaris* (Richards and Tamada, 1992). De plus, avec la deuxième protéine de 6,8 kDa, elle est impliquée dans la sévérité des symptômes sur *Terragona expansa* et *Chenopodium quinoa* (Jupin *et al.*, 1992). Le rôle de la troisième protéine putative n'est pas connu à ce jour.

Le RNA-4 (1467 nt) code pour une protéine de 31 kDa impliquée dans la transmission du virus par le champignon vecteur (Tamada and Abe, 1989).

Quant au RNA-5 (environ 1350 nt), il n'a été détecté que dans quelques rares cas! tout d'abord au Japon (Tamada *et al.*, 1989), et plus récemment en France (Koenig *et al.*, 1997). Ce RNA code pour une protéine de 26 kDa qui serait impliquée dans la symptomatologie foliaire (Kiguchi *et al.*, 1996).

Dans les isolats naturels du BNYVV, ou bien lorsque la souche est maintenue sur *B. vulgaris* par transmission naturelle avec le champignon vecteur, les RNA 1, 2, 3 et 4 sont toujours présents. Par contre, lorsque le virus est inoculé mécaniquement à des feuilles de *C. quinoa* ou *T. expansa*, seuls les RNA 1 et 2 sont indispensables, ces RNA assurant les fonctions de réplication, d'encapsulation et de mouvement de cellule à cellule.

### 3. Le BWYV

Le virus des jaunisses occidentales de la betterave ou beet western yellows virus (BWYV) appartient à la famille des *Luteoviridae* qui rassemble des virus répartis sur cinq continents: l'Afrique (Afrique du Sud, Ethiopie, Liban, Malawi, Maroc, Soudan, Tunisie, Zimbabwe), l'Amérique du Nord (Etats-Unis, Canada), l'Asie (Chine, Iran, Pakistan, Japon, Indonésie, Thaïlande, Syrie), l'Europe (Allemagne, France, Royaume-Uni, Turquie) et l'Océanie (Nouvelle-Zélande).

Le spectre d'hôte des *Luteoviridae* est très large: dans l'ensemble de ces régions, ils infectent environ 200 espèces de plantes réparties dans 28 familles. Les symptômes occasionnés par l'infection peuvent être de nature variable. On peut citer le nanisme (Soybean Dwarf Virus) parfois associé à une nécrose (Tobacco Necrotic Dwarf Virus), le rabougrissement et l'enroulement des feuilles (Potato Leafroll Virus). Mais le symptôme le plus caractéristique est lié à la modification de la couleur des feuilles, allant d'une légère chlorose (Physalis Mild Chlorosis Virus) au rougissement des feuilles (Carrot Red Leaf Virus), le symptôme le plus courant étant une jaunisse (Beet Western Yellows Virus) des feuilles entre les nervures, ce qui est à l'origine du nom de cette famille (*luteus* signifie jaune en latin) (cf. figure In-13). Les pertes occasionnées dans les cultures infectées par les *Luteoviridae* sont importantes, notamment dans les cultures de céréales, pomme de terre ou betterave (Casper, 1988).

Parmi les caractéristiques communes à la famille des *Luteoviridae*, on retrouve un certain degré de parenté sérologique, des caractéristiques physico-chimiques identiques, en particulier des particules sphériques d'un diamètre voisin de 30 nm (Harrison, 1999) et des propriétés biologiques communes comme la restriction aux cellules du phloème et la transmission obligatoire par puceron de manière persistante et circulante (Herrbach, 1999).

On retrouve trois genres au sein de la famille des *Luteoviridae*:

- le genre *luteovirus* (membre type Barley Yellow Dwarf Virus-PAV)
- le genre *polerovirus* (membre type Potato Leaf Roll Virus)
- le genre *enamovirus* (membre type Pea Enation Mosaic Virus-1)

Le BWYV fait partie du genre *polerovirus* et son génome consiste en une seule molécule de RNA simple brin de polarité positive d'une taille de 5641 nucléotides (Mayo and Ziegler-Graff, 1996). L'extrémité 5' est liée à une protéine VPg et l'extrémité 3' n'est pas polyadénylée. On retrouve sur ce RNA 6 ORF, les trois ORF 5' proximales étant exprimées à partir du RNA génomique alors que les trois ORF 3' proximales sont exprimées à partir d'un RNA subgénomique (cf. figure In-14).

L'ORF 0 code pour une protéine de 29 kDa dont la fonction n'était pas connue avant ce travail. Cette protéine n'a jamais été détectée dans des plantes infectées par un *polerovirus*, mais l'insertion de mutations nulles dans l'ORF 0 entraîne une baisse de l'accumulation du RNA viral dans des protoplastes ou des plantes infectés (Ziegler-Graff *et al.*, 1996).

Le produit de l'ORF 1 (P1) contient des motifs caractéristiques des protéases à sérine chimotrypsine-like et peut être classé parmi les protéases de type 3C comme celle du poliovirus (Koonin and Dolja, 1993). On trouve également dans l'ORF1, la séquence codant pour la VPg (Mayo and Ziegler-Graff, 1996). La protéine P2 est synthétisée par décalage du cadre de lecture, comme produit de fusion entre la majorité de l'ORF 1 et l'ORF 2. Elle contient les motifs polymérase et hélicase caractéristiques des RdRp (Mayo and Ziegler-Graff, 1996). Les protéines P1 et P2 sont les seules protéines nécessaires et suffisantes pour assurer la réplication du virus.

La protéine P3, exprimée à partir du RNA subgénomique, est la protéine majeure de capsid, d'un poids moléculaire de 22,5 kDa. Elle est la seule protéine nécessaire pour la formation des virions (Reutenauer *et al.*, 1993).

Entièrement présente dans l'ORF 3 mais dans une autre phase de lecture, on trouve l'ORF 4 qui code pour une protéine de 19 kDa, dont le rôle n'est pas encore clairement défini. Des expériences de mutations empêchant l'expression de la protéine P4, mais pas de la protéine P3, ont montré qu'elle n'est pas essentielle à l'infection tout du moins dans les plantes testées (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Cependant, des expériences biochimiques et de localisation cellulaire ont conduit Tacke *et al.* à émettre l'hypothèse que la protéine P4 joue un rôle dans le mouvement du virus dans la plante (Bruyère *et al.*, 1997 ; Schmitz *et al.*, 1997!; Tacke *et al.*, 1993).

Enfin, l'ORF 5 est exprimée sous forme d'une protéine de fusion P3-P5 par translecture du codon STOP de l'ORF 3. Cette protéine de translecture de 74kDa (ou P74) n'est pas nécessaire à l'encapsidation du virus, mais joue un rôle crucial dans la transmission du virus par le puceron vecteur, plus particulièrement la partie conservée du domaine P5 de translecture encore appelée domaine RT (pour ReadThrough) (Brault *et al.*, 1995 ; Brault *et al.*, 2000).

Au cours de ces trois années de thèse, mon travail a consisté à identifier chez ces virus les protéines responsables de la suppression du PTGS et à étudier certaines de leurs propriétés.

- Ainsi, pour le PCV, la localisation subcellulaire du suppresseur de PTGS et certaines de ses caractéristiques structurales ont permis de révéler une partie de son mode de fonctionnement

**(Publication n°1 :** Identification and Some Properties of a Cysteine-rich Suppressor of Gene Silencing Encoded by Peanut Clump Virus (2002). *Plant Journal*, 29 (5), 555-567)

- Concernant le BNYVV, j'ai également pu identifier le suppresseur, son étude fonctionnelle a pu être initiée et sera développée dans le futur.

- L'identification et l'étude du suppresseur de PTGS du BWYV ont mis en évidence un mécanisme inattendu de régulation de l'expression de cette protéine.

**(Publication n°2 :** P0 of Beet Western Yellows Virus is a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing (2002). *Journal of Virology*, Vol. 76, No. 13, 6815-6824)

- Enfin, l'utilisation de plantes transgéniques exprimant la protéine de translecture P74 du BWYV a révélé un mode original de contournement du PTGS par le virus.

**(Publication n°3 :** Virus-Induced Gene Silencing in Transgenic Plants Expressing the Minor Capsid Protein of Beet Western Yellows Virus (2002). *MPMI*, Vol. 15, No. 8, 799-807)

## CHAPITRE I

### Suppression du PTGS par deux protéines virales riches en cystéine : la protéine P15 du PCV et la protéine P14 du BNYVV

#### I. Les techniques d'étude de la suppression du PTGS

##### 1. Visualisation de la mise en place du PTGS

La mise en évidence de l'activité de suppression associée à un virus donné peut se faire de différentes façons. La première étape consiste à montrer que le virus possède effectivement une activité de suppression. Pour ce faire, il faut disposer d'un modèle de visualisation du PTGS, par exemple des plantes silencées constitutivement pour le transgène GUS ou GFP. L'infection de telles plantes par un virus capable de supprimer le PTGS conduira alors à la levée du PTGS et à l'expression du transgène correspondant.

Pour notre étude, nous avons utilisé la lignée de *Nicotiana benthamiana* 16c exprimant de manière constitutive le transgène GFP (Voinnet *et al.*, 1998). Ces plantes apparaissent donc verte sous lumière ultra-violette, alors qu'une plante sauvage apparaît rouge à cause de l'autofluorescence de la chlorophylle (cf. figure I-1). On peut induire le PTGS du transgène GFP dans ces plantes en infiltrant une suspension d'agro-bactéries renfermant un plasmide recombinant pBin-GFP où le gène GFP est cloné en aval du promoteur 35S (Voinnet *et al.*, 1998). Suite à cette infiltration, le T-DNA portant la construction GFP va s'insérer au hasard dans le génome de la plante et il y aura expression de la GFP à la fois à partir de ce dernier et du transgène intégré de façon stable dans la plante. Le mécanisme conduisant ensuite à l'induction du PTGS n'est pas clairement connu, mais il pourrait être dû à des intégrations multiples résultant en la production d'ARN aberrants. La mise en place du PTGS local dans la zone infiltrée (le patch) est visualisable sous lumière UV

comme une zone dans laquelle la fluorescence rouge de la chlorophylle a repris le dessus sur la fluorescence verte de la GFP. Le PTGS devient ensuite systémique et se propage dans toute la plante en empruntant le système vasculaire (cf. figure I-1 c). Deux à trois semaines après infiltration d'une plante GFP au stade 4 feuilles, le silencing est total et la plante apparaît uniformément rouge sous lumière UV (cf. figure I-1 d).

Si on infecte ensuite cette plante silencée par un virus capable de supprimer le PTGS, on verra réapparaître la fluorescence verte de la GFP dans les zones infectées de la plante (Brigneti *et al.*, 1998 ; Voinnet *et al.*, 1999).

## **2. Techniques d'étude de la suppression du PTGS**

Les techniques d'identification de la protéine virale responsable de l'activité de suppression sont diverses (cf. figure I-2). On peut, par exemple, croiser une plante transgénique exprimant la protéine virale suppressive avec une plante silencée constitutivement (Anandalakshmi *et al.*, 1998) (cf. figure I-2 a). Une autre approche consiste à infecter des plantes silencées avec un vecteur viral ne possédant pas d'activité détectable de suppression et exprimant la protéine candidate (Brigneti *et al.*, 1998) (cf. figure I-2 b). Enfin, on peut utiliser une technique d'expression transitoire qui consiste à exprimer simultanément l'inducteur du silencing et le suppresseur viral par agro-infiltration (Johansen and Carrington, 2001 ; Voinnet *et al.*, 2000) (cf. figure I-2 c). Nous avons utilisé cette dernière technique sur des plantes GFP, l'infiltration simultanée d'agrobactéries portant la construction GFP (inducteur du silencing) et d'agrobactéries portant une construction permettant l'expression d'une protéine suppressive résulte en une surexpression de la GFP dans la zone infiltrée qui apparaît alors plus verte que le reste de la plante sous lumière UV (cf. figure I-2 c). La surexpression est due à l'accumulation des mRNA de la GFP provenant à la fois du transgène intégré de manière stable dans la plante et du transgène apporté par l'agro-infiltration.

## II. Identification et quelques propriétés d'un nouveau suppresseur de PTGS, la protéine P15 du PCV

### 1. Rôle de la protéine P15

Les travaux réalisés jusqu'à présent au laboratoire sur le PCV ont permis d'attribuer une fonction à toutes les protéines codées par le génome viral, à l'exception de la protéine P15 codée par le RNA 1. Des études préliminaires ont cependant permis de cibler plus précisément le rôle de la protéine P15 dans l'infection virale. Ainsi, l'introduction de mutations nulles dans la phase codante de la protéine P15 résulte en une baisse très forte de l'accumulation des RNA viraux dans les protoplastes infectés (Dunoyer *et al.*, 2001) et en une perte totale d'infectivité sur *Nicotiana benthamiana* (résultats non publiés). Par ailleurs, la protéine P15 est absente au niveau des complexes de réplication (Dunoyer *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent donc que la protéine P15 agisse comme un déterminant de pathogénicité du PCV, mais qu'elle ne constitue pas un facteur de régulation de la réplication. On pouvait donc imaginer que cette protéine joue un rôle de protection des RNA viraux contre un mécanisme de défense de la plante qui pourrait être le PTGS.

L'infection par le PCV de plantes GFP silencées (cf. figure I-1 d) a permis de confirmer cette hypothèse, à savoir que ce virus possède une activité de suppression du PTGS. En effet, 15 jours après infection, on voit réapparaître la fluorescence verte de la GFP dans les feuilles jeunes des plantes infectées. L'identification de la protéine responsable de la suppression du PTGS a été faite par la technique de co-agroinfiltration qui nous a permis de montrer que seule la protéine P15 possédait cette activité.



## **2. Propriétés de la protéine P15**

Ce résultat nous a conduit à étudier en détail les propriétés de cette protéine. Nous avons pu déterminer sa localisation subcellulaire et montrer que la présence d'un motif SKL à l'extrémité C terminale de la protéine P15 est responsable de la localisation de cette protéine dans les peroxysomes.

D'autre part, l'extrémité C terminale de la protéine P15 contient une répétition de quatre heptades riches en leucine permettant une multimérisation de la protéine via une structure de type «coiled-coil!». Les expériences de co-agroinfiltration nous ont permis de montrer que l'autoassociation de la protéine P15 sous contrôle de cette structure coiled-coil est une propriété indispensable à son activité de suppression du PTGS, mais que sa localisation peroxysomale n'est pas nécessaire à cette fonction.

Ces résultats sont présentés et détaillés dans la publication n°1!:

**Identification and Some Properties of a Cysteine-Rich Suppressor of Gene Silencing Encoded by Peanut Clump Virus (2002). Publié dans Plant Journal, 29 (5), 555-567.**

### 3. La famille de protéines "cysteine-rich"

L'étude de la séquence en acides aminés de la protéine P15 révèle qu'elle présente des similarités avec de petites protéines codées par le génome de divers autres virus à RNA (+). On retrouve de telles protéines chez le Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV), le Lychnee Ring Spot Virus (LRSV), le Poa Semi Latent Virus (PSLV), et le Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV). La caractéristique commune à toutes ces protéines est la présence dans la séquence d'un nombre plus ou moins important de cystéines ce qui leur a valu la dénomination de CRP (cystein rich protein) (Koonin *et al.*, 1991). Dans certaines de ces protéines, la position des cystéines (et parfois d'histidines) est compatible avec la formation d'une structure en doigt de zinc qui peut expliquer leur capacité à fixer les acides nucléiques. Outre la présence de ces cystéines, ces protéines possèdent la propriété d'être exprimées à partir d'une ORF située à l'extrémité 3' du génome viral. Par ailleurs, en étudiant la séquence de certaines de ces protéines nous avons pu remarquer qu'elles possèdent toutes, à l'exception de la protéine P14 du BNYVV, le motif SKL. Ces protéines CRP pourraient donc constituer une nouvelle famille de protéines impliquées dans la suppression du PTGS. En effet, nous verrons que la protéine P14 du BNYVV est également un suppresseur de PTGS (voir ci-dessous, paragraphe III) et des données montrent que la protéine  $\gamma$ b du BSMV semble jouer un rôle de facteur de pathogénicité pour le virus (Donald and Jackson, 1994) ce qui est parfaitement compatible avec une activité de suppression.

Concernant la protéine P15, on peut aligner trois des quatre résidus cystéines et une histidine avec les acides aminés correspondants des CRP des autres virus (cf. figure I-3). Nous avons tenté de déterminer le rôle de ces cystéines conservées dans la suppression du PTGS en les remplaçant une à une par une alanine (mutants C1 à C4 et H5). Nous avons ensuite analysé la capacité de ces mutants à supprimer le silencing en utilisant la technique de «!patch-test!». Nous pouvons voir que seule la mutation dans la cystéine non conservée (C2,

cf. figure I-3) ne semble pas avoir d'effet sur l'activité de suppression de la protéine P15, les mRNA GFP étant détectés en quantités équivalentes à celles obtenues en présence de protéine P15 sauvage (cf. figure I-4a piste C2). Quant aux mutants dans les résidus C1, C3, C4 et H5 (résidus conservés parmi les protéines CRP, cf. figure I-3), ils ont perdu leur capacité à supprimer le PTGS (cf. figure I-4 a). Cependant, l'analyse par western blot des protéines totales extraites des feuilles infiltrées avec ces constructions révèle que les protéines mutées dans les cystéines conservées sont indétectables (cf. figure I-4 b), ce qui suggère que ces résidus jouent un rôle crucial dans la stabilité de la protéine. Cette instabilité pourrait être due à un changement de leur structure tridimensionnelle, suite à la mutation cystéine en alanine. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons construit de nouveaux mutants en remplaçant les cystéines conservées C1 (résidu 24) et C3 (résidu 34) par des sérines (mutants 24 S et 34 S) ce qui ne devrait pas altérer le repliement de la protéine de façon significative. Cependant, ces deux nouveaux mutants sont également indétectables par Western blot (cf. figure I-4 b). Ce résultat confirme donc le rôle crucial joué par ces cystéines dans la stabilité de la protéine P15 et ceci, soit par l'intermédiaire de ponts disulfures, soit par la formation d'un motif en doigt de zinc.

### **III. Identification de la protéine P14 du BNYVV comme suppresseur de PTGS**

La morphologie du BNYVV, son organisation génétique et son mode de transmission en font un virus relativement proche du PCV bien que ces deux virus appartiennent à deux genres différents (benyvirus et pecluvirus respectivement) qui ne sont assignés à aucune famille. Nous avons donc initié l'étude de la suppression du PTGS par le BNYVV afin de révéler d'éventuelles similitudes avec le mécanisme de suppression par le PCV.

## 1. Le BNYVV code pour un suppresseur de PTGS

Pour mettre en évidence l'existence d'une activité de suppression du PTGS associée au BNYVV, nous avons infecté des plantes GFP silencées et nous avons pu constater que les résultats étaient différents de ceux obtenus avec le PCV. En effet, l'observation des plantes infectées sous lumière UV révèle, 15 jours après infection, la réapparition de la fluorescence verte dans les tiges et les nervures mais pas dans le limbe de la feuille comme avec le PCV (cf. figure I-5 a). Ces observations sont confirmées par l'analyse par Northern blot des mRNA de la GFP qui montre que ceux-ci s'accumulent plus dans les tiges et les nervures que dans le limbe (cf. figure I-5 b). Ce type de suppression a déjà été décrit pour le TBSV qui supprime spécifiquement le PTGS dans les veines des feuilles (Voinnet *et al.*, 1999). Cependant, à la différence du TBSV qui supprime le PTGS uniquement dans les feuilles nouvellement apparues, le BNYVV supprime le PTGS à la fois dans les feuilles jeunes et les feuilles âgées.

Ces résultats démontrent donc que le BNYVV code pour un suppresseur de PTGS que nous avons ensuite cherché à identifier.

## 2. La protéine P14 du BNYVV est un suppresseur de PTGS

Les protéines codées par les RNA 1 et 2 du BNYVV ont des fonctions bien caractérisées dans la réplication, l'encapsidation, le mouvement ou la transmission du virus. Seule exception, l'ORF 3' proximale du RNA 2 codant pour la protéine P14 n'avait pas encore de fonction précise attribuée. Comme dans le cas de la protéine P15 du PCV, les résultats préliminaires obtenus par Hehn *et al.* (1995) avaient montré que des mutations introduites dans l'ORF de la protéine P14 conduisaient à une baisse de l'accumulation des RNA viraux dans des protoplastes infectés. À l'instar de la protéine P15 du PCV, nous avons

donc émis l'hypothèse que la protéine P14 pourrait également jouer un rôle dans la suppression du PTGS.

Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord cloné le gène de la protéine P14 dans le vecteur viral PVX afin d'infecter des plantes GFP silencées et vérifier si la protéine P14 exprimée à partir de ce vecteur viral entraînait la suppression du PTGS comme cela a été décrit pour les protéines HCPro et 2b (Brigneti *et al.*, 1998). Dans notre cas, l'infection des plantes GFP silencées par la construction PVX-P14 montre un profil de suppression similaire à celui obtenu avec le BNYVV, *i. e.* une réapparition de la fluorescence verte dans les tiges et les nervures de la plante infectée (cf. figure I-6 a) démontrant ainsi le rôle de suppresseur de la protéine P14.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons également utilisé la technique de "patch-test" en clonant le gène de la protéine P14 dans le plasmide binaire pBin-61 introduit dans *Agrobacterium*. Le résultat obtenu montre que la protéine P14 peut supprimer le PTGS en expression transitoire, mais avec une efficacité relative plus faible que les protéines HCPro et P15 (cf. figure I-6 b). Cette observation est confirmée par l'analyse par Northern blot des mRNA de la GFP et des siRNA GFP, marqueurs du PTGS. Les mRNA GFP s'accumulent en grande quantité dans les feuilles «!patchées!» avec les constructions pBin-GFP + pBin-P14, mais de façon moins importante que dans les feuilles «!patchées!» avec les constructions pBin-GFP + pBin-P15 ou HCPro (cf. figure I-6 b3). L'analyse des siRNA montre un profil en image-miroir par rapport au Northern blot des mRNA. En effet, les siRNA s'accumulent en grande quantité dans le témoin pBin-GFP + pBin, alors que dans les zones infiltrées avec les agrobactéries pBin-GFP + pBin-P14, on en retrouve beaucoup moins, tout comme dans les témoins positifs pBin-GFP + pBin-HCPro ou pBin-P15 (cf. figure I-6b 3).

Ces résultats montrent que la protéine P14 est un suppresseur de PTGS tout comme les protéines HCPro ou P15, mais avec une efficacité plus faible.

### 3. Propriétés de la protéine P14

#### a. Rôle des cystéines impliquées dans la formation du doigt de zinc

Parmi les protéines CRP, la protéine P14 semble la moins conservée. En effet, à l'exception des cystéines C1 et C4, on ne retrouve pas dans sa séquence les mêmes résidus conservés. Quant au motif SKL, il est absent en C terminal (cf. fig I-7). Toutefois, la protéine P14 possède, comme les autres CRP, la capacité de former un doigt de zinc, ce qui a été confirmé *in vitro* par fixation de la protéine P14 sur colonne chélatant le zinc (Hehn, 1995). La protéine P14 possède également la propriété de fixer *in vitro* les acides nucléiques (Hehn, 1995).

Par analogie avec la protéine P15, nous avons donc cherché à savoir si les cystéines impliquées dans la formation du doigt de zinc étaient importantes pour la stabilité et l'activité de suppression du PTGS de la protéine P14. Ces expériences ont été réalisées avec des mutants alanine disponibles au laboratoire, les mutants 14-354, 356, 357 et 358 (cf. figure I-8 a), dont les séquences ont été clonées dans le plasmide binaire pBin61 afin de tester leur capacité de suppression. Les deux mutants pBin-P14-357 et pBin-P14-358 avec les cystéines remplacées par des alanines ne sont plus capables de supprimer le PTGS lorsqu'ils sont co-infiltrés avec des agrobactéries pBin-GFP. Par contre, les mutations 356 et 354 ne touchant pas les cystéines présentes au niveau du doigt de zinc n'ont aucun effet sur l'activité de suppression du PTGS (cf. figure I-8 b). L'analyse par Western blot des protéines extraites des feuilles agro-infiltrées révèle que les deux mutants dans le doigt de zinc (les mutants 14-357 et 14-358) ne s'accumulent plus en quantité suffisante pour permettre leur détection (cf. figure I-8 c). Comme pour la protéine P15, il semble que la présence des 4 cystéines au niveau du doigt de zinc potentiel soit importante pour la stabilité de la protéine P14 et donc pour l'activité de suppression.

### b. Localisation subcellulaire de la protéine P14

Nous avons également recherché la localisation subcellulaire de la protéine P14 qui ne possède pas de motif SKL de localisation dans les peroxyosomes. Pour cela, nous avons fusionné la séquence codant pour la EGFP à l'extrémité 5' ou 3' terminale du gène P14 avant de cloner ces séquences dans le plasmide pRep qui renferme la copie DNA du réplicon dérivé du RNA 3 du BNYVV (Lauber *et al.*, 1998). Les constructions obtenues pRep-EG14 et pRep-14EG sont ensuite transcrites par la T7 RNA polymérase pour donner les transcrits Rep-EG14 et Rep-14EG. Puis, ces derniers sont utilisés pour infecter des protoplastes de cellules BY-2 et des plants de *Chenopodium quinoa* en présence du RNA 1 et du RNA 2 sauvage ou muté dans le gène codant pour la protéine P14 afin de tester la fonctionnalité des protéines de fusion.

En contexte viral, les protéines de fusion 14EG et EG14 se localisent à la fois dans le cytoplasme et dans le nucléole des cellules infectées, mais pas dans le noyau (cf. figure I-9 b). Cette protéine doit donc avoir la propriété d'entrer dans le nucléole, mais également d'en ressortir comme cela a été décrit pour de nombreuses protéines qui font la navette entre le noyau et le cytoplasme par le biais de signaux d'import et d'export nucléaires (Izaurrealde *et al.*, 1999; Whittaker and Helenius, 1998). Cette localisation est la même lorsqu'on utilise du RNA 2-3722 muté qui n'exprime plus la protéine P14 (cf. figure I-9 a et I-9 b planches 4 et 5). Ces résultats préliminaires signifient que la présence de protéine P14 sauvage ne modifie pas la localisation des protéines de fusion. Dans les mêmes conditions, la protéine EGFP se localise classiquement dans le cytoplasme et le noyau de la cellule infectée, mais jamais dans le nucléole (cf. figure I-9b, photo 1).

Nous avons également étudié le comportement des protéines de fusion 14EG et EG14 sur plante hôte *Chenopodium quinoa* en co-inoculant les réplicons correspondants en

présence de RNA 1 et de RNA 2-3722 incapable de synthétiser de la protéine P14. Le témoin RNA 1 + RNA 2 montre la présence de lésions locales chlorotiques jaunes sévères, alors que les lésions sont petites et nécrotiques lorsque les feuilles sont inoculées avec du RNA 1 et du RNA 2-3722 (cf. figure I-10 a, photos 1 et 2). La co-inoculation du Rep-EG14 restaure le phénotype sauvage, tandis que l'utilisation du Rep-14EG entraîne l'apparition de lésions diffuses (cf. figure I-10a, photos 3 et 4). Suivant la présence de la protéine EGFP en Nt ou en Ct de la protéine P14, il semble donc que la protéine de fusion n'ait plus les mêmes propriétés biologiques. Enfin, l'observation au microscope confocal des plantes infectées avec les RNA 1 + RNA 2-3722 + Rep-EG14 ou Rep-14EG, révèle le même type de localisation pour les protéines de fusion que dans les protoplastes BY-2, à savoir un marquage du cytoplasme et du nucléole (cf. figure I-10 b). Cette localisation va maintenant être étudiée plus en détail par immunomarquage en microscopie électronique de plantes infectées par du virus sauvage. Si la localisation nucléolaire de la protéine P14 se confirme, cela constituerait la première observation du genre pour un suppresseur de PTGS.

#### **IV. Conclusions**

Malgré leur appartenance au groupe des protéines "cysteine-rich" ou CRP, on peut noter des différences significatives entre les protéines P14 du BNYVV et P15 du PCV. Tout d'abord, la suppression du PTGS par les deux virus n'est pas identique, puisque le PCV supprime le PTGS dans la feuille entière, alors que le BNYVV agit uniquement dans les veines et les tiges de la plante. Par ailleurs, en expression transitoire, il semble que la protéine P15 supprime le PTGS de façon plus efficace que la protéine P14. De plus, au niveau de la localisation subcellulaire, la protéine P15 se localise dans les peroxysomes alors que la



protéine P14 se retrouve dans le cytoplasme et le nucléole. Toutes ces observations laissent donc à penser que le mode d'action de ces deux protéines est très certainement distinct.

Concernant la protéine P15, nous n'avons pas pu établir de lien direct entre la localisation peroxysomale et la suppression du PTGS. Il faut néanmoins noter que cette localisation semble avoir un rôle important pour le cycle infectieux du virus, et ceci probablement dans le mouvement de cellule à cellule ou à longue distance. En effet, un virus délété des six aminoacides C terminaux de la protéine P15, et donc du signal d'adressage peroxysomal SKL, s'accumule normalement dans des protoplastes BY-2 infectés, mais il est incapable d'infecter une plante entière (cf. publication n°1). Il nous reste maintenant à déterminer si ce rôle dans le mouvement de cellule à cellule peut être mis en parallèle avec la suppression ou s'il est tout autre. Il est intéressant de noter que la présence du motif SKL est conservée parmi quelques protéines CRP codées par des virus très différents. On peut supposer que la localisation peroxysomale joue un rôle au niveau du silencing systémique, puisqu'elle ne semble pas avoir d'effet sur la suppression du silencing local. La réponse à cette question sera peut-être apportée par la construction de tabacs transgéniques exprimant la protéine P15 sauvage ou délétée du signal de localisation peroxysomale. Le croisement de ces lignées avec des lignées rapporteuses de PTGS (par exemple la lignée GUS silencée 6b5 (Elmayan and Vaucheret, 1996)) montrera si la protéine P15 peut supprimer le PTGS dans ces plantes. Par la suite, des expériences de greffe peuvent permettre d'adresser la question de l'effet de la P15 sur le mouvement du PTGS. En effet, la greffe d'une plante GUS sur une plante 6b5 permet la transmission du PTGS au greffon, la greffe d'une plante GUS sur une plante P15X6b5 permettra de voir si la protéine P15 a un effet sur le signal du silencing systémique, comme cela a déjà été décrit pour les protéines HC-Pro et 2b (Guo et Ding, 2002 ; Mallory *et al.*, 2001).

On peut également imaginer que la localisation peroxysomale de la protéine P15 n'a rien à voir avec la suppression, mais serait associée à une autre fonction. En effet, les peroxysomes jouent de nombreux rôles dans la cellule, ils interviennent dans les réactions de  $\beta$ -oxydation des acides gras, dans les réactions de détoxification de la cellule (intervention de la catalase), dans le cycle du glyoxylate et bien d'autres encore (Parsons *et al.*, 2001). Récemment, la découverte de l'existence d'une fonction relative aux espèces réactives de l'oxygène et la présence d'oxyde nitrique synthase dans les peroxysomes ont révélé un autre rôle qui pourrait être en rapport avec la signalisation cellulaire (Corpas *et al.*, 2001; del Rio *et al.*, 2002). En effet, les molécules de  $O_2^{\bullet-}$ , de  $H_2O_2$  et de  $NO^{\bullet}$  sont connues pour être impliquées dans la signalisation cellulaire suite à la perception d'un stress biotique ou abiotique. Ainsi, il faut rappeler que l'infection par le TMV induit un burst oxydatif suite à la perception de la protéine de coque, burst qui va être à l'origine de toute une cascade de réactions conduisant à la réponse hypersensible et à la mort des cellules infectées (Allan *et al.*, 2001). À côté de sa fonction de suppression du PTGS, on peut donc très bien imaginer que la localisation peroxysomale de la protéine P15 permettrait d'inhiber la réaction d'hypersensibilité et la mort cellulaire.

Quant à la protéine P14, les résultats que nous avons rapportés sont encore préliminaires et demandent confirmation. Dans un premier temps, il faudra vérifier la localisation de la protéine P14 par immunomarquage de cellules infectées par les RNA 1 et 2 du BNYVV, puis contrôler son adressage hors contexte viral. Sa présence dans le nucléole est à rapprocher de sa propriété de fixation aux acides nucléiques via un motif en doigt de zinc (Hehn, 1995). Les perspectives soulevées par ce résultat sont très attractives et pourraient permettre de révéler un mode d'action de la suppression du PTGS encore inconnu. C'est

---

pourquoi il apparaît donc important de déterminer le motif de ciblage nucléolaire afin de savoir si cette localisation est nécessaire à l'activité de la protéine P14.

Enfin, pour mieux comprendre le mode de fonctionnement des protéines P14 et P15, nous avons entrepris l'étude d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques exprimant ces protéines en collaboration avec H. Vaucheret à l'INRA de Versailles. Le croisement avec des lignées GUS silencées a permis de montrer que la protéine P15 était capable de supprimer le PTGS dans ce système. Par ailleurs, les plantes exprimant la protéine P15 ont une morphologie très perturbée par rapport aux plantes sauvages et ceci, que la protéine P15 possède ou non le signal d'adressage aux peroxyosomes. Il semble donc que l'activité de suppression de cette protéine perturbe le développement de la plante et cette observation rejoint celles déjà faites par d'autres auteurs sur les plantes exprimant les protéines P1/HCPPro du TEV ou P19 du TBSV (Mallory *et al.*, 2001!; Silhavy *et al.*, 2002). Il reste cependant à déterminer si la perturbation du développement est liée à l'activité de suppression ou si les deux phénomènes peuvent être découplés comme dans le cas de la protéine HCPPro (Mallory *et al.*, 2002).

## CHAPITRE II

### Étude de la suppression du PTGS par les *Luteoviridae*

#### I. Suppression du PTGS par la protéine P0 du BWYV

Tout comme pour le PCV et le BNYVV, nous avons cherché à identifier la protéine responsable de la suppression du PTGS chez un autre virus étudié au laboratoire, le BWYV qui appartient au genre *polerovirus*. Ce dernier possède des propriétés biologiques très différentes des *benyvirus* ou des *pecluvirus*. En effet, nous avons vu dans l'introduction, que ce virus était obligatoirement transmis par puceron et que sa multiplication était limitée aux tissus du phloème. Rappelons également que les travaux réalisés jusqu'à présent au laboratoire ont attribué les fonctions de réplication, d'encapsidation et de transmission respectivement aux protéines P1-P2, P3 et P5 (voir figure In-14 pour l'organisation génétique). Quant à la protéine P4, elle semble jouer un rôle dans le mouvement à courte distance (Tacke *et al.*, 1991 ; Tacke *et al.*, 1993). Enfin, la protéine P0 n'avait pas encore de rôle défini.

##### 1. Rôle de la protéine P0

La protéine P0 est la moins conservée dans le genre *polerovirus* et elle est absente du genre *luteovirus* (Guilley *et al.*, 1995). Bien qu'étant le produit le plus abondamment exprimé lors d'une traduction *in vitro* du RNA viral dans les germes de blé (Veidt *et al.*, 1992), la protéine P0 n'a jamais pu être détectée dans les plantes ou les protoplastes infectés par un *polerovirus*. Néanmoins, l'utilisation de la mutagenèse dirigée semble indiquer que la protéine P0 joue un rôle dans le cycle d'infection virale. En effet, dans le cas du BWYV,

l'absence de synthèse d'une protéine P0 fonctionnelle entraîne une baisse de l'accumulation des RNA viraux dans les plantes et dans les protoplastes infectés (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). De la même façon, des mutations nulles introduites dans l'ORF 0 abolissent complètement l'accumulation du RNA de PLRV dans des disques foliaires infectés (Sadowy *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent donc que la protéine P0 intervienne soit comme activateur de réplication, soit pour aider le virus à contourner un mécanisme de défense de la plante.

Le rôle de la protéine P0 comme facteur de pathogénicité a été confirmé en infectant des plantes *N. benthamiana* wt avec une construction PVX-P0 qui s'est avérée être très virulente comparée à une construction PVX sauvage. Ce résultat suggérait un rôle de suppresseur pour la protéine P0 et nous avons donc utilisé la technique d'expression transitoire par agro-infiltration pour confirmer ce rôle potentiel. Par la suite, nous avons montré que cette activité était également associée à la protéine P0 de deux autres *polerovirus*, le CABYV (Cucurbit Aphid-Borne Yellows Virus) et le PLRV.

Cependant, l'infection par le BWYV (par puceron virulifère ou par greffe de plante infectée) de plantes GFP où le silencing est déjà établi ne permet pas de supprimer le PTGS (résultats non publiés). Par contre, cela est possible lorsque le cDNA du RNA du BWYV est placé dans un vecteur binaire pour être agro-infiltré. De façon surprenante, la suppression du PTGS par le virus se fait de manière beaucoup moins efficace qu'avec le seul gène P0 placé dans ce même vecteur binaire. En fait, nous avons montré qu'une basse expression de la protéine P0 à partir du génome viral était responsable de cette faible activité de suppression. Cela nous a conduit à analyser le contexte nucléotidique autour de l'AUG initiateur de l'ORF 0 et nous avons constaté que celui-ci était loin d'être optimal. Nous avons donc optimisé ce contexte pour augmenter l'efficacité de traduction de la protéine P0 et donc améliorer l'activité de suppression de cette protéine exprimée à partir du génome viral. Cependant, ces

mutations ne sont pas stables *in planta* et nous avons émis l'hypothèse que le BWYV régulait l'expression de son suppresseur par un mécanisme que nous avons entrepris d'analyser.

Ces résultats sont présentés et détaillés dans la publication n° 2!:

**P0 of Beet Western Yellows Virus Is a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing (2002). Publié dans Journal of Virology, Vol 76 n°13, 6815-6824.**

## 2. Recherche de facteurs régulant l'expression de la protéine P0

L'optimisation du contexte nucléotidique autour du codon d'initiation de la traduction de l'ORF 0 n'ayant pas permis de détecter la protéine P0 (voir publication n°2), nous avons imaginé qu'une autre protéine codée par le génome viral pourrait intervenir dans ce mécanisme. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc utilisé une série de constructions virales avec des délétions dans toutes les ORF à l'exception des ORF 1 et 2 codant pour la réplicase virale. Nous avons ensuite agro-infiltré ces différents mutants sur *N. benthamiana* afin de tenter de détecter la protéine P0. Nous disposons de mutants dans l'ORF 3 (mutant 6.26), l'ORF 5 (mutants 6.4 et 6ΔH3) et l'ORF 4 (mutant 5.1845) (cf. figure II-1 a). L'analyse par Western blot des feuilles agro-infiltrées avec ces constructions n'a révélé aucune accumulation de la protéine P0 en quantité détectable (cf. figure II-1 b) ; le témoin est représenté par la protéine P0 accumulée après agro-infiltration du plasmide pBin-P0.

Nous avons également tenté d'exprimer la protéine P0 en insérant sa séquence codante dans le plasmide pBin-BW en lieu et place de celle de la protéine de capsid (P3). Ainsi, la protéine P0 sera synthétisée à partir du RNA subgénomique colinéaire à la région 3' terminale du génome du BWYV (cf. figure In-14), RNA qui est normalement un messager très efficace pour la protéine P3. En principe, la protéine P0 sera donc exprimée en grande quantité et de manière décalée dans le temps. En effet, il faudra d'abord que le virus assure la traduction de la réplicase (P1-P2) nécessaire à la synthèse du RNA subgénomique afin d'avoir l'expression de l'ORF 0 présente dans la région 3' terminale du génome. Deux constructions ont été réalisées dans cette optique : le clone pBin-BW/P0<sub>3'</sub>, qui possède deux séquences codant pour la protéine P0, l'une dans sa position habituelle à l'extrémité 5', l'autre dans la région 3' terminale et le clone pBin-BW<sup>P0</sup>/P0<sub>3'</sub>, qui n'exprime que l'ORF 0 se trouvant à l'extrémité 3' du génome, l'AUG initiateur de l'ORF 0 ayant été muté et une délétion de 29 nt ayant été introduite en amont de l'ORF 1 (cf. figure II-2 a).

L'analyse par Western blot des protéines totales extraites de feuilles agro-infiltrées avec ces constructions montre que la protéine P0 s'accumule en grande quantité lorsqu'elle est exprimée à partir de l'ARN subgénomique (cf. figure II-2 b). Par ailleurs, les feuilles infiltrées avec les constructions BW/P0<sub>3</sub>' et BWP0/P0<sub>3</sub>' montrent une forte nécrose 5 jours après infection (cf. figure II-2 c) ce qui rappelle les résultats obtenus avec la construction PVX-P0 à savoir que la surexpression de P0 dans un contexte viral augmente très fortement la pathogénicité du virus et entraîne la mort de la plante.

### **3. Localisation subcellulaire de la protéine P0**

Dans le but de mieux appréhender le mode de fonctionnement de la protéine P0, nous avons cherché à déterminer sa localisation subcellulaire. Nous avons utilisé deux approches: l'expression de protéines de fusion P0-EGFP (P0EG) et EGFP-P0 (EGP0) à partir d'un vecteur viral PVX, et l'expression transitoire par bombardement des mêmes protéines de fusion sous contrôle du promoteur 35S du CaMV dans le vecteur pΩ (contenant la séquence Ω activatrice de la traduction du TMV, cf. M&M III-2 b) (cf. figure II-3 a). Ces expériences de localisation ont été faites dans des protoplastes de cellules de tabac BY-2 pour les constructions virales ou dans des cellules BY-2 non traitées pour le bombardement.

Les premières observations ne semblent pas montrer de différences majeures pour les infections de protoplastes avec les constructions virales PVX-P0EG et PVX-EGP0 : dans les deux cas, les protéines de fusion semblent se localiser dans des amas répartis dans le cytoplasme de la cellule (cf. figure II-3 b). Lorsque les protéines de fusion sont exprimées seules dans un vecteur d'expression transitoire pΩ, les différences entre les localisations des protéines P0EG et EGP0 sont minimales. En effet, l'observation en microscopie confocale de cellules BY-2 bombardées avec la construction P0EG révèle un marquage sous forme d'agrégats répartis dans le cytoplasme (cf. figure II-3 c), marquage que l'on retrouve avec la



construction EGPO mais de manière un peu plus diffuse (cf. figure II-3 c). Les deux types de constructions (virales ou transitoires) donnent donc des résultats comparables.

Nous avons ensuite testé la fonctionnalité de ces protéines de fusion dans la suppression du PTGS en employant la technique d'expression transitoire par co-infiltration ou "patch test". Seule la construction POEG supprime efficacement le PTGS de manière équivalente à la protéine P0 seule : la fluorescence de la GFP et l'accumulation des mRNA de la GFP dans les zones co-infiltrées pBin-GFP+pBin-POEG sont similaires à ce qu'on obtient avec pBin-GFP + pBin-P0 (résultat non présenté). Ce résultat signifie que des études plus poussées sur la localisation de la protéine P0 pourront être entreprises dans l'avenir en utilisant la construction POEG.

## II. Suppression du PTGS par le BYDV, un *luteovirus*

À l'inverse des *polerovirus*, les virus appartenant au genre *luteovirus* ne présentent pas d'ORF 0 sur leur génome, mais une ORF 6 en 3' qui n'est pas présente chez les *polerovirus* (cf. figure II-4 b). Le troisième genre des *Luteoviridae*, les *enamovirus*, possède une ORF 0, mais n'a pas d'ORF 4 et l'ORF 5 est plus courte (cf. figure II-4 c). Nous avons donc effectué des expériences en vue d'identifier le candidat au rôle de suppresseur du PTGS parmi les protéines codées par le BYDV, un *luteovirus*. Cette étude a été initiée en collaboration avec Aurélie Rakotondrofara du laboratoire d'Allen Miller au Plant Sciences Institute à Ames, Iowa (USA) et nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux protéines P4 et P6 du BYDV-PAV (le membre type des *luteovirus*, PAV représente le sérotype et dérive du nom des pucerons transmettant ce virus!: *Rhopalosiphum padi* et *Macrosiphum avenae*).

### 1. Rôle des protéines P4 et P6

Les expériences de Chay *et al.* (1996) démontrent sans ambiguïté que le produit de l'ORF 4 du BYDV (d'une taille de 17 kDa) intervient dans le mouvement du virus dans la plante. Quant à l'ORF 6, elle code pour une protéine putative de 4kDa qui pourrait être synthétisée à partir du RNA subgénomique 2 (cf. figure II-4 b) (Wang *et al.*, 1999). Sa fonction n'est pas connue, mais on sait que la séquence nucléotidique couvrant l'extrémité 3' de l'ORF 5 et la moitié 5' de l'ORF 6 stimule l'initiation de la traduction de l'ORF 1 alors qu'une mutation de l'AUG de l'ORF 6 n'affecte pas la réplication dans les protoplastes (Mohan *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 1999).

Pour identifier la protéine du BYDV responsable de la suppression du PTGS, nous avons donc utilisé l'approche classique consistant à cloner les ORF 4 et 6 dans le vecteur binaire utilisé dans les expériences de "patch test" (cf. figure II-5 a). Les premières expériences de co-agroinfiltration des constructions pBin-GFP + pBin-P4<sub>BY</sub> ou pBin-P6 nous ont permis de montrer que seule la protéine P4 présente une activité de suppression du PTGS (cf. figure II-5 b). Cependant, celle-ci est très faible comparée à l'activité de suppression de la protéine P0 ; en effet, la fluorescence verte dans la zone infiltrée est peu prononcée et les mRNA de la GFP s'accumulent beaucoup moins dans les feuilles co-infiltrées avec les constructions pBin-GFP + pBin-P4<sub>BY</sub> qu'avec les constructions pBin-GFP + pBin-P0 (cf. figure II-5 b et c). Ceci peut être dû au fait que le BYDV infecte uniquement les monocotylédones, alors que les expériences sont réalisées sur *N. benthamiana*, une dicotylédone. Il faut noter toutefois, que l'accumulation des siRNA n'a pas lieu dans les feuilles co-infiltrées pBin-GFP + pBin-P4<sub>BY</sub> (cf. figure II-5 c) ce qui traduit effectivement une activité de suppression du PTGS.

## 2. Comparaison entre les protéines P4 du BYDV et du BWYV

Bien que nous ayons identifié la protéine P0 comme le suppresseur du PTGS chez le BWYV et compte tenu du rôle de la protéine P4 chez le BYDV, il était intéressant de comparer les activités des protéines P4 des deux genres de virus.

Nous avons donc réalisé des expériences de co-agroinfiltration avec une construction pBin-P4<sub>BW</sub> en parallèle avec une construction pBin-P4<sub>BY</sub>. Les résultats obtenus confirment que l'activité de suppression est portée par la protéine P0 chez le BWYV : en effet, la protéine P4 du BWYV, bien que détectée facilement dans les zones infiltrées (cf. figure II-6 b), ne possède aucune activité de suppression (cf. figure II-6 a). Dans les deux genres *polerovirus* et *luteovirus*, la protéine P4 ne joue donc pas le même rôle. Enfin, comparée à la protéine P0, l'activité de suppression de la protéine P4 du BYDV est très faible et il sera intéressant de tester d'autres isolats de BYDV ou d'autres virus apparentés afin de vérifier si toutes les protéines P4 du genre *luteovirus* possèdent cette faible activité.

## III. Conclusions

La fonction de la protéine P0 des *polerovirus* est longtemps restée mystérieuse, et ceci en grande partie parce qu'on ne pouvait pas détecter cette protéine dans les plantes infectées. Grâce aux expériences décrites dans ce chapitre, nous avons pu montrer que cette protéine joue le rôle de suppresseur du PTGS chez le BWYV mais également chez d'autres représentants du genre *polerovirus*, comme le CABYV et le PLRV. Ces résultats sont tout à fait en accord avec les données expérimentales existantes qui attribuaient un rôle de facteur de pathogénicité à la protéine P0 du BWYV et du PLRV (van der Wilk *et al.*, 1997). En dehors de son rôle de suppresseur de PTGS, nous avons pu également montrer que la synthèse de la protéine P0 est régulée lorsqu'elle est exprimée en contexte viral. En effet, en

optimisant le contexte nucléotidique autour de l'AUG initiateur de l'ORF 0, nous avons pu augmenter la capacité de suppression du virus, mais toujours sans pouvoir détecter la protéine. Curieusement, cette optimisation du contexte nucléotidique autour de l'AUG de l'ORF 0 a un effet délétère sur la réplication du virus, ce qui peut s'expliquer si on admet qu'une augmentation de l'efficacité de l'initiation de la traduction de l'ORF 0 va se faire au détriment de l'initiation de la traduction par "leaky scanning" de la réplicase codée par les ORF 1 et 2. Les mutations secondaires observées dans la descendance du virus "optimisé" vont par contre diminuer l'efficacité d'initiation de la traduction de P0, et augmenter le taux d'expression de la réplicase ce qui sera un avantage sélectif face aux virus ne subissant pas de mutations secondaires. Au vu des résultats obtenus qui rendent compte de la complexité des mécanismes de régulation de l'expression de la protéine P0, d'autres expériences sont nécessaires pour tenter d'identifier le ou les autres facteurs cellulaires et/ou viraux impliqués.

Lorsque la protéine P0 est exprimée à partir du RNA subgénomique ou à partir du PVX, c'est-à-dire dans un contexte viral, il y a une augmentation des symptômes causés par le virus qui peut aller jusqu'à entraîner la mort de la plante (cf. publication n°2 et figure II-2). Il semble logique de penser que cette observation découle directement de l'activité de suppression de la protéine P0. Le même type d'observation avait déjà été fait dans le cas de la protéine HCPro qui peut également augmenter la pathogénicité d'un virus non apparenté (Pruss *et al.*, 1997). Dans le cas du BWYV, l'intérêt pour le virus serait donc de ne pas synthétiser la protéine P0 en trop grandes quantités afin de maintenir la plante infectée en vie. On peut donc imaginer qu'il y a eu une co-évolution entre plante et virus pour l'adaptation de la force de suppression en fonction du couple plante/virus.

Enfin, il faut également garder présent à l'esprit que les *polerovirus* sont limités au phloème des plantes qu'ils infectent et que cette limitation tissulaire pourrait être le fait d'un mécanisme de PTGS, l'hypothèse étant que les *polerovirus* sont incapables de supprimer le

PTGS en dehors des tissus phloémiens (Barker *et al.*, 2001). Nos résultats montrent que la protéine P0 exprimée hors contexte viral supprime le PTGS dans tous les types tissulaires. On peut donc proposer que cette limitation tissulaire puisse être le fait d'une régulation spatio-temporelle de l'expression de la protéine P0 par le virus, plutôt qu'une incapacité à supprimer le PTGS hors des cellules du phloème.

Comme pour les protéines P14 et P15, l'étude fonctionnelle de la protéine P0 passera par l'obtention de plantes transgéniques exprimant cette dernière. C'est pourquoi des plants de *Nicotiana tabacum* ainsi que d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques sont en cours d'obtention au laboratoire. Dans le cadre de cette étude, O. Voinnet du Sainsbury laboratory (Norwich, UK) envisage aussi de croiser des *A. thaliana* P0<sup>+</sup> avec des *A. thaliana* GFP silencés afin de voir si la protéine P0 peut supprimer le PTGS dans ce système.

Dans une optique plus appliquée, nous avons utilisé la propriété de la protéine P0 de supprimer le PTGS de façon très efficace et durable dans le temps pour surexprimer fortement des protéines hétérologues par agro-infiltration. En effet, il a été montré que l'aspect transitoire de l'expression par agroinfiltration d'une construction transgénique était en partie dû au silencing se mettant en place contre le messager du transgène même en l'absence de gène homologue (Johansen and Carrington, 2001). Ce phénomène peut être évité en co-infiltrant un suppresseur de PTGS avec la protéine d'intérêt (Johansen and Carrington, 2001). Cette technique a fait l'objet d'un dépôt de brevet par Baulcombe *et al.* et la société Plant Biosciences Ltd (Baulcombe *et al.*, 2001) dans le but de surexprimer une protéine d'intérêt. La protéine P0 a été rajoutée à la liste des suppresseurs viraux utilisables dans ce procédé. L'avantage de cette protéine par rapport à un autre suppresseur est la très forte augmentation de l'expression d'une protéine co-infiltrée (jusqu'à 50 fois) et la grande durabilité du procédé. En effet, on peut voir sur la figure II-7, que la co-infiltration de feuilles de *N. benthamiana* wt avec des constructions pBin-P4<sub>BW</sub>, pBin-CP<sub>BW</sub> ou pBin-GFP en

présence de pBin-P0 entraîne une accumulation beaucoup plus forte de ces protéines qu'en présence de pBin vide. De plus, ces protéines continuent à s'accumuler entre 5 et 15 jours en présence de protéine P0, alors qu'on observe l'effet inverse en absence de protéine P0 ; cela peut même aller jusqu'à la disparition complète de la protéine CP<sub>BW</sub> (cf. figure II-7).

Nous avons également commencé l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine P0. Les premières tentatives réalisées en fusionnant la protéine P0 avec la EGFP sont encourageantes. En effet, nous avons obtenu une construction POEG fonctionnelle qui sera utilisée pour préciser et étendre les observations préliminaires.

## CHAPITRE III

### Résistance du BWYV au PTGS dirigé contre le gène codant pour la protéine mineure de capsid (ou protéine RT)

#### I. Utilisation du PTGS comme moyen de lutte anti-virale

La transgénèse a été utilisée de manière intensive pour obtenir des plantes résistantes à une infection virale et la découverte récente du phénomène de PTGS a ouvert de nouvelles perspectives dans ce domaine. En effet, on s'est rendu compte que la résistance à un virus conférée par l'expression d'un gène viral était due la plupart du temps à la mise en place d'un phénomène de PTGS induit par le virus. On peut distinguer deux types de résistances suite à l'expression d'un gène viral : l'immunité et la récupération (recovery). Les plantes présentant une immunité au virus ont déjà développé un PTGS contre le transgène et le virus correspondant sera donc immédiatement reconnu et dégradé. Par contre, les plantes montrant un phénomène de "recovery" ne sont pas résistantes au virus, l'infection se met en place dans un premier temps, puis il y a induction par le virus d'un PTGS du transgène qui va donc entraîner la dégradation du virus. En utilisant cette découverte, les chercheurs ont réussi à obtenir diverses plantes résistantes à de nombreuses familles et genres de virus telles que *comovirus*, *rymovirus*, *Potyviridae*, *sobemovirus* ou *tosspovirus* (Jan *et al.*, 2000b ; Neves-Borges *et al.*, 2001 ; Pinto *et al.*, 1999 ; Scorza *et al.*, 2001 ; Xu *et al.*, 2001). Dans la plupart de ces exemples, le gène viral utilisé est celui codant pour la protéine de capsid ; en effet, c'est le gène le plus conservé au sein d'un même groupe. Ainsi, il est connu depuis quelques années que l'expression de la protéine de capsid du TEV dans des plantes transgéniques rend ces plantes résistantes à la surinfection par ce virus (Lindbo *et al.*, 1993). Cette résistance se traduit par un phénomène de rétablissement (recovery) qui se met en place 4 à 5 semaines

après infection et qui résulte de la dégradation des mRNA du transgène mais également des RNA viraux. Ce phénomène se produit également si le transgène correspond à une forme non traductible d'un gène viral (Lindbo and Dougherty, 1992). Par ailleurs, il est possible d'obtenir une résistance multiple en exprimant des protéines de fusion de différents virus, comme cela a été décrit pour le TuMV (Turnip Mosaic Virus) et le TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus) (Jan *et al.*, 2000a).

## **II. VIGS dans des plantes exprimant la protéine mineure de capsid (ou protéine RT) du BWYV**

Nous avons tenté d'exploiter le mécanisme décrit ci-dessus pour obtenir des plantes résistantes au BWYV ou montrant une inhibition de la transmission du virus par puceron. Pour ce faire, des plantes transgéniques exprimant la protéine mineure de capsid ou protéine RT du BWYV (cf. figure In-14 pour l'organisation génétique) ont été obtenues. Cependant, l'infection de ces plantes par le virus ne montrait pas de phénomène de résistance au BWYV ni d'inhibition de la transmission malgré un PTGS du transgène RT. En d'autres termes, le virus se révélait capable d'induire le silencing du transgène RT sans être affecté par ce PTGS. Les mêmes résultats ont été obtenus lorsqu'on inocule un autre *polerovirus*, le PLRV, qui possède des homologies de séquence suffisamment importantes au niveau du gène de la capsid avec le BWYV pour déclencher le VIGS du transgène ; dans ce cas là également, le PLRV se multiplie normalement dans la plante, malgré l'extinction du transgène RT.

Ces résultats sont décrits dans la publication n°3 :

**Virus-Induced Gene Silencing in Transgenic Plants Expressing the Minor Capsid protein of Beet Western Yellows Virus (2002). Publié dans *Molecular Plant Microbe Interactions* Vol. 15, No. 8, pp. 799–807.**



### III. Conclusions

L'utilisation de plantes transgéniques exprimant la protéine mineure de capsid (RT) du BWYV a permis de confirmer l'existence d'une activité de suppression du PTGS développée par ce virus. En effet, l'infection de ces plantes transgéniques par le BWYV déclenche un PTGS du transgène RT sans que le RNA viral ne soit affecté. On peut expliquer cette protection du RNA viral de deux façons : soit il est inaccessible à la machinerie de dégradation, soit, ce qui est plus probable, la protéine P0 supprime spécifiquement le PTGS dirigé contre le virus. Dans la publication n°2, nous avons montré que la protéine P0 supprime le PTGS localement mais qu'elle ne semble avoir aucune action sur le PTGS systémique. Cela peut donc expliquer pourquoi le PTGS dirigé contre le transgène peut se mettre en place en dehors des tissus phloémiens puisque le virus, et donc la protéine P0, est confiné dans le phloème.

En revanche, cela n'explique pas pourquoi, dans le phloème, les RNA du transgène sont dégradés alors que les RNA viraux ne le sont pas. Dans ce cas, il faut émettre l'hypothèse d'une différence entre la nature des RNA viraux et des mRNA dérivés du transgène. Il a été décrit que certains virus, comme le CMV, se multipliaient bien mieux dans des plantes mutées dans les gènes *SDE* ou *SGS* impliqués dans la mise en place du PTGS (Mourrain *et al.*, 2000). En revanche, d'autres virus, comme le TRV (Tobacco Rattle Virus) ou le TCV (Turnip Crinkle Virus), ne présentent pas d'augmentation du taux de multiplication dans ces plantes mutées (Dalmay *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2001). Il a été proposé que cette différence devait être due à la nature des RNA viraux : ainsi les RNA du CMV seraient reconnus par la branche *SDE1/SGS2* dépendante du PTGS et l'accumulation des RNA viraux se fera donc moins bien dans les plantes sauvages que dans les plantes mutées dans *SDE1/SGS2* ; par contre, les RNA de TCV ou de TRV ne seraient pas reconnus

par la machinerie cellulaire. Dans le cas du BWYV, le RNA viral ne doit pas être ciblé par la machinerie cellulaire, car la multiplication de ce virus ne semble pas stimulée dans les plantes mutées *sde1/sgs2* (résultats non publiés).

Plutôt qu'une différence dans la nature des RNA viraux, on peut également proposer que le ciblage des RNA viraux par la branche SDE1/SGS2 dépendante est reliée au type de suppresseur codé par le virus. En effet, il est intéressant de noter que les virus se multiplient mieux dans les plantes *sde1/sgs2* codent pour des suppresseurs impliqués dans la suppression du mouvement du silencing systémique et non pas dans le silencing local. C'est le cas de la protéine 2b du CMV, mais également de la protéine P25 du PVX qui fait également partie des virus dont le RNA peut être reconnu par la branche SDE1/SGS2 du PTGS (Voinnet *et al.*, 2000). Par contre, le BWYV, qui n'est pas affecté par cette voie (Brault, communication personnelle), code pour un suppresseur qui semble n'avoir aucun effet sur le silencing systémique. Il serait donc intéressant de voir si des virus comme le TRV ou le TCV codent également pour des suppresseurs agissant au niveau du PTGS local. Cette hypothèse pourrait être confirmée par l'utilisation d'une construction PVX exprimant la protéine RT du BWYV. L'infection des plantes transgéniques RT par ce virus recombinant est en cours et devrait entraîner l'extinction du transgène mais également la dégradation des RNA viraux.

Il faut également garder à l'esprit que les observations faites sur ces plantes transgéniques doivent être liées à la classe du transgène intégré. Suivant la classification de Vaucheret, les transgènes peuvent être répartis en différentes classes suivant leur capacité à maintenir ou non le PTGS en absence de l'inducteur (Palauqui et Vaucheret, 1998, cf. introduction page 20). Dans le cas présent, le transgène RT serait donc un transgène de classe I et le maintien du PTGS est lié à la présence de l'inducteur, *i.e.* le virus. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait pouvoir éliminer le virus afin de voir si le PTGS est maintenu ou non.



## CONCLUSION GÉNÉRALE

La découverte du mécanisme d'extinction de gènes chez les plantes puis chez les animaux est l'une des avancées les plus prometteuses de ces dernières années dans le monde de la biologie moléculaire. Les implications et les perspectives ouvertes par le RNAi sont immenses et pourraient révéler des aspects encore insoupçonnés dans de nombreux domaines de la biologie. Outre les possibilités offertes par l'utilisation du RNAi comme outil pour étudier la fonction de gènes, la compréhension précise des mécanismes de l'extinction de gènes est essentielle pour mieux cerner son rôle. À ce sujet, il faut souligner que les études réalisées chez les plantes contribuent pour beaucoup à notre compréhension actuelle du phénomène du PTGS, et de nombreux points encore obscurs, comme le mouvement du signal du PTGS, seront probablement élucidés dans un avenir proche.

Par ailleurs, la découverte du PTGS a également été une révolution dans le monde de la virologie végétale. En effet, il est maintenant clairement établi que le rôle prédominant du PTGS chez les plantes est de prémunir celles-ci contre les infections virales. Et le fait que les virus végétaux ont la capacité de supprimer le PTGS renforce encore cette idée. Depuis quelques années, plusieurs supresseurs viraux du PTGS ont été identifiés (Li and Ding, 2001; Voinnet *et al.*, 1999) et leur étude contribue à résoudre certaines questions concernant le mode d'action du PTGS. En effet, les protéines virales supresseurs agissent à différents niveaux de la cascade de réactions conduisant au PTGS, ce qui peut permettre de les utiliser comme outil pour adresser un aspect précis du phénomène encore incompris. Ainsi, la découverte récente d'un supresseur de PTGS, la protéine P19 du CymRSV (Cymbidium Ring Spot Virus), capable de fixer les siRNA, marqueurs de PTGS, et de bloquer le signal du

PTGS systémique (Silhavy *et al.*, 2002) pourrait apporter des éléments de réponse quant à la nature du signal systémique.

Toujours dans cette optique, nos travaux apportent une contribution à l'étude du mécanisme du PTGS, à travers l'identification de nouveaux supresseurs tels que les protéines P15 du PCV et P14 du BNYVV qui font partie d'un groupe de protéines virales riches en cystéine (CRP) retrouvées chez diverses familles de virus. L'analyse de ces protéines a cependant révélé qu'elles étaient très différentes par leurs propriétés. Ainsi, la protéine P15 fonctionne sous forme multimérique et se localise dans les peroxysomes, une localisation qui ne semble pas essentielle au fonctionnement de la protéine P15, du moins dans le système utilisé. Il est intéressant toutefois de noter que, contrairement à d'autres organites, les peroxysomes ne possèdent qu'une simple membrane et sont capables d'importer des protéines sous forme native ou oligomérique (Subramani, 1996) ; de plus, une protéine possédant un signal d'adressage peroxysomal peut entraîner une protéine n'en possédant pas dans les peroxysomes (Lee *et al.*, 1997). On peut donc proposer que la protéine P15 fonctionne en complexant un facteur cellulaire nécessaire à la mise en place du PTGS et accessoirement, le séquestre dans les peroxysomes. La purification de peroxysomes à partir de plantes sauvages saines ou infectées par le PCV et de plantes transgéniques P15<sup>+</sup> permettra de répondre à la question de l'existence d'une protéine additionnelle dans leur matrice.

La protéine P14, quant à elle, se localise dans le cytoplasme et le nucléole des cellules infectées par le BNYVV et est un supresseur beaucoup moins efficace. On ne sait pas encore si la localisation nucléolaire est nécessaire à son activité, mais on sait qu'une protéine humaine de type RNase III a été mise en évidence dans le noyau et le nucléole des cellules HeLa (Wu *et al.*, 2000). Chez les plantes, par contre, on ignore encore si une enzyme de type RNase III (comme Carpel Factory) peut se localiser dans ces structures. Si tel était le cas et si la localisation nucléolaire de la protéine P14 se confirmait, on pourrait imaginer que la

protéine P14 inactive une étape nucléaire du PTGS. Des études supplémentaires sont donc encore nécessaires avant d'élucider de manière plus approfondies les modes d'action respectifs des protéines P15 et P14.

Par ailleurs, nous avons également montré que la protéine P0 des *polerovirus*, de rôle jusqu'alors inconnu, est un suppresseur fort de PTGS. De manière surprenante, nous avons pu démontrer que le BWYV régule fortement l'activité de son suppresseur, ce qui pourrait expliquer la restriction de ces virus aux tissus du phloème. Nous avons également commencé à étudier la localisation subcellulaire de cette protéine et les premières observations montrent qu'elle semble se concentrer dans des agrégats répartis dans le cytoplasme. À l'heure actuelle, il est difficile de prédire la nature exacte de ces agrégats, mais des données récentes suggèrent que la protéine P0 du PLRV serait impliquée dans la formation de vésicules double membrane (van Bel et al., 2002). À l'avenir, il faudra donc essayer de reproduire ces résultats avec la protéine P0 du BWYV, ce qui permettrait de proposer un mode de fonctionnement original pour la suppression du PTGS : les vésicules double membrane pourraient former une cage protectrice où le RNA viral serait à l'abri du PTGS.

Enfin, des *A. thaliana* transgéniques P0<sup>+</sup>, P14<sup>+</sup> et P15<sup>+</sup> sont en cours d'obtention ou déjà disponibles et s'avéreront très utiles pour progresser dans la compréhension des mécanismes de suppression du PTGS utilisés par ces différentes protéines.

Une autre partie du travail a été réalisée sur des plantes transgéniques exprimant la protéine mineure de capsid du BWYV. Cette protéine de 74 kDa est impliquée dans la transmission du virus par le puceron vecteur et ces plantes avaient tout d'abord été obtenues dans le but de conférer une résistance au virus ou d'inhiber la transmission par le vecteur. Toutefois, l'infection de ces plantes par le BWYV n'a pas permis de mettre en évidence de mécanisme de résistance malgré une mise en place d'un PTGS dirigé contre le transgène RT

qui n'affecte pas le virus. Ces résultats confirment donc que la protéine P0 joue bien un rôle dans la protection du virus contre le mécanisme de PTGS.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ces trois années associés à ceux publiés par d'autres auteurs montrent que la suppression du PTGS semble être une caractéristique commune à beaucoup de virus de plante sinon à tous les phytovirus. Néanmoins, on peut se demander si cette caractéristique est limitée aux virus des végétaux. Les travaux de Li *et al.* (2002) semblent suggérer que ce n'est pas le cas. En effet, ces auteurs ont identifié chez un virus infectant à la fois les plantes et la drosophile, le FHV ou Flock House Virus, une protéine capable de supprimer le PTGS dans la plante et protégeant le virus contre le RNAi dans les cellules d'insecte (Li *et al.*, 2002).

Jusqu'à présent, les applications du RNAi dans le domaine de la santé paraissaient limitées car l'introduction de molécules de RNA db dans les cellules de mammifères déclenche une réponse non spécifique médiée par la protéine kinase RNA dépendante (PKR) qui va phosphoryler le facteur eIF-2 $\alpha$  avec comme conséquence un arrêt de la traduction et l'entrée en apoptose (Gil and Esteban, 2000). Toutefois, en utilisant directement des molécules de siRNA de 21-23nt, on arrive à contourner cette réponse déclenchée par des molécules de RNA db de plus de 30 nt et à induire le RNAi d'un gène cellulaire (Elbashir *et al.*, 2001c). Enfin, tout récemment, en transfectant des cellules avec des siRNA homologues de séquences virales, des chercheurs ont également réussi à diriger le RNAi contre des virus animaux tels que le HIV ou le poliovirus empêchant ainsi l'infection de ces cellules par le virus (Gitlin *et al.*, 2002; Jacque *et al.*, 2002). Chez les mammifères, le système de RNAi semble donc être actif contre les virus même s'il doit être masqué en temps normal par le système PKR. Bien sûr, cela soulève également la possibilité, fascinante sur le plan fondamental mais beaucoup moins d'un point de vue médical, que les virus de mammifères, à

l'image des phytovirus, aient également développé un système pour se prémunir contre le mécanisme du PTGS.



## MATÉRIEL ET METHODES

### I. Multiplication et purification du BNYVV, du PCV et du BWYV

#### 1. Virus et plantes hôtes

##### a. Le BNYVV

Au laboratoire, nous travaillons avec des isolats artificiels de BNYVV. Ces isolats sont obtenus, par inoculation sur *C. quinoa*, de transcrits infectieux synthétisés *in vitro* à partir des cDNA complets correspondant aux RNA 1, 2, 3 et 4 du BNYVV (Quillet *et al.*, 1989). L'isolat d'origine ayant permis le clonage des cDNA complets est l'isolat français F2 provenant de betteraves virosées de la région de Muret (Putz and Kuszala, 1978).

##### b. Le PCV

L'isolat de PCV (PCV2) étudié au laboratoire provient de Thyssée-Kaymor (Sénégal) (Manohar *et al.*, 1993). Lorsqu'il infecte l'arachide (*Arachis hypogaea*), il provoque un nanisme de la plante et l'apparition de taches annulaires au niveau des feuilles. Cet isolat est transmissible par les graines. À partir des clones cDNA entiers du PCV2, un isolat artificiel infectieux a été obtenu au laboratoire (Herzog *et al.*, 1998).

##### c. Le BWYV

Le clone infectieux utilisé dans les travaux rapportés dans ce mémoire a été obtenu à partir de la souche FL1 du BWYV, isolée à partir de laitue et provenant de l'INRA de Montfavet (Veidt *et al.*, 1988).

##### d. Plantes hôtes

Deux plantes hôtes ont principalement été utilisées dans les travaux décrits dans ce mémoire : *Chenopodium quinoa*, hôte du BNYVV, qui répond à l'infection virale par l'apparition de lésions locales chlorotiques et nécrotiques au niveau des feuilles inoculées, et *Nicotiana benthamiana*, plante chez laquelle les trois virus PCV, BNYVV et BWYV provoquent une infection systémique qui se traduit, dans le cas du PCV, par la formation de marbrures et de lésions chlorotiques au niveau des feuilles apicales!; l'infection par le BNYVV provoque des symptômes très légers et l'inoculation du BWYV induit une chlorose des feuilles entre les nervures.

## 2. Purification du BNYVV et du PCV

Le BNYVV et le PCV sont purifiés selon un protocole identique (Bouzoubaa, 1998). L'amplification a lieu dans *C. quinoa* pour le BNYVV et *N. benthamiana* pour le PCV. Après dix jours de virose, les feuilles inoculées, dans le cas du BNYVV, et les feuilles apicales, dans le cas du PCV, sont récoltées et broyées dans du tampon borate de sodium 100 mM pH 9 additionné de tétrachlorure de carbone dans des proportions respectives de 170 ml et 100 ml pour 100 g de feuilles. Le broyat est ensuite clarifié par une centrifugation de 30 min à 8000 rpm et filtré sur Miracloth. Le virus est précipité par addition de 0,8 % NaCl et 2 % PEG 6000 pendant 5h à 4°C sous agitation douce, puis il est sédimenté par une centrifugation de 20 min à 12000 rpm et remis en suspension dans 100 ml de tampon borate de sodium 10 mM pH 9. Une seconde précipitation au PEG/NaCl est effectuée et le culot est remis en suspension dans 30 ml de tampon borate de sodium 10 mM pH 9 puis ultracentrifugé à travers 7 ml d'un coussin de saccharose 20 % pendant 2 h à 35000 rpm. Le culot de virus est finalement remis en suspension dans 1 ml de tampon borate de sodium 10 mM pH 9. Les rendements moyens d'extraction se situent entre 2 à 8 mg de virus pour 100 g de feuilles. Le virus peut ensuite être déposé sur un gradient de Nicodenz 50 % final préparé dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8 et centrifugé une nuit à 47 000 rpm à une température de 15°C.

## 3. Purification du BWYV

Les lutéovirus restant confinés dans les tissus conducteurs du phloème, la technique d'extraction nécessite l'utilisation d'enzymes de type cellulase et macérozyme. Le rendement d'extraction reste cependant faible puisqu'il est de l'ordre de 1 mg de virus par kg de feuilles infectées pour le virus sauvage et inférieur au milligramme pour les mutants.

Toutes les centrifugations sont réalisées à 15°C et le stockage des suspensions se fait à température ambiante pour éviter toute précipitation du virus pendant la purification.

300 g de feuilles infectées et congelées sont broyées dans 600 ml de tampon citrate de sodium 0.1 M pH 6 (tampon citrate), contenant 0.5% de macérozyme R-10, 0.5% de cellulase, 0.5% d'éthanol et 0.1% d'acide thioglycolique. L'homogénat est transféré dans un bécher et agité doucement pendant 4 h à 25°C.

450 ml d'un mélange (1/1) de chloroforme et de n-butanol sont ensuite ajoutés, le tout étant homogénéisé vigoureusement pendant 2 min. Cette émulsion est centrifugée à 10000 rpm pendant 15 min dans un rotor JA-14 (Beckmann). A la phase aqueuse collectée sont ajoutés 4 ml de Triton X-100 (0.5% final). Après une agitation de 30 min, du PEG 6000 et du

NaCl sont additionnés à des concentrations finales de 8% et de 0.4 M respectivement. Cette préparation est agitée pendant 1 h puis laissée au repos à température ambiante pendant 45 min minimum. Cette incubation peut se prolonger toute la nuit.

Suite à une centrifugation de 20 min à 12000 rpm, les culots sont remis en suspension dans 90 ml de tampon citrate contenant 5% d'éthanol, puis laissés sous agitation pendant 1h (durée extensible à 16 h).

Après une centrifugation de 15 min à 9000 rpm, le surnageant qui contient la suspension virale est réparti sur plusieurs coussins de saccharose à 30% (de 8 ml chacun) préparés dans du tampon citrate contenant 0.5% d'éthanol. Après 2h30 de centrifugation à 35000 rpm (rotor 50.2 Ti), les culots obtenus sont repris dans 2 ml de tampon citrate de sodium 0.1 M pH6.

On prépare des gradients de 20 à 50% de saccharose par congélation-décongélation d'une solution de saccharose à 25% préparée dans du tampon citrate. La suspension de virus est ensuite déposée sur ces gradients et centrifugée pendant 2h30 à 35000 rpm (rotor SW41). Le matériel viral est visualisée à l'obscurité avec un éclairage en fibre optique et collectée en aspirant la bande fluorescente grâce à une seringue. La concentration en virus est déterminée en se basant sur une valeur d'un coefficient d'extinction de 8.6. Le virus est stocké à -80°C.

## II. Infection de plantes et de protoplastes

### 1. Inoculation mécanique (PCV et BNYVV)

Pour l'inoculation mécanique de plantes *C. quinoa* ou de *N. benthamiana* âgées de 6 à 8 semaines, chaque feuille est saupoudrée de célite, puis est frottée avec 30 µl de solution d'inoculation :

-RNA viral	5 µg
ou transcrits	10 µg
-Macaloïd 0,5 %	20 µl
-Tampon phosphate de Na 500 mM pH 7,5	25 µl
-tRNA entraîneur	5 µl
-H <sub>2</sub> O qsp	200 µl

À raison de 30 µl/feuille et 3 feuilles/plantes.

## 2. Inoculation par puceron (BWYV)

Les pucerons de l'espèce *Myzus persicae* ou puceron vert du pêcher proviennent de l'élevage de l'INRA de Colmar. Les pucerons sont élevés sur des jeunes plantes de piment, espèce non-hôte du BWYV. Des colonies de pucerons virulifères de la même espèce sont également maintenues sur des féveroles infectées par le BWYV. Les élevages sont maintenus dans une pièce climatisée à  $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ , avec une photopériode de 16 h de clarté et une humidité de 40%.

Les expériences de transmission de virus sont réalisées avec des pucerons *M. persicae* du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> stade larvaire provenant des élevages sur piment. Elles sont constituées de deux étapes successives conditionnées par le mode de transmission persistant et circulant du BWYV : l'acquisition du virus par les pucerons, à partir de différentes sources de virus (plantes, protoplastes et préparations virales), et l'inoculation du virus à la plante-test *M. perfoliata* par ces mêmes pucerons. Ces deux étapes se font sous un éclairage de 16 h et à température ambiante. Après inoculation, les plantes-tests sont logées dans des pièces climatisées ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2$  et 60 à 80 % d'humidité) et sous un éclairage de 16h. Les tests de transmission ont été réalisés par V. Brault à l'INRA de Colmar.

### a. Acquisition sur feuille:

Quatre à cinq semaines après l'agroinoculation, des feuilles entières sont prélevées sur les plantes de *N. clevelandii*. Ces feuilles sont tout d'abord lavées sous un fort jet d'eau du robinet pour les débarrasser de leurs poils épidermiques. Elles sont ensuite placées en survie dans des boîtes "Bonnemaison", boîtes qui permettent l'alimentation en eau et l'isolement de la feuille du milieu extérieur. À l'aide d'un pinceau, 200 pucerons provenant de l'élevage sur piment sont déposés sur ces feuilles. Après une acquisition de 24h, les pucerons sont transférés sur les plantes-tests *M. perfoliata* isolées sous des cylindres recouverts d'un voile. Cette deuxième étape correspond à la période d'inoculation qui dure entre 72 et 96 h. Les pucerons sont finalement éliminés par un traitement insecticide (mevinphos Phosdrin<sup>®</sup>, 0,4%). Les plantes sont ensuite placées dans des logettes climatisées pour une durée de trois à quatre semaines avant d'être testées par ELISA.

### b. Acquisition sur membrane à partir d'une solution de virus purifié

150 à 200 pucerons sont déposés dans un cylindre de 2.5 cm de diamètre et 5 cm de haut fermé par une membrane de Parafilm<sup>®</sup> étirée au maximum, pour permettre au puceron

de se nourrir au travers. Le virus purifié est dilué dans 100 à 200 µl du milieu d'acquisition artificiel MP148, déposé sur la membrane et recouvert d'une seconde membrane. Ce dispositif est placé sous lumière jaune afin d'attirer les pucerons sur la solution virale. Après la période d'acquisition, les pucerons sont transférés sur des plantes-test.

### **3. Inoculation par agro-infiltration (BWYV)**

Utilisée comme une alternative à l'inoculation par puceron, l'agro-infiltration d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* portant une construction binaire avec la séquence complète du virus sous promoteur 35S permet d'infecter efficacement des plants de *N. benthamiana*. Voir M&M IV pour les conditions d'infiltration.

### **4. Préparation et infection de protoplastes de tabacs BY-2**

#### **a. Culture des cellules de tabac BY-2**

Les cellules de tabac (*Nicotiana tabacum* L., souche Bright Yellow 2 (BY-2) (Nagata *et al.*, 1992)) sont maintenues en culture liquide, à 27°C, à l'obscurité, sous agitation constante (130!rpm), dans du milieu Murashige et Skoog basal (Duchefa), complétement avec de la thiamine 1!mg/ml, du KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200!mg/ml, de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4!D) 0,2!mg/ml, du saccharose 3% (poids/volume) et du myoinositol 100!mg/ml (milieu MS). Les cellules sont repiquées tous les sept jours par transfert de 1,5!ml dans 80!ml de milieu frais.

#### **b. Préparation des protoplastes de cellules de tabac BY-2**

Les protoplastes sont préparés, selon la méthode décrite par Watanabe *et al.* (1987) modifiée par O. Hemmer (Herzog *et al.*, 1998), à partir de cultures de cellules âgées de 5 jours. Les cellules sont collectées par centrifugation pendant 5 min à 800 rpm, puis incubées pendant 1 à 2 h à 30°C, à l'obscurité sous agitation douce, dans du mannitol 450!mM, MES 3,6!mM, pH!5,5 (solution I) contenant 0,1% de pectolyase Y23 et 1% de cellulase RS Onozuka. Les protoplastes sont ensuite récupérés par filtration du milieu de digestion sur un filtre ayant une réticulation de 100 µm. Après centrifugation (5 min à 800 rpm) le culot de protoplastes est lavé deux fois dans la solution I. Les protoplastes sont finalement remis en suspension dans du mannitol 450!mM, MES 3,6!mM pH!5,5, CaCl<sub>2</sub> 0,1!mM (solution II) à la concentration de 2.10<sup>6</sup> protoplastes/ml.

### c. Inoculation des protoplastes par électroporation et mise en culture

Environ  $1.10^6$  protoplastes (0,5 ml de suspension) sont additionnés à 2,5 µg de RNA viral ou 5 µg de RNA transcrits *in vitro*. Le mélange est introduit dans la cuve d'électroporation puis soumis à une décharge de 450 V/cm ( $100 \Omega$ , 125 µF). Les protoplastes sont ensuite dilués par 1 ml de solution II et la suspension est incubée pendant 30 min dans la glace afin de restabiliser les membranes cellulaires. Les protoplastes sont sédimentés par centrifugation pendant 2 min à 800 rpm, puis le culot est repris dans 1,5 ml, soit de milieu de Rottier (mannitol 450 mM, pH 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 mM;  $\text{KNO}_3$  1 mM;  $\text{MgSO}_4$  1 mM;  $\text{CaCl}_2$  5 mM; KI 1 µM;  $\text{CuSO}_4$  10 nM), soit de milieu MS, additionné de mannitol 450 mM, et en présence d'un antibactérien, la carbénicilline à 0,25 mg/ml. La suspension de protoplastes est alors mise en culture sur du milieu de Rottier gélosé (1% d'agarose) ou sur du milieu MS-mannitol gélosé, dans une chambre climatisée à 22°C en lumière diffuse.

## **III. Souches bactériennes, vecteurs de clonage et milieux de culture**

Les clonages sont réalisés dans des souches bactériennes dérivant d'*Escherichia coli* K12: NM522 ou DH5α.

### **1. Souches bactériennes**

#### a. NM522

Cette souche (RecA+) est couramment utilisée pour l'amplification de plasmides recombinants. Elle possède l'épisome F' nécessaire à la conjugaison bactérienne et à l'infection par les phages filamenteux (M13 et f1). Ces bactéries sont mutées dans l'opéron lactose et expriment une β-galactosidase tronquée dans la partie N-terminale qui peut être complétée par l'α-peptide de la β-galactosidase exprimé à partir d'un vecteur de clonage de type pUC ou pBluescript.

#### b. DH5α

Cette souche (recA-) utilisée pour l'amplification des plasmides lors des clonages permet de limiter les risques de recombinaison. Elle permet, comme la souche NM522, l'α-complémentation et la sélection des clones recombinants par la couleur des colonies en présence d'IPTG, un substrat de la β-galactosidase.

### c. BL21 (DE3) pLysS (Studier *et al.*, 1990)

Ces bactéries ont été utilisées essentiellement pour la surexpression de protéines à partir des vecteurs pET. Leur déficience en protéases 'lon' et 'ompT' permet une meilleure stabilité des protéines exogènes. Cette souche est lysogène pour le phage DE3, un dérivé du phage  $\lambda$ . Celui-ci contient dans son génome le gène *lacI* codant pour le répresseur du promoteur de l'opéron lactose ainsi que le gène de la T7 RNA Polymérase qui est placé sous la dépendance du promoteur lac UV5 inducible par l'IPTG.

La souche dispose également du plasmide pLysS qui confère la résistance au chloramphénicol. Ce plasmide code pour le lysozyme du phage T7 qui forme un complexe avec la T7 RNA polymérase, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle due à une expression basale de la T7 RNA polymérase, avant l'induction par l'IPTG (Moffatt and Studier, 1987). Cependant, le faible taux de lysozyme produit n'interfère pas avec l'activité de la T7 RNA polymérase après induction. Ce système est utilisé pour stabiliser les vecteurs d'expression dans lesquels le produit du gène cloné est toxique pour la bactérie.

### d. *Agrobacterium tumefaciens*

Cette bactérie phytopathogène, dont le chromosome contient le gène de résistance à la rifampicine, est l'agent responsable de la maladie appelée galle du collet. L'infection fait intervenir le plasmide Ti qui porte, entre autres, les gènes codant pour les opines, les gènes de virulence (*vir*) responsables du transfert du T-DNA (Transfer DNA ou ADN de transfert) et les gènes oncogènes (*onc*) intervenant dans l'induction tumorale. Le T-DNA du plasmide peut s'intégrer au hasard dans le génome des cellules infectées grâce à la présence de séquences bordantes et sous l'influence des gènes *vir*.

La souche C58C1 contient un plasmide Ti désarmé, c'est-à-dire démunie de T-DNA, des séquences bordantes et des gènes *onc*, mais possédant encore les gènes *vir* permettant le transfert *in trans* d'un fragment de DNA inséré entre les séquences bordantes d'un autre vecteur.

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour l'infiltration des feuilles de *N. benthamiana* lignée 16c est la souche C58C1 (pCH32). Elle contient, en plus du plasmide Ti désarmé, le plasmide binaire pCH32 qui contient le gène codant pour la GFP, appelé plus simplement pBin-GFP.

Les souches d'*E. coli* et d'*A. tumefaciens*, ainsi que les bactéries transformées peuvent être stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  en présence de 15 % de glycérol.

## 2. Vecteurs de clonage et vecteurs d'expression

### a. Vecteurs de clonage

- pUC19!: Ce vecteur de 2686 pb contient le gène codant pour la  $\beta$ -lactamase (gène de résistance à l'ampicilline) et l'origine de réplication du plasmide ColEI permettant l'amplification efficace de plasmides dans les souches bactériennes dérivées d'*E. coli*. Il possède une partie de l'opéron lactose comprenant!: la région 3' du gène *lacI*, le promoteur/opérateur inductible par l'IPTG et le début du gène *lacZ* codant pour le fragment N-terminal (ou peptide  $\alpha$ ) de la  $\beta$ -galactosidase. Une cassette de clonage (polylinker) a été insérée en phase au début de la séquence codante du gène *lacZ*.

- pBluescribe (+/-)!: Ces phagemides qui dérivent du plasmide pUC19 ont une taille de 3204 pb. Ils portent le gène de résistance à l'ampicilline, l'origine de réplication du plasmide ColEI, la région intergénique du phage f1 (les deux plasmides diffèrent par l'orientation de cette région) et le gène *lacZ* codant pour le peptide  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase ainsi qu'une cassette de clonage insérée au début de la séquence codante du gène *lacZ*. De part et d'autre de la cassette se trouvent les séquences promotrices de la RNA polymérase des phages T3 et T7. Ces promoteurs permettent de synthétiser, en présence de la RNA polymérase correspondante, les RNA complémentaires au fragment de DNA inséré.

### b. Vecteurs d'expression

- pET!: Les plasmides pET (pour plasmid for Expression by T7 RNA polymérase) (Studier *et al.*, 1990), dérivent du pBR322 et sont utilisés pour surexprimer des protéines dans *E. coli*. Ils confèrent la résistance à l'ampicilline. Le gène d'intérêt est cloné sous la dépendance du promoteur  $\phi 10$  (promoteur du gène 10 du phage T7) reconnu par la T7 RNA polymérase et en aval de la séquence Shine-Dalgarno.

Dans le cas du plasmide pET3a utilisé, l'ATG initiateur du gène 10 est inclus dans un site de clonage unique *NdeI* qui est utilisé pour introduire une séquence codante qui sera ainsi exprimée sans acide aminé supplémentaire à son extrémité N-terminale. Le répresseur lacI également codé par le plasmide peut se fixer sur le promoteur en amont du gène à cloner, ce qui empêche toute transcription de ce gène en absence d'induction par l'IPTG.

- p $\Omega$ !: D'une taille de 3508 pb, ce vecteur est utilisé dans les expériences de bombardement de cellules BY-2. Il possède l'origine de réplication d'*E. coli* ainsi que le gène de résistance à l'ampicilline. En amont de la cassette de clonage se trouve un double



promoteur 35S suivi de la séquence  $\Omega$  du TMV qui est un activateur de traduction (Sleat *et al.*, 1987), la cassette de clonage est délimitée en aval par le terminateur 35S. Vecteur fourni par I. Jupin.

- pBin-GFP!: Ce vecteur est utilisé, avec la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1, pour infecter les plantes transgéniques 16c et obtenir des plantes silencées. Ce vecteur binaire est dérivé du pBin!19 (Bevan *et al.*, 1984) et contient une origine de réplication peu spécifique (Broad Host Range) fonctionnant à la fois dans *E. coli* et dans *A. tumefaciens*. Il comporte entre ses séquences bordantes le gène codant pour la GFP flanqué du promoteur 35S du CaMV et du terminateur Nos de la nopaline synthase. Ce vecteur est maintenu dans les bactéries par sélection sur un milieu additionné de kanamycine et de tétracycline.

- pBin 61!: Comme le précédent, il dérive du pBin!19 et possède l'origine de réplication peu spécifique ainsi que les séquences bordantes provenant du plasmide Ti. Il contient le gène de résistance à la kanamycine et une cassette de clonage flanquée du promoteur 35S du CaMV et du terminateur 35S.

### 3. Milieux de cultures

#### a. Milieu LB

Le milieu de culture le plus couramment utilisé est le milieu complet!LB (Luria Bertani) (Bactotryptone 1%, Extrait de levure 0,5 %, NaCl 0,5 %, pH 7,4).

#### b. Milieu ZB

C'est un milieu plus pauvre que le précédent, utilisé pour l'induction de la synthèse de protéines. Il contient 1% de bactotryptone et 0,5% de NaCl.

#### c. Milieu YEB

Milieu utilisé pour la culture des agrobactéries. Il contient 0,5% de Bacto-Beef Extract, 0,1% de Bacto-Yeast Extract, 0,5% de Bacto-peptone, 0,5% de saccharose. On l'ajuste à un pH de 7.2 et après autoclavage, on rajoute 2mM de MgSO<sub>4</sub>.

Les milieux LB ZB ou YEB peuvent être solidifiés à l'aide de 1,5% d'agar.

Les différents milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C durant 30!min puis additionnés, si nécessaire, d'antibiotique [ampicilline (100!µg/ml), kanamycine (30!µg/ml)

pour *E. coli* et 100 µg/ml pour *A. tumefaciens*), tétracycline (15 µg/ml) chloramphénicol (25 µg/ml) ou rifampicine (pour *A. tumefaciens* 100 µg/ml)].

Les bactéries sont cultivées en milieu liquide sous agitation, ou sur milieu solide, à une température de 37°C pour les souches dérivant d'*E. coli* et de 28°C pour les agrobactéries.

## IV. Étude du PTGS

### 1. Préparation des agrobactéries

Les agrobactéries sont mises en préculture dans 5 ml de LB en présence de tétracycline (5 µg/ml) et de kanamycine (50 µg/ml) pendant environ 20h à 28°C. La préculture est utilisée pour ensemer 50 ml de milieu de culture (LB, tétracycline 5 µg/ml, kanamycine 50 µg/ml, MES 10 mM, acétosyringone 20 µM) mis sous agitation, pendant 18h à 28°C. Les agrobactéries sont ensuite sédimentées (10 min à 5000 rpm), resuspendues dans 10 ml de solution MMA (MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 10 mM, acétosyringone 150 µM) et la DO<sub>600nm</sub> est ajustée à 1 dans le tampon MMA. La suspension bactérienne est incubée à température ambiante 2 à 3 heures avant l'infiltration.

### 2. Obtention de plantes silencées

On infiltre des plants de *Nicotiana benthamiana* lignée 16c. Cette lignée transgénique porte une seule copie du transgène correspondant à l'ORF codant pour une GFP modifiée par Haselhoff *et al.* (1997) au niveau d'un locus unique et de manière homozygote (Ruiz *et al.*, 1998). Ces plantes font apparaître une fluorescence verte lorsqu'elles sont éclairées sous UV. L'infiltration des agrobactéries possédant le plasmide pBin-GFP (M&M/III-2 b) est réalisée sur ces plantes au stade 4 feuilles avec une seringue de 2 ml sans aiguille. On applique la seringue sur la face supérieure de la feuille préalablement blessée par piqûre. On infiltre toutes les feuilles sauf les cotylédons. Le silencing de la GFP se traduit par la disparition de la fluorescence verte et peut être observé dans les feuilles infiltrées au bout de 4 jours et dans les feuilles néoformées à partir du huitième jour.

### 3. Co agro-infiltration ou patch-test

Pour tester l'activité de suppression du PTGS d'une protéine virale, on réalise une agro-infiltration avec un mélange d'agrobactéries dont l'une des souches possède le plasmide pBin-GFP et l'autre souche un plasmide pBin!61 portant le gène de la protéine virale à étudier. Les 2 suspensions bactériennes sont préparées de la même manière que précédemment puis sont mélangées volume à volume, chacune à une  $DO_{600nm}$  de 1, et le mélange est utilisé pour infiltrer des plantes GFP lignée 16c.

## V. Techniques de clonage

### 1. Amplification d'un fragment de DNA par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique permet l'amplification *in vitro* d'un fragment de DNA de manière exponentielle grâce à l'utilisation de la DNA polymérase thermostable isolée de *Thermus aquaticus* (Taq). Elle nécessite l'utilisation de deux amorces oligodésoxyribonucléotidiques spécifiques de la séquence à amplifier. La réaction se déroule en 20 à 30 cycles comportant une étape de dénaturation du DNA matrice, une étape d'hybridation des amorces avec les brins matrices, suivie d'une étape d'élongation des amorces dont la durée dépend de la taille du fragment à amplifier. Les conditions générales de l'amplification sont les suivantes!:

DNA (10!ng/!μl)	2!μl
Oligonucléotide 1 (20!ng/!μl)	10!μl
Oligonucléotide 2 (20!ng/!μl)	10!μl
BSA à 2!mg/ml	2!μl
Tampon PCR ×10 [Tris-HCl 750!mM, pH 8,8!; MgCl <sub>2</sub> 15!mM!; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 200!mM!; Tween 20 0,1%]	10!μl
dNTP 10!mM	2!μl
Taq DNA polymérase 2 U/!μl	0,25!μl
H <sub>2</sub> O qsp	100!μl

Chaque cycle comprend des incubations successives!: 30 sec à 95°C (étape de dénaturation), 40 sec à une température inférieure de 4°C à la plus faible des températures de fusion ( $T_m$ ) des amorces utilisées (étape d'hybridation) et de 30 sec à 2 min à 72°C (étape d'élongation). La température de fusion d'un oligonucléotide de taille inférieure à 25 nt est

donnée par la relation suivante:  $T_m = 4 \times \text{le nombre de paires G/C} + 2 \times \text{le nombre de paires A/T}$ . Pour les oligonucléotides dont la taille excède 25 nt, la formule à utiliser devient :  $T_m = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - (650 / \text{taille amorce})$ . Le temps d'élongation est déterminé sur la base de 30 sec pour obtenir un fragment de 500 pb.

Nous avons appliqué cette technique pour faire de la mutagenèse dirigée. La stratégie consiste en l'extension de fragments chevauchants par amplification PCR ("overlap extension" PCR). Cette technique (Fig. M&M-1) nécessite quatre oligonucléotides amorces (1, 2, 3 et 4) dont deux sont mutagènes (2 et 3) et deux étapes successives d'amplification par PCR. Les oligonucléotides 2 et 3 possèdent une partie homologue chevauchante qui contient la mutation que l'on veut introduire. Dans la première étape, deux amplifications par PCR sont réalisées avec les couples d'oligonucléotides (1 et 3) et (2 et 4) respectivement. Les deux fragments de DNA obtenus, qui possèdent une région commune, sont purifiés (M&M!V-7) puis utilisés comme matrice dans la seconde étape d'amplification par PCR en présence du couple d'oligonucléotides (1 et 4). Le produit final, généralement digéré par deux enzymes de restriction, peut être introduit dans un vecteur digéré par les mêmes enzymes.

## 2. Digestion par les enzymes de restriction

Ces endonucléases, qui coupent les molécules de DNA bicaténaire au niveau de séquences spécifiques, génèrent des fragments ayant soit des extrémités cohésives 5' ou 3' sortantes, soit des extrémités franches. Chaque enzyme de restriction présente une activité optimale dans un tampon spécifique et à une température donnée. En général, l'incubation se déroule pendant 1 h à 37°C.

Pour digérer 1 µg de DNA nous avons utilisé les conditions suivantes:

DNA à 1 µg/µl	1 µl à 5 µl
BSA à 2 mg/ml	1 µl
Tampon ×10 spécifique de l'enzyme	2 µl
Enzyme à 10 IU/ml	0,2 µl
H <sub>2</sub> O qsp	20 µl

Les fragments de restriction peuvent être analysés en gel d'agarose (M&M!V-6) et purifiés en gel d'agarose LMP (M&M!V-7).

### 3. Déphosphorylation d'un vecteur

La déphosphorylation empêche un vecteur linéarisé de se refermer sur lui-même lors de l'étape de ligation et favorise ainsi l'insertion du fragment de DNA à cloner.

La déphosphorylation est réalisée par action de la phosphatase alcaline d'intestin de veau, qui élimine les phosphates 5'-terminaux. Cette enzyme, thermostable, ne présente pas de spécificité étroite vis-à-vis d'un tampon d'incubation et peut donc être utilisée immédiatement après digestion par une enzyme de restriction. Classiquement, 1 µg de DNA est incubé dans 50 µl de tampon Tris-acétate 10 mM pH 7,5, acétate de magnésium 10 mM, acétate de potassium 50 mM en présence de 0,1 U de phosphatase alcaline, pendant 1 h à 55°C. L'enzyme est ensuite soit éliminée par extraction phénolique soit inactivée par chauffage à 68°C.

### 4. Phosphorylation d'un oligonucléotide

La phosphorylation est réalisée grâce à la T4 polynucléotide kinase qui catalyse le transfert du phosphate γ de l'ATP sur l'extrémité 5'-OH d'une molécule de DNA. Les conditions de phosphorylation sont!:

DNA	1 µg
ATP 50 mM	1 µl
Tampon ×10 (Tris-HCl 700 mM pH 8 MgCl <sub>2</sub> 100 mM ; DTT 50 mM)	5 µl
T4 polynucléotide kinase (10 U/ml)	1 µl
H <sub>2</sub> O qsp	50 µl

La réaction se fait à 37°C pendant 30 min. Elle est stoppée par extraction phénolique.

Pour obtenir un oligonucléotide radiomarqué, on incube 20 ng d'oligonucléotide dans 20 µl de milieu réactionnel, en présence de 10 µCi d'ATP[γ-<sup>32</sup>P] à 3000 Ci/mmol à la place de l'ATP.

### 5. Création d'extrémités franches à partir des extrémités 5' sortantes d'un fragment de DNA

Lorsque les extrémités cohésives d'un vecteur et d'un fragment de DNA ne sont pas compatibles, on peut les rendre franches afin de permettre la ligation.

On utilise le fragment de Klenow de la DNA polymérase I d'*E. coli* qui possède une activité polymérasique 5'→3' et une faible activité exonucléasique 3'→5' mais pas d'activité exonucléasique 5'→3'. La réaction est réalisée pendant 30!min à 37°C dans le milieu réactionnel suivant!:

DNA	1 µg
Tampon ×10 (Tris-HCl 500 mM pH 7,8 ; MgCl <sub>2</sub> 50 mM ; β-mercaptoéthanol 100 mM)	5 µl
dNTP 2 mM	2 µl
Klenow (1 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O qsp	50 µl

### 6. Analyse des fragments de DNA par électrophorèse en gel d'agarose

Les fragments de DNA obtenus par digestion enzymatique sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose dont le pourcentage (0,8 à 2,5 %) varie selon la taille des fragments à analyser. Le DNA, en suspension dans le tampon de charge (Tris-HCl 2!mM pH!8, EDTA 10!mM, saccharose 5%, BBP 0,01%), est déposé sur le gel préparé dans du tampon TBE x0,5 (Tris-Borate 100!mM pH!8,3, EDTA 2!mM). Après électrophorèse à 100!V dans le tampon TBE x0,5, le gel est coloré au BET (0,5!µg/ml) et les fragments de DNA sont visualisés sous lumière UV.

### 7. Purification de fragments de DNA à partir d'un gel d'agarose LMP

Les fragments de DNA sont purifiés en gel d'agarose LMP ("Low Melting Point"), qui a la propriété de fondre à 65°C. L'électrophorèse est réalisée au froid dans les conditions décrites dans le paragraphe V-6. Les bandes de gel contenant les fragments de DNA désirés sont identifiées sous lumière UV, puis découpées et chauffées pendant 10!min à 65°C dans 400!µl de tampon Tris-HCl 200!mM pH!8, EDTA 1!mM. Le DNA est purifié par une extraction au phénol-Tris, puis une extraction au phénol-Tris/chloroforme/alccol isoamylique suivie par un lavage à l'éther. Il est ensuite précipité par addition de 2 volumes d'éthanol en présence de NaCl 200!mM et de 5!µg de tRNA d'*E. coli*. Après centrifugation pendant 30!min à 15000!rpm, le culot de DNA est lavé à l'éthanol 80%, séché et remis en suspension dans de l'eau.

## 8. Ligation

La T4 DNA ligase catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'-hydroxyle et 5'-phosphate des molécules de DNA.

### a. Ligation des fragments de DNA dans l'agarose LMP

Après migration sur gel LMP et coloration au BET, les bandes correspondant au vecteur et à l'insert sont découpées sous UV. La ligation des fragments peut être réalisée directement dans l'agarose : les bandes sont chauffées 10 min à 65°C avant d'être ajoutées au milieu de ligation. Les conditions de ligation sont les suivantes!:

Vecteur	50 à 500 ng
Insert (rapport stoechiométrique de 1:3)	50 à 500 ng
Tampon ×5 (Tris-HCl 250 mM pH 7,6 ; MgCl <sub>2</sub> 50 mM ; DTT 5 mM ; ATP 5 mM ; PEG8000 25%)	20 µl
T4 DNA ligase (1 U/µl)	1 ou 3 µl
H <sub>2</sub> O qsp	100 µl

L'incubation se fait pendant une nuit à 16°C en présence de 1 ou 3 µl d'enzyme suivant que les extrémités à liguer sont cohésives ou franches. L'extraction du DNA après ligation dans l'agarose est réalisée selon le même protocole que celui utilisé pour la purification des bandes de DNA à partir d'agarose. Le culot est remis en suspension dans 10 µl d'eau.

### b. Ligation de fragments de DNA purifiés

Les fragments purifiés à partir du gel LMP peuvent être ligués dans les conditions suivantes!:

Vecteur	50 à 500 ng
Insert (rapport stoechiométrique de 1:3)	50 à 500 ng
BSA (2 mg/ml)	1 µl
ATP 50 mM	0,5 µl
Tampon ×5 (Tris-HCl 250 mM pH 7,6 ; MgCl <sub>2</sub> 50 mM ; DTT 5 mM ; ATP 5 mM ; PEG8000 25%)	2 µl
T4 DNA ligase (1 U/µl)	1 ou 3 µl
H <sub>2</sub> O qsp	20 µl

Après extraction phénolique et précipitation éthanolique en présence de NaCl 200!mM et de 5 µg de tRNA, les produits de ligation sont repris dans 10 µl d'eau.

## 9. Transformation de bactéries par la technique d'électroporation

### a. Préparation des bactéries compétentes

Les bactéries sont cultivées à 37°C dans 1 litre de milieu LB jusqu'à une  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,5 à 0,8. La culture est placée 30!min dans la glace puis, après des centrifugations successives de 15!min à 4000!rpm, le culot bactérien obtenu est remis en suspension d'abord dans 1 litre d'eau froide, ensuite dans 1/2 litre d'eau froide, puis dans 20!ml de glycérol 10!% et finalement dans 2 à 3!ml de glycérol 10!%. Les bactéries ainsi préparées peuvent être congelées dans la carboglace et stockées à -80°C pendant plusieurs mois.

### b. Électrotransformation

Cette méthode de transformation très efficace est réalisée à l'aide d'un électroporateur (BioRad) dans une cuve dont les électrodes sont distantes de 2!mm. Le contrôleur d'impulsions est réglé sur 25!µF de capacité et 2,5!kV/cm, la résistance étant ajustée à 200!W. 40!µl de bactéries compétentes sont décongelés à température ambiante puis ajoutés à 1!µl de produits de ligation. Après passage du courant électrique, les bactéries sont additionnées d'1!ml de LB, incubées 30!min à 37°C puis étalées sur milieu gélosé sélectif. Après croissance pendant une nuit à 37°C, les colonies transformées sont analysées par les méthodes décrites ci-après.

## 10. Analyse et purification des clones recombinants

### a. Analyse des clones

#### - Analyse par PCR!:

Les colonies recombinantes peuvent être analysées par PCR. Pour cela les colonies ayant poussé sur la boîte de Petri contenant le milieu de culture solidifié sont repiquées à la fois sur boîte et dans le milieu réactionnel suivant!:

Oligonucléotide 1 (1!µg/µl)	0,1!µl
Oligonucléotide 2 (1!µg/µl)	0,1!µl
BSA à 2!mg/ml	1!µl



Tampon PCR ×10 [Tris-HCl 750mM, pH8,8; MgCl <sub>2</sub> 15mM; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 200mM; Tween 20 0,1%]	5μl
dNTP 10mM	1μl
Taq DNA polymérase 2U/μl	0,15μl
H <sub>2</sub> O qsp	50μl

L'utilisation de couples d'oligonucléotides adéquats permet de déterminer la présence et l'orientation de l'insert.

*- Préparation de petites quantités de DNA plasmidique (minipréparation):*

1,5ml de milieu liquide sélectif estensemencé avec une colonie recombinante et le DNA plasmidique est extrait selon la technique de la lyse alcaline décrite par Sambrook *et al.* (1989). Cette technique permet d'extraire un DNA suffisamment pur pour être analysé par digestion enzymatique (M&M<sup>IV</sup>-2) et par séquençage.

b. Purification du DNA plasmidique (maxipréparation)

Le DNA plasmidique des clones à amplifier est extrait selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989) à partir de 300ml de milieu de culture.

Le DNA plasmidique est purifié en gradient de chlorure de césium en présence de BET dans les conditions suivantes: le DNA plasmidique est remis en suspension dans 4 ml de tampon TE (Tris-HCl 10mM, pH8; EDTA 1mM). Après addition de 4,5g de chlorure de césium et de 50μl de BET (10mg/ml), le DNA est centrifugé 5h à 65000rpm dans un rotor vertical Beckman Vti65 à 20°C. La bande la plus dense, qui correspond au DNA plasmidique, est récoltée sous lumière UV, additionnée de 2 volumes d'eau et le DNA est précipité par 9 volumes d'éthanol. Après centrifugation à 6000 rpm pendant 20 min, le DNA est dissous dans 400μl de tampon (Tris-HCl 20mM, pH8; NaCl 200mM) puis soumis à deux extractions phénoliques, suivies d'un lavage à l'éther. Le DNA est ensuite précipité par addition d'éthanol et après centrifugation, lavage et séchage, il est repris dans de l'eau. La concentration du DNA plasmidique est déterminée par lecture de la DO à 260nm.

## **VI. Extraction et analyse des acides nucléiques**

## 1. Extraction et analyse du DNA génomique de plante

### a. Extraction du DNA génomique

L'extraction du DNA génomique est faite sur 0,5 g de plantes à l'aide du kit Dneasy de QIAGEN suivant les instructions du fabricant.

### b. Analyse du DNA génomique de plante (Southern Blot)

10 µg de DNA génomique sont digérés en présence de spermidine 2,5 mM par 200 U d'enzyme de restriction. Après extraction au phénol/chloroforme, le DNA est précipité et repris dans 10 µl d'eau. Les fragments de DNA ainsi obtenu sont séparés sur un gel d'agarose 0,8 % préparé dans du tampon TAE<sub>x1</sub> (Tris-Acétate 40mM ; EDTA 1 mM pH 8)

Les fragments de DNA sont ensuite transférés en présence de SSC x6 (Citrates de Sodium 0,09 M ; NaCl 0,9 M) sur membrane de nylon "Hybond-N" (Amersham) après traitement du gel dans les conditions suivantes : le gel est placé dans une solution d'HCl 0,25 M pendant 15 min, sous agitation douce, permettant ainsi la dépurination partielle du DNA. Puis il est lavé deux fois 30 min dans une solution de NaOH 0,5 M ; NaCl 1,5 M. Ce traitement a pour but d'hydrolyser le DNA au niveau des sites dépurinés, ce qui augmente la vitesse et l'efficacité du transfert sur la membrane. La dernière étape du traitement consiste en une neutralisation de deux fois 30 min avec une solution de Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 ; NaCl 1,5 M ; EDTA 1 mM.

Après transfert, les fragments de DNA sont liés de manière irréversible à la membrane par irradiation aux UV (254 nm) puis la membrane est préhybridée 2 h à 42°C dans une solution de SSC x6 ; SDS 0,5 % ; Denhardts x5 ; formamide désionisée 50 % ; dextran sulfate 10 % ; DNA de sperme de saumon (25 µg/ml). La sonde obtenue par "random priming" est dénaturée 5 min à 100°C puis ajoutée au milieu de préhybridation. Après 48 h d'hybridation à 42°C, la membrane est lavée deux à trois fois 15 min à 42°C dans une solution de SSC x2 ; SDS 0,1 % puis dans une solution de SSC x0,2 ; SDS 0,1 %. La membrane est ensuite autoradiographiée.

## 2. Transcription *in vitro*

La transcription est réalisée à partir de DNA plasmidique recombinant possédant les promoteurs des bactériophages T3 ou T7 en amont du fragment de DNA inséré. En utilisant la RNA polymérase adéquate, il est possible d'obtenir le RNA correspondant au DNA inséré. Afin de limiter la transcription au seul insert, le DNA plasmidique est au préalable linéarisé

par une enzyme de restriction dont le site unique se trouve directement en aval du fragment de DNA à transcrire.

#### a. Synthèse de RNA artificiels cappés

La transcription est réalisée en présence de m<sup>7</sup>GpppG, un analogue de la coiffe (ou cap), selon les conditions détaillées dans le tableau M&M-1. Afin de favoriser l'incorporation de ce groupement en 5' des transcrits synthétisés, le GTP est utilisé en faible concentration au début de l'incubation. Après 30 et 60 min, du GTP est ajouté au milieu réactionnel pour éviter que la quantité de ce ribonucléotide ne devienne limitante. En fin de réaction, les transcrits sont soumis à une extraction phénol-eau, suivie d'une extraction phénol-Tris/chloroforme/alcool isoamylique, d'un lavage à l'éther puis à une précipitation en présence de quatre volumes d'éthanol et de un volume d'acétate d'ammonium 4M. Après centrifugation, le culot de RNA est lavé à l'éthanol 80% puis repris dans l'eau stérile.

#### b. Synthèse de sondes ribonucléiques

Les sondes RNA sont obtenues par transcription en présence d'UTP[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]. Le protocole permettant la synthèse de ces sondes ribonucléiques est décrit dans le tableau M&M-1. Après 1h d'incubation, le milieu réactionnel est additionné de DNase afin d'éliminer le DNA matrice pour qu'il n'interfère pas lors de l'hybridation. Après extraction phénolique, les RNA sont précipités en présence de quatre volumes d'éthanol et d'un volume d'acétate d'ammonium 4M. Après centrifugation, le culot est repris dans 100  $\mu$ l d'eau stérile.

### **3. Analyse des RNA en gel d'agarose en conditions dénaturantes**

Les RNA sont analysés par électrophorèse en gel dénaturant (agarose 1% ; HEPES-KOH 20mM, pH 7,8 ; EDTA 1mM ; formaldéhyde 6%). Les échantillons, en suspension dans le tampon HEPES-KOH 20mM, pH 7,8 ; EDTA 1mM ; formamide désionisé 50% ; formaldéhyde 16% ; glycérol 50% ; bleu de bromophénol 0,01%, sont chauffés à 65°C pendant 5 min, puis déposés sur le gel. L'électrophorèse est réalisée à 100 V dans le tampon HEPES-KOH 20mM, pH 7,8, EDTA 1mM. Les RNA sont révélés par coloration du gel dans le tampon acétate de sodium 10mM pH 5,5 ; acétate de magnésium 1mM ; orthotoluidine 0,05% et décoloration dans de l'eau ou de l'acide acétique 1%.

#### 4. Détection des RNA par la technique de Northern-blot

Cette méthode est basée sur la détection de RNA par hybridation moléculaire au moyen de sondes radioactives spécifiques.

Après séparation par électrophorèse en gel d'agarose dénaturant, les RNA sont transférés par capillarité sur une membrane HYBOND (Amersham) dans du tampon SSC $\times 20$  (NaCl 3M, citrate de sodium 300mM) pendant une nuit. Après un bref lavage dans du SSC $\times 10$ , les RNA sont fixés sur la membrane HYBOND par irradiation aux UV (254nm, 120mJoules) dans un Stratalinker. Les RNA cellulaires sont visualisés sous UV grâce à l'addition de BET dans le tampon de charge (0,005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) et constituent un témoin de charge. Les RNA viraux sont détectés par hybridation moléculaire à l'aide de sondes radioactives spécifiques.

La membrane HYBOND est incubée pendant 2h à 60°C dans 10ml de tampon d'hybridation (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, pH6,5; formamide 50%; SSC x5; solution de Denhardt  $\times 8$  [BSA 0,16%, PVP 0,16%, Ficoll 0,16%]; SDS 0,1%; DNA de sperme de saumon 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; RNA de levure 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Le milieu d'hybridation est ensuite additionné de 1.10<sup>6</sup> à 5.10<sup>6</sup> cpm de la sonde radioactive. L'hybridation est effectuée à 55°C pendant 16h sous agitation douce.

Afin d'éliminer les hybridations aspécifiques, la membrane HYBOND est lavée à 65°C, deux fois pendant 20min dans une solution SSC $\times 2$ , SDS 0,1% et deux fois pendant 20min dans une solution SSC $\times 0,2$ , SDS 0,1%, puis séchée et autoradiographiée. Le signal radioactif peut être quantifié à l'aide d'un phosphorimager FUJIX BAS 1000.

#### 5. Extraction et analyse des siRNA

Cette technique est utilisée pour visualiser les RNA de 21-23 nt générés lors du phénomène de PTGS. Les feuilles récoltées sont réduites en poudre dans de l'azote liquide. La poudre obtenue (0,5 à 1g) est broyée dans un mortier en présence de tampon (Tris HCl 50mM, pH9; EDTA 10mM; SDS 2%; NaCl 0,1M; ProteinaseK 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) à raison de 10ml/g de poudre. Le broyat obtenu est soumis à deux extractions phénoliques et les acides nucléiques totaux sont précipités par deux volumes d'éthanol. Après centrifugation, le culot est repris dans 400 $\mu\text{l}$  d'eau, chauffé à 65°C pendant 5min puis les RNA sont précipités à 4°C pendant au moins 30min par du PEG 8000 5% final et du NaCl 0,5M final. Après centrifugation à 10000g pendant 10min, les RNA de haut poids moléculaire se retrouvent dans le culot. Les RNA de bas poids moléculaire contenus dans le surnageant sont précipités

par 3 volumes d'éthanol, à -20°C pendant au moins 3h. Après centrifugation à 10000g, ces RNA sont remis en suspension dans du formamide 50%, chauffés à 65°C pendant 5 min et additionnés de 1/3 de volume de tampon de charge (TBE 0,5%; Saccharose 40%; Bleu de bromophénol 0,1%).

Les RNA de 21 à 23 nucléotides sont analysés sur gel de polyacrylamide (19:1) 15%, urée 7M, TBE 0,5. On utilise comme marqueur de poids moléculaire un oligonucléotide de 25nt marqué à l'ATP[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] à l'aide de la T4 polynucléotide kinase (M&M V-4). Le gel est ensuite électrotransféré sur une membrane HYBOND pendant 2h (500mA) dans du TBE 0,5. Puis la membrane est équilibrée dans du SSCx20 et les RNA sont fixés par irradiation aux UV. Finalement la membrane est mise à préhybrider dans le tampon d'hybridation (formamide 50%; SDS 7%; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, pH 7; NaCl 0,3M; Denhardt's x5; DNA sperme de saumon 100µg/ml) à 40°C pendant au moins 1h.

Les sondes RNA radioactives (M&M VI-2 b) sont soumises à une hydrolyse alcaline à 60°C dans du tampon carbonate 200mM (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 120mM, NaHCO<sub>3</sub> 80mM) pendant le temps nécessaire pour obtenir des fragments de 50 à 100nt et déterminé par la formule :  $t = (Li - Lf) / (k \cdot Li \cdot Lf)$  où t est le temps en minutes, Li la longueur initiale de la sondes (en kb), Lf la longueur finale et k une constante égale à 0,11 kb.min<sup>-1</sup>. L'hydrolyse est arrêtée par addition de NaOAc 180mM, pH 5. Les sondes obtenues sont ajoutées au milieu de préhybridation et l'hybridation est effectuée à 40°C pendant 16h sous agitation douce. Afin d'éliminer les hybridations aspécifiques, la membrane est lavée à 50°C, deux fois 20min dans une solution SSCx2, SDS 0,2% puis séchée et autoradiographiée.

## 6. Analyse de l'état transcriptionnel d'un gène (Run-off transcription)

Cette technique permet d'isoler les transcrits en cours de synthèse dans le noyau afin de déterminer si un gène donné dont l'expression est éteinte est sujet au TGS ou au PTGS. La technique employée dérive essentiellement de Dehio and Schell (1994).

### a. Extraction de noyaux de *N. benthamiana*

10 g de feuilles sont réduits en poudre dans l'azote liquide puis homogénéisés dans un tampon de broyage ( tampon A (Saccharose 250 mM, MES pH6.6 10 mM, EDTA 0.5 mM, spermine 0.15 mM, spermidine 1.38 mg/ml, NaCl 10mM, β mercaptoéthanol 0.12%, Pefabloc AEBSF (Roche®) 200 mM) + Dextran T40 10%, Triton x1). Le mélange obtenu est filtré à travers du Miracloth® (Calbiochem®) et réparti dans des tubes Corex 30 que l'on

centrifuge à 3500 rpm dans une JA-20. Les culots sont alors resuspendus dans 1-2 ml du tampon A et le tout est chargé sur des gradients de Percoll (40% - 60% - 80% - Saccharose 2M) dans des corex 30 et mis à centrifuger 15 min à 2600 rpm dans une JS-13. Les noyaux se retrouvent au fond du tube sur le culot d'amidon, ils sont décollés avec un pinceau (sans toucher l'amidon) et dilués 10X dans le tampon B (Tris pH 7.8 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, glycérol 20% et β mercaptoéthanol 0.07%). Les noyaux sont alors lavés dans du tampon B et centrifugés à deux reprises 5 min à 5000 rpm dans une JA-20 et repris dans 200 µl de tampon B, ils sont ensuite conservés à - 80°C. Le comptage des noyaux se fait dans une cellule de Mallasez à partir de 10 µl de suspension nucléaire diluée dans 1 ml de tampon B additionné de DAPI à 1 µg/µl (rendement attendu!: 2-5.10<sup>7</sup> noyaux/10 g de tissus).

#### b. Run-off transcription

3.10<sup>6</sup> noyaux sont repris dans 300 µl de tampon B et placés dans le mélange réactionnel suivant!:

RNasine 25 U/µl	10 µl
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> M	15 µl
MgCl <sub>2</sub> 0.1M	10 µl
MnCl <sub>2</sub> 0.1 M	4 µl
ATP, CTP, GTP 20mM	11 µl
UTP 125 µM	3 µl
UTP[α- <sup>32</sup> P] 10 µCi/µl	25 µl
H <sub>2</sub> O	22 µl

Ce mélange est placé 30 min à 29°C, puis on ajoute 16 µl d'H<sub>2</sub>O, 16 µl de tRNA 10mg/ml, 40 µl de tampon C (Hepes pH7.6 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM et CaCl<sub>2</sub> 5 mM) et 150 U de DNase et le tout est placé 30 min à 37°C. On ajoute alors 50 µl de tampon D (Tris pH7.5 100 mM, EDTA 50 mM et SDS 10%) et 10 µl de protéinase K (10mg/ml) sont alors additionnés avant de laisser la réaction 25 min à température ambiante. Les transcrits marqués sont ensuite extraits au phénol/chloroforme et précipités la nuit à - 20°C par 2 vol d'alcool et 2M d'acétate d'ammonium. Après centrifugation et lavage à l'alcool 70°, on reprend dans 200µl de tampon TE + 200 µl de tampon d'hybridation (SSC X6, formamide 10%, SDS 0.1%, Denhardt 5X, tRNA 100µg/µl et Sulfate de Dextran 10%).

Ces transcrits cellulaires vont être utilisés comme sonde pour révéler une membrane sur laquelle sont fixés les plasmides contenant la séquence du gène étudié

Pour l'hybridation, on utilise du Hybond N+, que l'on mouille à l'eau puis du SSC X10. Par slot-blot, on charge sur la membrane 2 fois 50 µl de solution contenant 2 µg de plasmide, NaOH 0.1 M, SSC X10 et préalablement dénaturée 15 min à 95°C. On lave ensuite les slots avec 200 µl de SSC X10 et la membrane est fixée aux UV. La membrane est préhybridée la nuit dans 4 ml de tampon d'hybridation à 42 °C. On ajoute ensuite la sonde (les transcrits marqués) et l'on hybride 48h à 42°C. La membrane est lavée 2 fois 15 min dans du SSC X2, 0.1% SDS à 42°C et 2 fois 10 min dans du SSC X0.2, 0,1% SDS à 55°C.

## VII. Préparation et analyse des protéines

### 1. Préparation des protéines

#### a. Traduction *in vitro*

La traduction des RNA est réalisée en présence de <sup>35</sup>S-méthionine (NEG009A, Perkin Elmer) dans un extrait acellulaire de germes de blé commercialisé par Promega. Les conditions de traduction sont celles conseillées par le fournisseur. Les produits de traduction sont ensuite analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Avant dépôt, les protéines sont dénaturées par addition d'un volume de tampon de dissociation (Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 10%; β-mercaptoéthanol 25%) et chauffées à 100°C pendant 3 min.

#### b. Protéines de plantes et de protoplastes

200 mg de feuilles sont broyées dans 200 µl de tampon de dissociation. Les protoplastes (1.10<sup>6</sup>) sont sédimentés 2 min à 800 rpm et le culot est repris dans 100 µl de tampon de dissociation. Les protéines de plantes ou de protoplastes sont dénaturées par chauffage à 100°C pendant 3 min et après élimination des débris cellulaires par centrifugation, sont déposées sur un gel de polyacrylamide dénaturant et analysées par Western blot.

### 2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. On utilise un système de gels et de tampons discontinus, décrit par (Laemmli, 1970),

qui permet de concentrer les échantillons en une bande très fine dans un "gel de concentration" puis de séparer les protéines selon leur masse moléculaire dans un "gel de séparation". Le tableau M&M-2 donne la composition des gels, dont le pourcentage varie en fonction de la taille des protéines à séparer.

Après électrophorèse à 30 mA (avec une limitation à 150 V) dans le tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1%, le gel est soit fixé pendant une heure dans un mélange éthanol à 25% et acide acétique à 10%, puis séché sous vide à 80°C et placé sous autoradiographie, soit transféré sur membrane Immobilon™-P (Millipore).

### **3. Immunodétection (Western-blot)**

#### **a. Principe**

La technique consiste à séparer les protéines en gel de polyacrylamide dénaturant puis à les transférer sur membrane Immobilon™-P. La révélation d'une protéine particulière est ensuite réalisée à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre cette protéine.

#### **b. Transfert sur Immobilon™-P**

Les protéines contenues dans les extraits de protoplastes ou de feuilles sont soumises à une électrophorèse à 30 mA (150 V) en gel de polyacrylamide dénaturant. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane Immobilon™-P. Le gel et la membrane sont pris en "sandwich" entre deux papiers Whatman 3MM et deux "scotch brite". Le montage est réalisé dans le tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM et le transfert se fait par électrophorèse, à 400 mA pendant 2 h, dans le même tampon.

#### **c. Immunorévélation**

Après transfert, la membrane est lavée dans du tampon PBS pH 7,4, Tween 20 1% (A) puis incubée dans du tampon B (tampon PBS, lait en poudre 5%, Tween 20 1%) pour saturer les sites libres et éviter, par la suite, les réactions aspécifiques. Elle est ensuite incubée dans le tampon B additionné de sérum de lapin contenant des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine recherchée. Après trois lavages dans le tampon A, on procède à une nouvelle incubation dans le tampon B pendant 1 h, puis pendant 4 h en présence d'anticorps secondaires, couplés soit à la peroxydase soit à la phosphatase alcaline. Après trois lavages dans le tampon A et un lavage dans le tampon PBS, Tween 20 0,1% (pour la peroxydase) ou dans le tampon DEA 100 mM pH 9 (pour la phosphatase alcaline), les



complexes formés par l'antigène (la protéine recherchée) et les anticorps sont révélés par réaction chimiluminescente en utilisant le kit Pierce (couplé à la peroxydase) ou BioRad (couplé à la phosphatase alcaline). Pour cela le substrat de l'enzyme est déposé sur la face transférée de la membrane et après 5 minutes de réaction à l'obscurité et à température ambiante la membrane est placée sous autoradiographie.

#### **4. Test d'interaction protéine-protéine**

Ce test est aussi appelé "Farwestern assay". Le milieu contenant le premier partenaire de l'interaction est migré sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (M&M VII-2) puis après électrotransfert sur Immobilon™-P, les protéines sont renaturées par 3 lavages de la membrane à 4°C dans du tampon HB (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; KCl 75 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM; NaCl 300 mM). La membrane est ensuite incubée pendant 2 h avec le deuxième partenaire de l'interaction, obtenu par traduction *in vitro* en présence de <sup>35</sup>S-méthionine, dans du tampon HB en présence de lait 5%. Après 3 lavages dans du tampon PBS pH 7,4, Tween 20 1%, la membrane est autoradiographiée.

### **VIII. Localisation subcellulaire des protéines virales**

Les protéines étudiées sont fusionnées à un rapporteur (GFP, RFP) et peuvent être détectées en microscopie à épifluorescence ou confocale soit après électroporation de protoplastes de BY-2 (cf. M&M II-4) avec des transcrits viraux contenant la construction d'intérêt, soit après bombardement de cellules BY-2 avec un plasmide contenant la fusion protéine-GFP.

#### **1. Transformation de cellules BY-2 par bombardement**

##### a. Principe de la transformation avec le canon à particules

Cet appareil permet la transformation de cellules par introduction de DNA fixé sur des particules de tungstène. L'appareil est constitué d'une chambre de tir dans laquelle un vide partiel est créé (0.8-0.9 bar). Les billes de tungstène sont placées sur une grille métallique dans une buse située dans la partie supérieure de la chambre de tir. La buse est reliée à une bouteille d'hélium par l'intermédiaire d'une électrovanne qui permet de libérer à travers la buse une déflagration de durée et de pression déterminées (25 ms, 7 bars). La

déflagration projette les particules de tungstène sur les cellules BY-2 placées dans une boîte de Petri.

#### b. Préparation des cellules pour le bombardement

5 à 10 ml de cellules de tabac BY-2 de 4 jours sont déposées sur un disque de papier filtre ( $\varnothing$  3.5 cm) par aspiration douce sous vide. Le filtre est ensuite placé dans une boîte de Petri sur du milieu de culture BY-2 (cf. M&M II-4 a) additionné de 1.5% d'agar et 100 mM de mannitol et sorbitol. Les boîtes sont incubées 5h à 24°C et à l'obscurité.

#### c. Précipitation de l'ADN plasmidique sur les particules de tungstène

2 mg de billes de tungstène sont mélangés à 1 ml d'éthanol absolu, puis vortexés 3 min et laissés 30 min à température ambiante. Les billes sont alors séchées 5 min sous vide et on ajoute 33  $\mu$ l de glycérol 50% et, tout en vortexant, 10  $\mu$ l de DNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 33  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> 2M et 15  $\mu$ l de spermidine 0.5 M. Le tout est laissé 30 min à température ambiante, centrifugé 1 min à 50 g et lavé avec 150 $\mu$ l d'éthanol 70° puis 100°, avant d'être finalement repris dans 30  $\mu$ l d'éthanol 100°. Les particules sont conservées à 4°C et sont prêtes pour le bombardement (6  $\mu$ l par tir, pour une construction, 4 bombardements sur 2 boîtes).

## **2. Observations en microscopie à épifluorescence ou confocale**

Dans le cas d'un microscope à épifluorescence, la lumière émise par la source traverse les objectifs et arrive sur la préparation pour exciter les fluorochromes présents dans les échantillons. La lumière émise par les échantillons repasse par les objectifs et des filtres dichroïques permettent de discriminer la lumière d'excitation de la lumière émise. Les observations de microscopie à épifluorescence ont été effectuées sur un microscope droit Nikon Eclipse E800 équipé d'un système d'acquisition vidéo SONY DXC950P, couplé au logiciel de traitement d'images Visiolab 200 (Biocom). Une lampe à vapeur de mercure, HBO103W, et un bloc filtre [ex!460-500!nm, em!510 nm] permet l'excitation et la visualisation de la GFP. Un autre bloc filtre [ex!540+/-12,5!nm, em!605+/-27,5 nm] permet la détection des fluorochromes Alexa<sup>™</sup> 546, Alexa<sup>™</sup> 568 ou de la RFP.

L'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale a permis de pallier à ces inconvénients puisque son principe est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que

l'image de la fluorescence émise dans le plan focal. La microscopie confocale offre différents avantages par rapport à la microscopie conventionnelle pour la localisation *in situ* d'une sonde fluorescente dans des cellules et plus particulièrement dans des coupes de tissus épais :

- élimination du signal fluorescent provenant d'autres plans
- réglages électroniques du contraste, de la luminosité et de l'agrandissement
- observation simultanée de différentes sondes fluorescentes
- acquisition de séries de sections optiques permettant la reconstruction 3D.

De plus, dans le cas d'un microscope confocal, la source de lumière est un laser qui donne des raies de lumière monochromatique de longueur d'onde très précise. Le microscope confocal utilisé est un microscope inversé à balayage laser Zeiss LSM!510. Il est équipé d'un laser Argon (Ar) qui émet trois raies (454 , 488 et 514!nm) et de deux lasers Hélium/Néon (HeNe!I et!II) émettant une raie à 543!nm et une raie à 633!nm. Il dispose également de miroirs dichroïques et de filtres d'excitation et d'émission permettant l'acquisition simultanée de plusieurs signaux fluorescents distincts à partir d'un même plan optique sans risque de chevauchement de fluorescence ou "crosstalk".

**BIBLIOGRAPHIE**

**Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. and Beachy, R. N.** (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**, 738-43.

**Allan, A. C., Lapidot, M., Culver, J. N. and Fluhr, R.** (2001). An early tobacco mosaic virus-induced oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein. *Plant Physiol* **126**, 97-108.

**Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J. M., Jr., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V. B.** (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **290**, 142-4.

**Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. and Vance, V. B.** (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13079-84.

**Astier-Manificier, S. and Cornuet, P.** (1971). RNA-dependent RNA polymerase in Chinese cabbage. *Biochim Biophys Acta* **232**, 484-93.

**Atkinson, R. G., Bielecki, L. R., Gleave, A. P., Janssen, B. J. and Morris, B. A.** (1998). Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a geminivirus-based episomal vector. *Plant J* **15**, 593-604.

**Atreya, C. D. and Pirone, T. P.** (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11919-23.

**Barker, H., McGeachy, K. D., Ryabov, E. V., Commandeur, U., Mayo, M. A. and Taliansky, M.** (2001). Evidence for RNA-mediated defence effects on the accumulation of Potato leafroll virus. *J Gen Virol* **82**, 3099-106.

**Baulcombe, D. C.** (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **32**, 79-88.

**Baulcombe, D. C., Voinnet, O. and Hamilton, A.** (2001). Enhanced Expression. In *Brevet WO 01/38512 A2*. UK.

**Beclin, C., Berthome, R., Palauqui, J. C., Tepfer, M. and Vaucheret, H.** (1998). Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* **252**, 313-7.

**Beclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P. and Vaucheret, H.** (2002). A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr Biol* **12**, 684-8.

**Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6.

**Boerjan, W., Bauw, G., Van Montagu, M. and Inze, D.** (1994). Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine synthetase reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco. *Plant Cell* **6**, 1401-14.

**Bosher, J. M. and Labouesse, M.** (2000). RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* **2**, E31-6.

**Bouzoubaa, S.** (1998). Furovirus isolation and RNA extraction. Plant virology protocols: from virus isolation to transgenic resistance., vol. 81, pp. 107-114: Foster G. D. and Taylors S. C.

**Bouzoubaa, S., Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G. and Richards, K.** (1987). Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA1. *J Gen Virol* **68**, 615-626.

**Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Richards, K. and Ziegler-Graff, V.** (2000). Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J Virol* **74**, 1140-8.

**Brault, V., van den Heuvel, J. F., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Garaud, J. C., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G.** (1995). Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *Embo J* **14**, 650-9.

**Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. and Baulcombe, D. C.** (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Embo J* **17**, 6739-46.

**Bruyère, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M. T., Van den Heuvel, J. F., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G. and Herrbach, E.** (1997). Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* **230**, 323-34.

**Carrington, J. C., Cary, S. M., Parks, T. D. and Dougherty, W. G.** (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *Embo J* **8**, 365-70.

**Casper, R.** (1988). Luteoviruses. In *The Plant Viruses : Polyhedral Virions with Monopartite RNA genomes*, (ed. R. Koenig), pp. 235-258. New-York: Plenum.

**Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. and Cogoni, C.** (2002). Involvement of small RNAs and role of the *qde* genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. *Genes Dev* **16**, 790-5.

**Cerutti, L., Mian, N. and Bateman, A.** (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* **25**, 481-2.

**Chay, C. A., Gunasinge, U. B., Dinesh-Kumar, S. P., Miller, W. A. and Gray, S. M.** (1996). Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* **219**, 57-65.

**Chen, S. M., Takiff, H. E., Barber, A. M., Dubois, G. C., Bardwell, J. C. and Court, D. L.** (1990). Expression and characterization of RNase III and Era proteins. Products of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**, 2888-95.

**Citovsky, V. and Zambryski, P.** (2000). Systemic transport of RNA in plants. *Trends Plant Sci* **5**, 52-4.

**Cogoni, C. and Macino, G.** (1997). Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10233-8.

**Cogoni, C. and Macino, G.** (1999a). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* **399**, 166-9.

**Cogoni, C. and Macino, G.** (1999b). Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* **286**, 2342-4.

**Corpas, F. J., Barroso, J. B. and del Rio, L. A.** (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* **6**, 145-50.

**Covey, S. N., Al-Kaff, N. S., Langara, A. and Turner, D. S.** (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**, 781-782.

**Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C. and Carrington, J. C.** (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**, 549-59.

**Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D. C.** (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**, 543-53.

**Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T. H. and Baulcombe, D. C.** (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Embo J* **20**, 2069-78.

**de Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., Van Montagu, M., Inze, D. and Castresana, C.** (1992). Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *Embo J* **11**, 2595-602.

**Dehio, C. and Schell, J.** (1994). Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5538-42.

**del Rio, L. A., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Gomez, M. and Barroso, J. B.** (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* **53**, 1255-72.

**Ding, S. W., Li, W. X. and Symons, R. H.** (1995). A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *Embo J* **14**, 5762-72.

**Domeier, M. E., Morse, D. P., Knight, S. W., Portereiko, M., Bass, B. L. and Mango, S. E.** (2000). A link between RNA interference and nonsense-mediated Decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **289**, 1928-1930.

**Donald, R. G. and Jackson, A. O.** (1994). The barley stripe mosaic virus gamma b gene encodes a multifunctional cysteine-rich protein that affects pathogenesis. *Plant Cell* **6**, 1593-606.

**Dougherty, W. G. and Parks, T. D.** (1995). Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Curr Opin Cell Biol* **7**, 399-405.

**Dougherty, W. G., Lindbo, J. A., Smith, H. A., Parks, T. D., Swaney, S. and Proebsting, W. M.** (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 544-52.

**Dunoyer, P., Herzog, E., Hemmer, O., Ritzenthaler, C. and Fritsch, C.** (2001). Peanut clump virus RNA-1-encoded P15 regulates viral RNA accumulation but is not abundant at viral RNA replication sites. *J Virol* **75**, 1941-8.

**Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8.

**Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200.

**Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* **20**, 6877-88.

**Elmayan, T. and Vaucheret, H.** (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J* **9**, 787-797.

**English, J. J., Mueller, E. and Baulcombe, D. C.** (1996). Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* **8**, 179-188.

**Erhardt, M., Stussi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, K. E., Jonard, G. and Bouzoubaa, S.** (1999). The first triple gene block protein of peanut clump virus localizes to the plasmodesmata during virus infection. *Virology* **264**, 220-9.

**Fagard, M., Boutet, S., Morel, J. B., Bellini, C. and Vaucheret, H.** (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11650-4.

**Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.

**Gil, J. and Esteban, M.** (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* **5**, 107-14.

**Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G.** (1992). Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* **189**, 40-7.

**Gitlin, L., Karelsky, S. and Andino, R.** (2002). Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*.

**Goldbach, R. and Wellink, J.** (1988). Evolution of plus-strand RNA viruses. *Intervirology* **29**, 260-7.

**Goodwin, J. B. and Dreher, T. W.** (1998). Transfer RNA mimicry in a new group of positive-strand RNA plant viruses, the furoviruses: differential aminoacylation between the RNA components of one genome. *Virology* **246**, 170-8.



**Grosshans, H. and Slack, F. J.** (2002). Micro-RNAs: small is plentiful. *J Cell Biol* **156**, 17-21.

**Guilley, H., Richards, K. E. and Jonard, G.** (1995). Nucleotide sequence of beet mild yellowing virus RNA. *Arch Virol* **140**, 1109-18.

**Guo, H. S. and Ding, S. W.** (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *Embo J* **21**, 398-407.

**Haeberle, A. M. and Stussi-Garaud, C.** (1995). In situ localization of the non-structural protein P25 encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *J Gen Virol* **76** ( Pt 3), 643-50.

**Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-2.

**Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-6.

**Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. and Hannon, G. J.** (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146-50.

**Hansen, E. R., Petracek, M. E., Dickey, L. F. and Thompson, W. F.** (2001). The 5' End of the Pea Ferredoxin-1 mRNA Mediates Rapid and Reversible Light-Directed Changes in Translation in Tobacco. *Plant Physiol* **125**, 770-8.

**Harrison, B. D.** (1999). Steps in the Development of Luteovirology. In *The Luteoviridae*, (eds H. G. Smith and H. Barker), pp. 1-14. Oxon (UK): CAB International.

**Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C. and Hodge, S.** (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2122-7.

**Hehn, A.** (1995). Les gènes 3' proximaux du RNA 2 du BNYVV : leur rôle dans la réplication et la traduction du génome viral ainsi que dans le mouvement de cellule à cellule. In *Thèse de Doctorat*. Strasbourg: Université Louis Pasteur.

**Hehn, A., Bouzoubaa, S., Bate, N., Twell, D., Marbach, J., Richards, K., Guilley, H. and Jonard, G.** (1995). The small cysteine-rich protein P14 of beet necrotic yellow vein virus regulates accumulation of RNA 2 in cis and coat protein in trans. *Virology* **210**, 73-81.

**Hehn, A., Fritsch, C., Richards, K. E., Guilley, H. and Jonard, G.** (1997). Evidence for in vitro and in vivo autocatalytic processing of the primary translation product

of beet necrotic yellow vein virus RNA 1 by a papain-like proteinase. *Arch Virol* **142**, 1051-8.

**Herrbach, E.** (1999). Vector-Virus Interactions. In *The Luteoviridae*, (eds H. G. Smith and H. Barker), pp. 85-146. Oxon (UK): CAB International.

**Herzog, E., Guilley, H. and Fritsch, C.** (1995). Translation of the second gene of peanut clump virus RNA 2 occurs by leaky scanning in vitro. *Virology* **208**, 215-25.

**Herzog, E., Guilley, H., Manohar, S. K., Dollet, M., Richards, K., Fritsch, C. and Jonard, G.** (1994). Complete nucleotide sequence of peanut clump virus RNA 1 and relationships with other fungus-transmitted rod-shaped viruses. *J Gen Virol* **75** ( Pt 11), 3147-55.

**Herzog, E., Hemmer, O., Hauser, S., Meyer, G., Bouzoubaa, S. and Fritsch, C.** (1998). Identification of genes involved in replication and movement of peanut clump virus. *Virology* **248**, 312-22.

**Hull, R.** (2002). *Matthew's Plant Virology*: Academic Press.

**Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T. and Zamore, P. D.** (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834-8.

**Izaurralde, E., Kann, M., Pante, N., Sodeik, B. and Hohn, T.** (1999). Viruses, microorganisms and scientists meet the nuclear pore. Leysin, VD, Switzerland, February 26-March 1, 1998. *Embo J* **18**, 289-96.

**Jacobsen, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz, E. M.** (1999). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* **126**, 5231-43.

**Jacque, J. M., Triques, K. and Stevenson, M.** (2002). Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*.

**Jan, F. J., Fagoaga, C., Pang, S. Z. and Gonsalves, D.** (2000a). A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *J Gen Virol* **81**, 2103-9.

**Jan, F. J., Pang, S. Z., Tricoli, D. M. and Gonsalves, D.** (2000b). Evidence that resistance in squash mosaic comovirus coat protein-transgenic plants is affected by plant developmental stage and enhanced by combination of transgenes from different lines. *J Gen Virol* **81**, 2299-306.

**Jeddeloh, J. A., Stokes, T. L. and Richards, E. J.** (1999). Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet* **22**, 94-7.

**Ji, L. H. and Ding, S. W.** (2001). The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 715-24.

**Johansen, L. K. and Carrington, J. C.** (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol* **126**, 930-8.

**Jones, L., Ratcliff, F. and Baulcombe, D. C.** (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* **11**, 747-57.

**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**, 479-88.

**Kasschau, K. D. and Carrington, J. C.** (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**, 461-70.

**Kasschau, K. D., Cronin, S. and Carrington, J. C.** (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* **228**, 251-62.

**Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26.

**Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W.** (2000). Heritable gene silencing in drosophila using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* **18**, 896-8.

**Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J. and Plasterk, R. H.** (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* **15**, 2654-9.

**Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J. and Plasterk, R. H.** (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* **15**, 2654-9.

**Ketting, R. F., Haverkamp, T. H. A., van Luenen, H. G. A. and Plasterk, R. H.** (1999). *mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner Syndrome helicase and RNase D. *Cell* **99**, 133-141.

**Kiguchi, T., Saito, M. and Tamada, T.** (1996). Nucleotide sequence analysis of RNA-5 of five isolates of beet necrotic yellow vein virus and the identity of a deletion mutant. *J Gen Virol* **77** ( Pt 4), 575-80.

**Knight, S. W. and Bass, B. L.** (2001). A role for the RNase III DCR-1 in RNA interference and germ line development in *C. elegans*. *Science* **293**, 2269-2271.

**Koenig, R., Haeberle, A. M. and Commandeur, U.** (1997). Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Arch Virol* **142**, 1499-504.

**Koonin, E. V. and Dolja, V. V.** (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**, 375-430.

**Koonin, E. V., Boyko, V. P. and Dolja, V. V.** (1991). Small cysteine-rich proteins of different groups of plant RNA viruses are related to different families of nucleic acid-binding proteins. *Virology* **181**, 395-8.

**Kumagai, M. H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L. K.** (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1679-83.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

**Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-8.

**Lam, E., Kato, N. and Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-53.

**Lauber, E., Bleykasten-Grosshans, C., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Jonard, G., Richards, K. E. and Guilley, H.** (1998). Cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus: I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 618-25.

**Lee, M. S., Mullen, R. T. and Trelease, R. N.** (1997). Oilseed isocitrate lyases lacking their essential type 1 peroxisomal targeting signal are piggybacked to glyoxysomes. *Plant Cell* **9**, 185-97.

**Lewis, D. L., Hagstrom, J. E., Loomis, A. G., Wolff, J. A. and Herweijer, H.** (2002). Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* **32**, 107-8.

**Li, H. W., Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., Ji, L. H., Wong, S. M. and Ding, S. W.** (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *Embo J* **18**, 2683-91.

**Li, H., Li, W. X. and Ding, S. W.** (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* **296**, 1319-21.

**Li, W. X. and Ding, S. W.** (2001). Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 150-4.

**Li, Y. X., Farrell, M. J., Liu, R., Mohanty, N. and Kirby, M. L.** (2000). Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish. *Dev Biol* **217**, 394-405.

**Lindbo, J. A. and Dougherty, W. G.** (1992). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**, 725-33.

**Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M. and Dougherty, W. G.** (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.

**Lipardi, C., Wei, Q. and Paterson, B. M.** (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* **107**, 297-307.

**Llave, C., Kasschau, K. D. and Carrington, J. C.** (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13401-6.

**Lohmann, J. U., Endl, I. and Bosch, T. C.** (1999). Silencing of developmental genes in Hydra. *Dev Biol* **214**, 211-4.

**Lopez-Moya, J. J., Canto, T., Diaz-Ruiz, J. R. and Lopez-Abella, D.** (1995). Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox virus isolate with the aid of potato virus Y helper component. *J Gen Virol* **76 ( Pt 9)**, 2293-7.

**Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X. and Ding, S. W.** (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *Embo J* **19**, 1672-80.

**Mallory, A. C., Ely, L., Smith, T. H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V. B.** (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* **13**, 571-83.

**Mallory, A. C., Parks, G., Endres, M. W., Baulcombe, D., Bowman, L. H., Pruss, G. J. and Vance, V. B.** (2002). The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nat Biotechnol* **20**, 622-5.

**Manohar, S. K., Guilley, H., Dollet, M., Richards, K. and Jonard, G.** (1993). Nucleotide sequence and genetic organization of peanut clump virus RNA 2 and partial characterization of deleted forms. *Virology* **195**, 33-41.

**Mayo, M. A. and Ziegler-Graff, V.** (1996). Molecular biology of luteoviruses. *Adv Virus Res* **46**, 413-60.

**McKinney, H. M.** (1929). Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J. of Agr. Res.* **39**, 557-578.

**Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A. and Matzke, A. J.** (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* **19**, 5194-201.

**Moffatt, B. A. and Studier, F. W.** (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* **49**, 221-7.

**Mohan, B. R., Dinesh-Kumar, S. P. and Miller, W. A.** (1995). Genes and cis-acting sequences involved in replication of barley yellow dwarf virus-PAV RNA. *Virology* **212**, 186-95.

**Morel, J. B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F. and Vaucheret, H.** (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**, 629-39.

**Morel, J. B., Mourrain, P., Beclin, C. and Vaucheret, H.** (2000). DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Arabidopsis. *Curr Biol* **10**, 1591-4.

**Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N. and al.** (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533-42.

**Nagata, T., Nemoto, Y. and Hasezawa, S.** (1992). Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* **132**, 1-30.

**Napoli, C. A., Lemieux, C. and Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene *in trans*. *Plant Cell* **2**, 279-289.

**Neves-Borges, A. C., Collares, W. M., Pontes, J. A., Breyne, P., Farinelli, L. and de Oliveira, D. E.** (2001). Coat protein RNAs-mediated protection against Andean potato mottle virus in transgenic tobacco. *Plant Sci* **160**, 699-712.

**Niesbach-Klosgen, U., Guilley, H., Jonard, G. and Richards, K.** (1990). Immunodetection in vivo of beet necrotic yellow vein virus-encoded proteins. *Virology* **178**, 52-61.

**Palauqui, J. C. and Vaucheret, H.** (1998). Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9675-80.

**Palauqui, J. C., Elmayan, T., Dorlhac de Borne, F., Cr  t  , P., Charles, C. and Vaucheret, H.** (1996). Frequencies, timing, and spatial patterns of cosuppression of nitrate reductase and nitrite reductase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* **112**, 1447-1456.

**Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M. and Vaucheret, H.** (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *Embo J* **16**, 4738-45.

**Parsons, M., Furuya, T., Pal, S. and Kessler, P.** (2001). Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol* **115**, 19-28.

**Pasquinelli, A. E.** (2002). MicroRNAs: deviants no longer. *Trends Genet* **18**, 171-3.

**Pinto, Y. M., Kok, R. A. and Baulcombe, D. C.** (1999). Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. *Nat Biotechnol* **17**, 702-7.

**Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C. and Bowman Vance, V.** (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859-68.

**Putz, C.** (1977). Composition and structure of beet necrotic yellow vein virus. *J Gen Virol* **35**, 397-401.

**Putz, C. and Kuszala, M.** (1978). La rhizomanie de la betterave sucri  re en Alsace. Recherche d'une nouvelle méthode de purification du beet necrotic yellow vein virus. *Annales de Phytopathologie* **10**, 247-262.

**Putz, C., Pinck, L. and Fritsch, C.** (1983). Identification of the 3' and 5' of beet necrotic yellow vein virus. Presence of poly(A) sequence. *FEBS lett* **156**, 41-56.

**Que, Q. and Jorgensen, R. A.** (1998). Homology-based control of gene expression patterns in transgenic petunia flowers. *Dev Genet* **22**, 100-9.

**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.

**Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A. and Baulcombe, D. C.** (1999). Gene silencing without DNA : RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**, 1207-16.

**Ratcliff, F., Harrison, B. D. and Baulcombe, D. C.** (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558-1560.

**Reutenauer, A., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G.** (1993). Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology* **195**, 692-9.

**Richards, K. and Tamada, T.** (1992). Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. *Ann Rev Phytopathol* **30**, 291-313.

**Richards, K., Jonard, G., Guilley, H., Ziegler, V. and Putz, C.** (1985). In vitro translation of beet necrotic yellow vein virus RNA and studies of sequence homology among the RNA species using cloned cDNA probes. *J Gen Virol* **66**, 345-350.

**Roberts, A. G., Cruz, S. S., Roberts, I. M., Prior, D. A. M., Turgeon, R. and Oparka, K. J.** (1997). Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana* : comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell* **9**, 1381-1396.

**Rougvie, A. E.** (2001). Control of developmental timing in animals. *Nat Rev Genet* **2**, 690-701.

**Rožanov, M. N., Drugeon, G. and Haenni, A. L.** (1995). Papain-like proteinase of turnip yellow mosaic virus: a prototype of a new viral proteinase group. *Arch Virol* **140**, 273-88.

**Ruiz, M. T., Voinnet, O. and Baulcombe, D. C.** (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**, 937-46.

**Sadowy, E., Maasen, A., Juszczuk, M., David, D., Zagorski-Ostojka, W., Gronenborn, B. and Hulanicka, M. D.** (2001). The ORF0 product of *Potato leafroll virus* is indispensable for virus accumulation. *J Gen Virol* **82**, 1529-32.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

**Sanchez Alvarado, A. and Newmark, P. A.** (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5049-54.



**Scandalios, J. G.** (1990). Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv Genet* **28**, 1-41.

**Schiebel, W., Pelissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sanger, H. L. and Wassenegger, M.** (1998). Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* **10**, 2087-101.

**Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Pruffer, D., Rohde, W. and Rohfritsch, O.** (1997). In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235**, 311-22.

**Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Damsteegt, V., Webb, K. and Ravelonandro, M.** (2001). Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Res* **10**, 201-9.

**Sharp, P. A.** (1999). RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev* **13**, 139-41.

**Sijen, T. and Kooter, J. M.** (2000). Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* **22**, 520-31.

**Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. and Fire, A.** (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465-76.

**Silhavy, D., Molnar, M., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. and Burgyan, J.** (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25- nucleotides double-stranded RNAs. *Embo J* **21**, 3070-80.

**Sleat, D. E., Gallie, D. R., Jefferson, R. A., Bevan, M. W., Turner, P. C. and Wilson, T. M.** (1987). Characterisation of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation in vitro. *Gene* **60**, 217-25.

**Smardon, A., Spoerke, J. M., Stacey, S. C., Klein, M. E., Mackin, N. and Maine, E. M.** (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* **10**, 169-78.

**Stam, M. d. B., R.; Kenter, S.; van der Hoorn, R. A. L.; van Blokland, R.; Mol, J. N. M. and Kooter, J.M.** (1997). Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant J* **12**.

**Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.

**Subramani, S.** (1996). Protein translocation into peroxisomes. *J Biol Chem* **271**, 32483-6.

**Tacke, E., Prufer, D., Schmitz, J. and Rohde, W.** (1991). The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J Gen Virol* **72** ( Pt 8), 2035-8.

**Tacke, E., Schmitz, J., Prufer, D. and Rohde, W.** (1993). Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* **197**, 274-82.

**Tamada, T.** (1975). Beet Necrotic Yellow Vein Virus: CMI/AAB. Description of plant viruses n°144.

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

**Tamada, T., Schmitt, C., Saito, M., Guilley, H., Richards, K. and 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*. *J Gen Virol* **77** ( Pt 7), 1359-67.

**Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T. and Harada, T.** (1989). Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J Gen Virol* **70**.

**Thouvenel, J. C. and Fauquet, C.** (1980). *Polymyxa graminis* on new *Sorghum* species in Africa. *Plant Disease* **64**, 957-958.

**Thouvenel, J. C. and Fauquet, C.** (1981). Peanut Clump Virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* **235**.

**Thouvenel, J. C. and Fauquet, C.** (1988). Viruses with fungal vectors, Ch 18: Peanut Clump Virus in West Africa (J. I. C Cooper, and N. J. C. Asher, Eds.), Vol.2, pp. 247-254: Development in applied biology : AAB.

**Thouvenel, J. C., Fauquet, C. and Lamy, D.** (1978). Transmission par la graine du virus du "clump" de l'arachide. *Oléagineux* **33**, 503-504.

**Trochain, J.** (1931). La lèpre de l'arachide. *Rev. Bot. Appl. Agric. Trop.* **11**, 330-334.

**Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A.** (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* **13**, 3191-7.

**Vaistij, F. E., Jones, L. and Baulcombe, D. C.** (2002). Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. *Plant Cell* **14**, 857-67.

**Van Bel, A. J., Ehlers, K. and Knoblauch, M.** (2002). Sieve elements caught in the act. *Trends Plant Sci* **7**, 126-32.

**Van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J. N. M. and Kooter, J. M.** (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia Hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J* **6**, 861-877.

**Van der Biezen, E. A. and Jones, J. D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**, 454-6.

**van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. and Stuitje, A. R.** (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291-9.

**van der Wilk, F., Houterman, P., Molthoff, J., Hans, F., Dekker, B., van den Heuvel, J., Huttinga, H. and Goldbach, R.** (1997). Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 153-9.

**Vance, V. and Vaucheret, H.** (2001). RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* **292**, 2277-80.

**Vaucheret, H. and Fagard, M.** (2001). Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* **17**, 29-35.

**Vaucheret, H., Beclin, C. and Fagard, M.** (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* **114**, 3083-91.

**Veidt, I., Bouzoubaa, S. E., Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G.** (1992). Synthesis of full-length transcripts of beet western yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology* **186**, 192-200.

**Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G.** (1988). Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Res* **16**, 9917-32.

**Voinnet, O.** (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* **17**, 449-59.

**Voinnet, O., Lederer, C. and Baulcombe, D. C.** (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157-67.

**Voinnet, O., Pinto, Y. M. and Baulcombe, D. C.** (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14147-52.

**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**, 177-87.

**Wang, S., Guo, L., Allen, E. and Miller, W. A.** (1999). A potential mechanism for selective control of cap-independent translation by a viral RNA sequence in cis and in trans. *Rna* **5**, 728-38.

**Wassenegger, M.** (2000). RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol* **43**, 203-20.

**Watanabe, Y., Meshi, T. and Okada, Y.** (1987). Infection of tobacco protoplasts with *in vitro* transcribed tobacco mosaic virus RNA using an improved electroporation method. *FEBS lett* **219**, 65-69.

**Waterhouse, P. M., Graham, M. W. and Wang, M. B.** (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13959-64.

**Waterhouse, P. M., Wang, M. B. and Lough, T.** (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-42.

**Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A. and al.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**, 581-90.

**Whittaker, G. R. and Helenius, A.** (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* **246**, 1-23.

**Wianny, F. and Zernicka-Goetz, M.** (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* **2**, 70-5.

**Winston, W. M., Molodowitch, C. and Hunter, C. P.** (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* **295**, 2456-9.

**Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J. and Crooke, S. T.** (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol Chem* **275**, 36957-65.

**Wu-Scharf, D., Jeong, B. R., Zhang, C. and Cerutti, H.** (2000). Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* **290**, 1159-1162.

**Xu, J., Schubert, J. and Altpeter, F.** (2001). Dissection of RNA-mediated ryegrass mosaic virus resistance in fertile transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant J* **26**, 265-74.

**Zambryski, P., Holsters, M., Kruger, K., Depicker, A., Schell, J., Van Montagu, M. and Goodman, H. M.** (1980). Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. *Science* **209**, 1385-91.

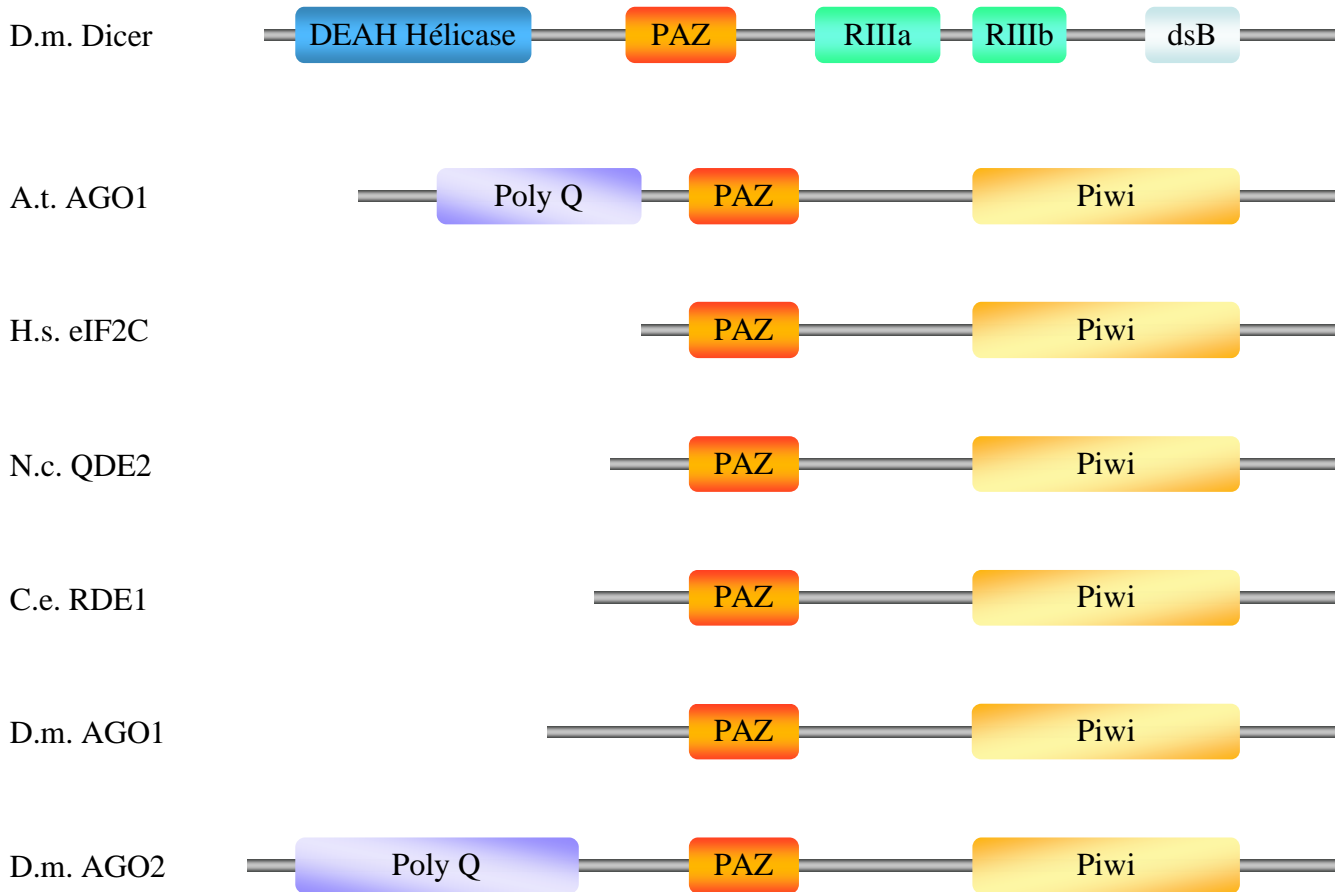
**Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.

**Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J. D., Simonis, M.-T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K. E. and Jonard, G.** (1996). The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 501-510.



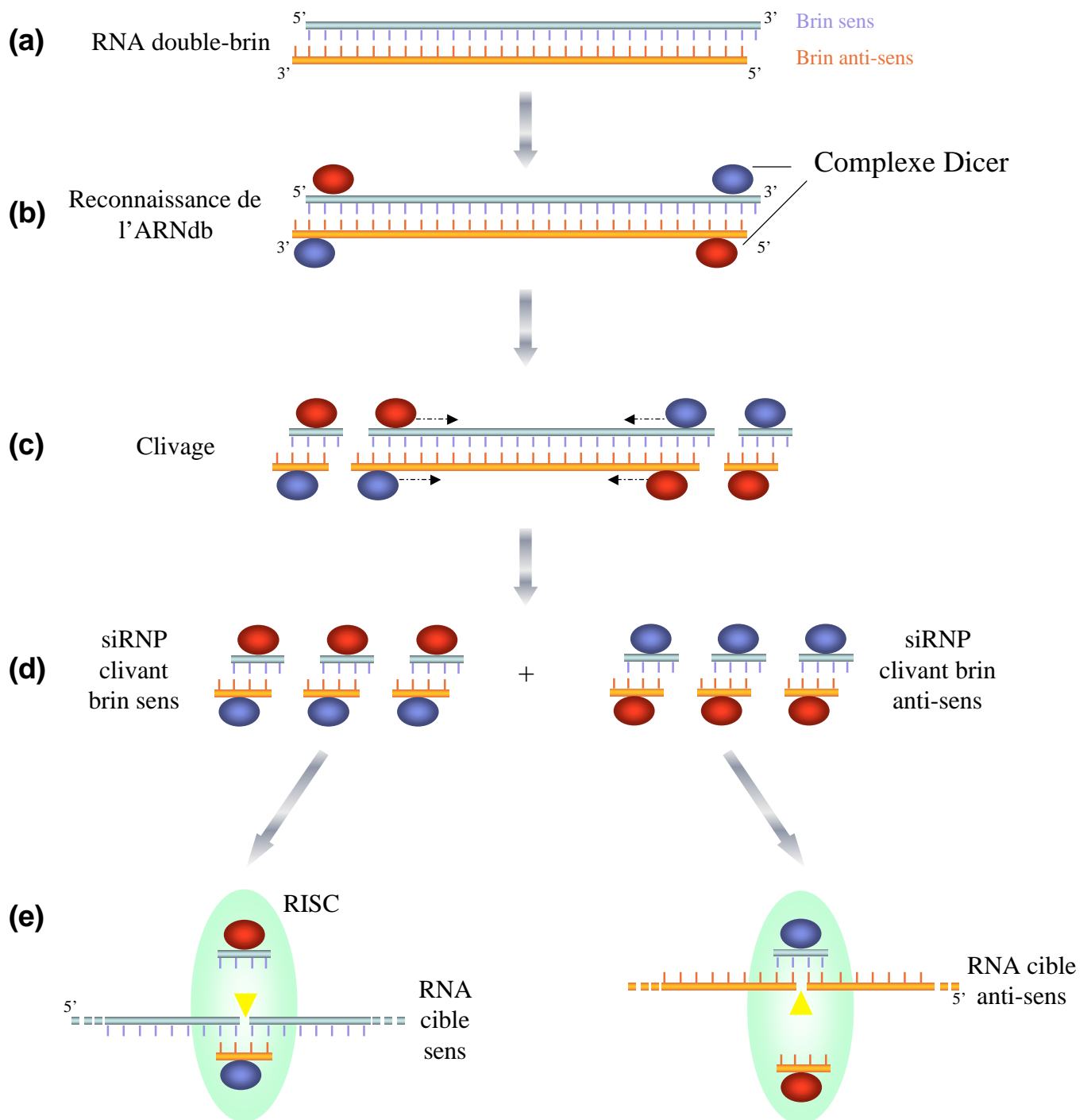
**Figure In-1 :** Mise en évidence du phénomène de co-suppression chez le pétunia.

Phénotypes de différentes lignées de pétunias transgéniques transformées avec le gène de la chalcone synthase et montrant une co-suppression du gène *chs*. (a) pétunia sauvage, (b) à (g) : pétunias transgéniques . Photos d'après Atkinson et al. (1998).



**Figure In-2 :** Alignement des protéines de la famille argonaute/pinhead/piwi/zwille.

D.m. : *Drosophila melanogaster* ; A.t. : *Arabidopsis thaliana* ; H.s. : *Homo sapiens* ; N.c. : *Neurospora crassa* ; C.e. : *Caenorhabditis elegans*. PAZ : domaine conservé Piwi/Argonaute/Zwille ; RIII : domaine Rnase III ; dsB : domaine de liaison à l'ARN double-brin ; PolyQ : répétitions de résidus glutamines.

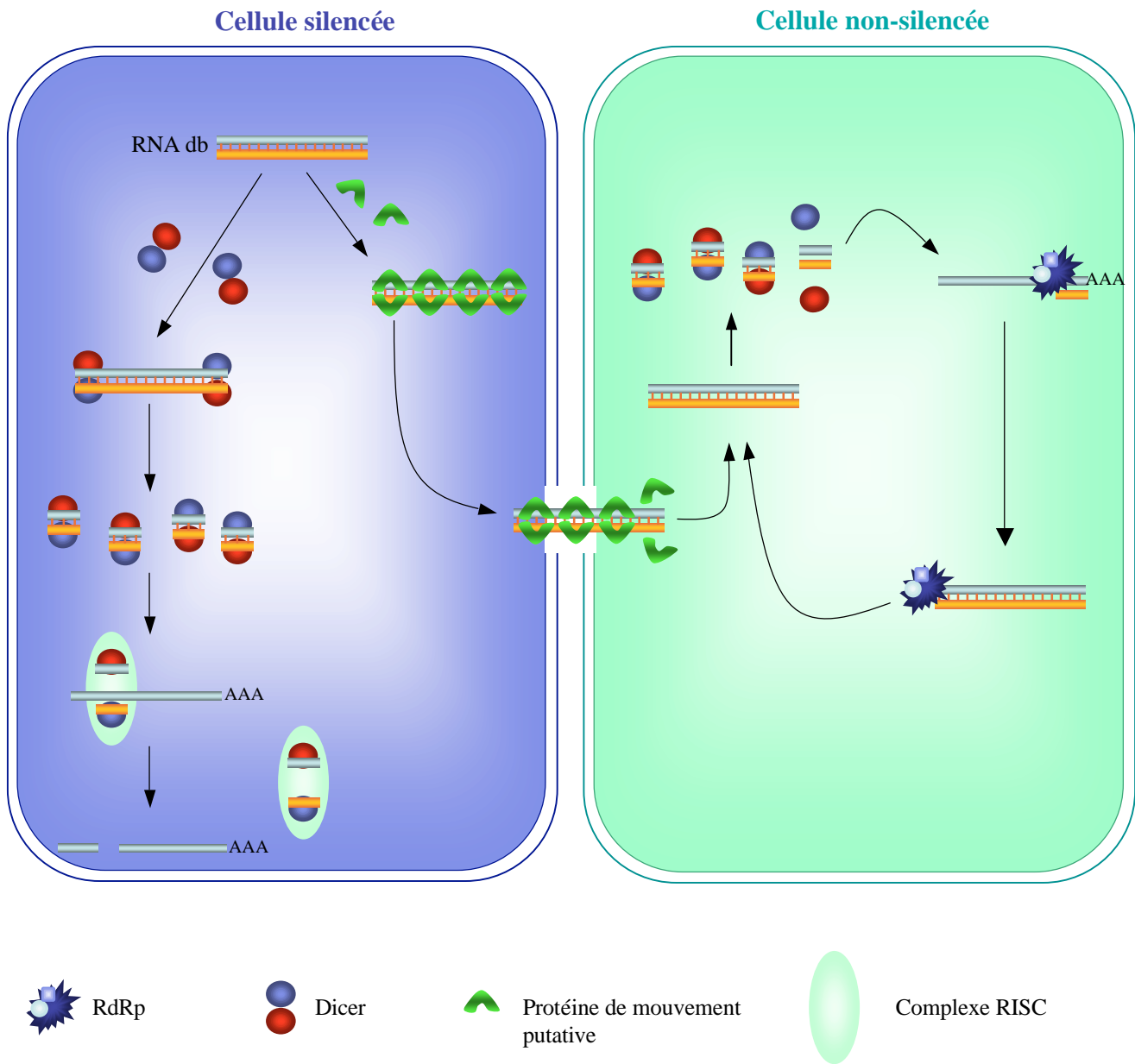


**Figure In-3 :** Modèle pour la reconnaissance et le clivage des RNA cibles.

Un complexe contenant Dicer se fixe aux extrémités du RNAdb (a) de manière asymétrique (b), Les deux ovales représentent deux monomères ou deux domaines d'un complexe contenant Dicer, la présence de nucléotides non appariés en 3' est bénéfique pour la réaction. Le RNAdb est ensuite clivé en fragments de 21-23nt (c) qui restent associés avec Dicer (siRNP : small interfering ribonucleoprotein) (d) et vont pouvoir interagir avec le complexe RISC qui va reconnaître le RNA homologue. On ne sait pas si Dicer reste associé avec le complexe, mais une activité nucléasique (▼) clive ensuite l'ARN cible de façon séquence spécifique au centre de la région reconnue par le siRNA guide (e). Un des domaines du complexe contenant Dicer (en bleu) dirige l'hybridation sur le RNA cible et confère la spécificité.

D'après Elbashir et al., 2001.





**Figure In-4 :** Modèle pour le signal et l'amplification du PTGS.

Pour expliquer le mouvement du PTGS systémique à travers l'organisme, il doit exister une protéine capable de transporter du RNA double-brin (db) ou des siRNAs d'une cellule silencée vers une cellule non-silencée. Une fois dans la cellule voisine, ce RNAdb va être dégradé et une partie des siRNAs obtenus va pouvoir servir d'amorce à la RdRp cellulaire pour synthétiser de l'ARNdb à partir de l'ARN cible. Ce nouveau RNAdb sera alors dégradé à son tour et le PTGS est ainsi amplifié et peut se propager dans tout l'organisme.

D'après Waterhouse et al., 2001.

Fonction	Plante *	Ver *	Mouche *	Fungus *	Alga *	TE †	PAZ ‡
<b>RdRp</b>	SGS 2 SDE 1	EGO 1		QDE 1			
<b>Homologue eIF2C</b>	AGO 1	RDE 1	AGO 1 AGO 2	QDE 2		Non	Oui
<b>Hélicase type RecQ, DEAH ou Upfp1</b>	SDE 3	MUT 7 MUT 14 SMG 2		QDE 3	MUT 6	Oui	
<b>Rnase III + Hélicase</b>	CAF 1?	DICER	DICER				Oui
<b>Modelage chromatine</b>	DDM1						
<b>Méthyl-transférase</b>	MET 1						
?	SGS 3						
?		RDE 4				Non	
?		RDE 2 et 3 Mut 2				Oui	

**Figure In-5 :** Gènes ayant un rôle dans les mécanismes de RNAi et PTGS.

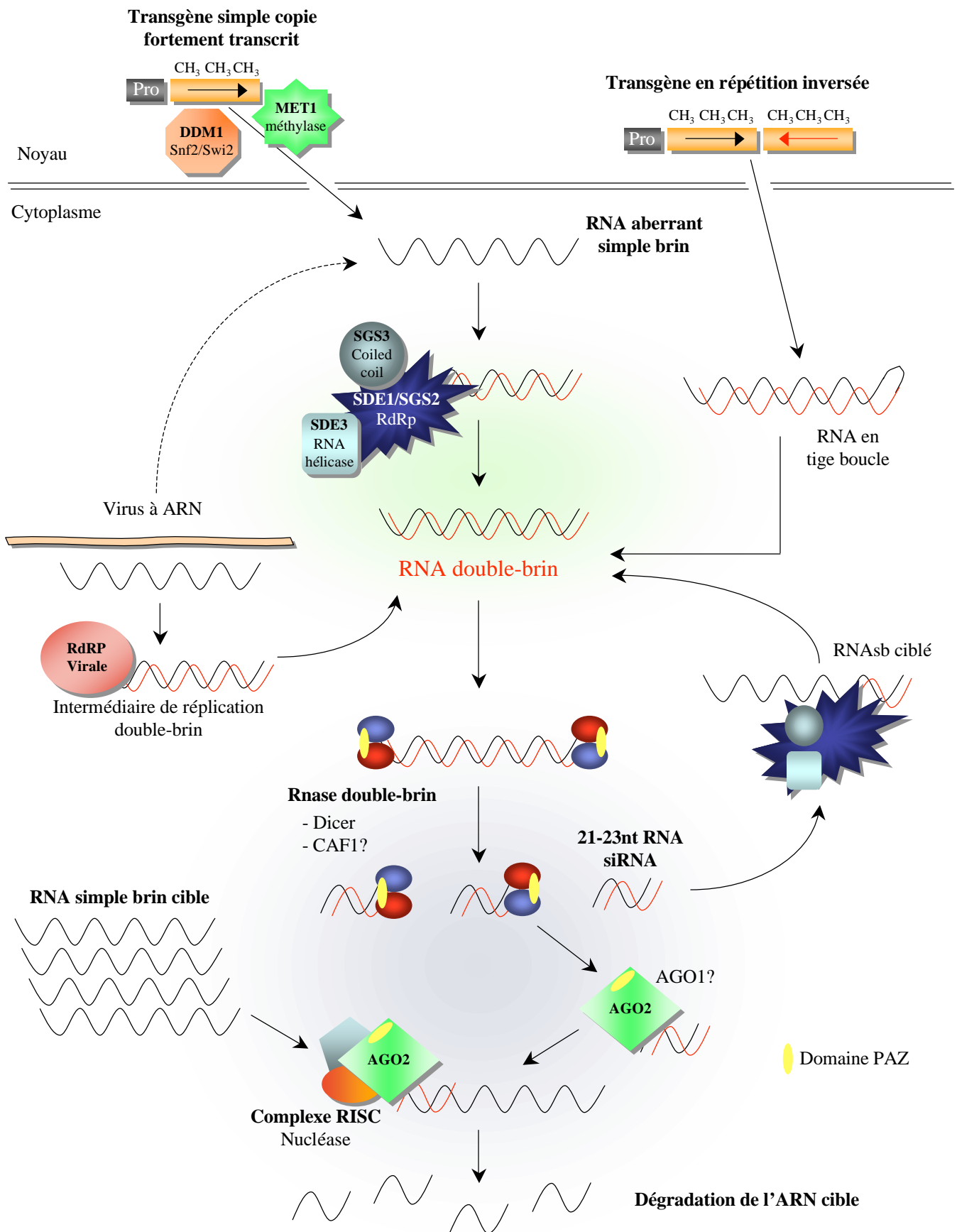
\* Plante : *Arabidopsis thaliana* ; Ver : *Caenorhabditis elegans* ; Mouche : *Drosophila melanogaster* ; Fungus : *Neurospora crassa* ; Alga : *Chlamydomonas reinhardtii*.

† TE : activation de l'activité de transposition dans le mutant de ce gène

‡ PAZ : présence du domaine PAZ (Piwi, Argonaute, Zwillie)

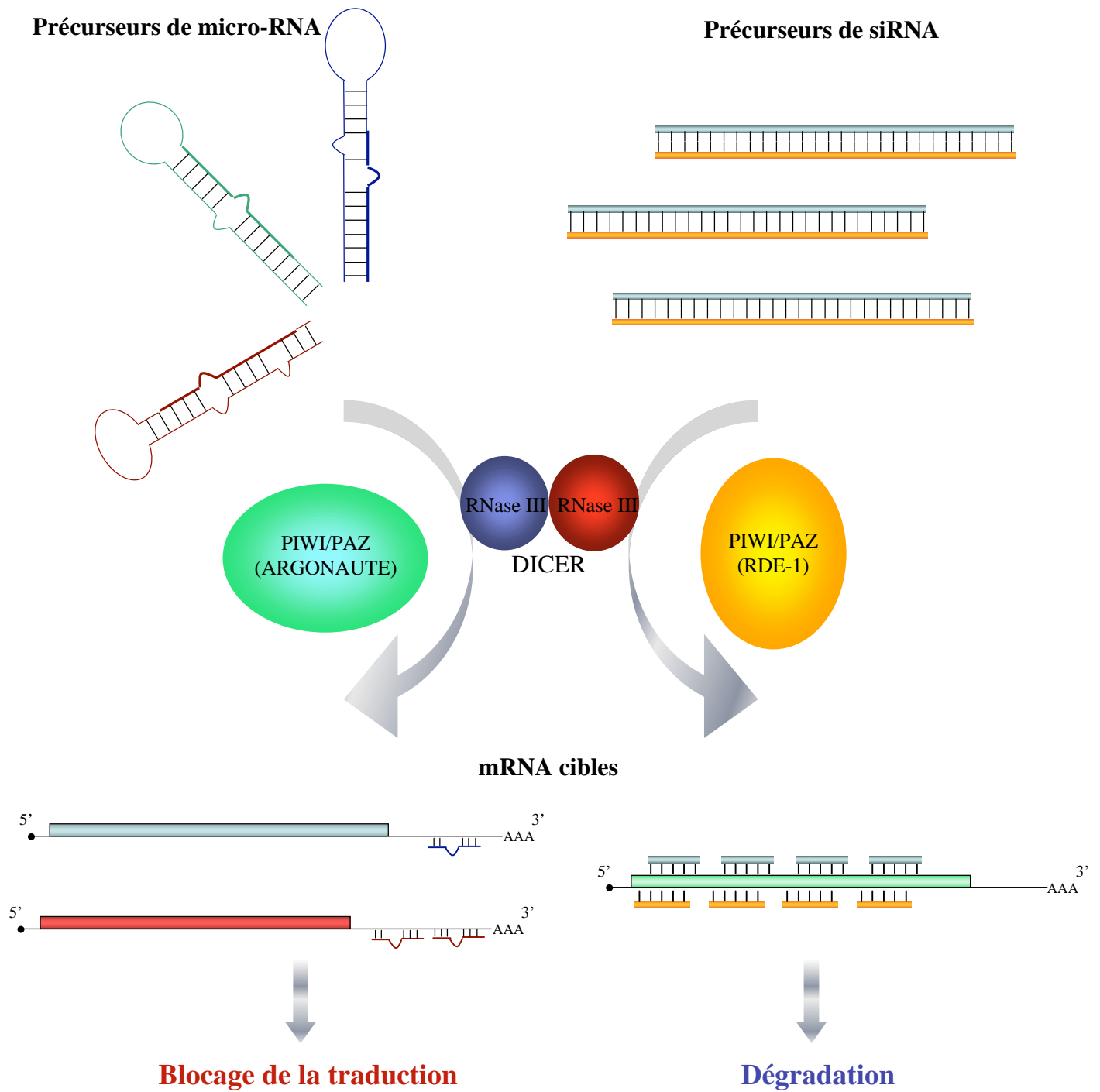
|| Effet sur l'activation de la transposition testé uniquement sur les mutants mut6 et mut7

CAF : Carpel Factory.



**Figure In-6 :** Modèle général du PTGS.

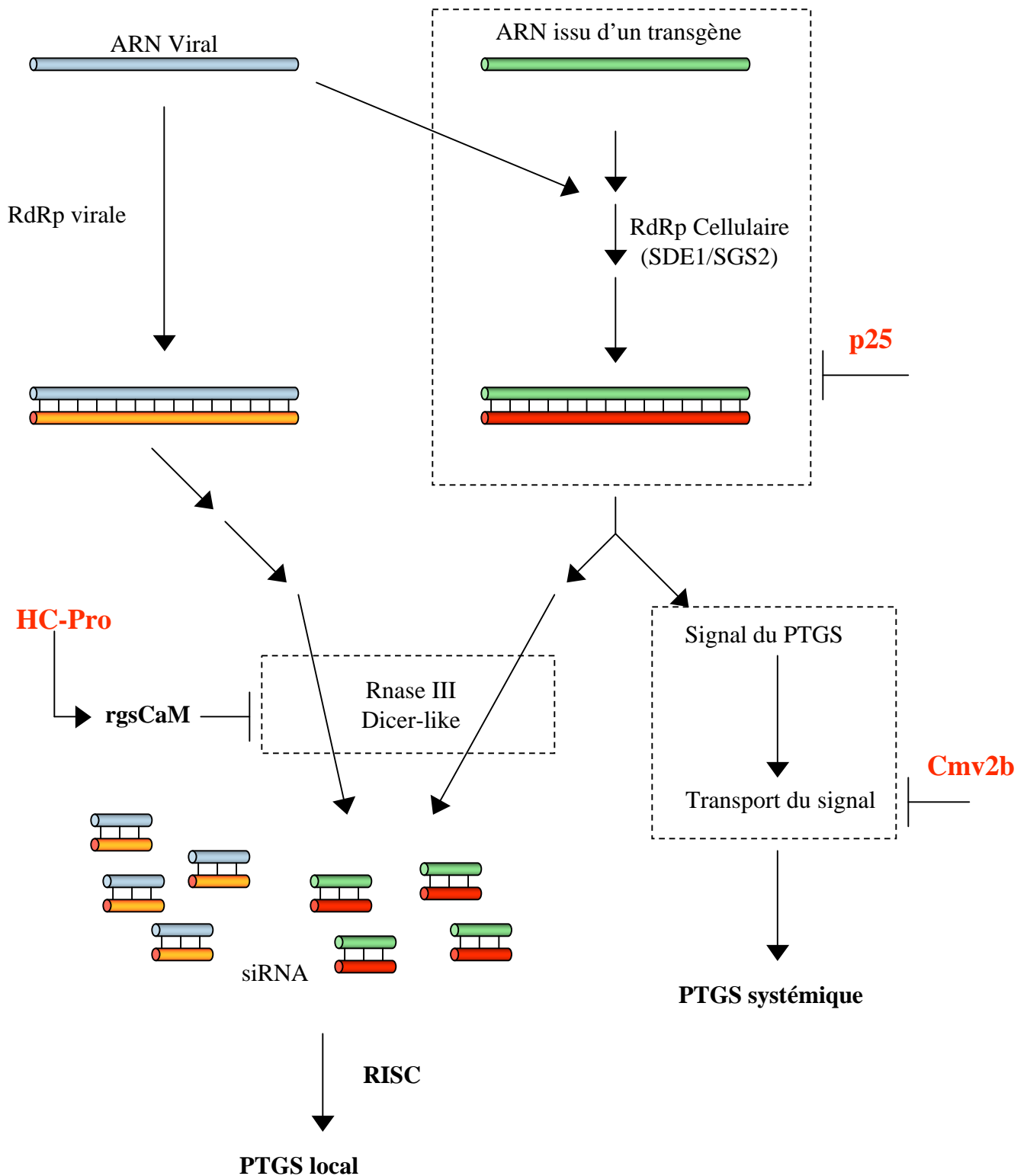
Chez les plantes on peut distinguer deux branches distinctes pour induire le PTGS. La première est dépendante des gènes *sde-1/sgs-2* (au milieu) et est induite à partir de RNA simple brin aberrant. La deuxième est indépendante des gènes *sde-1/sgs-2* et est induite soit par un RNAdb soit par un RNA viral. Le RNAdb est ensuite clivé par Dicer en siRNA qui vont permettre de cibler le complexe RISC sur les RNA homologues en séquence pour les dégrader. Les siRNA peuvent également servir d'amorce à la RdRp pour synthétiser du RNAdb à partir de RNAsb. D'après Voinnet, 2001 et Vaucheret et al. 2001.



**Figure In-7 :** Mode d'action comparé des micro-RNA et des siRNA.

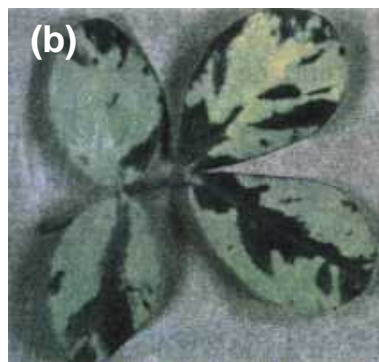
Les précurseurs de micro-RNA d'environ 70 nt sont clivés par Dicer pour former les formes matures, simple-brin, d'environ 22 nt (en gras sur le schéma). De même, les longues molécules de RNA db qui initient le RNAi sont dégradés par Dicer en siRNA de 21-23 nt. Des membres distincts de la famille de protéines à domaines PIWI/PAZ (cf. figure In-2) sont impliqués dans les étapes ultérieures des deux procédés. Les siRNA entraînent la dégradation de leur cibles, mais les micro-RNA s'apparient à l'extrémité 3' non codante du mRNA cible et régulent négativement la traduction de celui-ci.

D'après Pasquinelli, 2002.



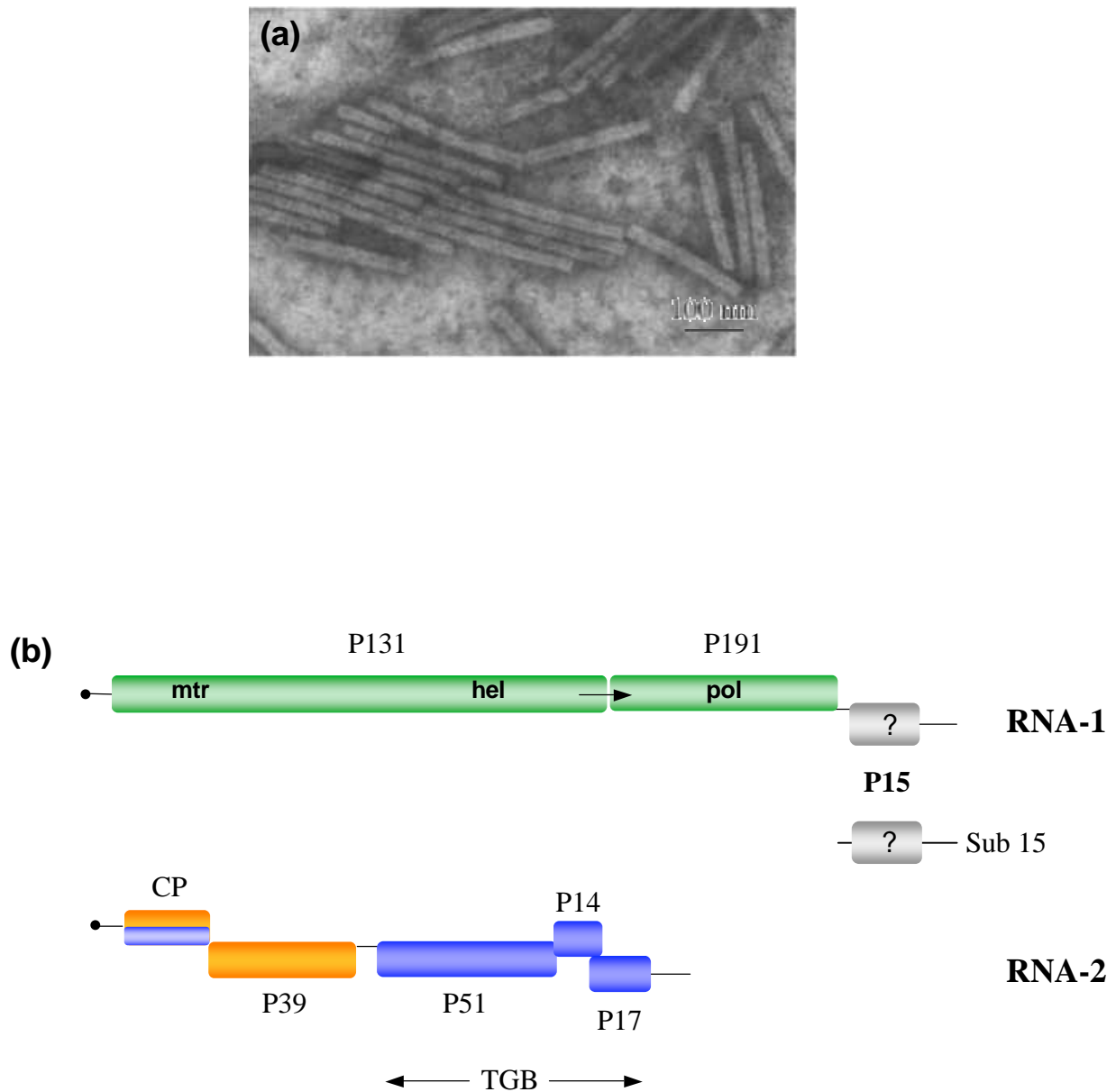
**Figure In-8 :** Mode d'action des différents types de suppresseurs viraux.

Les deux branches du PTGS sont représentées. HC-Pro agirait en amont de la dégradation des RNAdb par Dicer en interagissant avec une protéine cellulaire, rgs-CaM, inhibant ainsi le silencing local. P25 et Cmv2b agissent sur la branche sde-1/sgs-2, respectivement en empêchant la formation du signal (p25) ou son mouvement (Cmv2b). Ces deux protéines ont un effet sur le silencing systémique. D'après Li et al., 2001.



**Figure In-9** : Symptômes du rabougrissement de l'arachide.

- (a) Plants d'arachides infectées par le PCV. À gauche, plante infectée ; à droite, plante saine.  
(b) Symptômes foliaires observés sur des feuilles d'arachide infectées par le PCV.



**Figure In-10 :** Morphologie et organisation génétique du Peanut Clump Virus.

(a) Observation au microscope électronique des particules virales du PCV. (Photo de M. Mayo)

(b) Organisation génétique des RNA-1 et 2 du PCV. —> Translecture du codon STOP de l'ORF 131.

mtr : motif méthyltransférase, hel : motif hélicase, pol : motif RNA polymérase RNA dépendante.

TGB : Triple Gene Block.

- Protéines impliquées dans la réplication du RNA viral
- Protéines impliquées dans le mouvement du virus
- Protéines impliquées dans l'encapsulation et la transmission du virus par le champignon vecteur



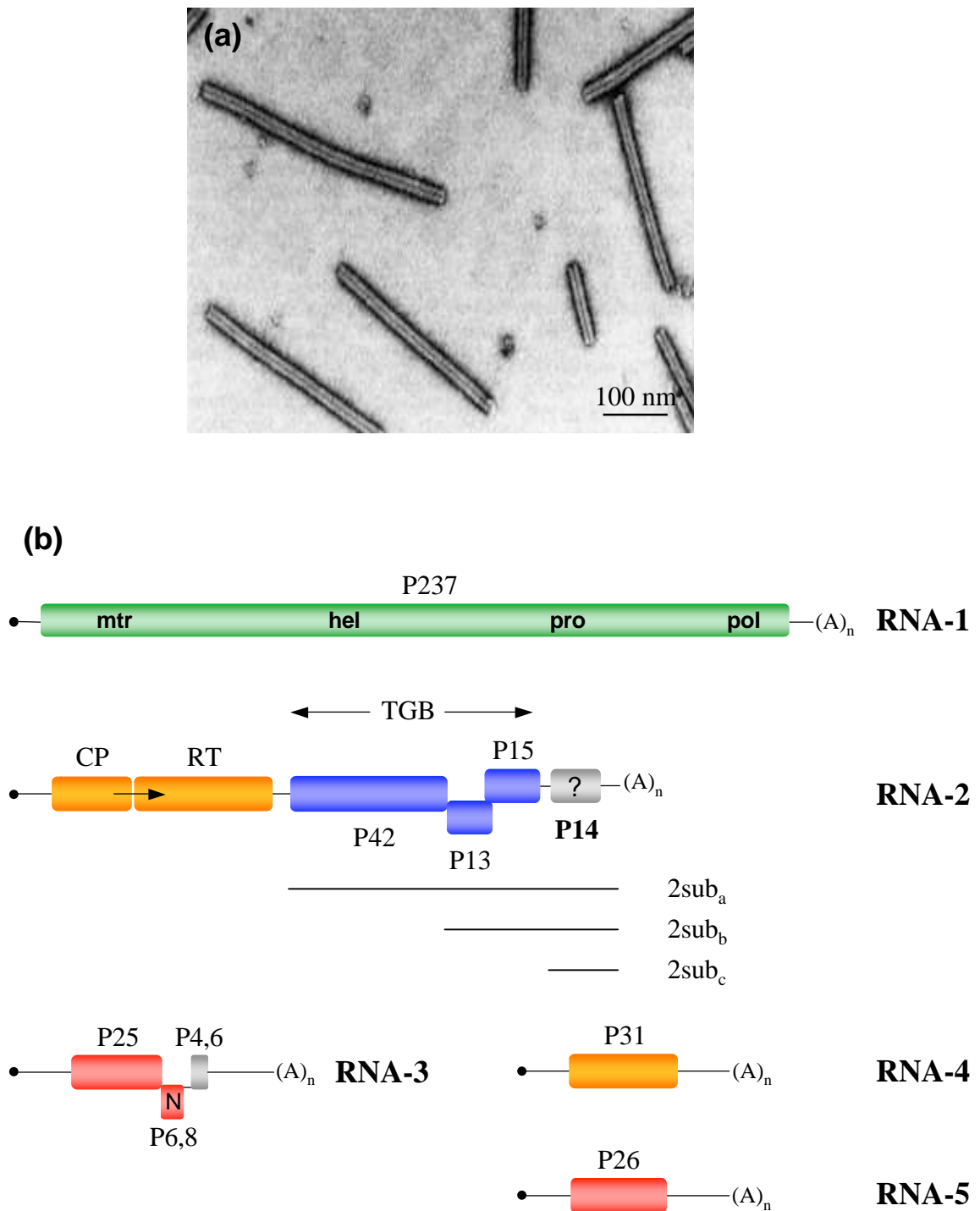
**Figure In-11 :** Symptômes du Beet Necrotic Yellow Vein Virus.

(a) Parcelle de betterave contaminée par le BNYVV. Les zones infectées apparaissent comme des foyers de teinte vert clair.

(b) Feuille de betterave infectée par le BNYVV montrant les symptômes caractéristiques de chlorose au niveau des nervures.

(c) Racines de betteraves infectées (à gauche) comparée à des racines saines (à droite). L'infection par le BNYVV induit une prolifération anarchique du chevelu racinaire et une diminution de la taille du pivot.





**Figure In-12 :** Morphologie et organisation génétique du BNYVV.

(a) Observation en microscopie électronique des particules virales du BNYVV.

(b) Organisation génétique des RNA 1 à 5 du BNYVV.  $\longrightarrow$  : translecture du codon STOP de la CP.

mtr : motif méthyltransférase, hel : motif hélicase, pro : motif protéase, pol : motif RNA polymérase RNA dépendante. TGB : Triple Gene Block.

- Protéines impliquées dans la réplication du RNA viral
- Protéines impliquées dans le mouvement du virus
- Protéines impliquées dans l'encapsidation et/ou la transmission du virus par le champignon vecteur
- Protéines impliquées dans la symptomatologie



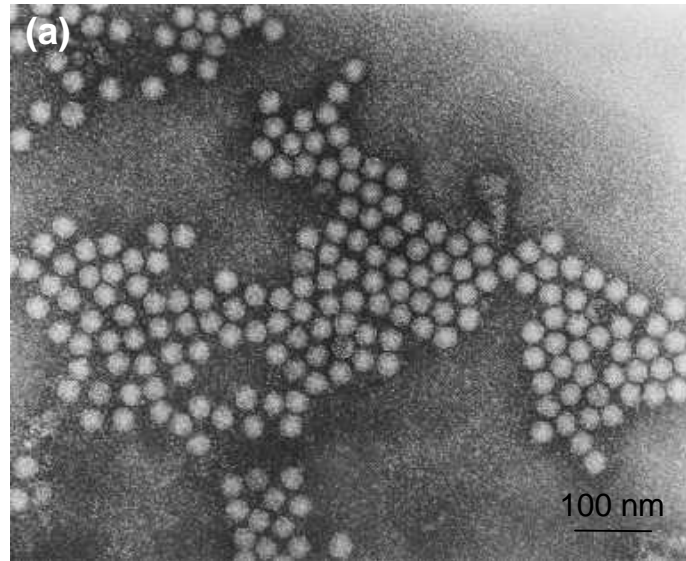
**Figure In-13 :** Symptômes causés par le Beet Western Yellows Virus.

(a) Champ de betteraves infecté par le BWYV, la zone infectée est clairement visible au centre.

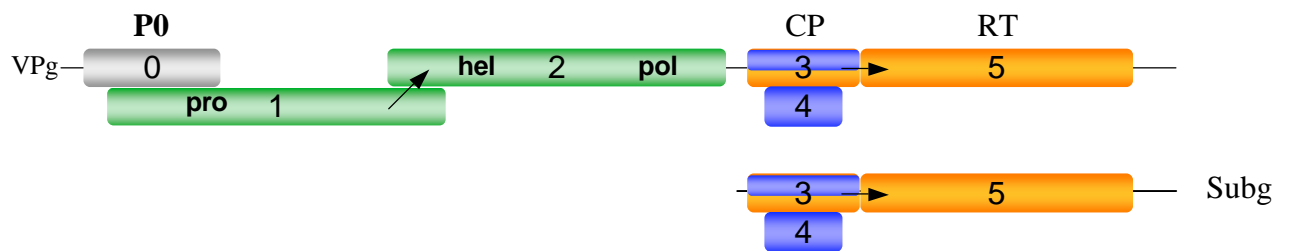
(b) Feuille de betterave infectée.

(c) Plant de *Nicotiana clevelandii* infecté par le BWYV.

La coloration jaune prise par les feuilles de plantes infectées est due à un défaut de transport des nutriments.



(b)



**Figure In-14 :** Morphologie et organisation génétique du BWYV.

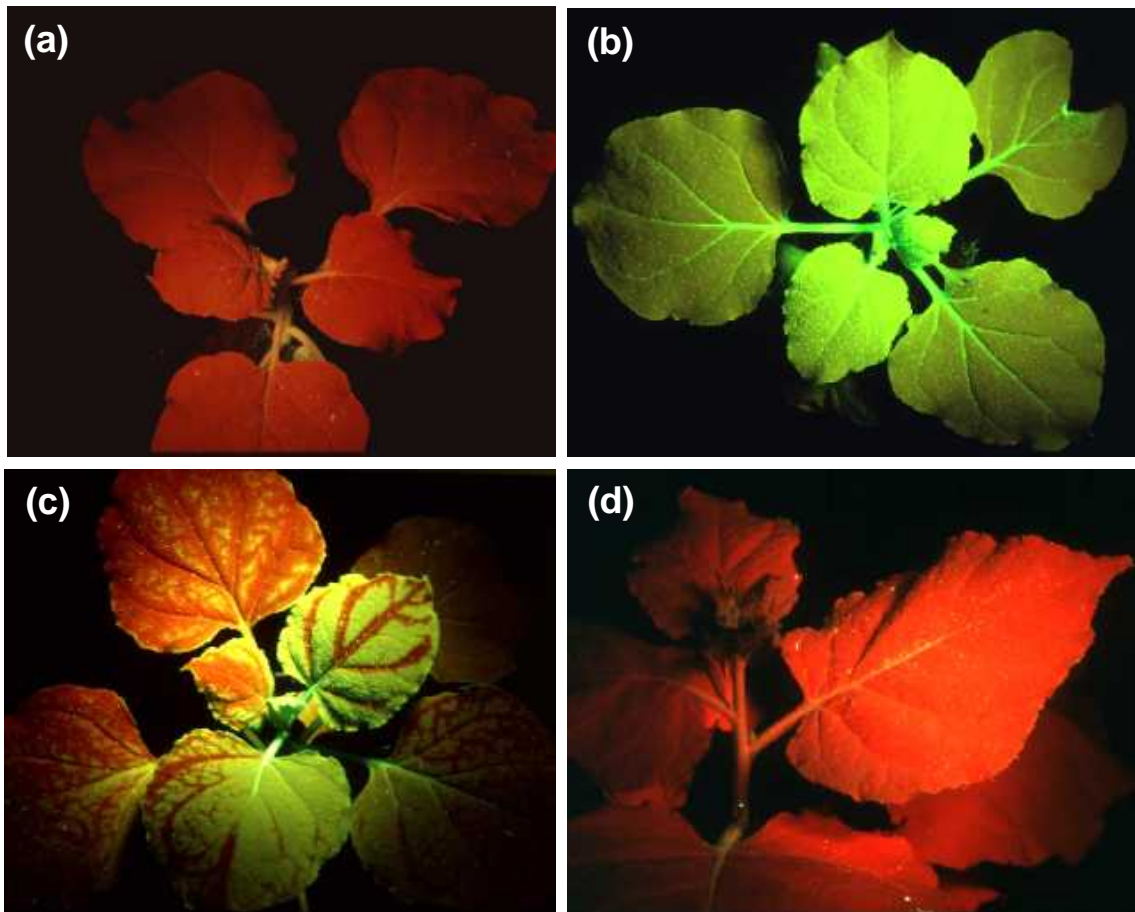
(a) Observation en microscopie électronique des particules du BWYV.

(b) Organisation génétique du RNA du BWYV. Les ORF 0, 1 et 2 sont exprimées à partir du RNA génomique, alors que les ORF 3, 4 et 5 sont traduites à partir d'un RNA subgénomique (subg).

La protéine P2 est exprimée par décalage du cadre de lecture dans l'ORF 1 ( ↗ ) et la protéine RT par translecture ( → ) du codon STOP de l'ORF 3.

Pro : motif protéase, hel : motif hélicase, pol : motif RdRp

- Protéines impliquées dans la réplication du RNA viral.
- Protéines impliquées dans le mouvement du virus.
- Protéines impliquées dans l'encapsulation (CP) et la transmission du virus par le puceron vecteur.



**Figure I-1 :** Modèle utilisé pour l'étude de la suppression du PTGS.

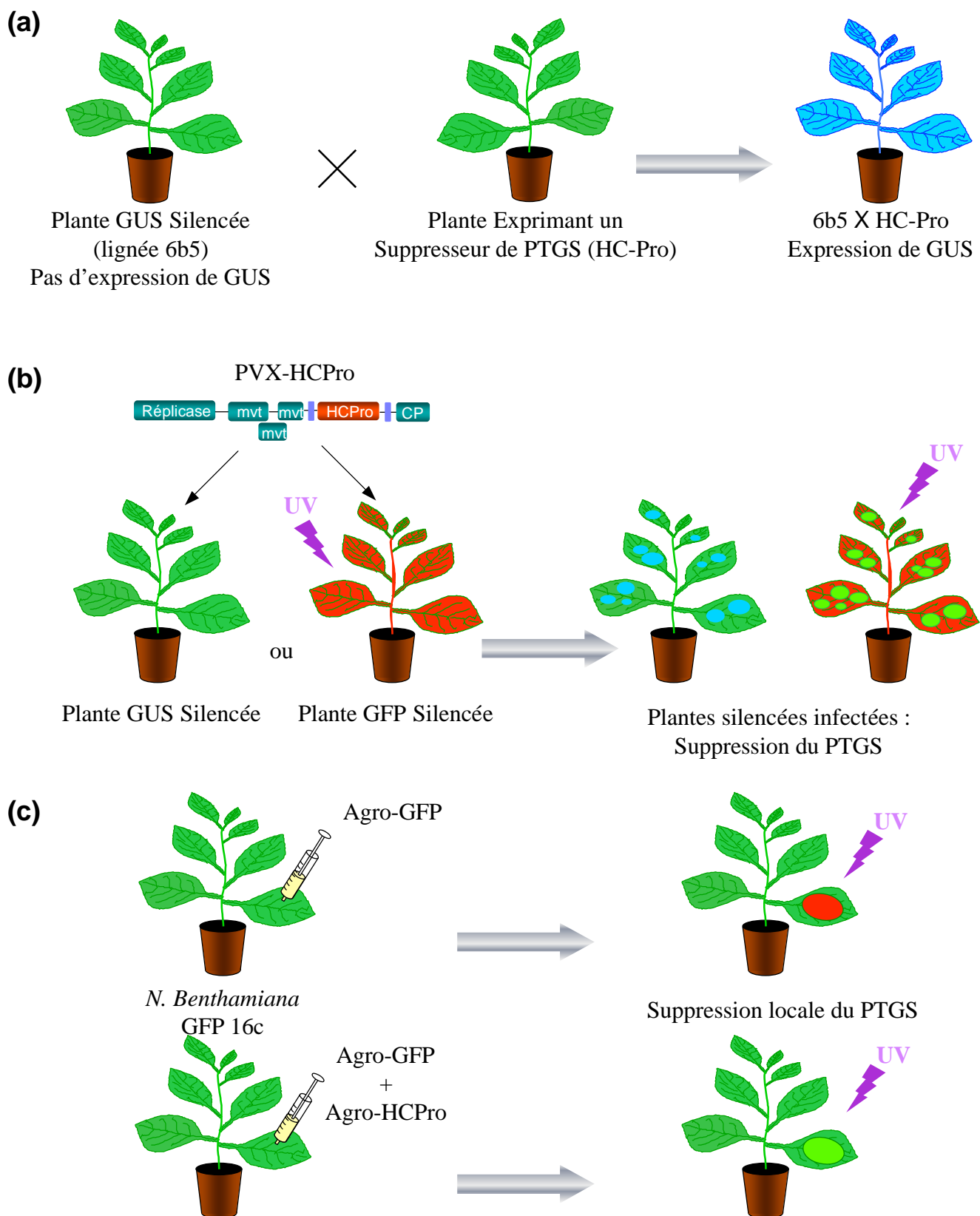
Photographies prises sous lumière ultra-violette.

(a) *Nicotiana benthamiana* wt.

(b) *Nicotiana benthamiana* lignée 16c exprimant la GFP.

(c) *Nicotiana benthamiana* GFP en cours de silencing après agro-infiltration d'une construction GFP.

(d) *Nicotiana benthamiana* GFP totalement silencée.



**Figure I-2 :** Les différents moyens d'identification d'un supprimeur de PTGS.

(a) Croisement génétique avec une plante silencée constitutivement. Il y aura levée du silencing dans le produit du croisement.

(b) Infection de plantes silencées avec un vecteur viral contenant le supprimeur (PVX-HCPro). La réversion du silencing se fera dans toute la plante si le supprimeur peut bloquer la maintenance du PTGS.

(c) Expression transitoire par agro-infiltration. La présence d'une souche d'agrobactéries portant la construction HCPro en plus de la souche portant l'inducteur du silencing (agro-GFP) conduit à la suppression du PTGS et à la surexpression de la GFP dans la zone infiltrée (le patch).

PCV	1	-----MPKSEFFREERK
BSMV	1	---MATFSCVCCGT-----STTSTYCGKR CERKHVYSETRN
PSLV	1	---MSTDLCVCGNV-KD--VSTFVESQEDGKFCSAKCLRKATFRRVRK
LRSV	1	MASSPNVKVCTMCCIV-FD-----SELEFCSPKCETRAGFKSERK
BNYVV	1	--MGMVDSL CVFVGRVITEGSESVEGVERFSIKFSEWKLFTIAVFVEYRE
consensus	1	. *

PCV	13	RRVAL-LGEDAV--CKLNGVCGYSCGMPPAVEKVSVPADTEEDVYMLIF
BSMV	35	KRLELYKKYLLEPQKCALNGIVGHSCGMPCSI AEEACDQ-----LP
PSLV	44	QLAEYLKHDLI PVSCQLNSFPGYHCGMISALEM----DPSGK-----P
LRSV	40	RRAELFAKHNLTAKT CGLNKFPAESCGMYANIAEHQLPDGTTT-----L
BNYVV	49	-----LGEKECSLKDAGRLHFNVSCVK-----
consensus	51	. . . . . * * .

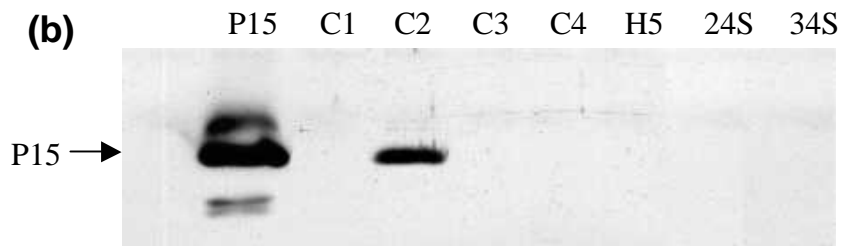
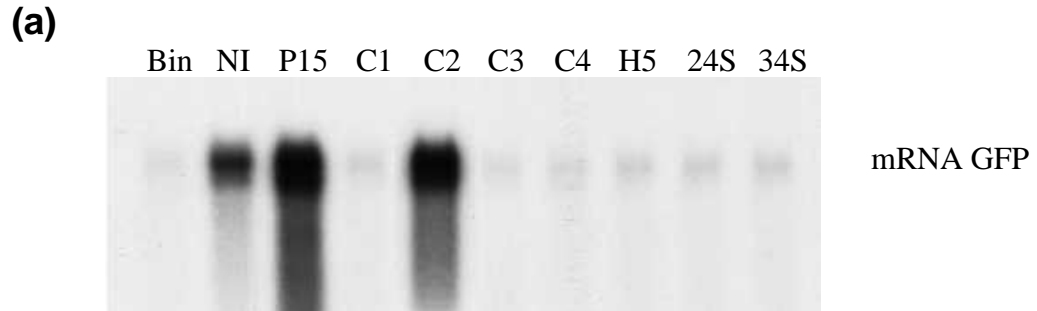
PCV	59	PYEQFCG-----EKHFKLYESLKDVSDELKLRRLERQRETL
BSMV	76	IVSRFCG-----QKHADLYDSL LKRSEQELLEFLQKKMQELK
PSLV	84	VVMNFCG-----QKHEALALAKADGAKLRLEYLERRFYQMK
LRSV	84	TIDDYCG-----SKHYYQGGLLAVMSDELKIRAAALKLEHQR
BNYVV	71	----CCQKLKCKKQKNHSHKVVQNGYLRKVRNF S I L G V C G D C C E S F T L A
consensus	101	. . * . . . . * * . . . . . * . . . . . * . . . . . . . . . .

PCV	97	ASFQQKLKRYDEKIALLSEK-----FK
BSMV	114	LSHIVKMAKLESEVNAI R KSVASSFEDSVGCDD-----S
PSLV	122	DVYARRLDRIAENLKEERNRLTTS GTITV KR D G E E S K Q L E V S V P M T T A D F
LRSV	122	ATAVAKG I K L A K E L A A L R N S -----
BNYVV	116	DEKPHVIVDPEV-----
consensus	151	. . . . .

PCV	119	NLRSKL
BSMV	148	SSVSKL
PSLV	172	FKLSKL
LRSV	142	---SKL
BNYVV		-----
consensus	201	...

**Figure I-3 :** Aligement de différentes protéines «cystein-rich!». PCV : Peanut Clump Virus, BSMV : Barley Stripe Mosaic Virus, PSLV : Poa Semi Latent Virus, LRSV : Lychnee Ring Spot Virus, BNYVV : Beet Necrotic Yellow Vein Virus.

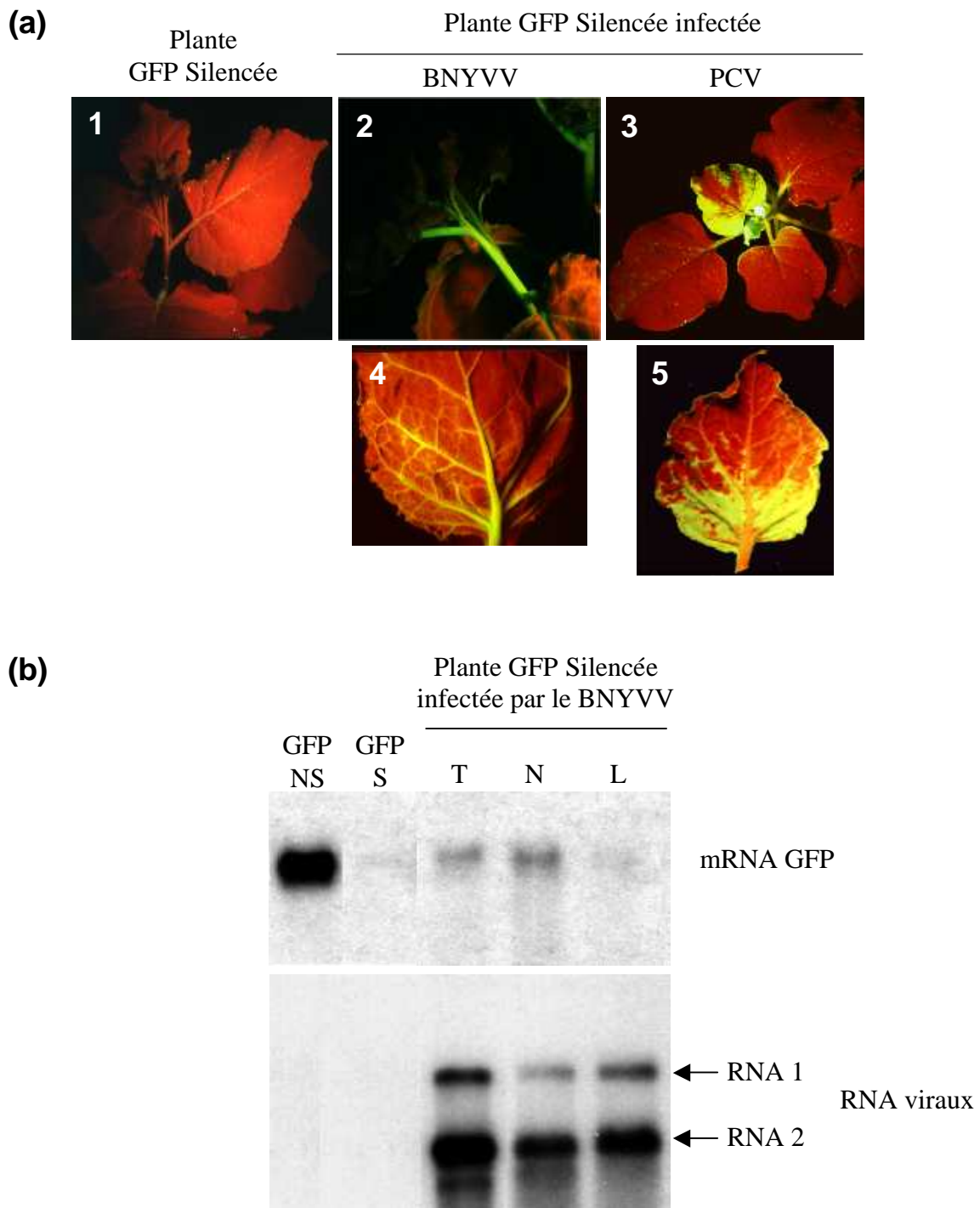
Les cystéines et histidines conservées sont entourées d'un rectangle, la cystéine non-conservée de la protéine P15 est indiquée par une flèche verte et les cystéines impliquées dans la formation d'un doigt de zinc chez la protéine P14 du BNYVV sont indiquées par des flèches jaunes. Les résidus marqués d'un point sont retrouvés dans au moins 3 des séquences, ceux marqués d'une astérisque sont conservés dans les 5 séquences. La couleur rouge indique l'identité et la couleur bleue, la similarité.



**Figure I-4 :** Rôle des cystéines de la protéine P15 dans sa fonction de suppression de PTGS.

(a) Analyse par Northern blot des mRNA GFP accumulés dans les patchs co-infiltrés avec pBin-GFP et : pBin 61 vide (Bin), pBin P15 (P15), pBin 15C1 (C1), pBin 15C2 (C2), pBin 15C3 (C3), pBin 15C4 (C4), pBin 15-24S (24S), ou pBin 15-34S (34S). NI : feuilles de *N. benthamiana* 16c non infiltrées.

(b) Analyse par Western blot de la protéine P15 et des mutants de la protéine P15, extraits à partir des mêmes échantillons qu'en (a).



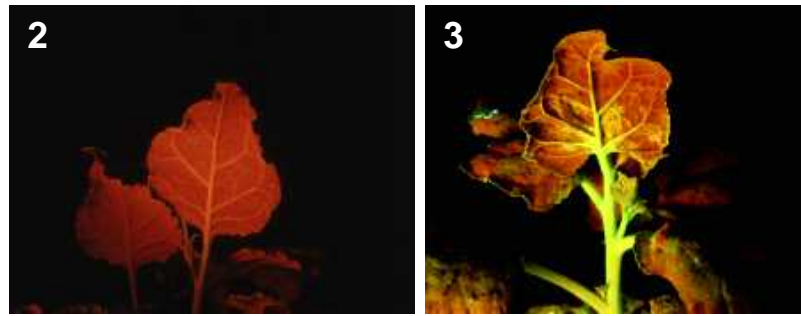
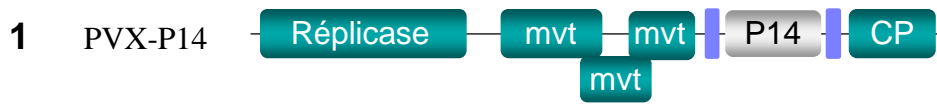
**Figure I-5 :** Suppression du PTGS par le BNYVV.

(a) Comparaison de la suppression du PTGS par le PCV et par le BNYVV. Le BNYVV supprime le PTGS dans les tiges et les nervures (photos 2 et 4) et le PCV dans la feuille entière (photos 3 et 5). Photographies prises sous lumière UV 15 jours après infection.

(b) Analyse par Northern blot des RNA messagers extraits des plantes infectées par le BNYVV. GFP NS : plante GFP non silencieuse, GFP S : plante GFP silencieuse, T : tige, N : nervure, L : limbe.



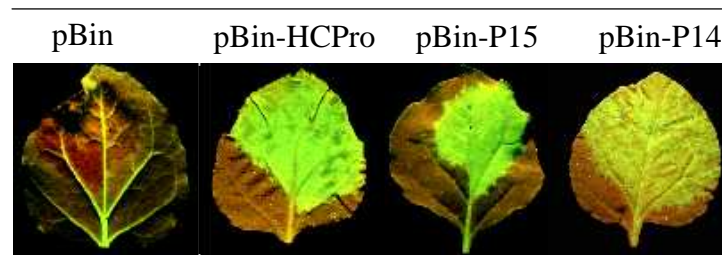
(a)



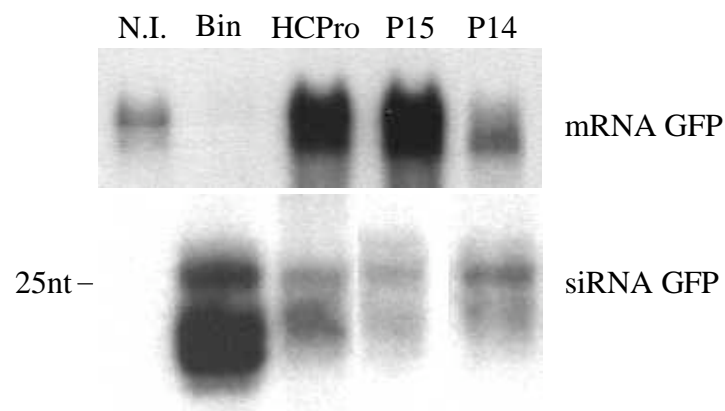
(b)



2 Co-infiltration pBin-GFP +



3 Co-infiltration pBin-GFP +



**Figure I-6 :** La protéine P14 du BNYVV est un suppresseur de PTGS.

(a) Exprimée à partir du PVX, la protéine P14 supprime le PTGS dans les tiges et les nervures.

1 : construction PVX-P14, [ ] : promoteur du RNAsubg de la CP ; 2 : plante GFP silencée infectée par PVX ; 3 : plante GFP silencée infectée par la construction PVX-P14.

(b) Suppression du PTGS par la protéine P14 en expression transitoire par agroinfiltration.

1 : constructions binaires utilisées ; 2 : feuilles co-agroinfiltrées par pBin-GFP + pBin (témoin négatif), pBinHCPro ou pBinP15 (témoins positifs) et pBin14 ; 3 : analyse par Northern blot des mRNA GFP et des siRNA extraits des zones agro-infiltrées. La protéine P14 semble supprimer le PTGS moins efficacement que la protéine P15 ou la protéine HCPro. N. I. : feuille GFP non infiltrée.

SCORE=33

\*

HAD AVG GGC

\*

PCV : 37  
BSMV : 38  
PSLV : 37  
LRSV : 39  
BNYVV : 12

```
PCV      -----MPKSEFFREERKERRVA
BSMV     ---MMATFSCVCCGT-----STTSTYCGKRCERKHVYSETRNKRL
PSLV     ---MSTDLCVCGNV-KD--VSTFVESCEDGKFCSAKCLRKATFRRVRKQLAE
LRSV     MAFSPNVKVCTMCCIV-FD-----SELEPCSPKCETRAGFKSERKRRAE
BNYVV    --MGMVDSLCPVGRVITEGSESVHGVERISIKFSEWKLFTIAVFVEYRE----
```

Cons : \*

```
PCV      D-LGEDAV---CKLNGVCGYSCGMPPAVEKVSVPADTEEDVYMLIFPYEQFCG-
BSMV     LYKKYLLEPQKCALNGIVGHS CGMPCSI AEEACDQ-----LPIVSRFCG-
PSLV     EYLKHDLPVSCOLNSFPGYHCGMISALEM---DPSGK-----FVVMNFCG-
LRSV     LPAKHNLTAKT CGLNKFFPAESCGMYANIAEHQLPDGTTT-----LTIDDYCG-
BNYVV    -----LGEKECSLKDAGRLIPNVSCVX-----CCQ
```

Cons : \*

```
PCV      -----EKHFKLYESLKDVSDDELKLRRLERORETLLASFQOKLKRYDE
BSMV     -----OKHADLYDSELLKRSEQELLLLEFLQKKMOELKLSHIVKMAKLES
PSLV     -----OKHEALALALKAKDGAKLRLEYLERRFPYQMKDVYARRLDRIAE
LRSV     -----SKHY YCGGLLAVMSDTELKIRAAALKLEHORATAVAKGIKLA
BNYVV    KLKCKKQKNHNSKHVQNGYLRKVENPFI LGVCHDCCEASTLEADEKPRVIVDPEV
```

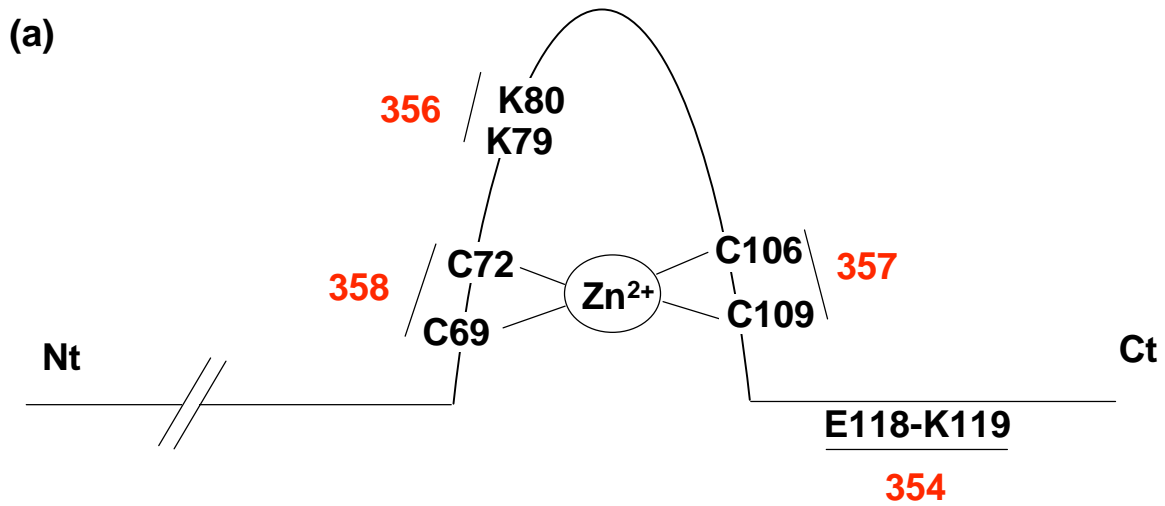
Cons : \*

```
PCV      KIALLSK-----FANLRSKL
BSMV     EVNAIRKSVASSPEDSVGCD-----SSVSKL
PSLV     NLKEERNRLTTSGTITVKRDGEESKQLEVSVPMTTADPKLSKL
LRSV     ELAALRNS-----SKL
BNYVV    -----
```

Cons



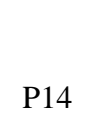

**Figure I-7 :** Alignements des protéines CRP montrant les domaines conservés.

Les couleurs indiquent le pourcentage de similarités entre les différentes protéines, du bleu au rouge = pourcentage de similarité croissant. La protéine P14 du BNYVV présente le moins de similarité avec les autres protéines CRP.

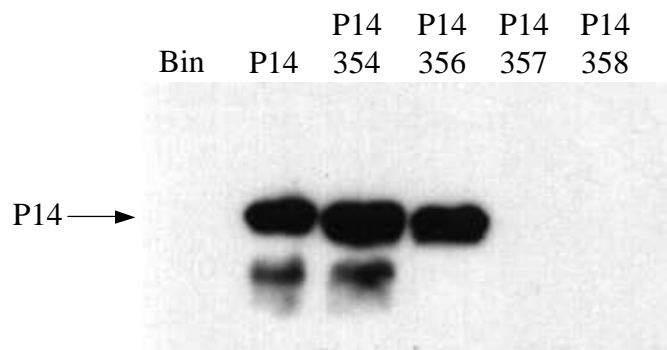


(b)

1

Construction	Suppression du PTGS
14-354	+ 
14-356	+ 
14-357	- 
14-358	- 

2

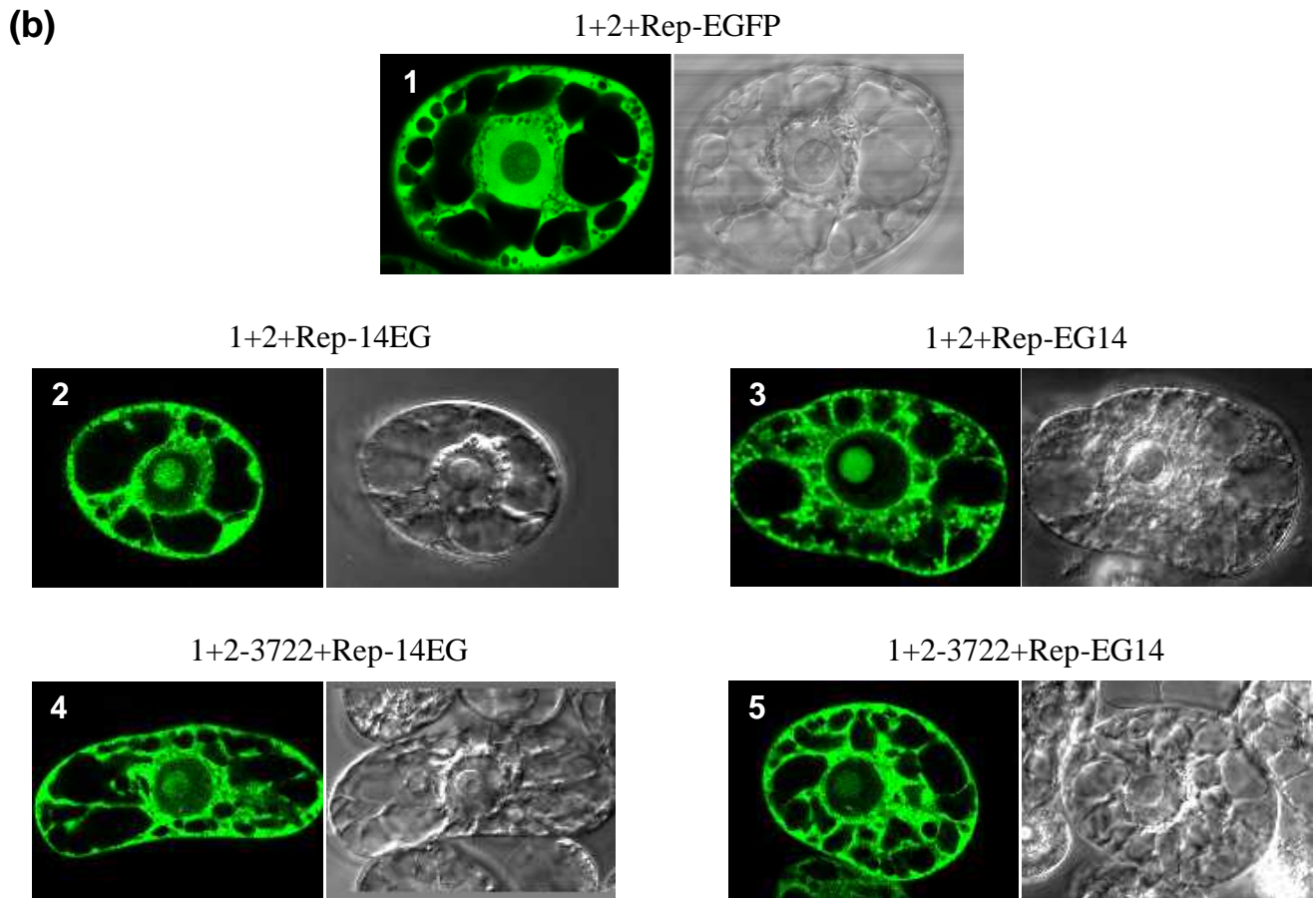
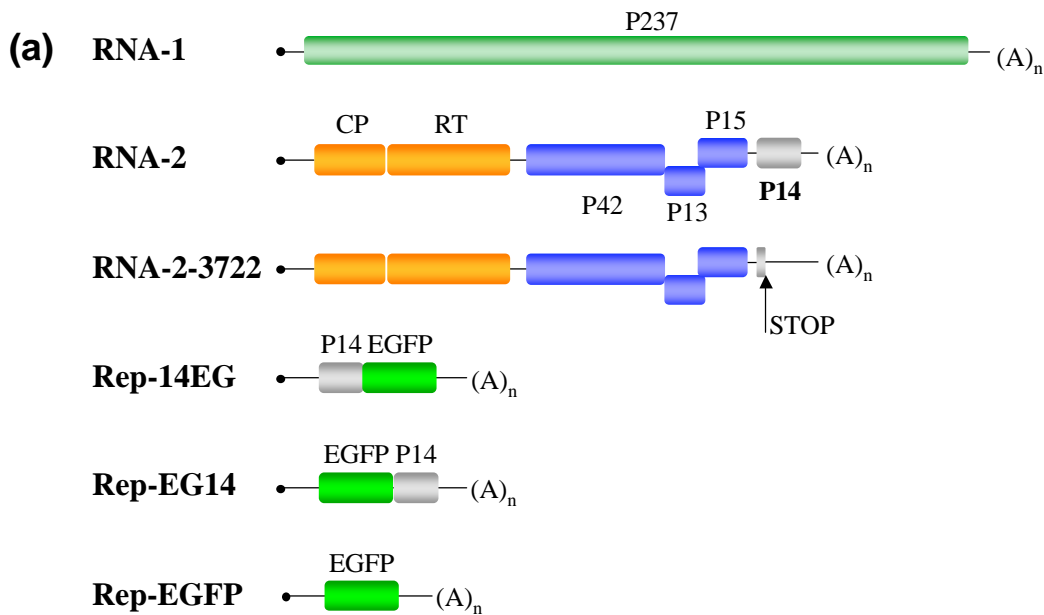


**Figure I-8 :** Rôle du doigt de zinc de la protéine P14 dans la suppression du PTGS.

(a) Représentation schématique des mutants dans le doigt de zinc. Les acides aminés indiqués ont été remplacés par des alanines.

(b) Suppression du PTGS par les mutants P14-354, 356, 357 et 358.

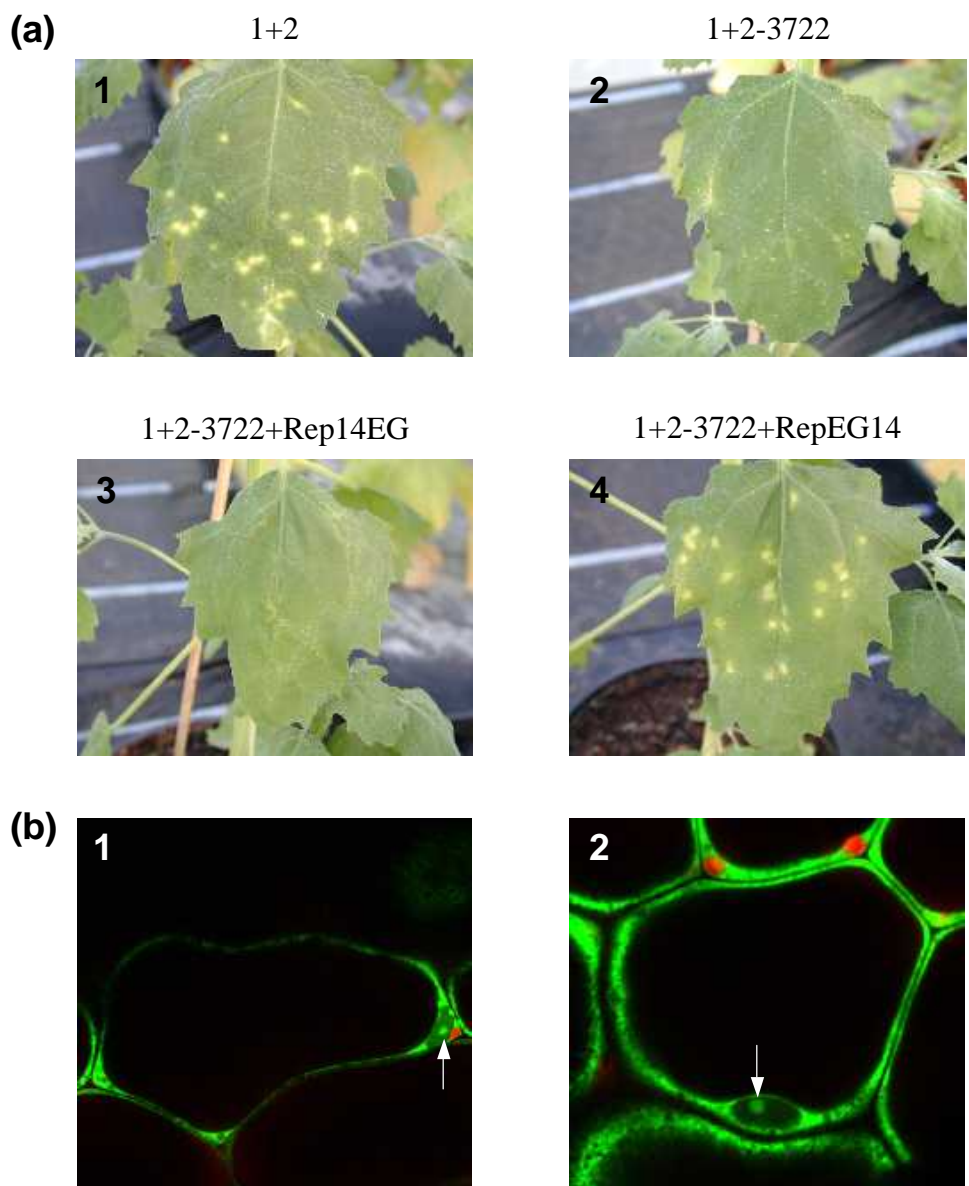
(c) Analyse par Western blot des protéines totales extraites des feuilles infiltrées avec les constructions indiquées.



**Figure I-9 :** Localisation de la protéine P14 en contexte viral.

(a) Représentation schématique des constructions utilisées. Dans la construction 2-3722, la séquence de l'ORF 14 a été mutée par changement de l'ATG en ATC et par insertion d'un codon STOP TAG en position +2.

(b) Observation en microscopie confocale de la localisation subcellulaire des protéines de fusion 14EG et EG14 dans des protoplastes de cellules BY2, 24h post-infection.

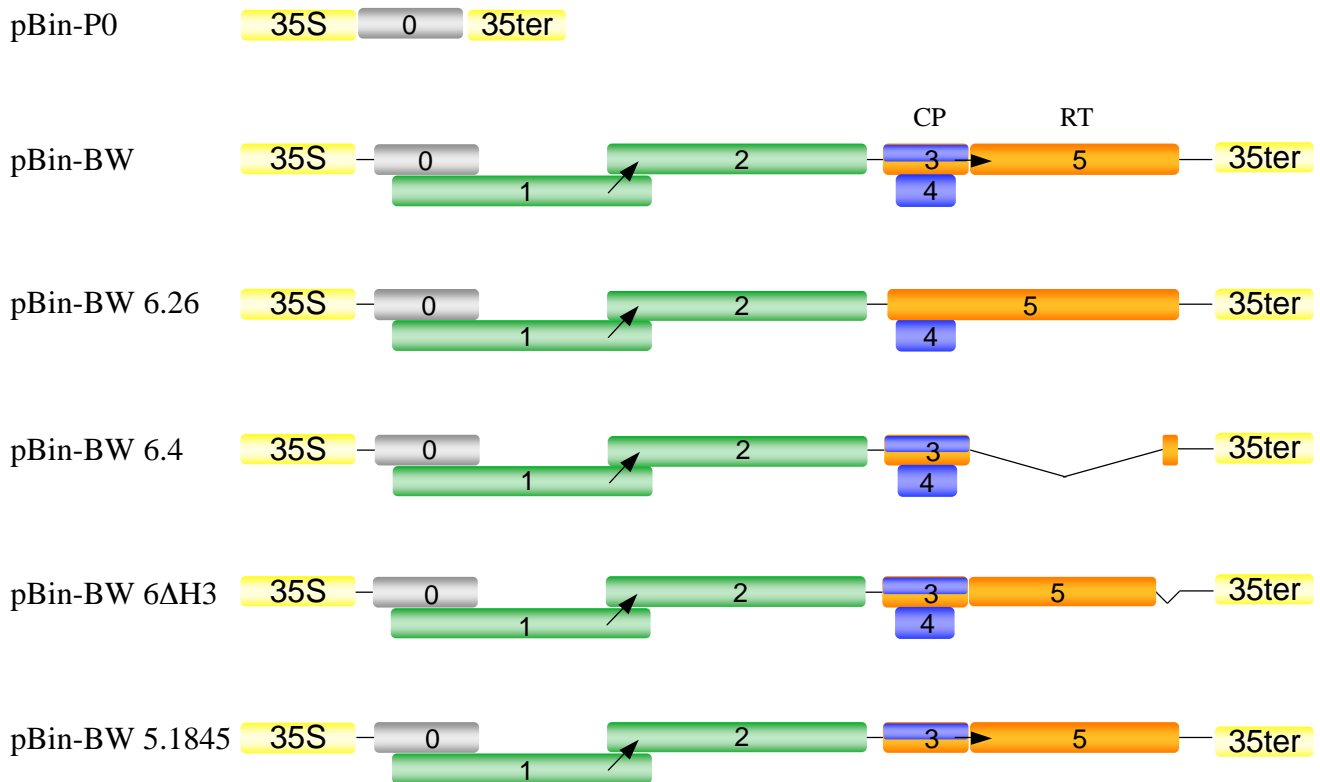


**Figure I-10 :** Fonctionnalité des protéines de fusion EG14 et 14EG.

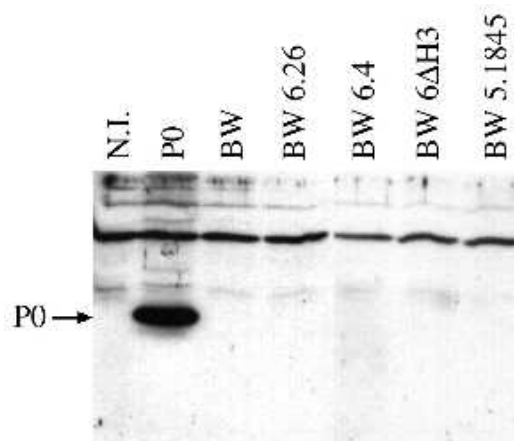
(a) Photographies de feuilles de *Chenopodium quinoa* infectées par les constructions indiquées. En l'absence de la protéine P14, les lésions sont petites et nécrotiques (photographie 2).

(b) Observation en microscopie confocale de la localisation subcellulaire des protéines de fusion 14EG et EG14 dans les plantes montrées en (a) (photos 3 et 4). Les flèches indiquent le nucléole. La fluorescence rouge est due aux chloroplastes.

(a)



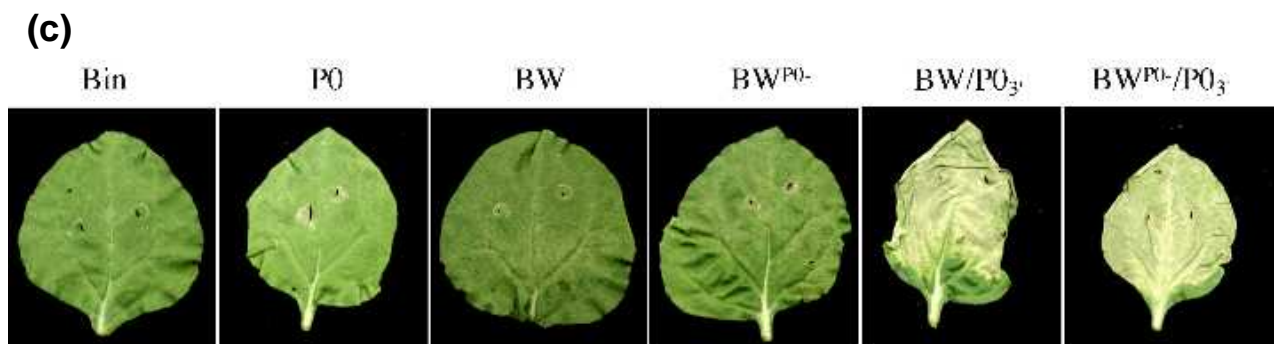
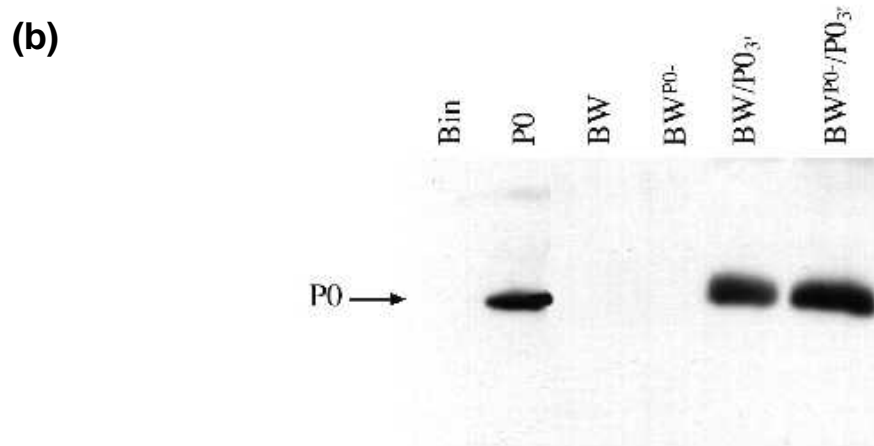
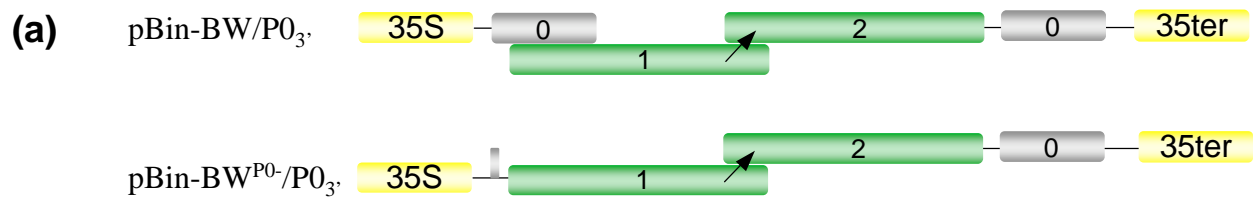
(b)



**Figure II-1 :** Tentative de détection de la protéine P0 à partir de différents mutants du BWYV.

(a) Représentation schématique des constructions utilisées. Mutant 6.26 : remplacement du codon STOP de la CP en codon Y, mutant 6.4 : déletion de l'ORF 5 (sauf 123 derniers nts), mutant 6 $\Delta$ H3 : déletion des 32 aminoacides C terminaux de la P5, mutant 5.1845 : mutation de l'AUG de l'ORF 4 et introduction de 2 codons STOP en aval.

(b) Analyse par Western blot des protéines totales extraites de feuilles agro-infiltrées avec les constructions pBin indiquées. N.I. : plante non infiltrée.

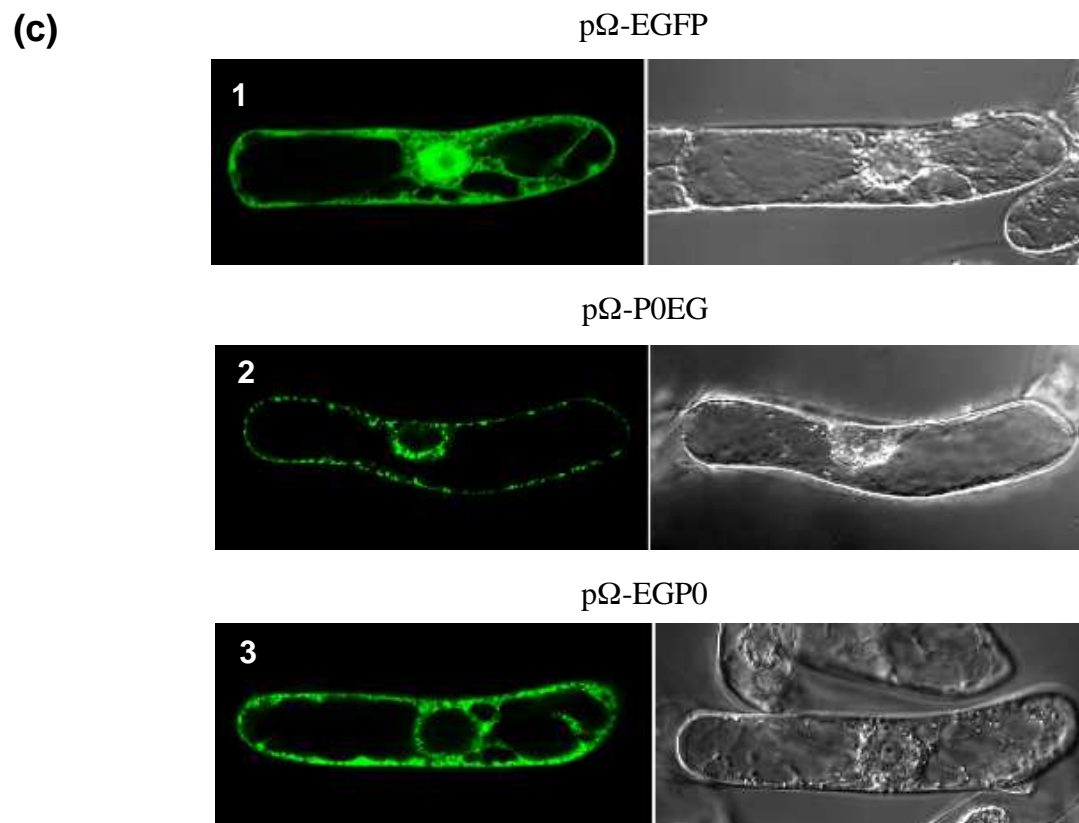
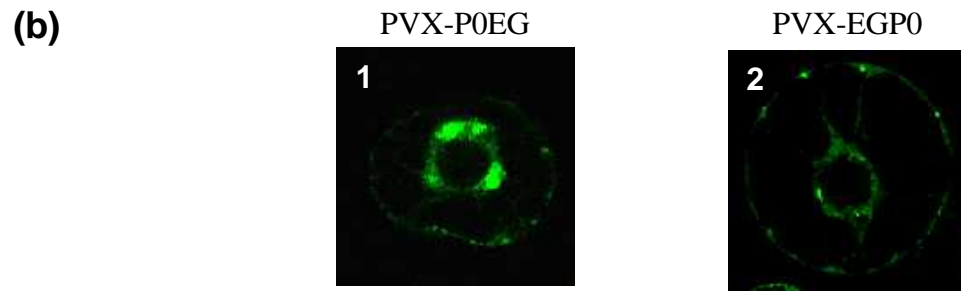
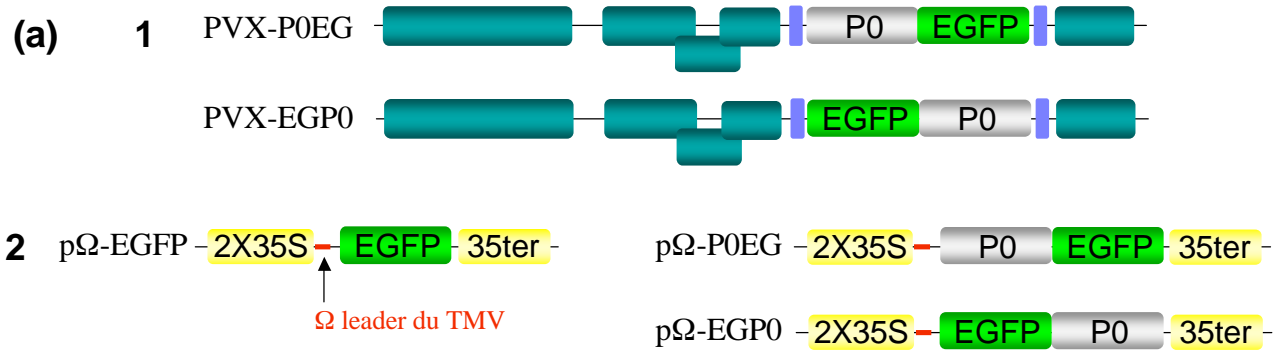


**Figure II-2 :** Expression de la protéine P0 à partir du RNA subgénomique du BWYV.

(a) Représentation schématique des constructions utilisées.

(b) Analyse par Western blot des protéines totales extraites de feuilles agro-infiltrées avec les constructions binaires indiquées.

(c) Photographies sous lumière visible des feuilles agro-infiltrées avec les constructions P0 ou virales avec ou sans l'ORF0 dans le RNA subgénomique.



**Figure II-3 :** Localisation subcellulaire de la protéine P0.

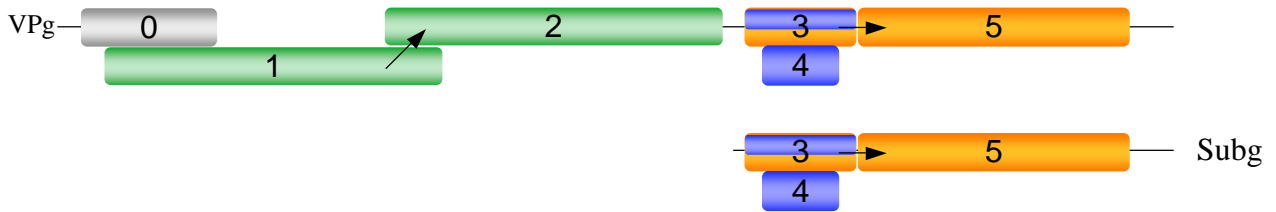
(a) Représentations schématiques des constructions utilisées. 1 : constructions virales ; 2 : constructions pΩ, le leader Ω du TMV augmente l'efficacité de traduction.

(b) Observation en microscopie confocale de protoplastes de cellules BY-2 24h après infection par les constructions PVX-P0EG (1) et PVX-EGP0 (2).

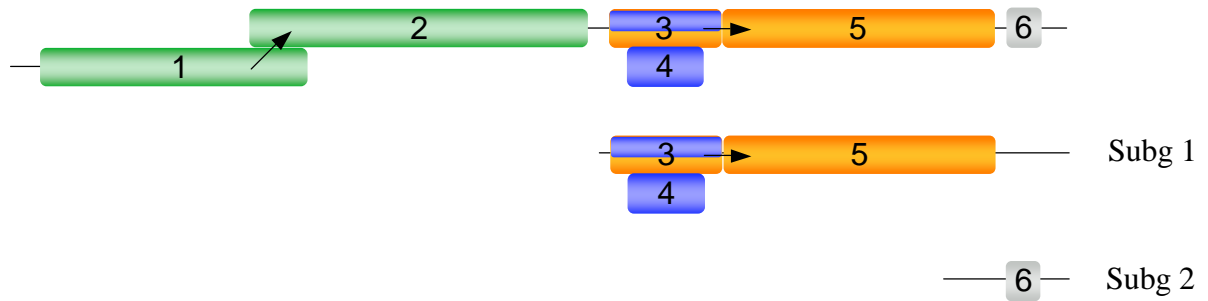
(c) Observation en microscopie confocale de cellules BY-2 16h après bombardement des constructions pΩ-EGFP (1), pΩ-P0EG (2) et pΩ-EGP0 (3). À gauche : observation de la fluorescence de l'EGFP, à droite : observation en contraste différentiel interférentiel (DIC).



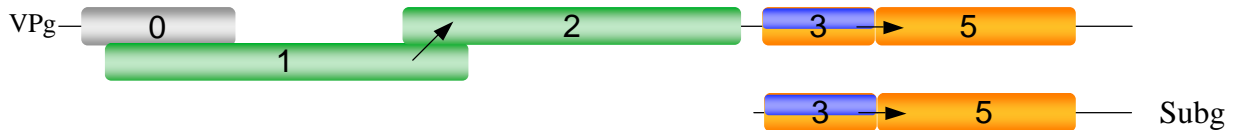
(a) *polerovirus*



(b) *luteovirus*



(c) *enamovirus*



**Figure II-4 :** Organisation génétique des *Luteoviridae*.

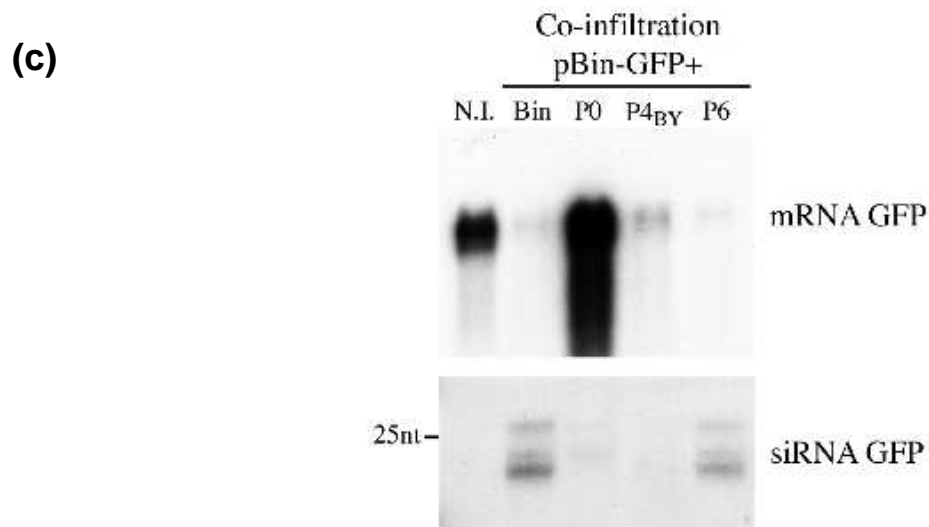
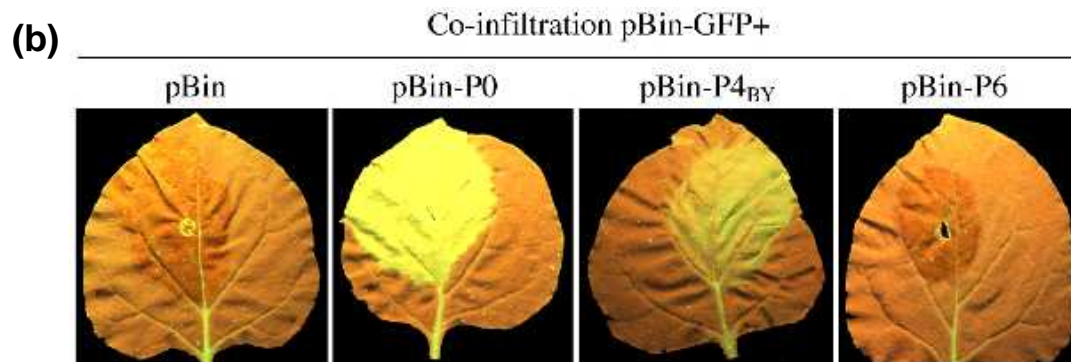
(a) Genre *polerovirus*, membre type : le PLRV

(b) Genre *luteovirus*, membre type : le BYDV-PAV

(c) Genre *enamovirus*, membre type : le PEMV-1 (Pea Enation Mosaic Virus)

- Protéines impliquées dans la réplication du RNA viral.
- Protéines impliquées dans le mouvement du virus.
- Protéines impliquées dans l'encapsidation (CP) et la transmission du virus par le puceron vecteur.

(a) pBin-P4<sub>BY</sub> - 35S - P4 - 35ter -      pBin-P6 - 35S - P6 - 35ter -

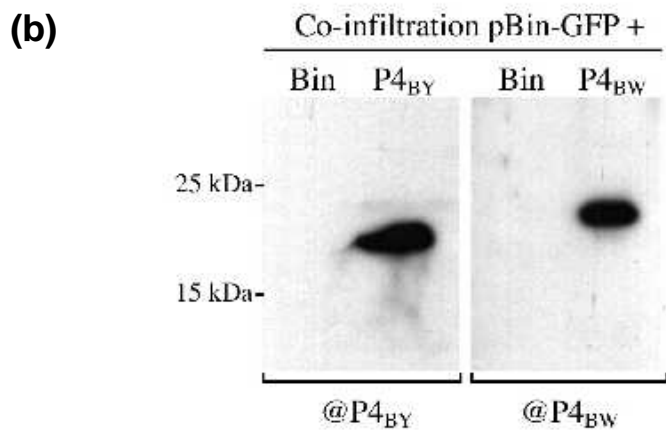
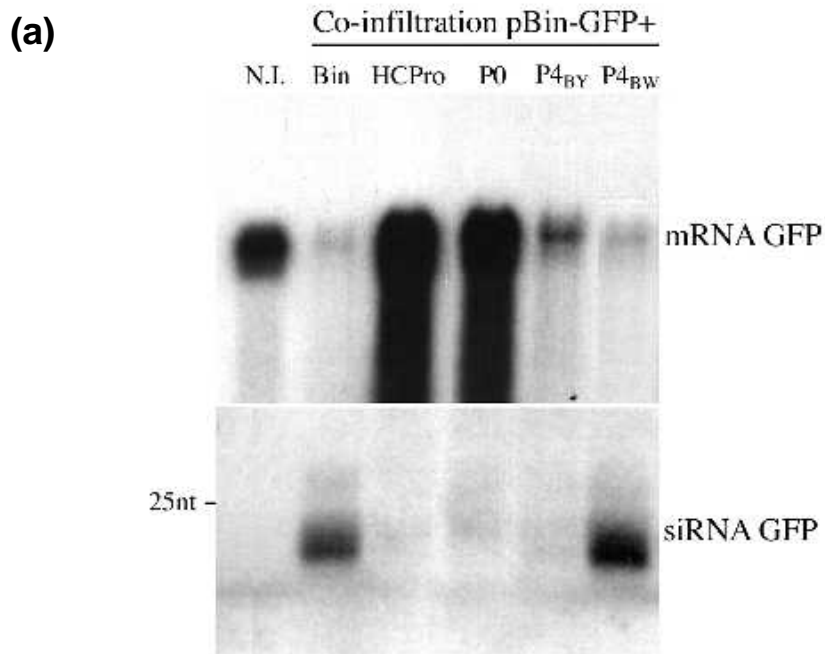


**Figure II-5 :** Suppression du PTGS par la protéine P4 du BYDV.

(a) Représentation schématique des constructions binaires contenant les ORF 4 et 6 du BYDV.

(b) Photographies sous lumière UV de feuilles de *N. benthamiana* 16c co-infiltrées avec pBin-GFP + pBin vide (Bin, témoin négatif) ; pBin-P0 (P0 témoin positif) ; pBin-P4<sub>BY</sub> ou pBin-P6.

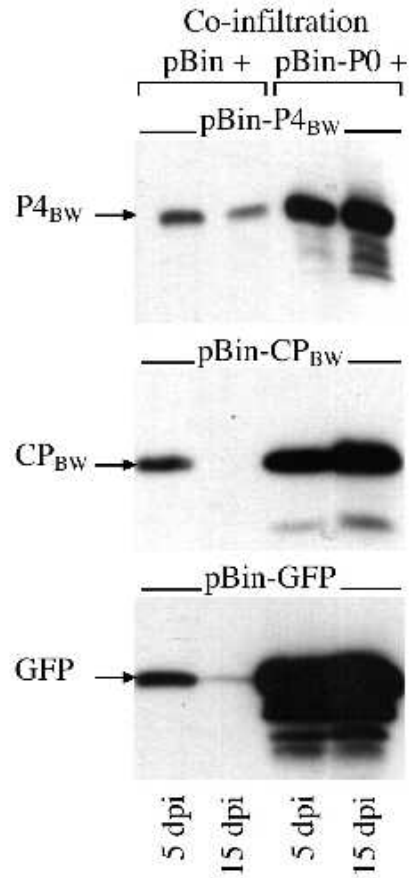
(c) Analyse par Northern blot des mRNA et des siRNA GFP extraits des feuilles montrées en (b). N.I. : plante GFP non infiltrée.



**Figure II-6 :** Comparaison entre les protéines P4 du BYDV et du BWYV.

(a) Analyse par Northern blot des mRNA et des siRNA GFP extraits des plantes co-infiltrées avec pBin-GFP et les constructions pBin indiquées. N.I. : plante GFP non infiltrée, Bin : plasmide pBin sans insert.

(b) Analyse par Western blot des protéines totales extraites de feuilles co-infiltrées avec pBin-GFP + pBin, pBin-P4<sub>BY</sub> ou pBin-P4<sub>BW</sub>. Hybridation avec un anticorps spécifique de la protéine P4 du BYDV (à gauche) ou de la P4 du BWYV (à droite). Les deux protéines migrent un peu plus haut que le poids moléculaire calculé (17kDa pour la P4 du BYDV et 19kDa pour la P4 du BWYV).



**Figure II-7 :** L'activité de suppression de la protéine P0 permet la surexpression de protéines hétérologues.

Analyse par Western blot de protéines totales extraites 5 et 15 jours post-infiltration (dpi) de feuilles co-infiltrées avec pBin ou pBin-P0 + pBin-P4<sub>BW</sub>, pBin-CP<sub>BW</sub> et pBin-GFP et révélées avec les anticorps correspondants. La position des protéines est indiquée sur la gauche.