



Rôle de la protéine p14 du BNYVV et de l'ARN-3 viral dans la suppression de l'interférence par l'ARN et le mouvement à longue distance

Alyssa Flobinus

► To cite this version:

Alyssa Flobinus. Rôle de la protéine p14 du BNYVV et de l'ARN-3 viral dans la suppression de l'interférence par l'ARN et le mouvement à longue distance. Virologie. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ045 . tel-01561088

HAL Id: tel-01561088

<https://theses.hal.science/tel-01561088>

Submitted on 12 Jul 2017

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**Institut de Biologie Moléculaire des Plantes - UPR 2357****THÈSE** présentée par :**Alyssa FLOBINUS**soutenue le : **16 Septembre 2016**pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**Discipline / Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Aspects moléculaires
et cellulaires de la biologie**Rôle de la protéine p14 du BNYVV et de l'ARN-3 viral
dans la suppression de l'interférence par l'ARN
et le mouvement à longue distance****THÈSE dirigée par :**
M. GILMER David

Professeur à l'Université de Strasbourg, IBMP (Strasbourg)

RAPPORTEURS :
Mme SALEH Maria Carla
M. BENARD LionelDirecteur de recherche, Institut Pasteur (Paris)
Chargé de recherche (CR1), LBMCE (Paris)**AUTRES MEMBRES DU JURY :**
M. GAGLIARDI Dominique

Directeur de recherche, IBMP (Strasbourg)

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres du jury, les Docteurs Maria Carla Saleh, Lionel Bénard et Dominique Gagliardi, d'avoir accepté de juger et d'évaluer mon travail de thèse.

Ensuite, je tiens à remercier les Docteurs Marie-Christine Mazon et Nathalie Schnepf qui m'ont permis de commencer mon aventure dans la recherche en m'accueillant au sein de leur laboratoire pour mon stage de Master.

Je remercie très chaleureusement mes deux directeurs de thèse, le Professeur David Gilmer et le Docteur Salah Bouzoubaa, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe ; c'est également grâce à eux que j'ai réussi le concours de l'école doctorale ! Merci à vous, pour vos précieux conseils, votre patience et votre gentillesse envers moi. Merci de m'avoir encadrée, aidée, accompagnée et soutenue durant ma thèse. Merci pour votre disponibilité, votre sympathie et vos histoires drôles qui ont rendu nos rapports beaucoup plus simples et agréables. Merci à vous aussi pour les fous rires ! Merci à David pour ses blagues et à Salah pour ses délicieuses gourmandises marocaines !

Je remercie la directrice de notre laboratoire, le Docteur Véronique Ziegler-Graff, qui a été ma première interlocutrice, pour ses conseils et sa gentillesse.

Un grand merci à Elodie, alias « mamie Klein », qui m'a très bien accueillie dans l'équipe, et avec qui j'ai commencé mes expériences. Je la remercie également pour ses nombreux bons conseils, sa gentillesse et son soutien. Merci pour toutes les sorties que nous avons réalisées ensemble, pour nos discussions intra ou extra-labo. Merci tout simplement pour tous nos bons moments passés ensemble.

Merci à Danièle, alias « Dani Boon », alias « la momie », alias « la Makrel » pour sa sympathie, sa gentillesse, nos fous rires et tous les bons moments passés ensemble, au labo comme à l'extérieur !

Merci à Gisèle alias « Mamie Gi », Reza et Arezoo qui ont partagé de très bons moments avec moi, que ce soit au labo ou en dehors.

Merci à Mattia alias « Dall'Mat », pour sa sympathie, sa gentillesse, ses blagues, ses chansons italiennes ! Merci pour tous les bons moments passés ensemble !

Je remercie toute l'équipe pédagogique pour l'enseignement de virologie, alias la « Team Viro » : Mario, David, Salah, Maria, Corinne, sans oublier Danièle (TP) qui m'ont permis de réaliser ma 4^{ème} année de thèse en tant que ½ ATER. Je les remercie de m'avoir aidée à préparer les enseignements, pour leur soutien, leur gentillesse et leur bonne humeur ! Merci d'avoir rendu cette année agréable en me permettant de finir ma thèse dans les meilleures conditions. Merci à Anastasie, mon binôme d'ATER avec qui j'ai passé de très bons moments. Ce fut pour moi un plaisir d'échanger et de travailler avec toi.

Je remercie très chaleureusement ma Famille adorée pour son soutien, ses encouragements à chaque étape de ma vie, et sans laquelle je ne serai pas arrivée jusqu'ici.

Je remercie le groupe d'amis, Elodie, Léa, Manu, Dalia, Kamal, Kinda, Aya, Annette, Khalid, Marco, Adrien, Clément, Nina, Sonia, Edouardo, Marina, Claire et Sébastien avec qui j'ai partagé des moments inoubliables. Je remercie chacun, individuellement, pour leur soutien et leurs précieux conseils.

Je remercie Ketty, Anne-Flore et Windy pour leur soutien. Je remercie également tous les frères et sœurs de la Communauté du Chemin-Neuf pour leur soutien quotidien, leur gentillesse extraordinaire et leurs précieux conseils.

Enfin je tiens à tous vous dire un grand **MERCI** d'avoir partagé cette expérience avec moi de près ou de loin et d'avoir rendu cette étape de ma vie plus agréable !!!



Tables

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	1
ABRÉVIATIONS	4
INTRODUCTION GÉNÉRALE	5
I. MÉTABOLISME DES ARNm CELLULAIRES	5
1. Mécanisme de dégradation dépendant de la déadénylation.....	6
1.1. Déadénylation	6
1.2. Decapping et dégradation 5' → 3'	8
1.2.1. Dégradation des produits du <i>decapping</i>	10
1.2.1.1. Dégradation d'ARN non coiffé par l'exoribonucléase XRN.....	10
1.2.1.1.1. Fonctions des enzymes XRN.....	11
1.2.1.1.2. Mécanisme d'action des enzymes XRN	11
1.2.1.1.3. Recrutement de XRN.....	12
1.2.1.2. Elimination du groupement m ⁷ Gpp	12
1.2.2. Contrôle du mécanisme de <i>decapping</i>	13
1.3. Dégradation 3' → 5'	14
1.4. Dégradation des ARNm dépendant de l'uridylation.....	15
2. Mécanismes de surveillance des ARNm chez les eucaryotes	16
2.1. NMD : nonsense-mediated mRNA decay	16
2.1.1. Mécanismes d'activation du NMD	17
2.2. NSD : Nonstop mRNA decay.....	20
2.2.1. Mécanisme d'activation du NSD.....	20
2.3. NGD : No-go mRNA decay	21
3. Mécanismes spécifiques de dégradation des ARNm.....	22
3.1. AUMD : AU-rich mediated mRNA decay	22
3.2. GUMD : GU- rich mediated mRNA decay	23
3.3. Dégradation des ARNm induite par les microRNA	23
3.4. Dégradation des ARNm par les siRNA	26
II. INTERFACE ENTRE LES VIRUS ET LA MACHINERIE DE DEGRADATION DES ARNm CELLULAIRES	28
III. CARACTERISTIQUES DU BNYVV	31
1. Classification du BNYVV	31
2. Gamme d'hôtes.....	31
3. Transmission par le vecteur.....	31
3.1. Cycle du vecteur.....	31
4. Rhizomanie.....	32
4.1. Symptômes.....	32
4.2. Enjeux économiques	32
5. Description du BNYVV	33
IV. OBJECTIFS DE LA THÈSE	36
CHAPITRE I : ETUDE DU RÔLE DE L'ARN3 DANS LE MOUVEMENT À LONGUE DISTANCE DU BNYVV	38
I. INTRODUCTION	38
II. ARTICLE	43
CHAPITRE II : ETUDE DU MODE D'ACTION DE LA PROTÉINE P14 DU BNYVV ET DE SON RÔLE DANS LE MOUVEMENT SYSTÉMIQUE VIRAL	66
I. INTRODUCTION	66

II. ARTICLE	72
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	86
BIBLIOGRAPHIE.....	93
ANNEXE.....	106

Table des figures et des tableaux

Figure I : Principales voies de dégradation des ARNm	6
Figure II : Mécanisme d'action de XRN vu du site actif	11
Figure III : L'activation du NMD chez la levure	18
Figure IV : Activation du NMD chez les mammifères	19
Figure V : Activation du NMD chez les plantes	20
Figure VI : Mécanisme d'activation de la voie NSD	21
Figure VII : Mécanisme d'activation de la voie NGD chez la levure.....	22
Figure VIII : Mécanisme du <i>AU-rich mediated mRNA decay</i> illustré par le Tristetrapolin (TTP)	23
Figure IX : Mécanisme du <i>GU-rich mediated mRNA decay</i> illustré par le CUGBP1	24
Figure X : Biogenèse des miRNA chez les mammifères	25
Figure XI : Régulation pos-transcriptionnelle par les miRNA chez les mammifères.....	26
Figure XII : Biogenèse des miRNA chez les plantes	27
Figure XIII : Mécanisme antiviral du <i>RNA silencing</i>	28
Figure XIV : Représentation du cycle du vecteur <i>Polymyxa betae</i>	31
Figure XV : Symptômes de la rhizomanie de la betterave sucrière	32
Figure XVI : Photo de particules virales du BNYVV visualisées en microscopie électronique à transmission.....	33
Figure XVII : Représentation de l'organisation des ARN du BNYVV	34
Figure I.1 : Expression ectopique de l'ARN3 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
Figure I.2 : Identification de l'exoribonucléase Xrn1 responsable de la dégradation de l'ARN3	41
Figure II.1 : Recherche d'interactions entre les protéines virales et la séquence « coremin ».....	67
Figure II.2 : Visualisation de la complémentation phénotypique apportée par l'ARN3 en l'absence de l'expression de VSR (BNYVV p14)	69
Figure II.3 : Détection des protéines exprimées transitoirement chez <i>N. benthamiana</i>	70
Tableau II.1 : Protéines d'intérêts identifiées par MS/MS suite à l'immunoprécipitation des protéines étiquetées	71

Abbréviations

Abréviations

ADN/ ADNc : Acide désoxyribonucléique/
Acide désoxyribonucléique
complémentaire

Ago : Argonaute

ARN/ARNm : Acide ribonucléique/ Acide
ribonucléique messenger

AUMD : AU-rich mediated mRNA decay

°C : Degré Celsius

CCR4 : Catabolite repressor 4

DsRBP/DsRBD : Double-stranded RNA-
binding protein / Double-stranded RNA-
binding domain

GFP : Green fluorescent protein

ibid : ibidem, référence identique à la
précédente

kDa : kilo Dalton

miRNA : microRNA

ncRNA : noncodingRNA

NMD : Nonsense-mediated mRNA decay

nt : nucleotide

pb : paire de bases

PTGS : Post-transcriptional gene silencing

RNP : Ribonucleoprotein complex

RDR : RNA polymerase- RNA dependent

RBPs : RNA-binding proteins

RISC : RNA-induced silencing complex

siRNA : small interfering RNA

TGS : Transcriptional gene silencing

VSR : viral suppressor of RNA silencing

UTR : untranslated region

Noms des virus les plus cités:

BNYVV : Beet necrotic yellow vein virus

BSBMV : Beet soil-borne mosaic virus

CMV : Cucumber mosaic virus

RCNMV : Red clover necrotic mosaic
virus

TBSV : Tomato Bushy stunt virus

TRV : Tobacco rattle virus

TuYV : Turnip yellows virus

WNV : West Nile virus

Introduction générale

Introduction générale

L'expression phénotypique d'un génome se caractérise entre autres par la production de protéines structurales et enzymatiques issues de la traduction d'ARN messagers (ARNm) par la machinerie traductionnelle. Les constituants cellulaires nécessitent leur renouvellement constant. Celui-ci est dépendant de la demi-vie des macromolécules et des conditions physiologiques de la cellule. Cette situation assure le maintien d'une homéostasie permettant l'adaptation rapide des métabolismes cellulaires. Cela passe nécessairement par une régulation fine des mécanismes de synthèse et de dégradation des acides ribonucléiques et des protéines pour assurer des réponses adaptatives aux situations de stress, de carence ou de signalisation.

Les virus utilisent tous la machinerie traductionnelle des cellules qu'ils infectent et sont donc sujets aux mécanismes de dégradation cellulaire souvent utilisés pour contrer l'infection virale. Différentes stratégies de contre-défense virale sont mise en place pour maintenir une homéostasie dans la cellule infectée, dans le but de la maintenir en vie mais aussi de faciliter l'amplification virale. Dans une première partie, je détaillerai les mécanismes moléculaires du métabolisme des ARN messagers puis, je présenterai le modèle viral que j'ai étudié durant ma thèse, le BNYVV. Ce virus possède un génome réparti sur plusieurs ARN. Ces ARN viraux présentent toutes les caractéristiques des messagers cellulaires.

I. Métabolisme des ARNm cellulaires

De façon générale, un ARNm est défini comme étant une molécule vectrice de l'information génétique transcrite à partir de la séquence d'ADN d'un gène. Un ARNm a pour fonction d'être traduit en protéine afin d'exprimer le gène correspondant. Chez les eucaryotes, les ARNm sont produits dans le noyau par l'ARN polymérase ADN dépendante de type II. Au cours de leur transcription, ils subissent des modifications telles que l'ajout d'une coiffe (guanine méthylée en position 7) à l'extrémité 5', la polyadénylation (poly(A)) de leur extrémité 3' et l'épissage. L'épissage consiste à enlever les introns et à relier entre eux les exons, permettant ainsi d'obtenir un ARN messager mature (ARNm). Cet épissage est dit alternatif en présence de plusieurs introns induisant l'omission ou pas de certains exons, conduisant à la production de plusieurs ARNm à partir d'un même gène. L'ARNm ainsi produit interagit avec des protéines nucléaires pour former un complexe ribonucléoprotéique (mRNP) permettant d'assurer sa stabilité nucléaire et de valider son export dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme, l'ARNm sera traduit, stocké ou dégradé. La traduction du messenger fait

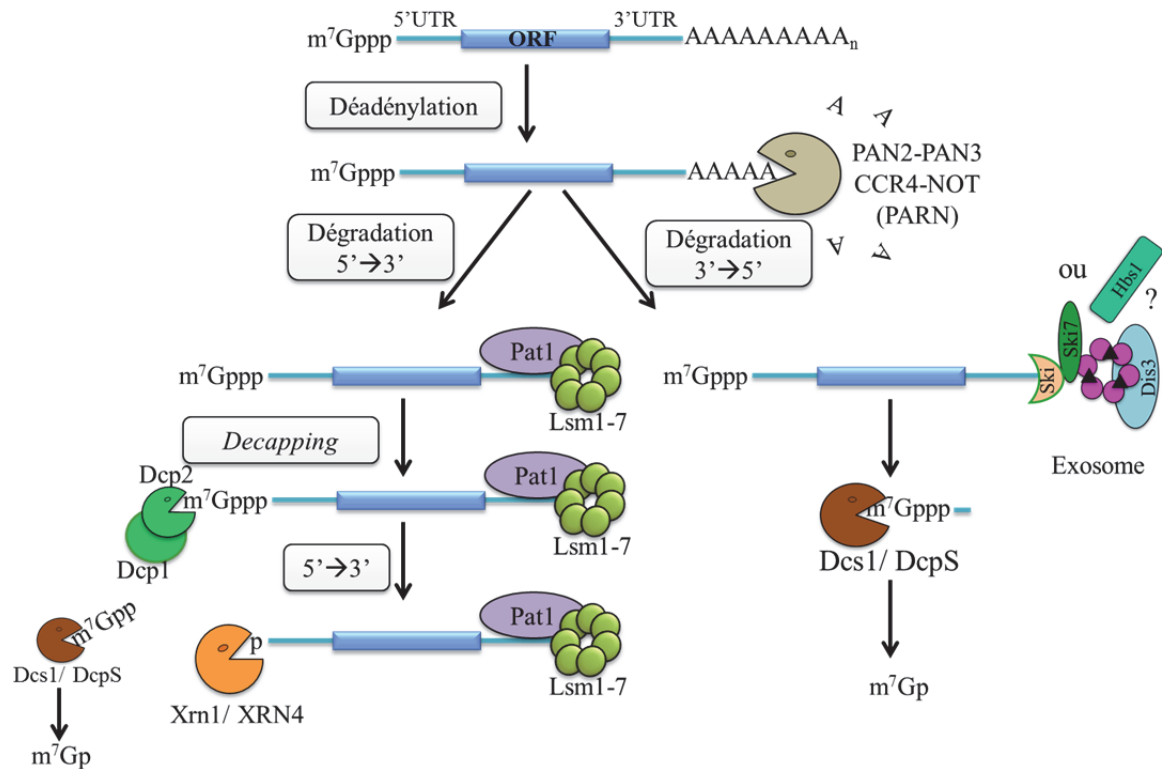


Figure I : Principales voies de dégradation des ARNm. Les ARNm destinés à être dégradés sont déadénylés. Ensuite, ils peuvent suivre la voie de dégradation 5'→3' après une étape de *decapping* ou bien ils peuvent directement être pris en charge après la déadénylation par la voie 3'→5'. m⁷Gppp correspond à la coiffe ; AAAAAAAAAA_n, correspond à la queue poly(A) ; 5' et 3' UTR : séquence terminale de l'ARN non traduite et ORF représente la phase codante de l'ARN. Figure adaptée de Garneau *et al.* (Garneau *et al.*, 2007).

appel au facteur eIF4E (*eukaryotic initiation factor*) qui lie la coiffe de l'ARNm et recrute eIF4G et la protéine PABP ou Pab1 (*poly(A)-binding protein*) qui se lie à la séquence poly(A). Le facteur eIF4G assure ainsi la formation d'un pont entre la coiffe et la queue poly(A), circularisant de ce fait l'ARNm, le stabilisant et le protégeant de l'action des exonucléases. Il peut donc être traduit de manière efficace. Le stockage de l'ARNm nécessite son maintien sous forme non exprimée, soit pour être traduit plus tardivement, soit pour être dégradé. La dégradation de l'ARNm post-traductionnelle ou en réponse à des stimuli environnementaux / développementaux, assure une régulation rapide de l'expression du gène correspondant et adaptée aux besoins de la cellule.

Chez la plupart des systèmes eucaryotes étudiés, les processus par lesquels les ARNm, en fin de vie, sont dégradés dans la cellule dépendent de la déadénylation de l'ARNm suivie d'une part par une suppression de la coiffe (*decapping*) et par une dégradation totale de l'ARNm dans le sens 5'→3'. D'autre part, l'ARN peut également être dégradé dans le sens 3'→5' directement après la déadénylation. Les facteurs impliqués dans ces deux voies dépendent des organismes étudiés et c'est pourquoi trois d'entre eux seront pris comme exemples pour synthétiser les connaissances actuelles : la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), les mammifères (*Homo sapiens*) et les plantes (*Arabidopsis thaliana*).

1. Mécanisme de dégradation dépendant de la déadénylation

1.1. Déadénylation

La déadénylation est la première étape clé de la dégradation d'un ARNm, qui consiste à réduire la taille de la queue poly(A) afin de permettre le recrutement de la machinerie de dégradation (**Figure I**). Chez la levure *S. cerevisiae*, la déadénylation peut être régulée par la dynamique d'interaction entre PABP et la queue poly(A), par des protéines spécifiques (*mRNA-binding protein*) ou par des signaux environnementaux comme le stress ou une carence en nutriments (Parker and Song, 2004, Parker, 2012).

Les enzymes impliquées dans ce mécanisme sont des déadénylases, plus précisément des exoribonucléases dépendantes des ions magnésium (Mg^{2+}), qui hydrolysent la queue poly(A) dans le sens 3'→5' en libérant de l'adénosine monophosphate (5'-AMP). Les déadénylases sont réparties en deux groupes : le premier est caractérisé par l'existence d'enzymes possédant dans leur site actif des résidus conservés qui sont l'acide aspartique et l'acide glutamique (DEDD). Ces résidus coordonnent la fixation des ions Mg^{2+} . On retrouve dans ce groupe les protéines Caf1 ou Pop2 (*CCR4 associated factor 1*), Caf1Z, PARN (*poly(A)- specific*

ribonuclease) et PAN2 (*PABP-dependent poly(A) nuclease*). Le deuxième groupe renferme des déadénylases de type EEP (*exonuclease-endonuclease-phosphatase*), dont le site catalytique renferme les deux résidus, l'acide aspartique et l'histidine. Parmi les enzymes de ce groupe est retrouvée la déadénylase CCR4 (*catabolite repressor 4*) (Siwaszek *et al.*, 2014).

Chez la levure, la déadénylation est prise en charge par deux complexes, CCR4-NOT et PAN2-PAN3. Le complexe CCR4-NOT, très conservé, est constitué des deux nucléases CCR4 et Caf1 (Pop2) et de sept protéines accessoires dont les rôles commencent à être définis (Alhusaini and Collier, 2016). CCR4 est la principale enzyme responsable de la déadénylation, elle est associée au complexe par l'intermédiaire de la nucléase Caf1. Cette dernière aurait pour but d'amplifier la fonction de CCR4, soit en stabilisant l'interaction entre le complexe et l'ARNm ciblé, soit en stabilisant le complexe lui-même. CCR4-NOT se compose également du complexe NOT constitué de la protéine NOT1 qui échafaude le complexe CCR4-NOT, des quatre autres protéines NOT et des facteurs Caf130 et Caf40 qui auraient un rôle dans la régulation de la déadénylation (Parker and Song, 2004, Siwaszek *et al.*, 2014). Le second complexe, l'hétérotrimère PAN2-PAN3, est formé par l'association d'une protéine PAN2 avec un dimère de PAN3. D'après les analyses biochimiques des déadénylases, la protéine PABP stimule l'activité de PAN2 tandis qu'elle inhibe l'activité de CCR4. Ainsi la dynamique du complexe mRNP affecte la déadénylation (Parker and Song, 2004, Parker, 2012).

Chez les mammifères, on retrouve plusieurs déadénylases. La suppression de la queue poly(A) des ARNm est réalisée par les deux complexes, CCR4-NOT et PAN2-PAN3. Chez l'homme, le complexe CCR4-NOT comprend un plus grand nombre de sous-unités que chez la levure mais sa fonction reste la même. Une autre déadénylase, PARN, est retrouvée chez tous les eucaryotes, excepté chez la levure et la drosophile. Son activité est inhibée par la présence de la PABP et est stimulée par la coiffe (Parker and Song, 2004, Garneau *et al.*, 2007, Siwaszek *et al.*, 2014). Cette enzyme intervient spécifiquement dans la déadénylation des ARNm possédant des éléments *AU-rich* et de ceux destinés à la voie de dégradation *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD, voir ci-dessous) (Parker and Song, 2004).

Chez les plantes, des homologues des complexes CCR4-NOT et PAN ont été identifiés (Siwaszek *et al.*, 2014). Les homologues de CCR4 et Caf1 possèdent également une activité de déadénylation (Suzuki *et al.*, 2015). Comme chez les mammifères, un homologue de PARN est retrouvé chez *A. thaliana* dont l'activité est importante au cours du développement

embryonnaire (Chiba and Green, 2009). Cette déadénylase est également impliquée dans la régulation des ARNm mitochondriaux (Hirayama *et al.*, 2013).

Un modèle de déadénylation similaire, en deux étapes, est proposé pour la levure et les mammifères. Tout d'abord, le complexe PAN2-PAN3 est recruté au niveau de la queue poly(A) par une interaction entre PABP et PAN3. Puis, le complexe est activé pour raccourcir la queue poly(A) des ARNm cytoplasmiques à environ 65 et 110 résidus au lieu de 90 et 150-200 initialement chez la levure et chez les mammifères respectivement (Tian *et al.*, 2005). Ensuite, CCR4-NOT prend le relais et continue à dégrader la queue poly(A). Lorsque la taille de cette dernière atteint environ 10 à 15 résidus, on parlera d'oligo(A) au lieu d'une queue poly(A), l'ARN devient substrat des enzymes de la voie du *decapping* (Parker, 2012, Siwaszek *et al.*, 2014). Si l'extrémité 3' n'est pas prise en charge par un facteur favorable au *decapping*, la queue oligo(A) sera complètement dégradée par une déadénylase et l'ARN sera ciblé par les facteurs de la voie de dégradation 3'→5' (Tharun, 2009).

1.2. *Decapping* et dégradation 5'→3'

Le processus de *decapping* se traduit par la suppression de la coiffe à l'extrémité 5' d'un ARNm (**Figure 1**). Ce processus se définit globalement en trois étapes. Premièrement, la coiffe de l'ARNm doit être accessible au complexe de *decapping* et doit donc être libre de tous facteurs (eIF4E et eIF4G). Ceci implique la nécessité d'inhiber la traduction. Ensuite, le complexe de *decapping* doit être recruté au niveau de la coiffe puis activé, entraînant ainsi la catalyse de la coiffe par Dcp2 et la libération du groupement m7Gpp et de l'ARNm qui ne porte plus qu'un phosphate à son extrémité 5'. Chacune de ces étapes est régulée par différents facteurs cellulaires.

La réaction de *decapping* est réalisée par le complexe enzymatique Dcp1-Dcp2 associé à d'autres facteurs cellulaires. La protéine Dcp1 appartient à la famille EVH1/WH1 *domain* (*Ena/VASP homology 1/ Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 1*) (Parker and Song, 2004). Ce domaine favorise les interactions protéine-protéine, permettant ainsi leur assemblage en complexe. Dans le complexe de *decapping*, la protéine Dcp2 porte l'activité catalytique grâce à son motif Nudix. Cette protéine est classée dans la superfamille des hydrolases Nudix regroupant principalement des pyrophosphohydrolases dont l'activité catalytique consiste à hydrolyser une grande variété de substrats contenant un nucléoside diphosphate lié à une chaîne quelconque X d'ARN (Song *et al.*, 2013). La protéine Dcp2 possède une région N-terminale de 300 acides aminés conservée chez plusieurs

organismes. Ce domaine renferme une région Box A (impliquée dans l'interaction entre Dcp1 et Dcp2), le domaine Nudix (qui comporte le motif Nudix indispensable à son activité catalytique) et une région Box B, impliquée dans la liaison à l'ARN et la reconnaissance de la guanine méthylée en position 7 (Piccirillo *et al.*, 2003, Parker, 2012). Les ARN qui sont reconnus par ce complexe possèdent une taille supérieure ou égale à 25 nt. En dessous de cette taille, l'efficacité d'hydrolyse de Dcp2 diminue (Siwaszek *et al.*, 2014).

Chez la levure, les facteurs impliqués dans le *decapping* sont regroupés en trois classes différentes. La classe III est constituée de deux facteurs Dhh1 (*DexD/H Helicase I*), membre de la superfamille DEAD box hélicase et Scd6 (*Suppressor of clathrin deficiency*). Ces deux protéines sont impliquées dans la répression de la traduction en inhibant la formation du complexe de pré-initiation 48S. Ceci conduit à la libération des facteurs associés à la coiffe. Une autre protéine intervient aussi dans l'inhibition de la traduction, il s'agit du facteur Pat1 (ou MRT1), première protéine associée avec la topoisomérase II, qui appartient à la classe II. Pat1 est un facteur clé très conservé chez les eucaryotes. Il est impliqué dans l'arrêt de la traduction, dans le recrutement et dans l'activation du complexe enzymatique Dcp1-Dcp2. Pat1 est également considéré comme une protéine d'échafaudage tout comme Edc3, *Enhancer of decapping*, qui appartient à la classe I dans laquelle on retrouve aussi Edc1 et 2. Ces facteurs Edc jouent un rôle dans l'activation du complexe Dcp1-Dcp2. Edc1 et Edc2 se lient directement à l'ARNm (Arribas-Layton *et al.*, 2013). Un autre facteur, impliqué dans l'activation de Dcp1-Dcp2 est le complexe Lsm1-7 (*sm-like*) qui possède sept sous-unités Lsm1 à Lsm7 ; il interagit également avec Pat1.

Une étude très récente révèle que les facteurs Not2, Not3 et Not5 du complexe CCR4-NOT sont aussi impliqués dans le processus de *decapping* (Alhusaini and Coller, 2016). Les facteurs Not3 et Not5 interagissent avec le facteur Pat1 pour stimuler le *decapping* (ibid). En fin de la déadénylation, les protéines Not3 et Not5 peuvent recruter le facteur Pat1 à l'extrémité 3' de l'ARN qui recrute à son tour le complexe Lsm1-7. Ceci conduit à la formation du complexe Lsm1-7-Pat1 qui reconnaît et fixe spécifiquement l'oligo(A) de l'ARN suite à sa déadénylation. Cette liaison du complexe en 3' de l'ARN inhibe sa dégradation 3'→5' par l'exosome (Tharun, 2009). Ensuite, Pat1 aidé des facteurs Dhh1 et Scd6 inhibe l'initiation de la traduction et recrute Edc1-3. Le complexe Edc3-Dhh1-Scd6 se forme et le complexe Dcp1-Dcp2 est attiré au niveau de la coiffe pour être ensuite activé par Pat1, Edc3 et le complexe Lsm1-7 (Tharun *et al.*, 2000, Parker and Song, 2004, Nissan *et al.*, 2010, Parker, 2012, Chowdhury *et al.*, 2014, Siwaszek *et al.*, 2014).

Chez les mammifères, l'activité catalytique de *decapping* est portée par l'homologue de Dcp2, hDcp2 (Piccirillo *et al.*, 2003). Deux homologues de Dcp1, hDcp1a et hDcp1b, ont été identifiés chez l'homme sans distinction fonctionnelle, mais hDcp1a est le plus utilisé (Fenger-Gron *et al.*, 2005). Chez la levure, le complexe Dcp1-Dcp2 se forme librement. Par contre, un facteur supplémentaire est nécessaire chez l'homme. Hedls (ou EDC4) (*human enhancer of decapping large subunit*), interagit spécifiquement avec hDcp2 pour le stabiliser et favoriser son interaction avec hDcp1a. Hedls augmente également l'activité catalytique de hDcp2 *in vitro* par un mécanisme encore inconnu (ibid). D'autres homologues des facteurs du *decapping* sont présents chez l'homme. Il s'agit notamment des constituants du complexe Lsm1-7 (hLsm1-7), de Dhh1 (Rck/p54) et Edc3 (hEdc3) (ibid). Le facteur Pat1b (homologue de Pat1) est également présent et joue un rôle clé dans la dégradation des ARNm. Faisant un lien entre la déadénylation et le *decapping* en interagissant avec le complexe CCR4-NOT et les facteurs du *decapping*, Pat1 pourrait aussi induire la déadénylation par l'intermédiaire de Caf1 (Ozgur *et al.*, 2010). En plus de hDcp2, il existe d'autres protéines de la famille Nudix qui possèdent une activité de *decapping*, dont Nudt16 et Nud3 qui régulent la stabilité de certains ARNm (Song *et al.*, 2010, Grudzien-Nogalska *et al.*, 2016).

Chez les plantes, le système du *decapping* est comparable à celui des mammifères, dans la mesure où l'activité de *decapping* Dcp1-Dcp2 nécessite la présence de l'homologue de Hedls, VCS (VARICOSE) (Xu *et al.*, 2006). Le *decapping* requiert également DCP5 qui interagit directement avec le complexe Dcp1-Dcp2 sans toutefois affecter l'activité de Dcp2, contrairement à Dcp1 et VCS. DCP5 est impliqué dans la répression de la traduction, ce qui lui donne un impact sur le *decapping*. DCP5 intervient aussi dans la formation des *P-bodies* (Xu and Chua, 2009). Chez *A. thaliana*, un homologue de Pat1 a été mis en évidence par une expérience de complémentation fonctionnelle de Pat1 dans la levure et par l'accumulation d'ARN déadénylés coiffés dans les mutant *pat1* chez *A. thaliana* (Roux *et al.*, 2015).

1.2.1. Dégradation des produits du *decapping*

1.2.1.1. Dégradation d'ARN non coiffé par l'exoribonucléase XRN

Le processus de *decapping* achevé, l'ARN dépourvu de sa coiffe se retrouve avec une extrémité 5' monophosphate et devient alors la cible de l'exoribonucléase 5'→3' cytoplasmique XRN (**Figure I**). Chez la levure comme chez les mammifères, il existe deux membres dans la famille XRN, Xrn1 et Xrn2 qui sont localisés dans le cytoplasme et le noyau respectivement. Dans la plante *A. thaliana*, trois orthologues de Xrn2 sont présents. XRN2 et XRN3 sont nucléaires et XRN4 est cytoplasmique. L'absence de l'enzyme XRN1 est

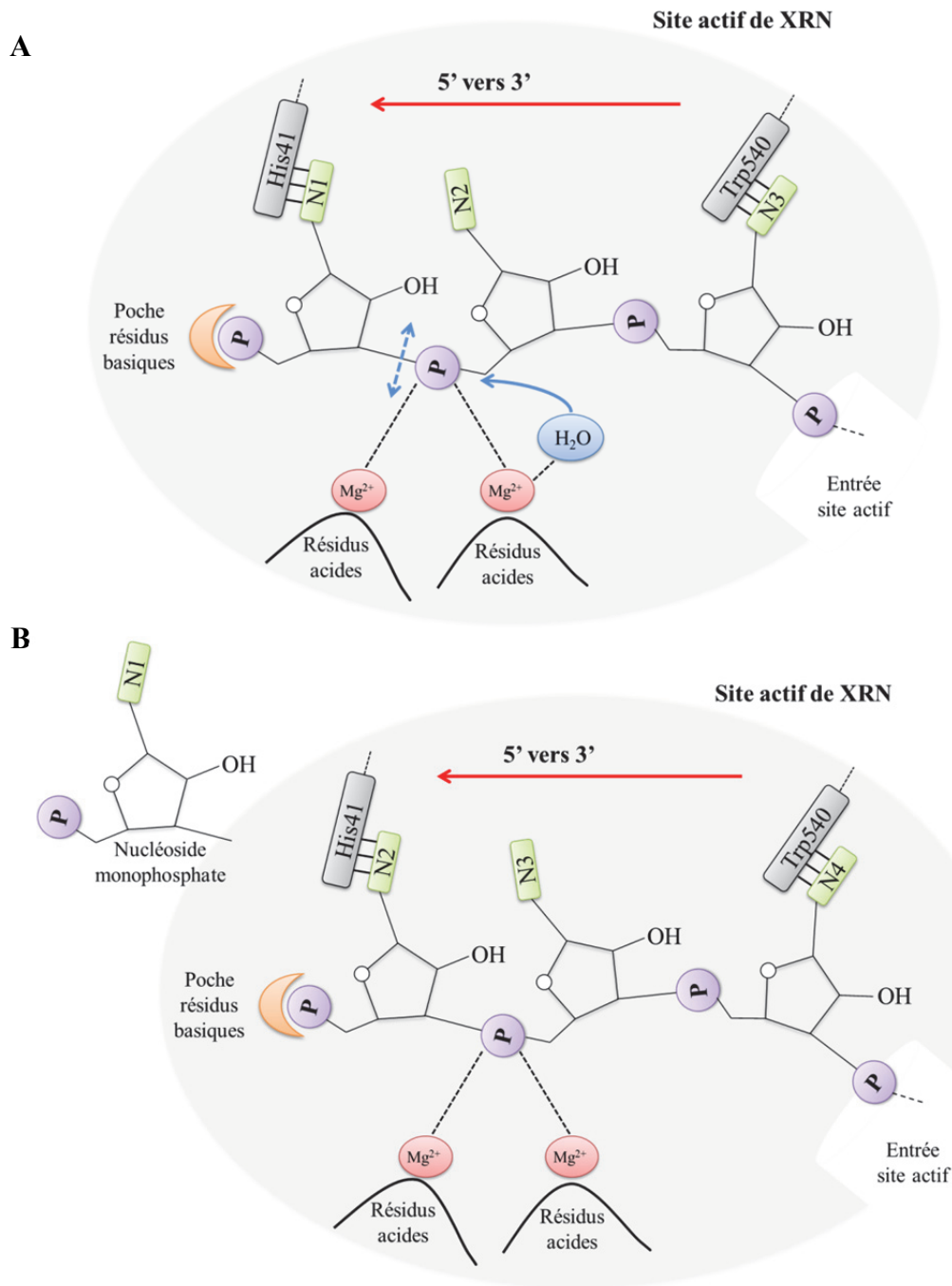


Figure II : Mécanisme d'action de XRN vu du site actif. (A) Positionnement de l'ARN dans le site actif de l'enzyme avant hydrolyse. La flèche bleue correspond à l'attaque nucléophile du phosphate et la double flèche en trait interrompu correspond à l'hydrolyse de la liaison phosphodiester. **(B)** Déplacement de l'ARN dans le site actif et libération d'un nucléoside monophosphate suite au clivage. La flèche rouge indique le sens de dégradation de l'ARN par l'enzyme. Les résidus histidine 41 (His41) et tryptophane 540 (Trp540) stabilisent le maintien de l'ARN en reconnaissant les bases. N1, N2 et N3 représentent les bases de 3 nucléotides. Les résidus basiques de la poche hydrophobe participent à la reconnaissance du substrat 5' monophosphate. P, groupement phosphate ; Mg²⁺, ion magnésium. Figure adaptée de l'article de M. Jinek *et al.* (Jinek et al. 2011).

compensée par l'exoribonucléase XRN4 : on parlera d'homologue fonctionnel (Kastenmayer and Green, 2000). Pour plus de clarté dans le texte, le nom de ces exoribonucléases sera noté Xrn chez la levure et les mammifères, et XRN chez les plantes.

1.2.1.1.1. Fonctions des enzymes XRN

Xrn2 et ses orthologues sont impliqués dans la dégradation des ARN nucléaires, dans la maturation des ARN ribosomiaux, la terminaison de la transcription et le contrôle qualité des ARN coiffés. Xrn2 intervient également dans l'élongation de télomères en dégradant un ARN non codant qui inhibe l'activité des télomérases (Nagarajan *et al.*, 2013).

Outre la dégradation des ARNm issus du processus de *decapping*, Xrn1 et ses homologues, dont XRN4, ciblent aussi les ARNm provenant du clivage endonucléolytique produit par le système de surveillance ou par le système d'interférence par l'ARN (Maldonado-Bonilla, 2014). Selon les organismes, ces enzymes participent à des voies de régulation plus spécifiques qui ne seront pas abordées ici.

En plus de leurs fonctions respectives, Xrn1 et Xrn2 partagent des fonctions communes telles que la dégradation des ARN non codants (ARN de transfert instable et défectueux, *microRNA*, *small nucleolar RNA*). De par leurs implications dans les différentes voies de régulations, ces exoribonucléases jouent un rôle très important au sein de l'organisme. De plus, tous les membres de la famille XRN possèdent une région N-terminale très conservée qui porte l'activité catalytique. Leur site actif ainsi que leur mécanisme d'action sont également très conservés (Jinek *et al.*, 2011, Nagarajan *et al.*, 2013).

1.2.1.1.2. Mécanisme d'action des enzymes XRN

Afin d'illustrer le mécanisme d'action des XRN, le modèle de Xrn1 chez *Drosophila melanogaster* est pris comme exemple.

L'ouverture très étroite du site actif de Xrn1 permet de limiter l'accès uniquement aux ARN simple brin ayant une extrémité 5' monophosphate et de dérouler les structures secondaires de l'ARN cible au cours du processus de dégradation. Du fait de l'agencement du site actif, seuls 3 nucléotides peuvent s'y insérer. Ce dernier renferme deux groupes de résidus acides conservés qui interagissent chacun avec une molécule d'ion magnésium (Mg^{2+}). On y retrouve aussi une poche de résidus basiques très conservés qui reconnaissent et fixent le groupement phosphate situé à l'extrémité 5' de l'ARN. Enfin, deux résidus très conservés, His41 et Trp540 interagissent avec les bases des nucléotides en position 1 et 3 respectivement (**Figure II, A**).

Lorsqu'un ARN avec une extrémité 5' monophosphate est ciblé par XRN, les trois premiers nucléotides pénètrent dans le site actif et le phosphate en 5' se lie aux résidus de la poche basique. Les nucléotides en position 1 et 3 interagissent avec His41 et Trp540 respectivement et le phosphate qui relie les deux premiers nucléotides (en position 1 et 2), interagit avec les ions Mg^{2+} (**Figure II, A**). Ensuite, un des Mg^{2+} recrute une molécule d'eau pour induire une attaque nucléophile du phosphate lié, ce qui provoque l'hydrolyse de la liaison phosphodiester et la libération d'un nucléoside 5'-monophosphate. Puis le phosphate actuellement lié aux deux ions Mg^{2+} est déplacé vers la poche basique, le nucléotide en position 2 s'avance donc en position 1 et interagit avec His41 alors que celui en position 3 se dissocie de Trp540 pour laisser la place au 4^{ème} nucléotide qui pénètre dans le site actif (**Figure II, B**). Ce processus de dégradation est orienté à la fois par le résidu His41 et la poche de résidus basiques qui permettent aussi de positionner le nucléotide pour le clivage (Jinek *et al.*, 2011, Nagarajan *et al.*, 2013). Ce mécanisme de dégradation rend XRN très processive et lui permet de dégrader entièrement son substrat.

1.2.1.1.3. Recrutement de XRN

Chez *S. cerevisiae*, Xrn1 est recruté au niveau de l'ARN cible *via* le complexe Lsm1-7-Pat1. L'enzyme interagit aussi avec le complexe Dcp1-Dcp2 afin de dégrader l'ARN issu du *decapping* (Nagarajan *et al.*, 2013).

Chez les mammifères, c'est le facteur Hedls qui recrute Xrn1 au niveau du complexe de *decapping*. A son extrémité C-terminale, Xrn1 possède un motif, *Edc4-binding*, conservé chez les vertébrés qui lui permet d'interagir avec l'extrémité C-terminale de Hedls (Braun *et al.*, 2012).

Chez les plantes, XRN4 est recruté au niveau de l'ARN cible grâce à une interaction entre XRN4 et le complexe Dcp1-Dcp2 (Weber *et al.*, 2008).

1.2.1.2. Elimination du groupement m⁷Gpp

Après le *decapping*, le m⁷Gpp libéré est pris en charge par Dcs1 ou son homologue DcpS chez les mammifères (*scavenger decapping enzyme*), une protéine de la famille HIT (*Histidine triad*) des pyrophosphatases dont l'activité catalytique dépend d'une triade de résidus histidines. Dcs1 hydrolyse principalement la coiffe des ARN de taille inférieure à 10 nucléotides issus principalement de la dégradation par l'exosome. Elle hydrolyse également le produit de clivage de Dcp1-Dcp2, m⁷Gpp, en m⁷Gp (van Dijk *et al.*, 2003, Parker and Song, 2004). A ce jour, une telle enzyme n'a pas été identifiée chez les plantes.

1.2.2. Contrôle du mécanisme de *decapping*

Chez les eucaryotes, le mécanisme de *decapping* est régulé par la composition du complexe mRNP : si le complexe est défavorable à la traduction et favorable au *decapping*, alors le processus sera activé ; sinon il sera inhibé. En effet, la traduction constitue un inhibiteur du *decapping*, puisqu'en présence des facteurs eIF4G-eIF4E, la coiffe est inaccessible au complexe de *decapping*. La présence de la queue poly(A) a également un effet inhibiteur de *decapping* puisqu'elle fixe PABP qui inhibe l'activité de Dcp2 et facilite le recrutement de la machinerie de traduction *via* le facteur eIF4G (Khanna and Kiledjian, 2004). Par conséquent, la déadénylation est importante à la fois pour exposer la coiffe aux enzymes et pour recruter les facteurs du *decapping* sur l'ARNm, bloquant ainsi la traduction par la formation d'un complexe mRNP non traductible (Parker, 2012, Alhusaini and Collier, 2016).

Les complexes mRNP en arrêt de traduction s'associent entre eux et forment les *P-bodies* (PBs) (Sheth and Parker, 2003). Ces PBs sont constitutivement présents dans les cellules non stressées, mais leur taille et leur accumulation dépend des cellules et de la concentration des mRNP en arrêt de traduction dans le cytoplasme. La formation de ces foyers ne dépend pas d'un acteur particulier, mais pourrait être modulée par différentes protéines impliquées dans la voie de dégradation. Par exemple, l'enzyme Dcp2 qui joue un rôle dans l'assemblage ou la maintenance des *P-bodies* ou le facteur Pat1 qui inhibe la traduction des ARNm favorisant ainsi la formation des foyers cytoplasmiques (Teixeira and Parker, 2007, Adjibade and Mazroui, 2014). Les PBs sont retrouvés chez la levure, les nématodes, la drosophile, les mammifères et chez les plantes (*A. thaliana*). On y retrouve les facteurs du *decapping* cités précédemment (selon l'organisme), Pat1, Dhh1, Edc3, Hedls, Lsm1-7, Dcp1, Dcp2, VCS ; des facteurs impliqués dans la déadénylation, CCR4-NOT, PARN ; des facteurs impliqués dans la dégradation 5'→3' ou dans d'autres voies plus spécifiques. En revanche, les facteurs de la voie de dégradation 3'→5' n'y sont pas retrouvés (Fenger-Gron *et al.*, 2005, Teixeira and Parker, 2007, Franks and Lykke-Andersen, 2008). Ainsi, de par leur composition, les PBs jouent un rôle dans la dégradation des ARNm puisqu'on y retrouve des facteurs impliqués dans la déadénylation, dans le *decapping*, dans la dégradation des ARNm par Xrn1 ou, de façon spécifique, dans la dégradation par les *microRNA*, la voie de dégradation NMD détaillée plus loin. Cependant, les PBs sont également des lieux de stockage de complexes mRNP en arrêt de traduction qui ne portent pas d'éléments activateurs de la dégradation. En effet, ces ARNm peuvent soit se détacher des PBs et retourner dans le processus de la traduction, soit entrer dans le processus de dégradation (Franks and Lykke-Andersen, 2008).

1.3.Dégradation 3'→5'

Alternativement à la dégradation dans le sens 5'→3', les ARNm issus de la déadénylation peuvent être dégradés de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' par l'exosome (**Figure I**) ou par Dis3L2 ou son homologue retrouvé chez les plantes, Rrp44B/SOV (*Suppressor Of VARICOSE*) (Zhang *et al.*, 2010, Malecki *et al.*, 2013). La coiffe n'étant pas hydrolysée par ces 3'→5' exoribonucléases, elle sera prise en charge par DcpS, *scavenger decapping enzyme*, décrite précédemment.

L'exosome est un complexe multi-protéique de 400 kDa retrouvé à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Il est impliqué dans le contrôle qualité, dans les processus de dégradation et de maturation de divers types d'ARN et intervient donc dans plusieurs voies du métabolisme des ARN. Ce complexe se compose d'environ 10 sous-unités, dont 9 sous-unités constituent le « core » de l'exosome. Ce dernier comprend 6 sous-unités, Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 et Mtr3, qui partagent des similarités structurales avec la PNPase (*polynucleotide phosphorylase*) et la RNase PH bactérienne ainsi qu'avec l'exosome des *Archaea*. Ces six sous-unités de l'exosome s'organisent en forme d'anneau avec une cavité centrale très étroite qui limite l'accès uniquement aux ARN simple brin. Sur cette structure en anneau, 3 sous-unités Rrp4, Rrp40 et Csl4, interagissent chacune avec deux sous-unités de l'anneau mais n'interagissent pas entre elles. Ces 3 sous-unités possèdent les motifs S1 et KH qui leur permettent de se lier à l'ARN. La 10^{ème} sous-unité est Dis3 ou Rrp44, un homologue de la RNase II d'*E. coli*, une 3'→5' exoribonucléase hydrolytique. Dis3 possède un domaine PIN qui lui confère une activité endonucléolytique et la capacité d'interagir avec le « core » de l'exosome. Les protéines du « core » ne possèdent pas d'activité catalytique fonctionnelle et permettent de conduire l'ARN cible vers la protéine Dis3 située sous le « core » de l'exosome et dont le site actif est retrouvé à la base du canal central. Cette sous-unité est donc essentielle à la fonction de l'exosome (Dziembowski *et al.*, 2007, Chlebowski *et al.*, 2013, Siwaszek *et al.*, 2014). Hormis Dis3, d'autres protéines telles que Rrp6 et Ski7 peuvent s'associer au « core » de l'exosome (Dziembowski *et al.*, 2007, Parker, 2012). Rrp6 est une 3'→5' exoribonucléase appartenant à la superfamille DEDD, elle intervient dans la fonction nucléaire de l'exosome, accompagnée de deux autres protéines Rrp47 et Mpp6 (Parker, 2012). Ski7 est une GTPase cytoplasmique essentielle à la voie de dégradation 3'→5'. Cette dernière permet au complexe Ski, *superkillers*, de s'associer à l'exosome et de réguler son activité. Il est à noter que, chez les mammifères, le facteur Ski7 n'existe pas mais sa fonction peut être remplacée par un produit du gène alternatif de Hbs1 qui intervient dans les mécanismes de

surveillance des ARNm (Chlebowski *et al.*, 2013). Le complexe Ski est composé de 3 protéines distinctes. Ski2, une ATPase de la famille des RNA hélicases qui, grâce à son activité d'hydrolyse, casse les structures de l'ARN et/ou détache les protéines associées à l'ARN pour ensuite le livrer à l'exosome. Ski3, porte un motif TPR (*tetratricopeptide repeat*) qui est impliqué dans l'assemblage de complexes multi-protéiques. Enfin, le dimère de Ski8 possède des répétitions WD (tryptophane – acide aspartique) qui permettent des interactions protéine – protéine. Ski3 et Ski8 modulent la liaison de l'ARN ainsi que les propriétés ATPase de Ski2 (Halbach *et al.*, 2013). Chez la levure comme chez les mammifères, l'ARN issu de la déadénylation pénètre dans le canal central de l'exosome par son extrémité 3' *via* le complexe Ski qui déstructure l'acide nucléique par l'intermédiaire de Ski2 (*ibid*). Cet ARN rejoint ensuite le site actif de Dis3 où il est hydrolysé en nucléoside 5' monophosphate. Un produit de dégradation coiffé, d'une taille inférieure à 10 nt est libéré (Chlebowski *et al.*, 2013). Ce dernier est pris en charge par Dcs1 chez la levure et par DcpS chez les mammifères (Siwaszek *et al.*, 2014). Chez ces derniers, il existe deux homologues de Dis3, Dis3 localisé dans le noyau et Dis3L qui est cytoplasmique (*ibid*).

Chez *A. thaliana*, la structure du « core » de l'exosome est conservée (Chekanova *et al.*, 2007). Si Rrp6 est codée par un gène unique chez la levure et l'homme, chez *A. thaliana*, trois gènes codent trois protéines de la famille Rrp6 : Rrp6L1 et Rrp6L qui sont nucléaires et Rrp6L3 qui est cytoplasmique (Lange *et al.*, 2008). Il existe également deux paralogues de Dis3, seule Rrp44A est associée à l'exosome (Kumakura *et al.*, 2013). Le second paralogue Rrp44B/SOV qui est cytoplasmique n'interagit pas avec l'exosome puisqu'il ne possède pas de domaine PIN (Zhang *et al.*, 2010). Rrp44B/SOV (ou Dis3L2 chez d'autres organismes) intervient dans une autre voie de dégradation 3'→5' alternative à l'exosome (Nagarajan *et al.*, 2013, Siwaszek *et al.*, 2014).

1.4.Dégradation des ARNm dépendant de l'uridylation

La stabilité des ARN est également régulée par le mécanisme de l'uridylation. Ce mécanisme, présent chez de nombreux eucaryotes, requiert l'activité uridyl-transférase de protéines spécifiques pour modifier post-transcriptionnellement l'extrémité 3' des ARN cibles. Cette modification peut soit stabiliser, soit déstabiliser différents types d'ARN cibles, tels que des ARNm, des *small RNA* (sRNA), ou encore des précurseurs ou des produits de clivage des sRNA (Scott and Norbury, 2013, Sement *et al.*, 2013). Par exemple, chez les mammifères, lorsque la phase S du cycle cellulaire se termine ou si la réplication de l'ADN est inhibée, les ARNm des histones sont régulés par uridylation. Ces ARNm ne portent pas de queue

polyadénylée à leur extrémité 3' mais une structure tige-boucle. Cette structure est nécessaire à la formation d'un complexe ternaire impliqué dans la dégradation des messagers. Le complexe se compose de la protéine SLBP (*stem-loop binding protein*), qui recrute la *terminal uridyl-transferase* (TUTase), et de l'exoribonucléase Eri1 (ou 3'hExo). Une fois que l'ARNm est uridylé à son extrémité 3', le complexe Lsm1-7 est mobilisé au niveau de la queue oligouridylée et recrute le complexe du *decapping*. L'ARNm sera ensuite dégradé par la voie 5'→3'. Le complexe Lsm1-7 interagit aussi avec Eri1 et amplifie son activité catalytique, lui permettant de cliver la tige-boucle de l'ARNm, libérant ainsi l'extrémité 3' pour une dégradation 3'→5' par l'exosome (Mullen and Marzluff, 2008, Scott and Norbury, 2013). Chez les mammifères, l'uridylation ne concerne pas uniquement les messagers des histones mais s'étend à une grande majorité des ARNm cellulaires (Lim *et al.*, 2014). Chez *Saccharomyces pombe*, le mécanisme d'uridylation conduit à une dégradation bidirectionnelle des ARNm (Rissland and Norbury, 2009, Malecki *et al.*, 2013). Chez *A. thaliana*, l'uridylation empêche une déadénylation excessive de l'ARN cible et favorise la polarité de sa dégradation dans le sens 5' vers 3' (Sement *et al.*, 2013, Zuber *et al.*, 2016).

2. Mécanismes de surveillance des ARNm chez les eucaryotes

Durant la synthèse des ARNm, des erreurs peuvent survenir et donner lieu à des ARNm aberrants. Ces derniers, s'ils sont traduits, peuvent produire des protéines non fonctionnelles ou possédant des fonctions non adaptées voire néfastes pour l'organisme. Pour éviter cela, à chaque étape de leur maturation, les ARNm sont soumis à des contrôles de qualité (Sommer and Nehrbass, 2005, Schmid and Jensen, 2008). En effet, dès leur synthèse nucléaire, les ARNm qui ne répondent pas aux critères de sélection sont soit dégradés soit retenus dans ce compartiment. Ceux qui sont exportés vers le cytoplasme sont de nouveau soumis à des systèmes dits de surveillance.

Il existe trois systèmes de surveillance dépendants de la traduction qui reconnaissent les ARNm anormaux selon certains critères. Leur reconnaissance entraîne leur dégradation. Il s'agit des voies *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), *non-stop mRNA decay* (NSD) et *no-go mRNA decay* (NGD).

2.1.NMD : *nonsense-mediated mRNA decay*

Le NMD est un mécanisme conservé qui provoque la dégradation des ARNm ayant un codon stop prématuré (PTC, *premature terminaison codon*) pour éviter la synthèse de protéines tronquées. Le NMD peut être déclenché par la présence d'éléments *cis-acting* situés en aval

d'un codon stop normal ou prématuré (Nyiko *et al.*, 2013). En effet, la présence d'une petite ORF en amont d'une ORF principale, d'un intron dans la région 3' non traduite (3'UTR) ou d'une longue région 3'UTR (*faux 3'UTR*) peut activer cette voie (Schweingruber *et al.*, 2013). Plusieurs événements peuvent être à l'origine de ces erreurs, tels qu'une initiation de la transcription en amont du site d'initiation habituel, un mauvais épissage de l'ARN, des mutations somatiques ou le mauvais réarrangement génique des gènes d'immunoglobulines ou ceux des récepteurs des cellules T (Li and Wilkinson, 1998).

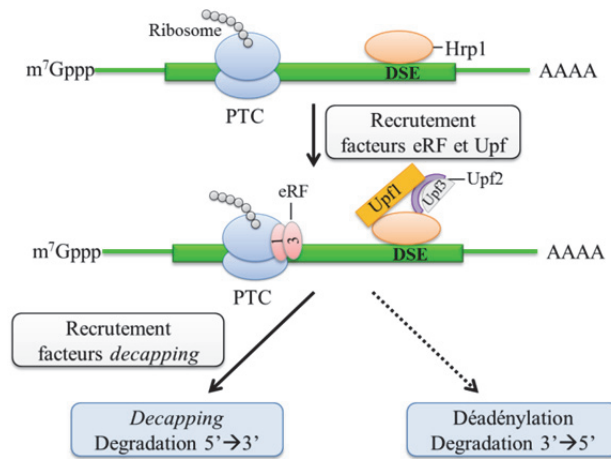
Hormis la fonction de surveillance, ce système joue également un rôle important dans la régulation négative de l'expression des ARNm codant des protéines parfaitement fonctionnelles et permet ainsi de moduler l'expression d'un gène en fonction des besoins de la cellule (Schweingruber *et al.*, 2013). Chez certains métazoaires, l'importance de cette voie ou des facteurs qui y sont en partie impliqués, a été mise en évidence au cours de l'embryogenèse (Hwang and Maquat, 2011). Chez les plantes, la défaillance des facteurs impliqués dans le NMD est létale. Une telle propriété est sans doute liée à l'implication des effecteurs dans la réponse contre les pathogènes (Nyiko *et al.*, 2013). Chez l'homme, le maintien des ARNm à l'origine de protéines tronquées est décrit dans le cas de certaines maladies génétiques telles que la β -Thalassaemia, la myopathie de Duchenne (Bhuvanagiri *et al.*, 2010).

Les effecteurs du NMD recrutés au niveau du PTC et leur mécanisme de mobilisation varient d'un organisme à l'autre. De la levure à l'homme, les plus conservés sont les Upf1 (*Up-frameshift protein 1*), Upf2 et Upf3. Le principal facteur est Upf1, une protéine qui possède une activité ARN hélicase ATP dépendante. Les protéines Upf2 et Upf3 interviennent dans la régulation de l'activité de la protéine Upf1. Upf2 interagit avec Upf1 et Upf3. Ce dernier a la capacité de se fixer à l'ARN. Un autre effecteur qui intervient dans la voie NMD, le complexe de terminaison de la traduction qui est constitué des facteurs eRF1 (*eukaryotic release factor 1*) et eRF3. Ce complexe est recruté au niveau du site accepteur A du ribosome pour y reconnaître le codon de terminaison de la traduction et libérer la chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée.

2.1.1. Mécanismes d'activation du NMD

Dans le noyau, l'ARNm est associé à des protéines qui assurent sa stabilité et son transport vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, le ribosome est recruté en vue de traduire l'ARNm. Lorsque le ribosome arrive au niveau d'un codon stop, le complexe eRF1-eRF3 recruté reconnaît le codon de terminaison et libère la chaîne polypeptidique. Généralement,

A



B

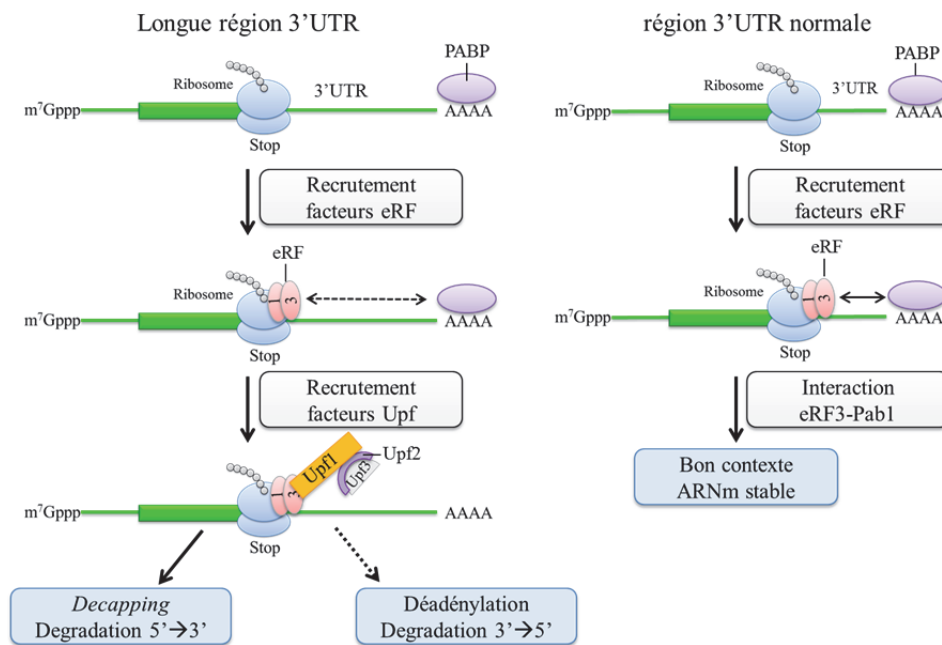


Figure III : L'activation du NMD chez la levure. (A) Lors d'une traduction « normale » la protéine Hrp1 est dissociée de l'ARNm suite au passage du ribosome. En présence d'un codon stop prématuré (PTC) la mise en place de la voie NMD est activée par le maintien du facteur pro-NMD (Hrp1) qui reste fixé à un élément DSE (*downstream sequence element*). **(B)** L'activation de la voie NMD est illustrée par le modèle du « faux 3'UTR » (longue région non traduite 3'UTR) en comparaison avec une situation classique (région non traduite 3'UTR normale). L'absence d'interaction entre les facteurs eRF3 et PABP est représentée par une double flèche en trait interrompu tandis que la double flèche en trait plein représente une interaction entre ces deux facteurs. Ce modèle est également retrouvé chez *Arabidopsis thaliana*. Ces deux mécanismes d'activation conduisent majoritairement au *decapping* de l'ARNm cible suivi d'une dégradation dans le sens 5'→3'. m⁷Gppp, coiffe ; AAAA, queue poly(A).

cet arrêt de la traduction se déroule dans le dernier exon. Ceci a pour conséquence la libération des protéines associées au messenger et la modification de la composition du complexe mRNP en vue d'améliorer la traduction de l'ARNm par sa stabilisation. En présence d'un codon stop prématuré, les protéines présentes en aval du ribosome restent associées à l'ARNm. Parmi ces protéines, certaines constituent des éléments *cis-acting* qui recrutent des facteurs pro-NMD et activent la voie du NMD (Gonzalez *et al.*, 2001). Ces éléments *cis-acting* varient en fonction de l'organisme.

Chez la levure, il existe au moins deux éléments *cis-acting* qui permettent d'activer la voie NMD. Le maintien d'une protéine nucléo-cytoplasmique, Hrp1 (*RNA-binding protein*) ou Upf3, sur un élément DSE (*downstream sequence elements*) en aval d'un PTC, conduit à la formation du complexe de surveillance Upf1-Upf2-Upf3 et à l'activation du NMD (**Figure III, A**) (Gonzalez *et al.*, 2001, Parker, 2012, Siwaszek *et al.*, 2014). Le deuxième élément *cis-acting* correspond à la présence d'une région 3' UTR anormalement grande appelée « *faux 3'UTR* » en aval d'un PTC ou d'un codon stop normal (**Figure III, B**). Lorsque la traduction se termine, le complexe de terminaison Sup45p-Sup35p (homologues de eRF1 et eRF3 respectivement) est recruté au niveau du site A du ribosome. En conditions normales, la courte distance entre le codon de terminaison et la queue poly(A) facilite l'interaction entre eRF3 et la PABP, ce qui stabilise l'ARNm. Si le mécanisme d'activation de la voie NMD n'est pas très bien connu chez la levure, les observations faites à ce jour montrent qu'en présence d'une longue région 3'UTR, la queue poly(A) reste éloignée du complexe de terminaison et n'interagit plus avec le facteur eRF3 (**Figure III, B**). Ce dernier étant disponible, il recrute Upf1 au niveau du site d'arrêt qui mobilise Upf2 et Upf3 pour former le complexe Upf. Upf1 est activé par un mécanisme encore inconnu et recrute les facteurs du *decapping* Edc3, Dcp2 *via* Edc3, et Pat1 accélérant ainsi le *decapping* de l'ARNm cible suivi par une dégradation dans le sens 5'→3'. Les ARNm peuvent aussi être rapidement déadénylés par un mécanisme encore inconnu puis dégradés par le complexe exosome (**Figure III, B**) (Gonzalez *et al.*, 2001, Isken and Maquat, 2007, Hwang and Maquat, 2011, Kervestin *et al.*, 2012, Siwaszek *et al.*, 2014).

Chez les mammifères, des facteurs supplémentaires apparaissent nécessaires à l'identification d'un ARNm porteur d'un PTC et à l'activation de la voie NMD. En effet, en plus des protéines Upf et eRF, le complexe EJC (*exon-junction complex*) constitue un élément *cis-acting* essentiel à l'activation du NMD. Ce complexe regroupe plusieurs protéines qui se fixent au cours de l'épissage de l'ARN pré messenger à environ 20-24 nucléotides en amont de

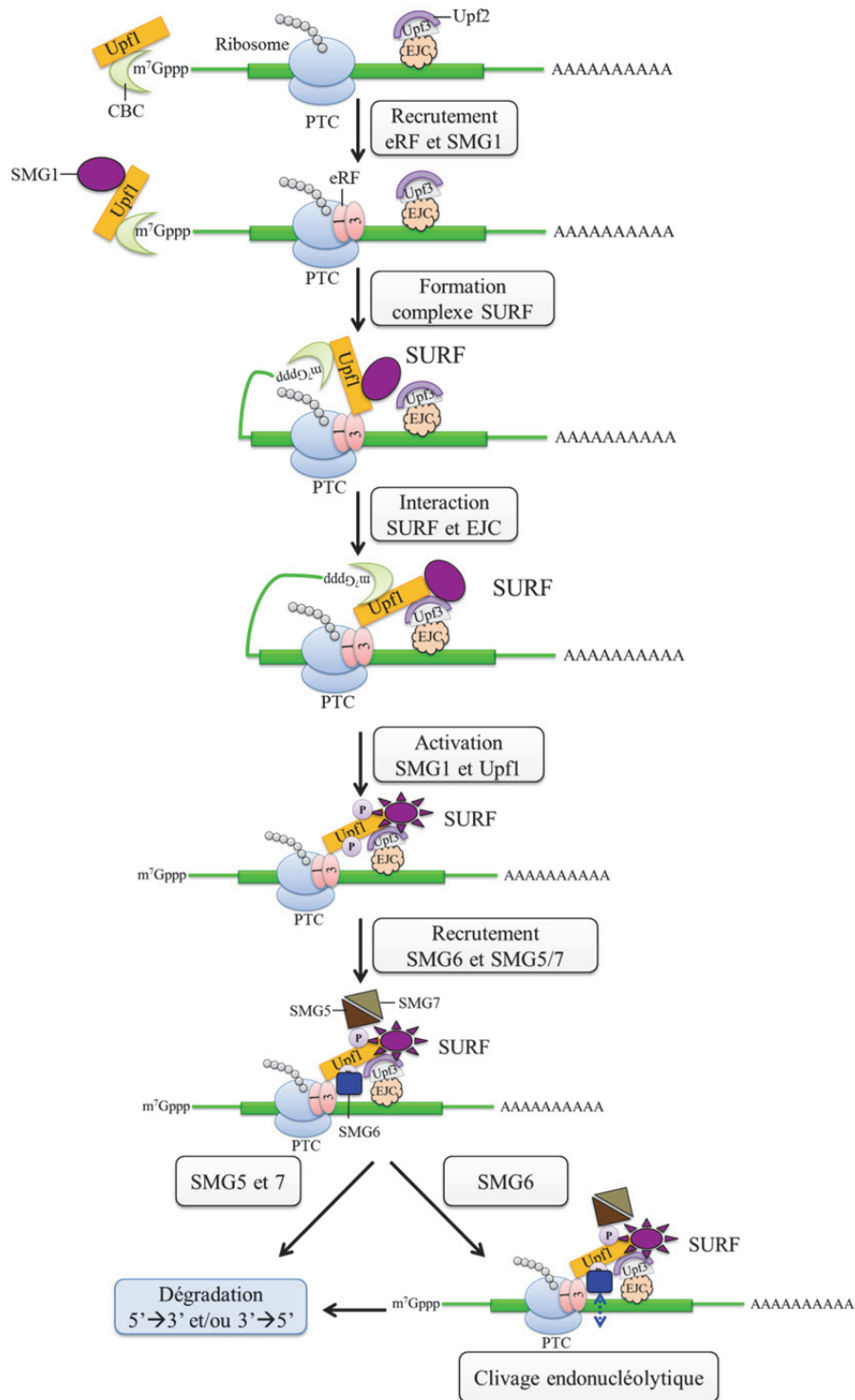


Figure IV : Activation du NMD chez les mammifères. La mise en place de la voie NMD par le maintien d'un élément *cis-acting* (EJC) en aval du codon stop prématuré (PTC), provoque la dégradation de l'ARNm cible par les facteurs SMG recrutés. EJC signifie *Exon-junction complexe*. CBC signifie *cap-binding complex*. Le complexe SURF est constitué des facteurs SMG1-Upf1-eRF1-eRF3 (Kashima et al. 2006). m7Gppp représente la coiffe et AAAAAAAAAA, la queue poly(A).

la plupart des jonctions exon-exon. Comme décrit précédemment, ces complexes sont généralement éliminés lors de la progression du ribosome sur l'ARNm. Dans le cas contraire, en présence d'un PTC, le facteur Upf2 se lie au « core » du complexe EJC *via* la protéine Upf3 ou Upf3X (paralogues du facteur Upf3). Les SMG (*suppressor with mmorphological effect on genitalia*), régulent l'activité de Upf1 et recrutent les effecteurs de la voie de dégradation des ARNm. Parmi ceux-ci, SMG1, une protéine de la famille des *phosphatidylinositol 3-kinase-related sérine/thréonine kinases* qui active Upf1 par phosphorylation, forme un complexe protéique avec les protéines SMG8 et 9 qui l'inactivent. Les protéines SMG6, SMG5 et SMG7 (ou PNCR2, *proline-rich nuclear receptor 2*) recrutent les facteurs impliqués dans la dégradation des ARNm.

Chez les mammifères, le modèle d'activation de la voie NMD le plus étudié dépend du complexe EJC. En effet, le système est déclenché par la présence d'un PTC situé à une distance supérieure à 50-55 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon et d'un EJC situé en aval du codon stop sur l'ARNm. Lorsque le complexe de terminaison est recruté par le ribosome positionné au PTC, le complexe EJC ne sera pas déplacé. Upf1 qui interagit avec une sous-unité protéique CBP80 du complexe de liaison à la coiffe (CBC, *cap-binding complex*) et SMG1, va interagir avec eRF3 pour former le complexe SURF constitué de **SMG1**, **Upf1**, **eRF1** et 3. Ensuite, SURF est recruté au niveau du complexe EJC grâce à l'interaction du facteur Upf2 avec SMG1 et Upf1. Une fois cette association réalisée, SMG1 n'est plus inhibé par SMG8 et 9 et phosphoryle Upf1 qui devient actif (**Figure IV**) (Kashima *et al.*, 2006). Activé, Upf1 inhibe la traduction en interagissant dans un premier temps avec le facteur d'initiation de la traduction eIF3 (Isken *et al.*, 2008) puis en recrutant les protéines SMG6 et SMG5-SMG7 au niveau de ses sites phosphorylés. Grâce à son activité endonucléolytique, SMG6 clive l'ARNm entre le PTC et le complexe EJC de façon à libérer un fragment 5' qui sera dégradé dans le sens 3'→5' par le complexe exosome. L'extrémité 3' sera d'abord débarrassée des facteurs NMD par l'intermédiaire de Upf1 et dégradée dans le sens 5'→3' par l'exoribonucléase Xrn1. SMG5, quant à elle, forme un hétérodimère avec SMG7 ou PNCR2 pour induire une dégradation 5'→3' par Xrn1 et/ou 3'→5' par le complexe exosome suite au *decapping* et/ou à la déadénylation de l'ARNm respectivement (**Figure IV**) (Hwang and Maquat, 2011, Popp and Maquat, 2013, Siwaszek *et al.*, 2014).

Chez les plantes, la voie NMD peut être activée par deux types d'éléments *cis-acting*. En effet, les ARNm qui possèdent une longue région 3'UTR inhabituelle sont sujets au NMD par un mécanisme similaire à celui décrit chez la levure (**Figure III, B**). Les ARNm qui portent un

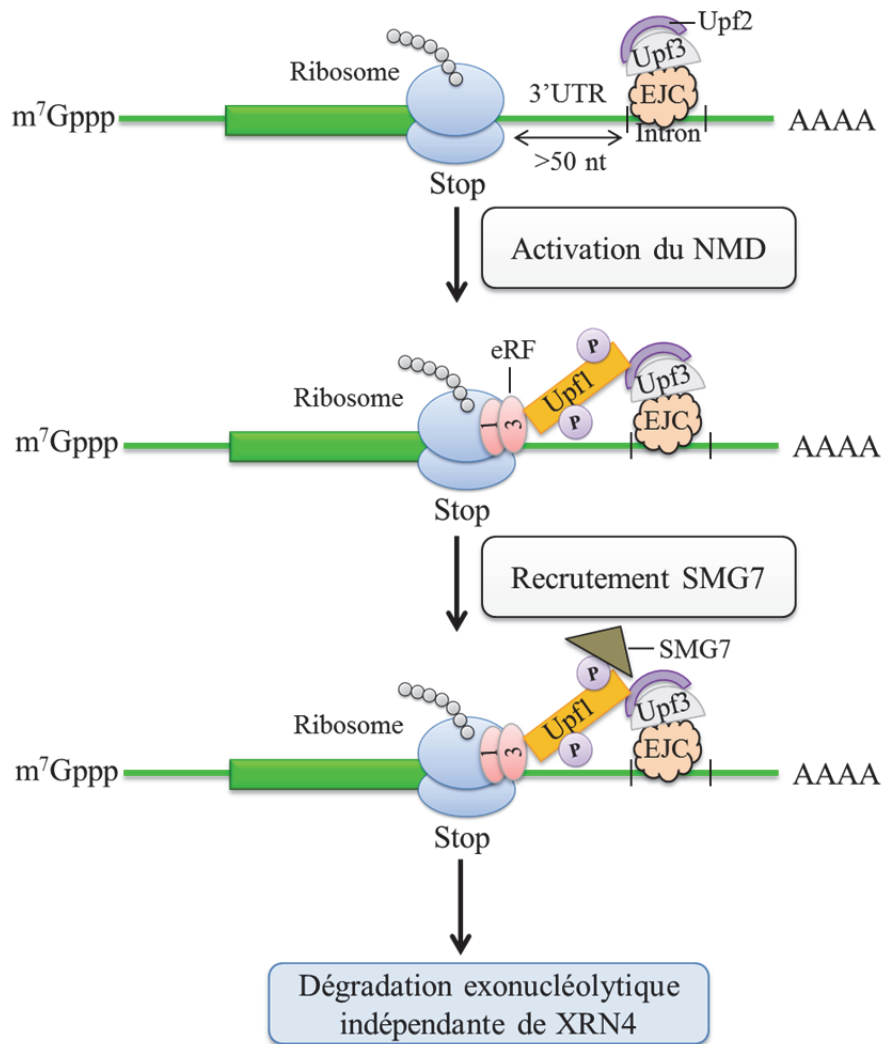


Figure V : Activation du NMD chez les plantes. En plus du mécanisme « faux 3'UTR » précédemment décrit chez la levure (**Figure III, B**), la voie du NMD est également activée par la présence d'un intron dans la région 3'UTR (région non traduite de l'ARN) *via* le maintien d'un complexe EJC (*Exon-junction complex*) sur cet intron. Le mécanisme d'activation est similaire à celui décrit pour les mammifères (**Figure IV**). Cependant, les enzymes impliquées dans la dégradation restent inconnues à ce jour. Stop, indique la position du codon stop de l'ARN. m⁷Gppp représente la coiffe et AAAA représente la queue poly(A).

intron (à une distance >50 nt en aval du codon stop) dans leur région 3'UTR maintiennent un complexe EJC et sont aussi ciblés par le NMD. Des homologues du complexe EJC impliqués dans l'activation du NMD sont retrouvés chez *A. thaliana*. Par conséquent, un mécanisme similaire à celui décrit précédemment pour les mammifères est envisagé chez cette plante (**Figures IV et V**) (Nyiko *et al.*, 2013, Siwaszek *et al.*, 2014). Cependant, il n'existe pas d'homologues de SMG1, SMG5 et SMG6 chez *A. thaliana*, seul SMG7 est conservé et impliqué dans les deux voies d'activation du NMD. Dès que le facteur Upf1 est phosphorylé (effecteur inconnu), il est pris en charge par SMG7 qui relocalise le complexe mRNP vers les *P-bodies* pour induire la dégradation de l'ARNm par un clivage exonucléolytique indépendant de XRN4 (Merai *et al.*, 2013, Nyiko *et al.*, 2013, Siwaszek *et al.*, 2014).

2.2.NSD : Nonstop mRNA decay

Ce système de surveillance reconnaît spécifiquement les ARNm qui ne possèdent pas de codon stop. L'apparition de tels messagers peut être liée à une polyadénylation précoce lors d'une pause ou d'un arrêt de l'ARN polymérase au cours de la transcription, favorisant l'utilisation du signal de polyadénylation situé à la fin de la séquence codante. Certains gènes possèdent des signaux de polyadénylation internes à leur séquence codante (cryptique) qui peuvent également être utilisés dans ce cas (Frischmeyer *et al.*, 2002, Cui and Denis, 2003). Les ARNm qui en résultent sont donc plus courts et subissent une dégradation par le complexe exosome. Une autre fonction du NSD est d'assurer la dégradation complète des ARNm qui ont débuté une dégradation 3'→5' alors qu'ils sont en train d'être traduits (van Hoof *et al.*, 2002).

Le mécanisme NSD a principalement été étudié chez la levure et l'homme. A la différence du NMD, peu de facteurs y sont impliqués. Il y a notamment le facteur Ski7 dont le domaine C-terminal possède une activité GTPase lui permettant de reconnaître un ribosome bloqué à l'extrémité 3' d'un ARNm dépourvu de codon stop. Le domaine N-terminal de Ski7 intervient dans le recrutement des complexes exosome et Ski. Si la fonction de chacune des protéines Ski n'est pas clairement définie dans la voie NSD, leur présence est cependant nécessaire à la dégradation de l'ARNm cible (van Hoof *et al.*, 2002, Klauer and van Hoof, 2012).

2.2.1. Mécanisme d'activation du NSD

Au cours de la traduction d'un ARNm sans codon stop, le ribosome continue la traduction dans la région 3' UTR où il reste bloqué par la queue poly(A).

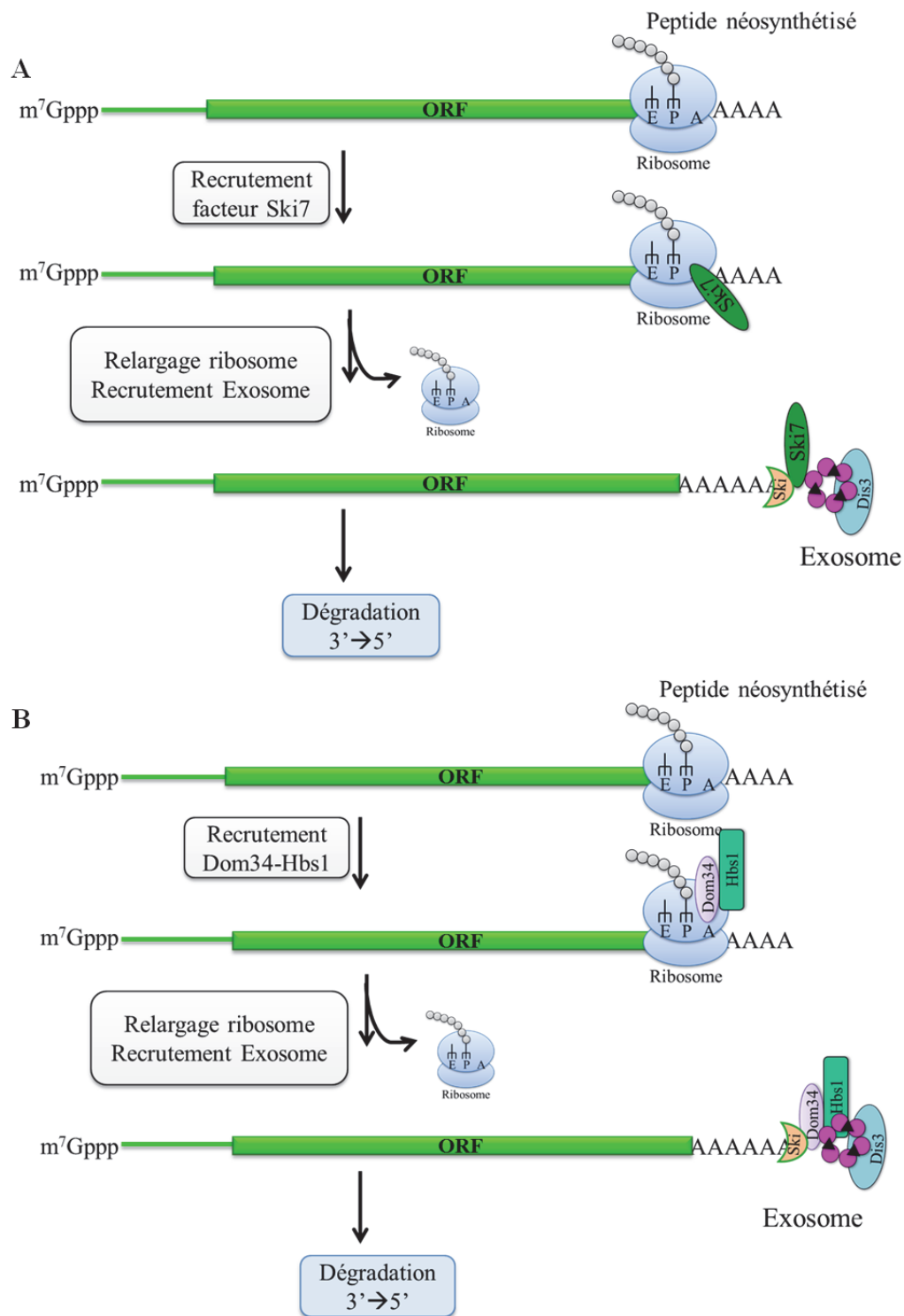


Figure VI : Mécanisme d'activation de la voie NSD. En l'absence d'un codon d'arrêt de la traduction, le ribosome poursuit la traduction jusqu'à la queue poly(A) où il reste bloqué. Des facteurs ski7 (**A**) ou Dom34-Hbs1 (**B**) sont alors recrutés afin de vérifier l'absence de codon stop et d'induire la dégradation de l'ARNm cible par le complexe exosome. m⁷Gppp représente la coiffe et AAAAAA, correspond à la queue poly(A) et ORF correspond à la phase codante de l'ARN.

Chez la levure, le facteur Ski7, grâce à son domaine C-terminal, identifie le ribosome à l'arrêt, dans la région 3'UTR de l'ARNm, par son site accepteur A dépourvu de codon. Ski7 recrute ensuite les complexes exosome et Ski pour dégrader l'ARNm dans le sens 3'→5' tout en bloquant la synthèse protéique (**Figure VI, A**) (van Hoof *et al.*, 2002, Isken and Maquat, 2007). En absence de Ski7, les messagers aberrants sont tout de même dégradés dans le sens 5'→3' par le mécanisme dépendant du *decapping* (Inada and Aiba, 2005).

Chez les mammifères, le système NSD a récemment été mis en évidence. Le mécanisme est similaire à celui des levures, à l'exception du facteur Ski7 qui est remplacé par le complexe Hbs1-Dom34/Pelota. Hbs1 appartient aussi à la famille des GTPases tout comme les facteurs eRF3 et Ski7. La protéine Dom34 (ou Pelota) est un homologue du facteur de terminaison de la traduction, eRF1. Ainsi c'est le complexe Hbs1-Dom34 qui identifie le ribosome à l'arrêt et recrute les facteurs nécessaires à la dégradation de l'ARNm cible (**Figure VI, B**) (Saito *et al.*, 2013).

Chez la levure, le complexe Hbs1-Dom34 est également présent et peut intervenir dans la voie NSD indépendamment de Ski7 (**Figure VI, B**) (Tsuboi *et al.*, 2012).

2.3.NGD : *No-go mRNA decay*

Ce dernier système de surveillance, essentiellement étudié chez la levure, cible spécifiquement les ARNm sur lesquels la progression du ribosome est bloquée au cours de la traduction. Cet arrêt du ribosome peut être dû à divers événements tels qu'une structure stable de l'ARNm de type tige-boucle ou pseudo-nœuds, une séquence connue pour ralentir ou arrêter le ribosome ou encore une faible concentration d'un ARN de transfert. Chaque arrêt ou ralentissement du ribosome ne doit pas susciter la dégradation de l'ARNm. Cela nécessite une distinction entre les arrêts normaux et anormaux. En effet, pour qu'il y ait mise en place du NGD, il faut qu'en plus d'être en arrêt prolongé sur l'ARNm, le site A du ribosome soit dépourvu d'un ARN de transfert. Une fois ces conditions réunies, le complexe Hbs1-Dom34 est recruté au niveau du site de blocage et interagit avec le site A du ribosome (**Figure VII**). L'ARNm cible subit alors un clivage endonucléolytique à proximité du site de blocage par une enzyme encore inconnue à ce jour. Le peptide néosynthétisé est alors libéré pour être dégradé et le ribosome est relargué puis il se dissocie. Deux produits de clivages sont obtenus : l'extrémité 5', qui porte la coiffe, est dégradée dans le sens 3'→5' par le complexe exosome et l'extrémité 3' qui porte la queue poly(A) est dégradée dans le sens 5'→3' par l'exoribonucléase Xrn1 (**Figure VII**) (Doma and Parker, 2006, Harigaya and Parker, 2010).

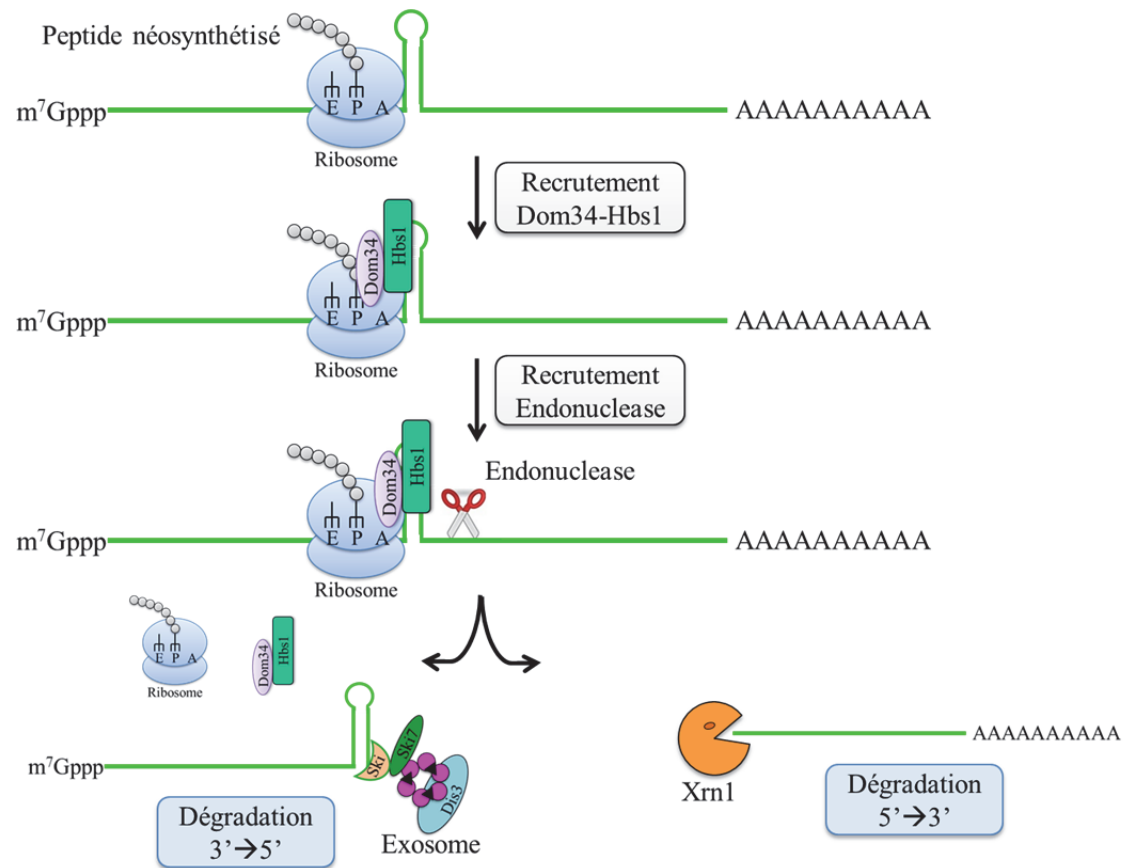


Figure VII : Mécanisme d'activation de la voie NGD chez la levure. Au cours de la traduction, le ribosome peut être stoppé dans sa progression par divers événements. Lorsque l'arrêt du ribosome est prolongé, des facteurs comme Dom34-Hbs1 sont recrutés afin de vérifier si l'arrêt du ribosome est normal ou d'induire une dégradation de l'ARNm, s'il s'agit d'une situation anormale. m⁷Gppp représente la coiffe et AAAAAAAAAA, correspond à la queue poly(A).

A ce jour, aucun mécanisme NSD et NGD n'a été mis en évidence chez les plantes.

3. Mécanismes spécifiques de dégradation des ARNm

Mis à part les mécanismes impliqués dans la dégradation des ARNm aberrants, il existe des voies de dégradations spécifiques qui régulent l'expression de gènes impliqués dans divers processus cellulaires. Ces mécanismes reconnaissent des éléments particuliers présents dans la région 3' UTR de leurs ARNm cibles. Parmi ces mécanismes, on retrouve les voies AUMD (*AU-mediated mRNA decay*) et GUMD (*GU-mediated mRNA decay*) qui utilisent des RBPs (*RNA-binding proteins*) pour cibler respectivement des ARNm qui portent des éléments spécifiques dans leur région 3' UTR tels que les éléments *AU-rich* ou *GU-rich*. On retrouve également le mécanisme de régulation par l'action des petits ARN (*miRNA*) qui ciblent les ARNm possédant une séquence complémentaire à leur séquence.

3.1.AUMD : *AU-rich mediated mRNA decay*

Le mécanisme AUMD repose sur la présence de séquences riches en 'AU' dans la région 3'UTR d'ARNm codant des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose ou dans des fonctions immunitaires. Ces *AU-rich elements* (AREs), se caractérisent par un nombre variable de répétitions du pentanucléotide « AUUUA » reconnues par une catégorie de RBPs appelées AUBP (*AU-binding proteins*) qui modulent la stabilité des ARNm porteurs des AREs. Ces protéines spécifiques sont retrouvées chez divers organismes dont la levure (Pedro-Segura *et al.*, 2008), les plantes (Qu *et al.*, 2014) et les mammifères chez qui elles sont les plus étudiées. Chez les mammifères, on retrouve par exemple, le TTP ou ZFP36 (*tristetrapolin*), le KSRP (*KH splicing regulatory protein*), le facteur AUF1 (*AU-rich binding factor-1*) qui activent la déadénylation des ARNm porteurs d'éléments *AU-rich* et induisent leur dégradation dans le sens 5'→3' et/ou 3'→5'. Leur fonction est régulée par la phosphorylation *via* des kinases qui ne sont pas toutes identifiées. En effet, cette modification peut altérer l'affinité des protéines pour leurs substrats ou favoriser l'interaction des protéines avec des facteurs qui inhibent leurs fonctions. Par exemple, le TTP qui appartient à la famille des *zinc finger RNA binding proteins*, fixe les AREs au niveau du 3' UTR et recrute la déadénylase CCR4-NOT, les enzymes du *decapping* ainsi que l'exosome pour dégrader son substrat (**Figure VIII, A**). Suite à l'activation d'une réponse immune, le TTP est phosphorylé. Ceci favorise son interaction avec des protéines régulatrices, qui n'inhibent pas sa capacité à fixer ses substrats mais qui l'empêchent de recruter les facteurs impliqués dans la dégradation des ARNm (**Figure VIII, B**). Ainsi, les messagers cibles sont maintenus et traduits à des

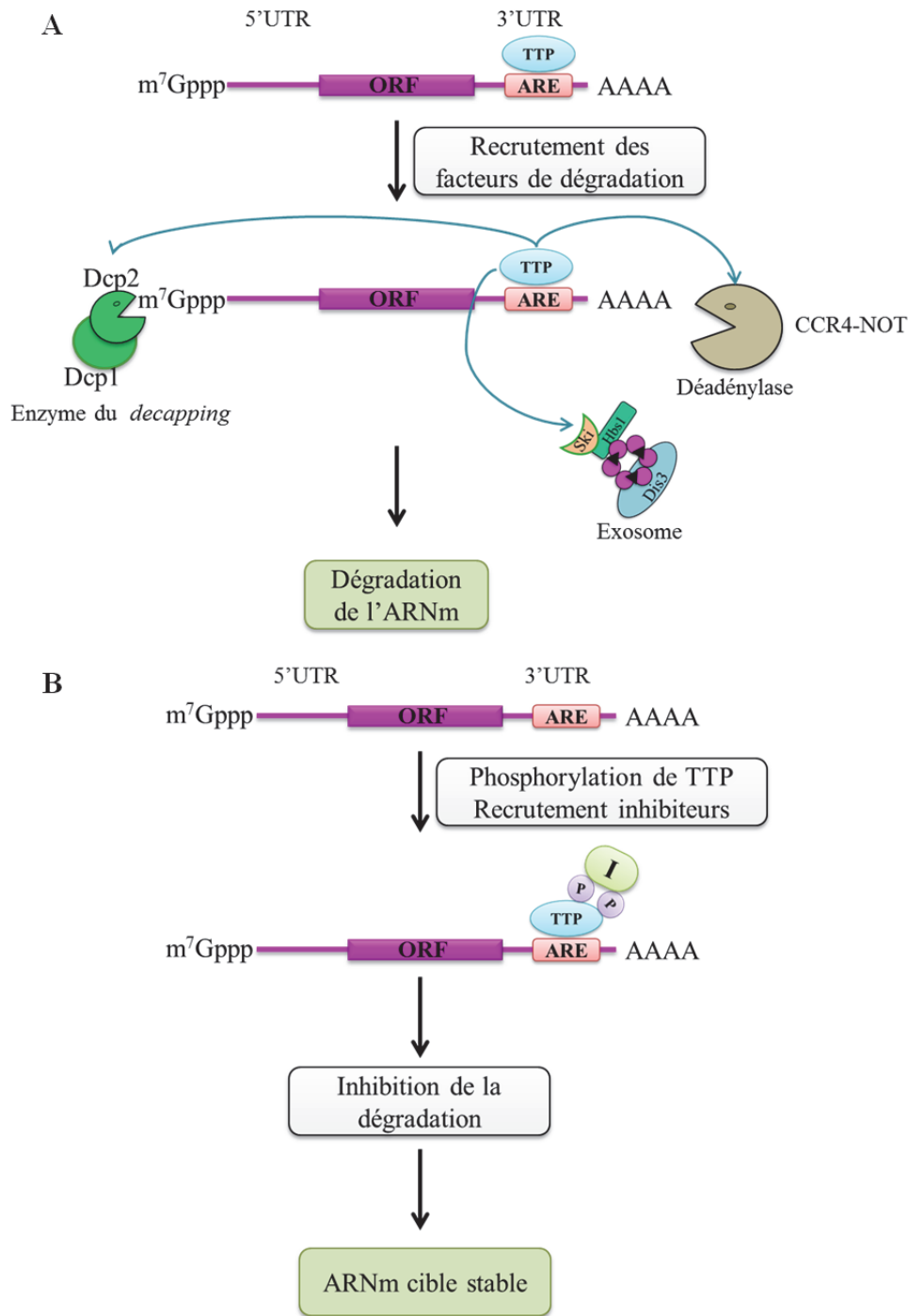


Figure VIII : Mécanisme du *AU-rich mediated mRNA decay* illustré par le Tristetrapolin (TTP). (A) En situation normale, le TTP provoque la dégradation des ARNm cibles. (B) Après l'activation de l'immunité cellulaire le TTP est phosphorylé puis inhibé par une protéine régulatrice (I) afin de maintenir le messenger stable. m⁷Gppp représente la coiffe et AAAA, correspond à la queue poly(A) et ORF correspond à la phase codante de l'ARN. 5' et 3' UTR représentent les régions terminales non traduites de l'ARN.

niveaux plus élevés, permettant d'assurer une réponse cellulaire plus efficace (Garneau *et al.*, 2007, Vlasova-St Louis and Bohjanen, 2016).

3.2.GUMD : *GU-rich mediated mRNA decay*

A l'inverse de la voie AUMD, ce mécanisme régule la population de transcrits porteurs d'un élément GREs (*GU-rich elements*) caractérisé par des répétitions du pentanucléotide « GUUUG » dans leur région 3' UTR. Ces transcrits sont généralement impliqués dans la croissance et la migration cellulaire ainsi que l'apoptose. Chez les mammifères, diverses RBPs reconnaissent et se fixent à ces éléments, dont la principale CUGBP1 (*CUG binding proteins 1*) encore appelée CELF1 (*CUGBP1 and ELAV-like family*). Une fois présente sur l'ARNm, CUGBP1 recrute la déadénylase PARN pour induire la déadénylation de sa cible suivie de sa dégradation (**Figure IX, A**). L'activité, la localisation et l'affinité pour les substrats de cette RBP sont régulées par de multiples phosphorylations (Adjibade and Mazroui, 2014, Vlasova-St Louis and Bohjanen, 2016). Par exemple, lors de l'activation des cellules T, la phosphorylation de CUGBP1 inhibe sa capacité à se fixer sur ses ARNm cibles. Par conséquent, les ARNm sont stabilisés, restent présents en grande quantité et favorisent la prolifération cellulaire (**Figure IX, B**) (Vlasova-St Louis and Bohjanen, 2016).

Il existe des RBPs qui reconnaissent à la fois des éléments *GU-rich* et *AU-rich*, c'est le cas de HuR, une protéine inhibitrice et compétiteur, qui appartient à la famille CELF. HuR stabilise les ARNm qui portent des éléments *GU-rich* et *AU-rich* dans leur région 3'UTR et favorise leur traduction (Garneau *et al.*, 2007, Adjibade and Mazroui, 2014, Vlasova-St Louis and Bohjanen, 2016). En effet, lorsque la fixation de HuR est privilégiée sur ces éléments, l'ARNm cible est alors stabilisé et relocalisé vers les polysomes où il sera de nouveau traduit (Vlasova-St Louis and Bohjanen, 2016). Comme les autres RBPs, la fonction de HuR est modulée par la phosphorylation de manière dépendante du site de phosphorylation.

3.3.Dégradation des ARNm induite par les *microRNA*

Les *microRNA* (miRNA) sont des petits ARN simple brin endogènes non-codants d'environ 22 nt qui font partie des effecteurs du mécanisme du *RNA silencing*. Ce mécanisme est utilisé pour réguler l'expression de gènes impliqués dans divers processus biologiques tels que le développement, le maintien de l'intégrité du génome mais aussi dans la défense contre les virus ou les éléments transposables. Cette régulation par le mécanisme du *RNA silencing* intervient à deux niveaux. Le premier niveau de régulation est transcriptionnel (TGS, *transcriptional gene silencing*) et inhibe la transcription de l'ADN cible. Le second est post-

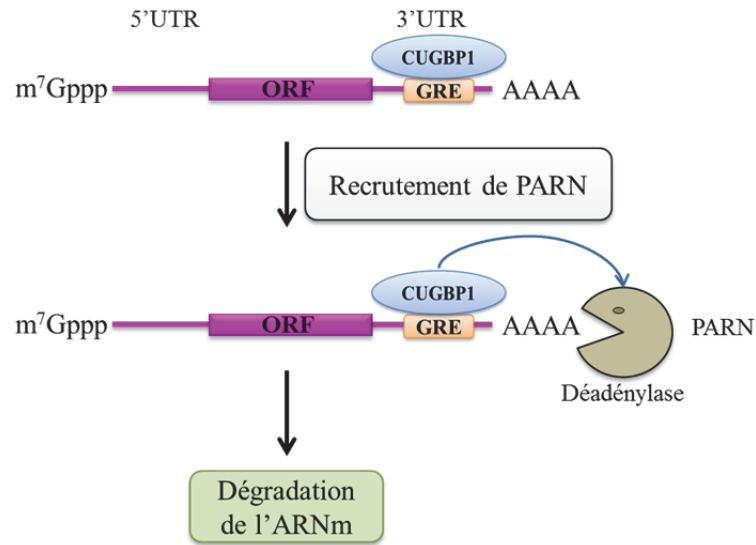
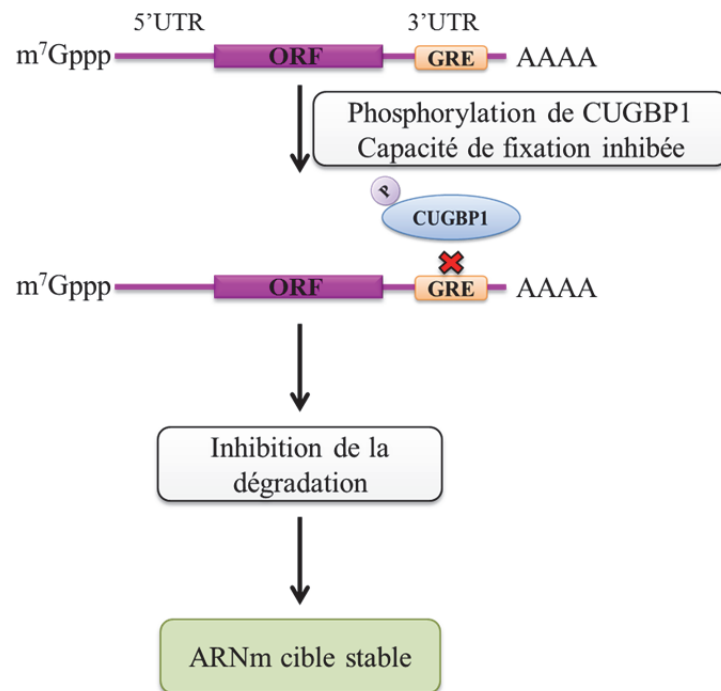
A**B**

Figure IX : Mécanisme du *GU-rich mediated mRNA decay* illustré par le CUGBP1. (A) En contexte normal, CUGBP1 se fixe sur les GREs et recrute la déadénylase PARN pour dégrader l'ARNm cible. (B) Lors de l'activation des cellules T, CUGBP1 est phosphorylée puis inhibée et l'ARNm cible est stabilisé. m⁷Gppp représente la coiffe et AAAA, correspond à la queue poly(A) et ORF correspond à la phase codante de l'ARN. 5' et 3' UTR représentent les séquences terminales non traduites de l'ARN.

transcriptionnel (PTGS, *post transcriptional gene silencing*) et induit la dégradation ou l'inhibition de la traduction des ARNm cibles. Le *RNA silencing* est retrouvé chez les insectes, les mammifères, les plantes et les nématodes. Mis à part les miRNA qui sont des produits de gènes *sensu stricto* et qui régulent l'expression de leurs gènes cibles au niveau post-transcriptionnel (Finnegan and Pasquinelli, 2013), le mécanisme de *silencing* peut également être réalisé par des petits ARN régulateurs (sRNA pour *small RNAs*, de 21 à 24 nt) d'origine endogène ou exogène. Ces sRNA sont produits par l'action de nucléases sur des ARN partiellement ou complètement double brin (Incarbone and Dunoyer, 2013).

La biogenèse d'un miRNA débute par la transcription d'un gène de miRNA par l'ARN polymérase II. Celle-ci produit un long miRNA primaire appelé « pri-miRNA » (Kim *et al.*, 2009, Finnegan and Pasquinelli, 2013). Chez les mammifères, ce dernier renferme une structure double brin imparfaite en forme d'épingle à cheveux « hairpin » excisée co-transcriptionnellement de l'ARN *via* un complexe microprocesseur de 650 kDa. Ce complexe est constitué de Drosha (une RNase de type III) et de son cofacteur DGCR8 (*Digeorge syndrome critical region gene 8*), dénommé Pasha chez *D. melanogaster* et *C. elegans*, qui interagit directement avec l'ARN afin de le stabiliser. Drosha possède deux domaines RNases qui forment un dimère intramoléculaire lui permettant de cliver les brins 5' et 3' du pri-miRNA. Pour cela, il utilise DGCR8 comme une règle moléculaire pour cliver la structure à la 11^{ème} pb en partant de la base de la tige-boucle (**Figure X**). Ce clivage produit un précurseur de miRNA nommé « pre-miRNA » d'environ 60-100 nt qui possède 2 nt non appariés à son extrémité 3'. Ce précurseur est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5 (Exp5) et son cofacteur Ran-GTP qui le protègent de la dégradation par les exoribonucléases (Winter *et al.*, 2009, Finnegan and Pasquinelli, 2013). L'Exp5 reconnaît et exporte spécifiquement un « pre-miRNA » car celui-ci possède une tige double brin supérieure à 14 pb et une petite extrémité 3' non appariée de 1 à 8 nt (**Figure X**). Une fois dans le cytoplasme, le « pre-miRNA » est libéré par une hydrolyse du GTP en GDP (Kim *et al.*, 2009, Winter *et al.*, 2009), puis recruté par le complexe RLC (*RISC-loading complex*). RLC est constitué de Dicer, TRBP (*transactivating response RNA-binding protein*), PACT (*protein activator of PKR*) et AGO (Argonaute). Dicer est une RNase de type III très conservée chez les eucaryotes. Elle est constituée d'un domaine PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*) qui reconnaît les 2 nt non appariés de l'extrémité 3' et l'extrémité 5' phosphorylée du « pre-miRNA ». Comme Drosha, elle contient deux domaines RNases qui clivent chaque brin du « pre-miRNA » et un domaine dsRBD (*double-stranded RNA-binding domain*). TRBP et PACT sont des facteurs

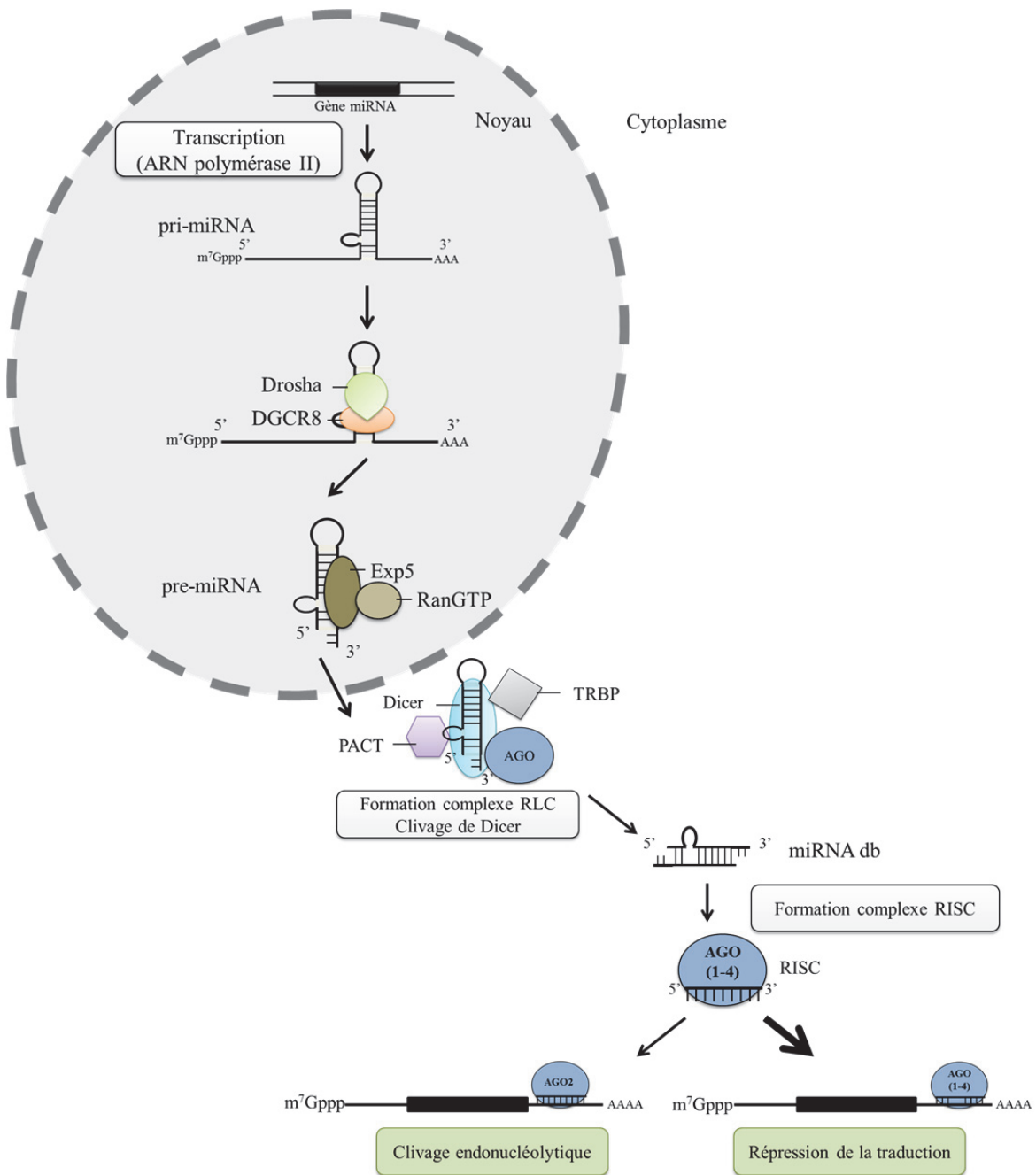


Figure X : Biogenèse des miRNA chez les mammifères. Les miRNA sont produits à partir d'une structure d'ARN double brin nucléaire qui est maturée par une succession d'enzymes cellulaires. Un des brins est chargé par les protéines Argonaute (AGO) et forme le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Ce complexe cible les ARNm de façon séquence spécifique *via* le miRNA et induit majoritairement (flèche trait épais) la répression de leur traduction ou, dans de rares cas (flèche trait fin), leur dégradation après le clivage par AGO. RLC, *RISC-loading complex*. m⁷Gppp représente la coiffe et AAA ou AAAA, correspond à la queue poly(A). db, double brin.

régulateurs qui facilitent la reconnaissance de l'ARN substrat et la fidélité du clivage par Dicer (Fiorenza and Barco, 2016, Svobodova *et al.*, 2016). Chez les mammifères, il existe quatre protéines Argonautes qui constituent une sous-famille de la famille Argonaute. Ce sont des facteurs régulateurs transcriptionnels et post-transcriptionnels qui utilisent un miRNA ou siRNA (*small interfering RNA*) comme guide pour identifier leurs cibles (Kim *et al.*, 2009). Ces protéines sont très conservées chez les animaux et les plantes mais leur nombre et leurs rôles varient d'une espèce à l'autre (Finnegan and Pasquinelli, 2013). Lorsque le « pre-miRNA » est chargé sur le complexe RLC, il subit un second processus de maturation par Dicer en amont de la boucle externe, générant ainsi un miRNA double brin mature d'environ 22 nt avec 2 nt non appariés aux extrémités 3' (Kim *et al.*, 2009, Winter *et al.*, 2009). Ensuite, le brin qui présente la plus faible stabilité thermodynamique à son extrémité 5' est considéré comme étant le brin « guide » et est chargé, sans distinction, par l'une des quatre protéines AGO pour former le complexe RISC ou miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) (**Figure X**) (Schwarz *et al.*, 2003, Finnegan and Pasquinelli, 2013). Toutes les protéines AGO sont constituées de trois domaines, le domaine PAZ qui est le site d'ancrage de l'extrémité 3' du miRNA, le domaine MID qui interagit avec l'extrémité 5' du miRNA et le domaine PIWI qui lie la partie centrale du miRNA. Ce dernier domaine porte une activité catalytique chez certaines protéines AGO, c'est le cas de la protéine AGO2 chez les mammifères (Kim *et al.*, 2009, Finnegan and Pasquinelli, 2013, Fiorenza and Barco, 2016). Concernant l'autre brin, appelé le brin « passager », il est généralement dégradé. Une fois le complexe RISC formé, AGO utilise le miRNA pour cibler les ARNm qui présentent une séquence complémentaire à celle du miRNA, principalement retrouvée dans leur région 3'UTR (Valinezhad Orang *et al.*, 2014). Le processus de régulation de l'ARNm cible dépend du degré de complémentarité entre l'ARNm cible et la région du miRNA appelée « seed region » qui comprend les nucléotides 2 à 8 (Filipowicz *et al.*, 2008). En effet, si l'appariement entre ces deux séquences est parfait (très rarement) alors l'ARNm cible subira un clivage endonucléolytique médié par AGO2, puis subira une dégradation classique des fragments 5' et 3' de l'ARNm cible (**Figure XI**). Dans la majorité des cas, l'appariement n'est pas parfait, ce qui conduit à une répression de la traduction qui n'est pas très bien comprise à ce jour. Cette répression est généralement suivie d'une dégradation des ARNm dans les *P-bodies* (Filipowicz *et al.*, 2008, Baulina *et al.*, 2016). En effet, la plupart des ARNm réprimés par les miRNA sont dégradés *via* la protéine GW182, une protéine d'échafaudage qui recrute les facteurs pro-dégradation. D'un poids moléculaire de 182 kDa, GW182 possède dans sa partie N-terminale plusieurs motifs GW (Glycine-Tryptophane) qui lui permettent d'interagir avec le domaine PIWI de

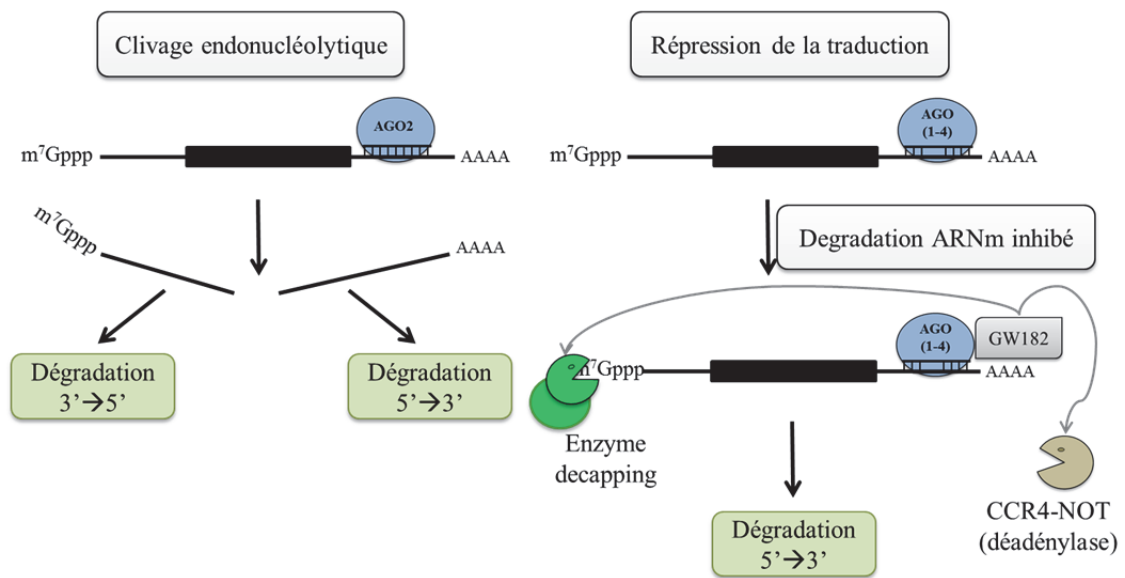


Figure XI : Régulation post-transcriptionnelle par les miRNA chez les mammifères. Dans de rares cas, lorsque le clivage endonucléolytique se produit, les produits générés sont éliminés par les voies de dégradation classiques. Concernant la répression de la traduction, généralement elle conduit à la dégradation de l'ARNm cible *via* les facteurs qui sont recrutés par la protéine GW182. m⁷Gppp représente la coiffe et AAAA représente la queue poly(A).

AGO. Elle interagit également avec la protéine PABP *via* son domaine C-terminal (Fabian *et al.*, 2010). Lorsque GW182 est recrutée au niveau de l'ARNm ciblé par RISC, elle mobilise la déadénylase CCR4-NOT ainsi que les enzymes du *decapping* Dcp1-Dcp2, puis l'ARNm est dégradé dans le sens 5'→3' par l'exoribonucléase Xrn1 (**Figure XI**) (Filipowicz *et al.*, 2008, Valinezhad Orang *et al.*, 2014).

Chez les plantes et plus particulièrement chez *A. thaliana*, la biogenèse des miRNA commence également dans le noyau par la transcription des gènes MIR qui produisent des pri-miRNA. Chez les plantes, il n'existe pas d'homologue à Drosha ; la maturation des deux formes pri- et pre- miRNA est donc assurée par l'un des homologues de Dicer, DCL1 (*Dicer-like 1*) avec l'aide d'une RBP, HYL1 (*Hyponastic leaves 1*) et d'une protéine de la famille *zinc finger*, Serrate (SE) qui augmente son efficacité (**Figure XII**) (Du and Zamore, 2005, Jones-Rhoades *et al.*, 2006, Voinnet, 2009). Le miRNA double brin obtenu, d'environ 21 nt, est ensuite méthylé, dans le noyau, à chaque extrémité 3' par une méthyltransférase, HEN1 (*Hua Enhancer 1*) permettant ainsi de stabiliser le duplexe en le préservant d'une uridylation suivie d'une dégradation (Jones-Rhoades *et al.*, 2006, Voinnet, 2009). Le miRNA double brin est par la suite transporté dans le cytoplasme *via* HASTY (HST), un homologue de l'exportine 5. Cependant, la forme sous laquelle sont transportés les miRNA n'est pas très bien comprise. Ensuite, le brin qui possède l'extrémité 5' la moins stable est conservé pour être chargé par AGO1 pour former le complexe miRISC (**Figure XII**) (ibid). Chez *A. thaliana*, il existe 10 protéines AGO, et seule AGO1, la plus caractérisée de toute, est impliquée dans la fonction des miRNA (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Contrairement aux animaux, les séquences de liaisons des miRNA de plantes sont majoritairement retrouvées dans la région codante de l'ARNm cible (Du and Zamore, 2005, Voinnet, 2009). De plus, le degré de complémentarité des bases entre le miRNA et sa cible est presque toujours parfait, conduisant ainsi au clivage endonucléolytique de l'ARN *via* AGO1 puis à la dégradation des fragments 5' et 3' obtenus par le complexe exosome et l'exoribonucléase XRN4 respectivement (Nagarajan *et al.*, 2013). Plus rarement, lorsque la complémentarité entre le miRNA et sa cible est faible, l'initiation de la traduction de l'ARNm cible est alors inhibée (**Figure XII**) (Filipowicz *et al.*, 2008, Valinezhad Orang *et al.*, 2014).

3.4.Dégradation des ARNm par les siRNA

L'une des autres fonctions du mécanisme de *RNA silencing* (*RNAi*) est d'assurer une défense contre les virus. Cette mission est médiée par les siRNA (*small interfering RNA*) qui interviennent au niveau du TGS et du PTGS. Chez les mammifères, si l'accumulation des

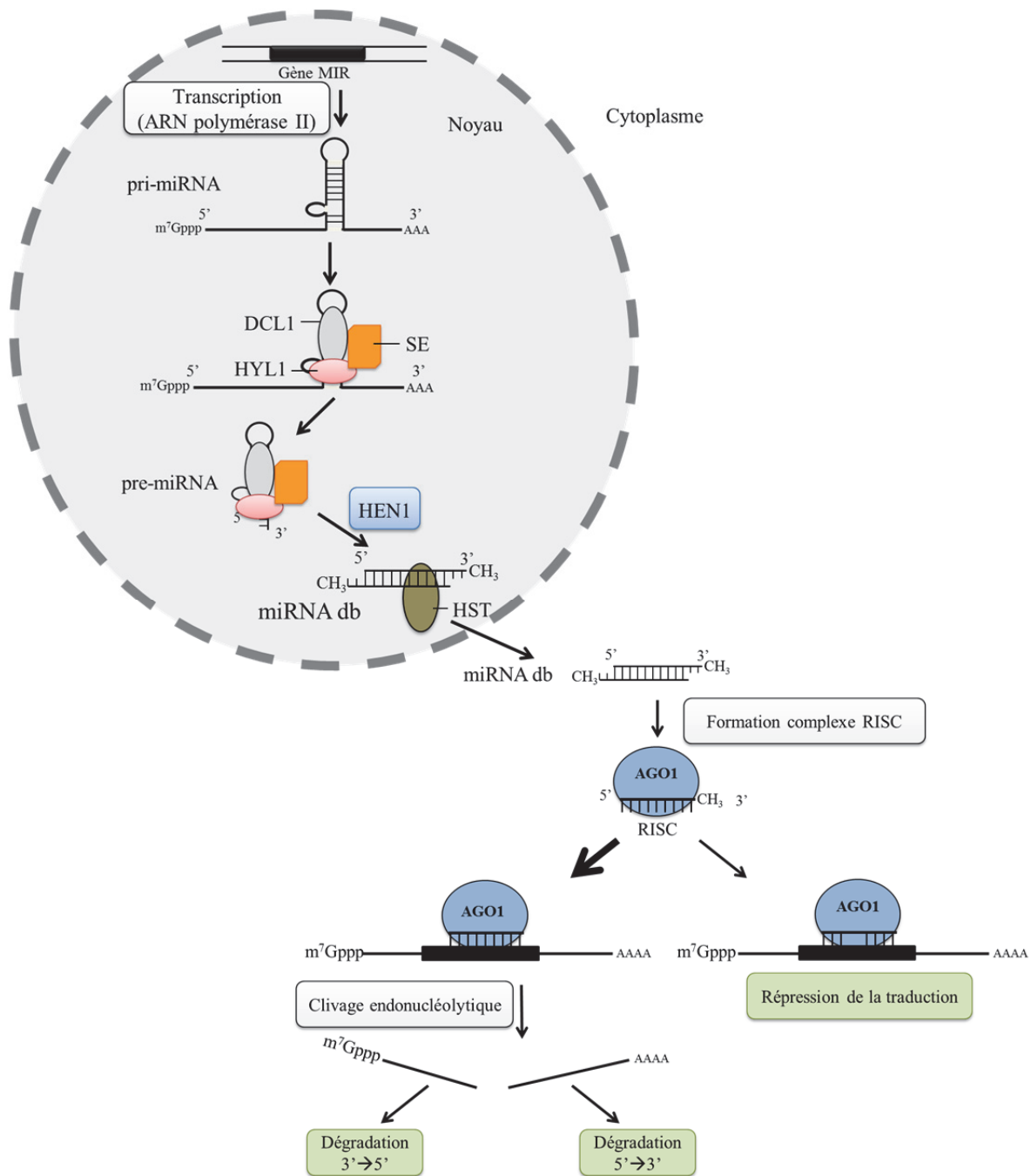


Figure XII : Biogenèse des miRNA chez les plantes. Le processus de maturation des miRNA de plante se fait majoritairement dans le noyau par l'intermédiaire du complexe DCL1 et HYL1. Contrairement aux mammifères, les miRNA de plantes sont méthylés à leur extrémité 3' par HEN1. Dans le cytoplasme, le miRNA mature est chargé par AGO pour former le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Ce dernier induit majoritairement le clivage endonucléotidique de ses cibles et dans de rares cas, l'inhibition de leur traduction. m^7Gppp , coiffe ; AAA ou AAAA, queue poly(A). 5' et 3', extrémités de l'ARN. db, double brin.

siRNA au cours d'une infection est faible, le *RNA silencing* est tout de même impliqué dans la défense antivirale puisque la délétion de composants du *RNAi* augmente la réplication virale (Burgess, 2013, Sidahmed *et al.*, 2014). Chez les insectes et les plantes, le *RNAi* est un mécanisme essentiel dans la défense contre les virus (Burgess, 2013, Incarbone and Dunoyer, 2013).

La biogenèse des siRNA partage quelques similarités avec celle des miRNA, notamment les principaux facteurs impliqués dans le processus de maturation des siRNA. Le *RNAi* est initié par un ARN viral double brin qui peut être obtenu soit par un intermédiaire de réplication, une hybridation moléculaire ou une structure secondaire de type tige-boucle. Ce précurseur viral est principalement clivé par les DCL4 et DCL2 qui produisent des siRNA primaires double brin de 21 et 22 nt respectivement (**Figure XIII, A**) (Incarbone and Dunoyer, 2013). Ils sont ensuite méthylés à leurs extrémités 3' par HEN1 comme pour les miRNA afin de les préserver de la dégradation (Ding and Voinnet, 2007). Le brin « guide » est ensuite chargé majoritairement par AGO1, qui peut être substitué par AGO2, pour former le complexe RISC et induire une dégradation de l'ARNm cible ou la répression de sa traduction comme décrit pour les miRNA chez les plantes (Filipowicz *et al.*, 2008, Harvey *et al.*, 2011, Valinezhad Orang *et al.*, 2014). Lors d'une infection par un virus à ADN, des siRNA de 24 nt sont produits en grande quantité par DCL3, puis l'un des brins est chargé par AGO4 qui induit la méthylation de l'ADN viral cible inhibant ainsi sa transcription (**Figure XIII, A**) (Incarbone and Dunoyer, 2013).

Chez les plantes, le signal du *RNA silencing* peut être amplifié *via* des ARN polymérases ARN dépendantes (RDR, *RNA polymerase RNA dependent*) et d'autres facteurs cellulaires par un mécanisme de transitivity. Ce dernier consiste à produire des ARN double brins à partir des ARNm ciblés par les siRNA primaires. Ainsi, comme décrit précédemment, ces nouveaux ARN double brin seront clivés par DCL4 et DCL2 pour produire des siRNA double brins appelés siRNA secondaires qui auront le même rôle que les siRNA primaires (Ding and Voinnet, 2007) (**Figure XIII, B**).

Pour assurer une protection dans l'ensemble de la plante, les siRNA se déplacent de cellule en cellule par l'intermédiaire des plasmodesmes, des jonctions intercellulaires traversant la paroi, afin de rejoindre les parties distales de la plante. Une fois dans les tissus spécifiques, les siRNA sont prêts à cibler les ARN complémentaires et induire le mécanisme de transitivity (Himber *et al.*, 2003, Molnar *et al.*, 2010, Mermigka *et al.*, 2016).

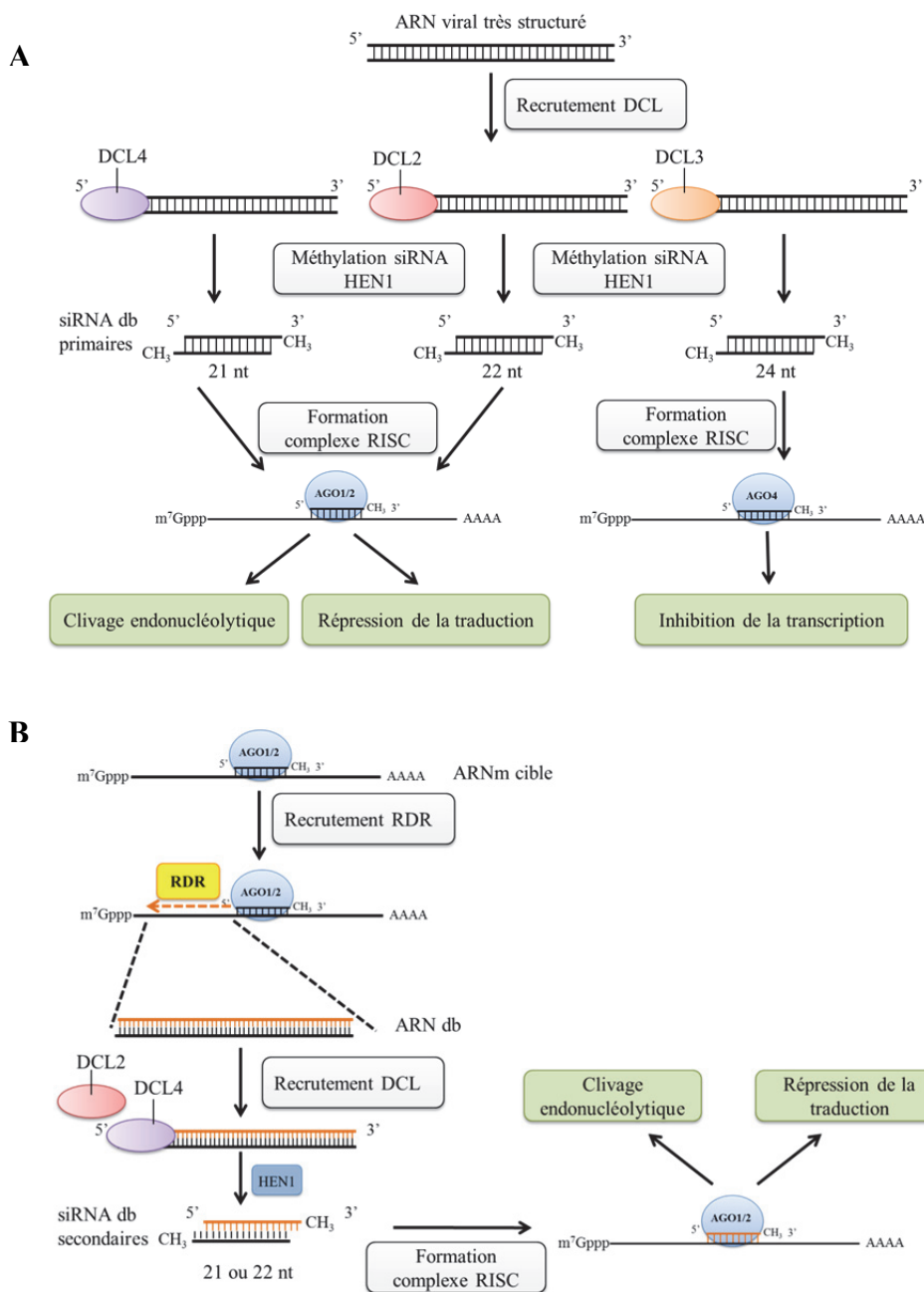


Figure XIII : Mécanisme antiviral du *RNA silencing*. (A) Le mécanisme de défense antivirale est initié par une molécule d'ARN viral très structurée qui est soumise à divers processus de maturation conduisant à la formation de siRNA primaires de taille variable en fonction de la protéine DCL à l'origine de leur formation. Le complexe RISC est formé par différentes protéines AGO en fonction de la provenance des siRNA et du type de régulation. (B) Le mécanisme d'amplification du signal du *RNA silencing* conduit à la formation de siRNA secondaires répartis sur toute la séquence de l'ARN cible alors que les siRNA primaires ne reconnaissent qu'une partie de l'ARN cible. Ce mécanisme d'amplification (ou de transitivity) assure ainsi une meilleure résistance. m⁷Gppp, coiffe ; AAAA, queue poly(A). 5' et 3', extrémités de l'ARN. db, double brin et nt, nucléotides.

II. Interface entre les virus et la machinerie de dégradation des ARNm cellulaires

Parasites intracellulaires obligatoires, les virus dépendent entièrement de la machinerie cellulaire, et en particulier de la machinerie traductionnelle pour se multiplier. Au vu de la complexité et de la robustesse des voies impliquées dans la machinerie de dégradation des ARNm cellulaires, l'accumulation de transcrits étrangers au cours d'une infection virale est sans aucun doute une étape à cibler. En effet, en fonction de leur provenance, les transcrits viraux présentent des caractéristiques relativement différentes de celles des ARNm cellulaires qui font d'eux des cibles du mécanisme de dégradation. Ces caractéristiques comprennent majoritairement la composition du complexe RNP des virus à réplication cytoplasmique, la taille des régions 5' et 3' UTR, la présence de multiples cistrons, la présence d'éléments pro-dégradation tels que les éléments *AU-rich*, l'absence de coiffe et/ou d'une queue poly(A) à leurs extrémités 5' et 3' respectivement.

Les virus à ADN ont généralement une réplication nucléaire et leurs transcrits présentent les caractéristiques de transcrits cellulaires. En revanche, les virus à ARN se répliquent pour la plupart dans le cytoplasme. Pour lutter contre les mécanismes de dégradation cités précédemment, ces virus ont élaboré différentes stratégies permettant de préserver l'intégrité de leur génome et de leurs transcrits. Ainsi, les génomes ou les transcrits viraux portent des éléments *cis-acting* à leurs extrémités. Selon le genre viral, du côté 5', certains virus arborent soit une coiffe, soit une VPg (*viral protein genome-linked*), une protéine liée de façon covalente à l'extrémité 5'. La coiffe et dans certains cas la VPg sont impliquées dans le recrutement des facteurs de la traduction chez les virus de plantes. Des séquences très structurées de type IRES (*Internal ribosome entry site*) permettent également le recrutement des facteurs d'initiation de la traduction. Du côté 3', les ARN viraux peuvent posséder soit une queue poly(A), soit une région très structurée telle qu'un TLS (*tRNA-like structure*) qui intervient dans la réplication virale. On retrouve également chez certains virus des éléments internes à leurs ARN susceptibles d'être détectés par les voies de dégradation spécifiques telles que la voie NMD ou AUMD. Aussi, pour assurer la stabilité de leur génome, ces virus possèdent des motifs particuliers sur leur ARN ou encore peuvent recruter des facteurs de stabilité. Par exemple, l'inhibition de la dégradation par l'exosome est assurée par des éléments très structurés présents à l'extrémité 3' des messagers codés par le Kaposi's sarcoma herpes virus (KSHV) ou le turnip yellow mosaic virus (Akiyama *et al.*, 2016). De nombreux

exemples illustrant ces stratégies de contre-défense virale sont décrits dans la revue de K. Narayanan et S. Makino (Narayanan and Makino, 2013).

Afin de favoriser la synthèse de leurs protéines, les virus vont jusqu'à perturber le système de dégradation des ARNm en exprimant des protéines qui inhibent ou qui dégradent les facteurs impliqués dans ces voies. Ainsi, de nombreux virus d'insectes et de plantes codent des suppresseurs du *RNA silencing* appelés VSR (*viral suppressor of RNA silencing*) qui, pour certains d'entre eux, régulent négativement cette voie. Certains VSR peuvent donc lier et séquestrer les ARN double brin soit pour empêcher la formation des siRNA, soit pour inhiber l'incorporation de ces derniers dans AGO. Par exemple, la protéine p19 du tomato bushy stunt virus séquestre les siRNA double brin de 21 pb et empêche la formation du complexe RISC, elle inhibe également le mouvement des siRNA vers les organes distants de la plante (Silhavy *et al.*, 2002). D'autres VSR peuvent également fixer directement les effecteurs de la voie du *RNA silencing* comme les protéines VP1 du Nora virus et 1A du cricket paralysis virus qui interagissent avec AGO2 et inhibent son activité catalytique (van Mierlo *et al.*, 2012, van Mierlo *et al.*, 2014). La protéine P0 du turnip yellow virus cible quant à elle AGO1 et induit sa dégradation *via* l'autophagie (Derrien *et al.*, 2012). D'autres exemples décrivant les VSR de plantes sont détaillés dans la revue de Incarbone et Dunoyer (Incarbone and Dunoyer, 2013).

Les virus peuvent aussi provoquer la dégradation rapide des ARNm cellulaires et rendre ainsi la machinerie de la traduction disponible pour leur propre utilisation. Une telle dégradation accélérée des ARNm est associée à des dysfonctionnements de la cellule infectée (Abernathy and Glaunsinger, 2015). Cependant, les ARNm viraux ne sont pas toujours exempts d'une dégradation par leurs propres protéines. Par conséquent, à travers cette stratégie, les virus régulent à la fois l'expression de leurs gènes mais aussi celle des gènes cellulaires. Pour assurer la dégradation des ARNm cellulaires, certains virus peuvent induire un clivage endonucléolytique des ARNm qui sont ensuite dégradés par l'exoribonucléase Xrn1, c'est le cas de la protéine SOX du KSHV. De plus, la présence de SOX est associée à une inhibition de la traduction *via* la rétention des ARNm dans le noyau (Narayanan and Makino, 2013, Abernathy and Glaunsinger, 2015). D'autres virus comme le virus influenza, déstabilisent les ARN cellulaires, en cours de synthèse, en capturant leur coiffe par le processus de « *cap snatching* ». Ces ARN dépourvus de leur coiffe sont directement ciblés par Xrn1 (Decroly *et al.*, 2012). Ces stratégies de contre-défense virale induisant la dégradation des messagers

cellulaires sont décrites dans la revue de E. Abernathy et B. Glaunsinger (Abernathy and Glaunsinger, 2015).

En plus de leur lutte contre le système de dégradation cellulaire, les virus exploitent les voies de dégradation ou certains des facteurs impliqués dans ces voies pour asseoir leur multiplication et l'expression de leurs gènes. Par exemple, le brome mosaic virus utilise le complexe Lsm1-7/Pat1/Dhh1 pour transférer ses ARN génomiques du processus de traduction vers le processus de réplication (Mas *et al.*, 2006). Le virus de l'hépatite C réquisitionne le complexe AGO2-miR122 pour se protéger d'une dégradation par l'exoribonucléase Xrn1 et stabiliser son génome mais aussi pour assurer sa réplication virale et stimuler, de façon modérée, sa traduction (Wilson and Sagan, 2014).

Puisque l'exoribonucléase Xrn1 est impliquée dans la dégradation des ARN, l'inhibition de son activité par les virus au cours d'une infection semble tout à fait normale. Certains virus comme les flavivirus, ciblent cette exoribonucléase. Les flavivirus produisent un ARN non codant qui interfère avec la machinerie de dégradation. Ces flavivirus possèdent une région 3'UTR très structurée qui est constituée d'une succession de pseudonœuds et de tige-boucles. Le premier pseudonœud forme une structure compacte appelée « *Three-way junction* » qui est responsable du blocage de Xrn1 au cours de sa progression sur l'ARN viral, conduisant ainsi à l'accumulation d'un ARN non codant (sfRNA, *subgenomic flavivirus RNA*) (Funk *et al.*, 2010, Chapman *et al.*, 2014a). L'accumulation de ce dernier inhibe l'activité de Xrn1, ce qui perturbe la voie de dégradation des ARN et conduit au maintien des ARNm cellulaires non coiffés. Ce sfRNA est aussi impliqué dans la suppression du *RNAi* dans les cellules de mammifères et d'insectes et dans la répression de la réponse à l'interféron-I, permettant ainsi d'amplifier la pathogénicité du virus (Pijlman *et al.*, 2008, Moon *et al.*, 2012, Manokaran *et al.*, 2015, Moon *et al.*, 2015). Une situation similaire est décrite chez le red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) et sera détaillée dans l'introduction du chapitre I.

Si l'inhibition de l'activité de XRN4 peut être importante pour certains virus de plante comme le tobacco mosaic virus (Peng *et al.*, 2011), l'activité de l'enzyme semble avoir un effet positif sur l'accumulation du bamboo mosaic virus par un mécanisme qui n'est pas encore caractérisé (Lee *et al.*, 2015).

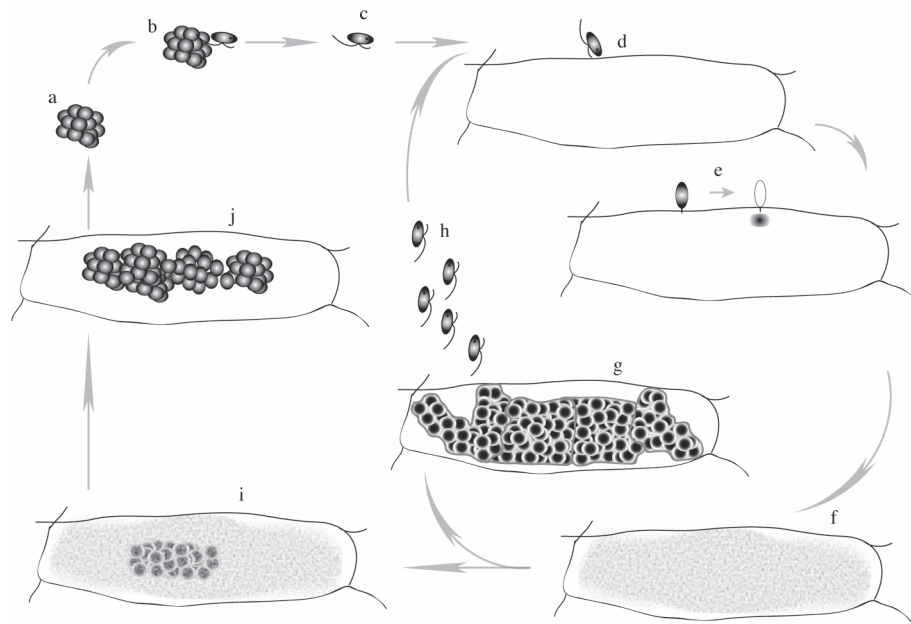


Figure XIV : Représentation du cycle du vecteur *Polymyxa betae*. (a) *P. betae* est maintenu dans les sols sous la forme de sporosores qui germent (b) sous la forme de zoospores biflagellées mobiles qui rejoignent une cellule épidermique ou corticale (c-d). Les zoospores se fixent à la cellule *via* le *stachel* et libèrent leur contenu dans la cellule (e). (f) Après la formation d'un plasmode multi-nucléé, celui-ci peut se différencier soit en zoosporange multi-lobé entouré d'une fine membrane produisant des zoospores biflagellées capables d'infecter de nouvelles cellules (g-h), soit en plasmode sporogène (i) qui formera des sporosores (j) qui seront libérés lors de la décomposition de la racine porteuse. Figure extraite de la revue de K. Hleibieh *et al.* (Hleibieh et al. 2007).

III. Caractéristiques du BNYVV

1. Classification du BNYVV

Le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave sucrière (BNYVV, Beet necrotic yellow vein virus) appartient à la famille des *Benyviridae*. Ce virus est le membre représentatif du genre *Benyvirus* dans lequel on retrouve également le beet soil-borne mosaic virus qui présente des similarités avec le BNYVV, et deux virus à génome bipartite, le rice stripe necrosis virus et le burdock mottle virus (Gilmer and Ratti, 2012).

2. Gamme d'hôtes

Le BNYVV infecte les plantes appartenant à la famille *Chenopodiaceae*. Chez les hôtes naturels *Beta macrocarpa* (betterave sauvage) et *Beta vulgaris* (betterave sucrière), il établit une infection systémique lorsque les trois premiers ARN génomiques sont présents. Chez l'hôte *Spinacia oleracea* et l'hôte de laboratoire *Nicotiana benthamiana*, les ARN1 et 2 suffisent à établir une infection systémique. Chez les hôtes de laboratoire *Chenopodium quinoa* et *Tetragonia expansa*, l'infection virale reste locale (Peltier *et al.*, 2008).

3. Transmission par le vecteur

Au champ, le BNYVV est transmis à la betterave par l'intermédiaire de son vecteur *Polymyxa betae*, un protozoaire appartenant au groupe monophylétique *Plasmodiophoridae*. Parasite obligatoire, *P. betae* se développe essentiellement dans les cellules épidermiques et corticales des racinelles (Peltier *et al.*, 2008). En plus d'infecter certaines plantes de la famille *Chenopodiaceae*, *P. betae* est également retrouvé dans les racines de certaines espèces de *Brassicaceae*, *Papeveraceae*, *Poaceae* et *Urticaceae* (ibid).

3.1. Cycle du vecteur

Le BNYVV est présent à l'intérieur de son vecteur qui est maintenu dans les sols sous la forme d'amas de spores de 5 à 7 µm de diamètre à paroi épaisse appelées sporosores (**Figure XIV, a**). En absence de plante hôte, ces spores résistent dans les sols pendant de nombreuses années. Elles germent en présence d'une plante hôte, d'eau et d'une température comprise entre 10 et 30°C. Le pH, la teneur en calcium et en magnésium sont également favorables à la germination (Peltier *et al.*, 2008). Dans ces conditions, la germination des sporosores libère des zoospores qui vont assurer le cycle décrit dans la **Figure XIV**. Si le vecteur est porteur du virus, c'est probablement à cette étape que la primo infection de la plante a lieu (McGrann *et al.*, 2009). L'amplification du vecteur dans les cellules racinaires est concomitante à la réplication virale. Cela permet au virus de se maintenir dans les zoospores qui parasiteront les

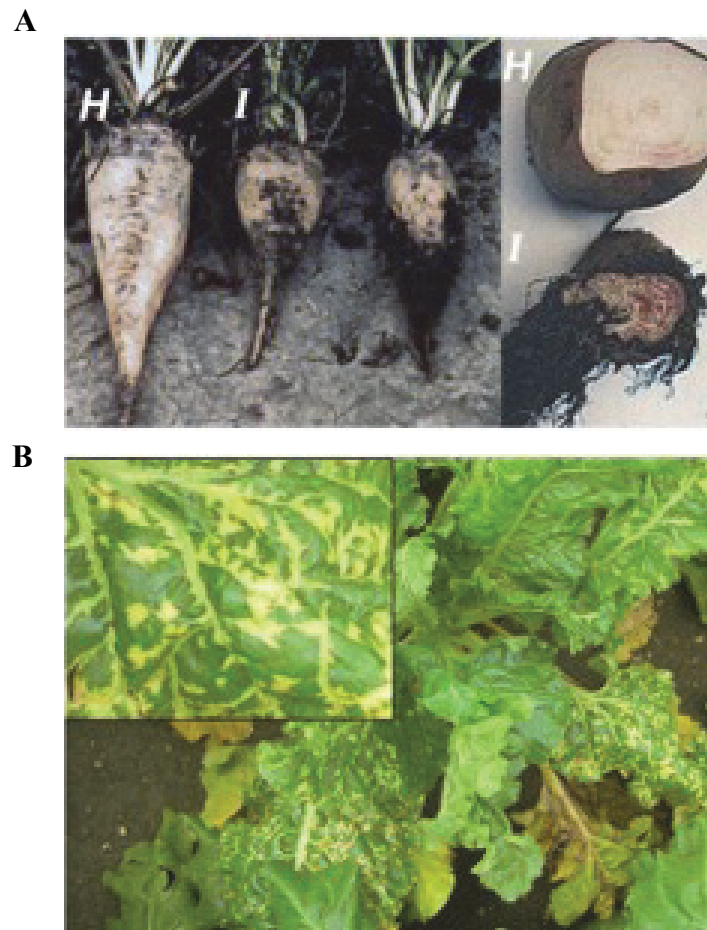


Figure XV : Symptômes de la rhizomanie de la betterave sucrière. (A) Les symptômes racinaires sont caractérisés par la prolifération intense des racines et la réduction de la taille du pivot qui se nécrose (comparer H, plante saine et I, plante infectée). **(B)** Les symptômes foliaires sont caractérisés par l'apparition des jaunisses et des nécroses le long des nervures. Figure extraite de la revue de K. Hleibieh *et al.* (Hleibieh et al. 2007).

radicelles au voisinage de leur point de sortie. Dans des conditions moins favorables, la formation de cystosores virulifères sera privilégiée et assurera la survie du vecteur et du virus pour une infection ultérieure (Peltier *et al.*, 2008). Par conséquent, le brassage des sols par les machines agricoles, la récolte et le transport des cultures, ou encore la présence d'eau dans les sols sont autant de facteurs qui facilitent la dispersion des spores virulifères et donc la propagation de la rhizomanie (McGrann *et al.*, 2009). La résistance extrême des spores explique le maintien de la rhizomanie dans les sols infestés durant de nombreuses années (ibid).

4. Rhizomanie

La rhizomanie de la betterave sucrière a été identifiée en Italie par le chercheur Canova en 1959. Cette maladie virale induite par le BNYVV est présente dans presque toutes les régions au monde pratiquant la culture de betterave sucrière (Europe, Asie et Amérique) (McGrann *et al.*, 2009).

4.1. Symptômes

La rhizomanie se manifeste par un nanisme de la plante et se caractérise par une réduction de la taille du pivot liée à la prolifération anarchique du chevelu racinaire (**Figure XV, A**). Lorsque l'infection devient sévère (**Figure XV, A**), le pivot et les racines se nécrosent (Peltier *et al.*, 2008, McGrann *et al.*, 2009) ce qui induit des déficits nutritifs entraînant l'apparition de symptômes foliaires tels que le flétrissement. Plus rarement, lorsque l'infection du BNYVV devient systémique, d'autres symptômes foliaires apparaissent tels qu'un jaunissement et des nécroses le long des nervures (**Figure XV, B**) (ibid). Ces derniers symptômes sont d'ailleurs à l'origine du nom du virus.

4.2. Enjeux économiques

La diminution de la taille des pivots entraîne des baisses de production en sucre comprises entre 50 et 80%, ce qui place la rhizomanie en tête des maladies les plus dommageables de la betterave (McGrann *et al.*, 2009). La fumigation des sols avec du bromure de méthyle a longtemps été utilisée pour réduire les populations de vecteurs. L'interdiction de ce procédé par le traité de Montréal ne permet plus de contrôler *P. betae* qui propage le virus (ibid). L'utilisation de betteraves naturellement « résistantes » porteuses de gènes de résistance dominants Rz1 à Rz5 assure le maintien de rendements et limite l'infection systémique des plantes. Cependant, de telles variétés n'ont pas d'effets sur l'accumulation du virus dans les racines qui se maintient ainsi dans le vecteur et conduit surtout à la sélection de nouveaux

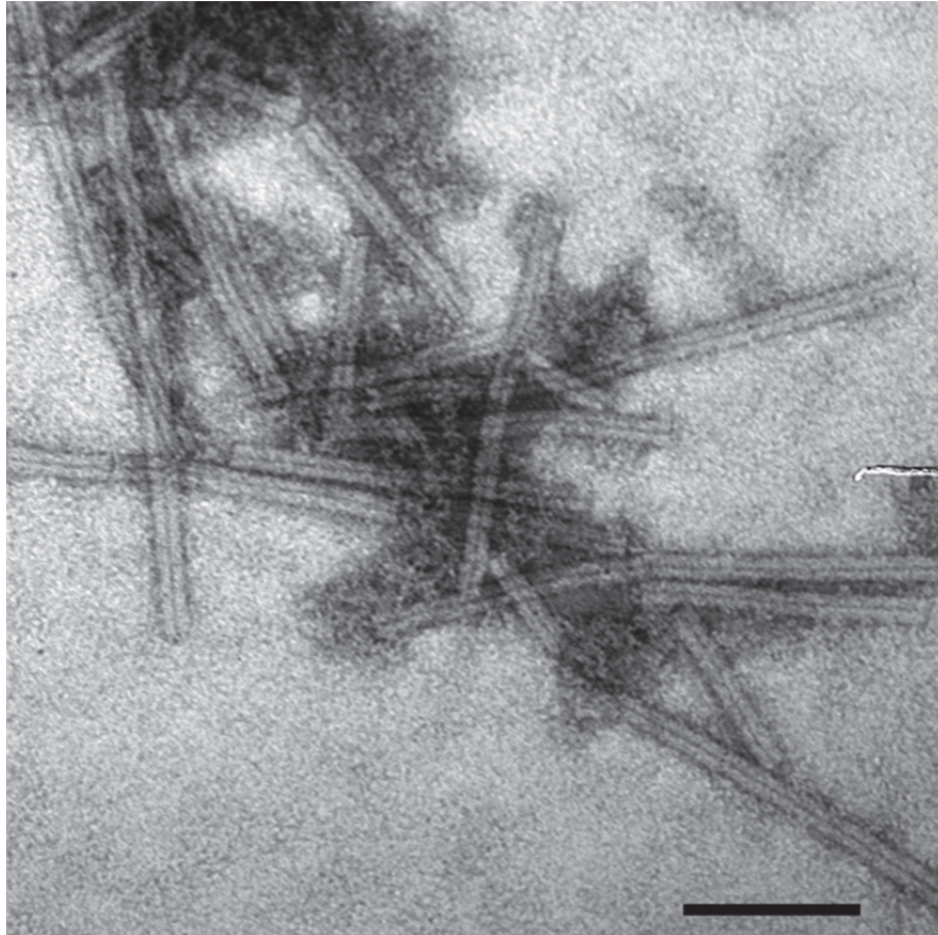


Figure XVI : Photo de particules virales du BNYVV visualisées en microscopie électronique à transmission. La barre d'échelle correspond à 100 nm. Figure extraite de la revue de C. Peltier *et al.* (Peltier et al. 2008).

isolats viraux capables de contourner les résistances (Peltier *et al.*, 2008, McGrann *et al.*, 2009). Ainsi, le nombre de gènes de résistance utilisables est limité. Il apparaît nécessaire de développer des méthodes de lutte alternatives efficaces permettant d'assurer des productions en sucre répondant aux demandes de la société. L'utilisation d'approches de transgénèse, telle que la mise en place d'une réponse PTGS qui confère une résistance *via* le ciblage de séquences génomiques essentielles et conservées du pathogène, s'est montrée très efficace pour le contrôle de nombreux phytovirus. Ces séquences génomiques sont souvent présentes dans les gènes essentiels codant la réplicase virale ou l'une des protéines impliquées dans le mouvement (Peltier *et al.*, 2008, Zare *et al.*, 2015).

5. Description du BNYVV

Le BNYVV est un virus dont le génome à ARN est encapsidé dans des particules rigides hélicoïdales de 20 nm de diamètre et de longueur variable qui dépend de la taille de l'ARN encapsidé (**Figure XVI**). Ce virus multipartite possède un génome réparti sur 4, voire 5, ARN simple brin de polarité positive. A ce jour, on distingue 4 types d'isolats, ceux de types A ou B qui se composent de 4 ARN, ARN1-ARN4, et ceux de types P ou J qui sont constitués de 5 ARN, ARN1-ARN5. Chacun de ces ARN présente des caractéristiques communes aux ARNm cellulaires puisqu'ils possèdent une coiffe et une queue poly(A) respectivement à leurs extrémités 5' et 3' (**Figure XVII**).

Les ARN1 et 2 codent les protéines nécessaires à la multiplication virale. Ils sont essentiels et suffisants pour établir une infection virale, par inoculation mécanique, de plantes utilisées au laboratoire, telles que *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana benthamiana* ou encore *Beta macrocarpa*. De plus, ces deux ARN suffisent pour induire une infection systémique chez l'hôte *N. benthamiana*.

L'ARN1, le plus grand, mesure 6746 nt et code une polyprotéine de 237 kDa indispensable à la réplication virale. Cette dernière subit un clivage protéolytique qui libère une protéine de 150 kDa portant un domaine méthyltransférase (MET), responsable de l'ajout de la coiffe aux extrémités 5' des ARN viraux ; un domaine hélicase (HEL), qui permet l'ouverture des structures secondaires et facilite la progression de la polymérase et un domaine protéase de type papaïne (PRO) dont la localisation n'est pas bien déterminée (Pakdel *et al.*, 2015). L'autre produit de clivage de 60 kDa obtenu correspond à l'ARN polymérase ARN dépendante (POL) (**Figure XVII**).

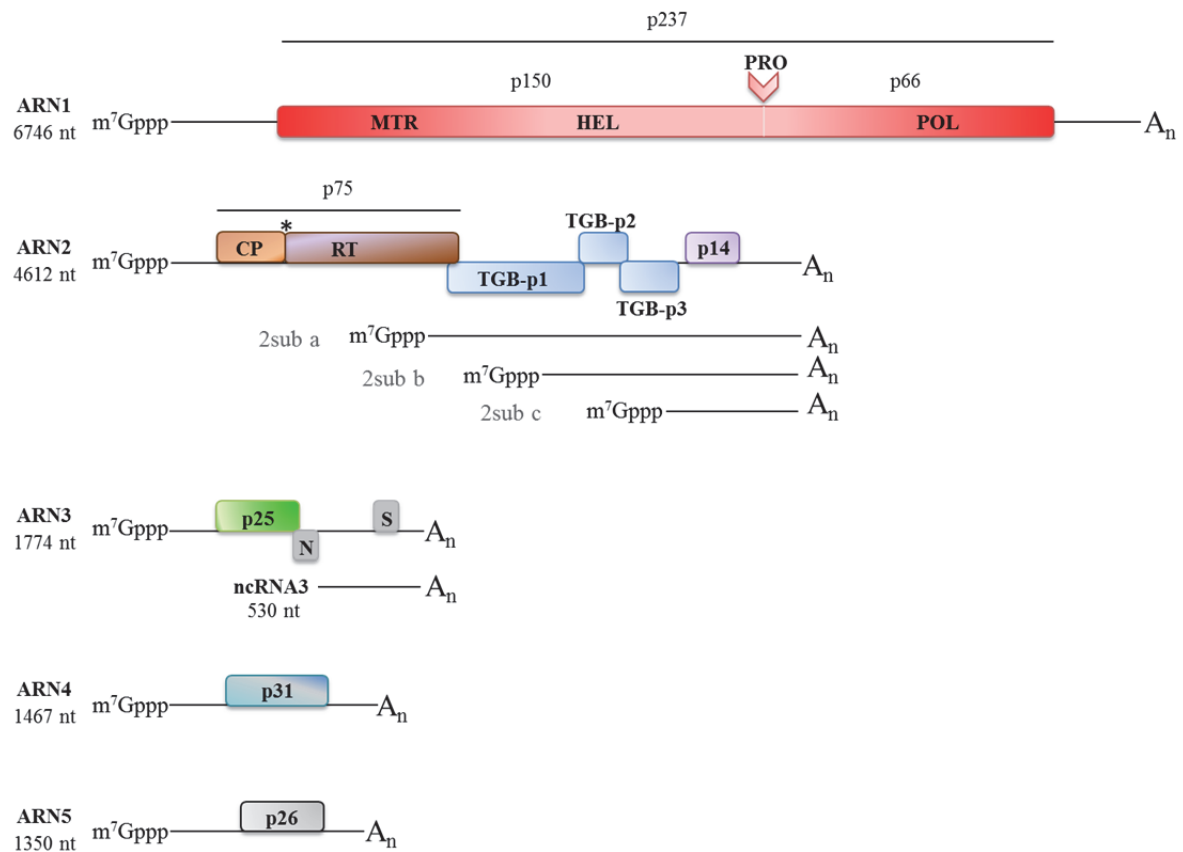


Figure XVII : Représentation de l'organisation des ARN du BNYVV. Les 5 ARN du BNYVV sont représentés ainsi que leur ORF (*open reading frame*) symbolisés par les rectangles de couleur. Les tailles ainsi que les noms des ARN sont indiqués en face de chaque ARN correspondant. m⁷Gppp correspond à la coiffe et (A_n) représente la queue poly(A). Le chevron rouge renversé représente le site de clivage protéolytique de la polyprotéine codée par l'ARN1. Ce clivage libère les protéines p150 et p66. MTR : méthyltransférase, HEL : hélicase, PRO : protéase virale et POL : ARN polymérase ARN dépendante. L'astérisque (*) retrouvé sur l'ARN2 indique l'emplacement du codon stop de type Ambre de l'ORF qui code la CP. Les annotations 2sub a-c désignent respectivement les trois ARN subgénomiques issus de l'ARN2. Le ncRNA3 correspond au produit de clivage obtenu à partir de l'ARN3. Figure adaptée de la revue de K. Hleibieh *et al.* (Hleibieh et al. 2007).

L'ARN2 mesure 4612 nt et comporte six ORF (*open reading frame*) (**Figure XVII**). Les deux premières ORF codent respectivement les protéines majeures (CP, 21 kDa) et mineures (CP-RT, 75 kDa) de capsid, dont les séquences codantes sont séparées par un codon stop de type Ambre (Peltier *et al.*, 2008). Ce dernier permet l'expression de la protéine mineure de capsid par un mécanisme de translecture (ou *read-through*) (ibid). La protéine CP-RT est retrouvée à l'une des extrémités de la particule virale (Erhardt *et al.*, 2001). Elle possède, à proximité de son extrémité C-terminale, le motif KTER essentiel à la transmission du virus par le vecteur *P. betae* (Tamada *et al.*, 1996).

Les ORF3, 4 et 5 se chevauchent partiellement et codent les protéines TGB (*triple gene block*) qui sont toutes les trois impliquées dans le mouvement du virus à courte distance (cellule à cellule) à travers les plasmodesmes. Ces ORF sont exprimées à partir d'ARN subgénomiques issus de l'ARN2 et codent les protéines TGB-p1 de 42 kDa, TGB-p2 de 13 kDa et TGB-p3 de 15 kDa respectivement. La protéine TGB-p1, la plus représentée, est traduite à partir de l'ARN subgénomique 2sub-a et les protéines TGB-p2 et -p3 sont traduites à partir de l'ARN subgénomique 2sub-b ; l'ORF5 étant traduite par un mécanisme de *leaky scanning* (**Figure XVII**) (Peltier *et al.*, 2008).

L'ORF6, 3' proximale code la protéine p14, une protéine riche en cystéine de 14 kDa traduite via l'ARN subgénomique 2sub-c (**Figure XVII**). La protéine p14 possède un domaine en doigt de zinc (Znf, *zinc finger*) dans lequel se trouve un motif NoLS (*Nucleolar localization signal*) qui lui confère une double localisation nucléolaire et cytoplasmique (Chiba *et al.*, 2013). Ce domaine Znf joue un rôle important dans la stabilité et la localisation cellulaire de la protéine p14. Il est impliqué dans la dimérisation de la protéine qui est nécessaire à sa localisation nucléolaire (ibid).

La protéine p14 est un suppresseur du *RNA silencing*, VSR, pour lequel le mécanisme d'action n'est pas encore complètement défini (Chiba *et al.*, 2013). En plus de son rôle de VSR, cette protéine joue un rôle essentiel dans le mouvement à longue distance du BNYVV chez *N. benthamiana* et *B. macrocarpa* indépendamment de la localisation subcellulaire de la protéine (ibid). En effet, l'utilisation de mutants alléliques de p14 affectés dans le NoLS permet d'exclure le rôle de la localisation nucléolaire de la protéine ainsi que celui de sa capacité à former des dimères dans le mouvement systémique du virus (ibid).

Si les ARN1 et 2 suffisent à établir une infection virale après inoculation mécanique en absence des ARN3 et 4, ces derniers sont indispensables au cycle naturel du virus puisqu'ils sont impliqués dans la pathogénicité et la transmission virale.

L'ARN3 qui mesure 1774 nt, est impliqué dans la manifestation des symptômes de la rhizomanie. Cet ARN code la protéine p25 (**Figure XVII**), un facteur de pathogénicité responsable de la sévérité des symptômes foliaires et racinaires (Koenig *et al.*, 1991, Jupin *et al.*, 1992, Tamada *et al.*, 1999, Peltier *et al.*, 2011). Son expression induit des dérèglements hormonaux dans les racines des plantes infectées (Peltier *et al.*, 2011). La protéine p25 présente une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique grâce à des signaux de localisation nucléaire, NLS (*nuclear localization signal*) et d'export nucléaire, NES (*nuclear export signal*) (Vetter *et al.*, 2004). La perturbation de sa localisation subcellulaire impacte le phénotype des lésions locales observées chez *C. quinoa* (ibid). L'ARN3 renferme deux petites ORF, (N et S) dont l'expression en contexte viral n'a jamais été mise en évidence (**Figure XVII**) (Jupin *et al.*, 1992). En plus de son rôle dans l'établissement des symptômes de la rhizomanie, l'ARN3 joue un rôle très important dans le mouvement à longue distance du BNYVV, particulièrement chez l'hôte *B. macrocarpa* indépendamment de son expression (Lauber *et al.*, 1998). Récemment, le laboratoire a démontré qu'un ARN non codant (ncRNA3, *noncoding RNA3*) initialement décrit comme un ARN subgénomique « *RNA3sub* » (Bouzoubaa *et al.*, 1991, Balmori *et al.*, 1993) était impliqué dans le mouvement systémique du virus (Peltier *et al.*, 2012). Cet ARN non codant de 540 nt est colinéaire à l'extrémité 3' de l'ARN3 (ibid).

L'ARN4 long de 1467 nt, code la protéine p31 de 31 kDa (**Figure XVII**) impliquée dans la transmission du BNYVV par le vecteur (Peltier *et al.*, 2008), dans l'aggravation des symptômes foliaires et dans un mécanisme de suppression du *RNA silencing* dans les racines de *N. benthamiana* (Rahim *et al.*, 2007).

L'ARN5, qui a une taille de 1350 nt, est uniquement retrouvé dans les isolats du BNYVV de type P ou J. Cet ARN code la protéine p26 de 26 kDa qui intervient dans la pathogénicité du virus (**Figure XVII**) en amplifiant la sévérité des symptômes de la rhizomanie et impactant les rendements en sucre (Peltier *et al.*, 2008, McGrann *et al.*, 2009). Cet ARN5 est également capable de produire un ARN non codant dont la séquence est colinéaire à son extrémité 3' terminale (Peltier *et al.*, 2012).

IV. Objectifs de la thèse

Avant mon arrivée au sein de l'équipe du Professeur David Gilmer, l'implication de l'ARN3 dans le mouvement systémique chez l'hôte *B. macrocarpa* était connue (Lauber *et al.*, 1998). Initialement, ce mouvement était associé à la présence d'une séquence nucléotidique de 330 nt appelée « core », située entre les nucléotides 1147 et 1477 de l'ARN3 (ibid). Par la suite, un motif de 20 nt dénommé « coremin » (1236-1255 nt) a été identifié à l'intérieur de la séquence « core » (Ratti *et al.*, 2009). « Coremin » est essentiel au mouvement à longue distance du virus chez l'hôte *B. macrocarpa* (Peltier *et al.*, 2012), et est à l'origine de l'accumulation de l'ARN non codant, ncRNA3 qui possède à son extrémité 5' le motif « coremin » précédé de 2 nt (ibid). En effet, la mutation de ce motif suffit à abolir la formation du ncRNA3 et le mouvement systémique chez *B. macrocarpa* (ibid). Le mécanisme par lequel le ncRNA3 est produit et s'accumule n'était pas connu mais les résultats provenant d'expériences réalisées *in vitro* laissaient penser qu'une nucléase cellulaire était à l'origine du processus de maturation de l'ARN3 (ibid).

Le premier objectif de ma thèse a consisté d'une part à caractériser la voie enzymatique responsable de l'accumulation du ncRNA3 et d'autre part à comprendre le rôle de l'ARN non codant sur l'activité enzymatique. Les résultats issus de cette étude sont présentés dans le 1^{er} chapitre intitulé : « **Rôle de l'ARN3 dans le mouvement à longue distance du BNYVV** » et suivi de l'article en révision pour une resoumission dans « *Journal of General Virology* ».

Le second objectif de ma thèse a été de poursuivre la caractérisation de la fonction de la protéine p14, le suppresseur de *RNA silencing* codé par l'ARN2. Comme décrit précédemment, la protéine p14 est essentielle au mouvement à longue distance du BNYVV chez *N. benthamiana* et *B. macrocarpa* (Chiba *et al.*, 2013). Le mécanisme d'action de la protéine p14 n'est pas encore défini, cependant, l'expression transitoire de celle-ci est associée à une réduction de la production des siRNA secondaires, ce qui suggère qu'elle pourrait agir en aval de la synthèse des siRNA primaires (ibid). J'ai, dans un premier temps, recherché l'implication de p14 sur la fonction de la protéine RDR puis poursuivi l'étude du rôle du VSR dans le mouvement systémique du *RNA silencing*.

Lors de son travail de thèse au laboratoire, Kamal Hleibieh a démontré qu'il existait une interaction spécifique entre la protéine p14 et la séquence « coremin » de l'ARN3 et que l'ARN3 pouvait partiellement compléter l'absence de la protéine p14 dans la progression de l'infection locale de feuilles chez *C. quinoa* (Hleibieh, 2010). Par conséquent, durant ma

thèse, j'ai poursuivi cette étude en évaluant le mouvement systémique de mutants viraux portant des versions alléliques de p14 complémentés ou non par l'ARN3 sauvage ou muté dans le motif « coremin ». L'ensemble de ce travail est présenté dans le 2^{ème} chapitre intitulé : **« Le rôle de la protéine p14 dans la suppression de l'interférence par l'ARN et le mouvement à longue distance du BNYVV »** et suivi d'un article publié dans « *Viruses* ».

Chapitre 1

Chapitre I : Etude du rôle de l'ARN3 dans le mouvement à longue distance du BNYVV

I. Introduction

Au cours d'une infection virale, les génomes et les transcrits viraux sont ciblés par les mécanismes de dégradation des ARNm. Pour contrer ces mécanismes et assurer leur maintien, les virus utilisent différentes stratégies (cf. **Introduction, partie II**). Certains détournent des facteurs cellulaires impliqués dans les mécanismes de dégradation ou de stabilisation des ARNm et d'autres inhibent ces voies de dégradation. Ainsi, le RCNMV accumule un produit de dégradation non codant (SR1f), issu de son ARN1 génomique, en bloquant la progression d'une exoribonucléase 5'→3' (Iwakawa *et al.*, 2008). Ce blocage est lié à la structure adoptée par une séquence particulière de 58 nt qui est retrouvée à l'extrémité 5' de cet ARN non codant (ibid). SR1f régule l'expression des gènes cellulaires et viraux, toutefois le mécanisme mis en œuvre reste inconnu (ibid). Une situation similaire est décrite chez les *Flavivirus*, qui accumulent un ARN non codant (sRNA, *subgenomic flavivirus RNA*). Ce sRNA est produit suite au blocage de la progression de l'exoribonucléase Xrn1 par une structure tertiaire présente sur l'ARN génomique (cf. **Introduction, partie II**).

Au cours d'une infection virale par le BNYVV, l'accumulation de l'ARN subgénomique, ARN3-sub colinéaire à l'extrémité 3' de l'ARN3, est connue depuis 1991 (Bouzoubaa *et al.*, 1991, Balmori *et al.*, 1993). Récemment, l'expression ectopique de l'ARN3 chez *N. benthamiana* a permis de mettre en évidence la production de l'ARN3-sub en l'absence de tout autre facteur viral. Cet ARN est en tout point identique à celui qui s'accumule lors de l'infection. Contrairement aux ARN subgénomiques produits à partir de l'ARN2 qui possèdent une coiffe, l'ARN3-sub possède un groupement phosphate en 5' suivi de la séquence « coremin » précédée de 2 nt (Peltier *et al.*, 2012). Une séquence identique est retrouvée aux extrémités des petits ARN produits à partir de l'ARN5 du BNYVV ou des ARN3 et 4 du BSBMV qui possèdent également le motif « coremin » (ibid). L'ensemble de ces données a permis de conclure que l'ARN3-sub ne correspondait pas à un ARN subgénomique conventionnel mais était plutôt issu de la dégradation de l'ARN3 génomique. Ce dernier est depuis nommé ncRNA3 (*noncoding RNA3*) (ibid). Il est intéressant de noter que le motif « coremin » est également retrouvé chez d'autres genres de virus comme certains cucumovirus, sous le nom de Box1 (de Wispelaere and Rao, 2009). Chez le cucumber mosaic virus (CMV), ce motif est essentiel à la production de l'ARN5, indépendamment de la

réplicase virale, qui porte à son extrémité 5' le motif « coremin » également précédé de 2 nt (ibid). La production de cet ARN5 serait liée à une activité exoribonucléase 5'→3' mais cela reste à vérifier (ibid). Des mutations réalisées dans la séquence Box1 du CMV ont montré que la production de l'ARN5 dépend de la séquence et de la structure de Box1 (Thompson *et al.*, 2008).

L'ARN3 du BNYVV est impliqué dans le mouvement systémique du virus chez l'hôte *B. macrocarpa*, grâce à sa séquence « core » (Lauber *et al.*, 1998). Des expériences de complémentation de l'ARN3 du BNYVV par l'ARN3 du BSBMV ont permis d'identifier le motif « coremin » de 20 nt (**5'-GUCCGAAGACGUUAAACUAC-3'**), situé dans la séquence « core », comme étant spécifiquement responsable du mouvement systémique du virus (Ratti *et al.*, 2009). Sur la base de ces observations et des données structurales du motif Box1 du CMV, des mutations ont été introduites dans la séquence « coremin » pour déstabiliser une structure tige-boucle. Ces approches ont révélé que la séquence et la structure de « coremin » sont essentielles à la production du ncRNA3 et au mouvement systémique du virus chez l'hôte *B. macrocarpa*. En effet, aucun de ces mutants n'est capable d'accumuler le ncRNA3 ni d'assurer le mouvement à longue distance (Peltier *et al.*, 2012). Ainsi, un lien a pu être établi entre l'accumulation du ncRNA3 et le mouvement systémique (ibid).

Le clivage de l'ARN est observé en système de traduction acellulaire de germes de blés. Pour exclure l'implication d'un ribozyme agissant en *cis* ou en *trans*, l'ARN3 a été incubé dans le tampon de traduction en présence ou non d'ARN totaux issus des germes de blés. Dans ces conditions, aucune production de ncRNA3 n'est observée (Peltier *et al.*, 2012). D'autres traitements effectués sur les extraits de germes de blé, en présence de l'ARN3, ont en revanche permis d'orienter les recherches vers l'implication d'une protéine cellulaire, sans pour autant l'identifier (ibid). Pour identifier le produit du gène responsable de la maturation de l'ARN3 en ncRNA3, une approche génétique a été utilisée. Les plantes hôtes du BNYVV ne constituent pas des outils génétiques adaptés car leur génome est trop complexe et n'est que partiellement caractérisé. De plus, la plante modèle *A. thaliana* n'est pas une plante hôte du BNYVV. Par conséquent, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un système eucaryote unicellulaire modèle : la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

L'expression ectopique de l'ARN3 a d'abord été conduite chez cet organisme. Les ADNc de l'ARN3, de l'ARN3E qui possède la séquence complémentaire inversée de « coremin » et celui de l'ARN3Δ5'UTR, dépourvu de sa région 5'UTR (Δ1-390 nt) ont été introduits dans

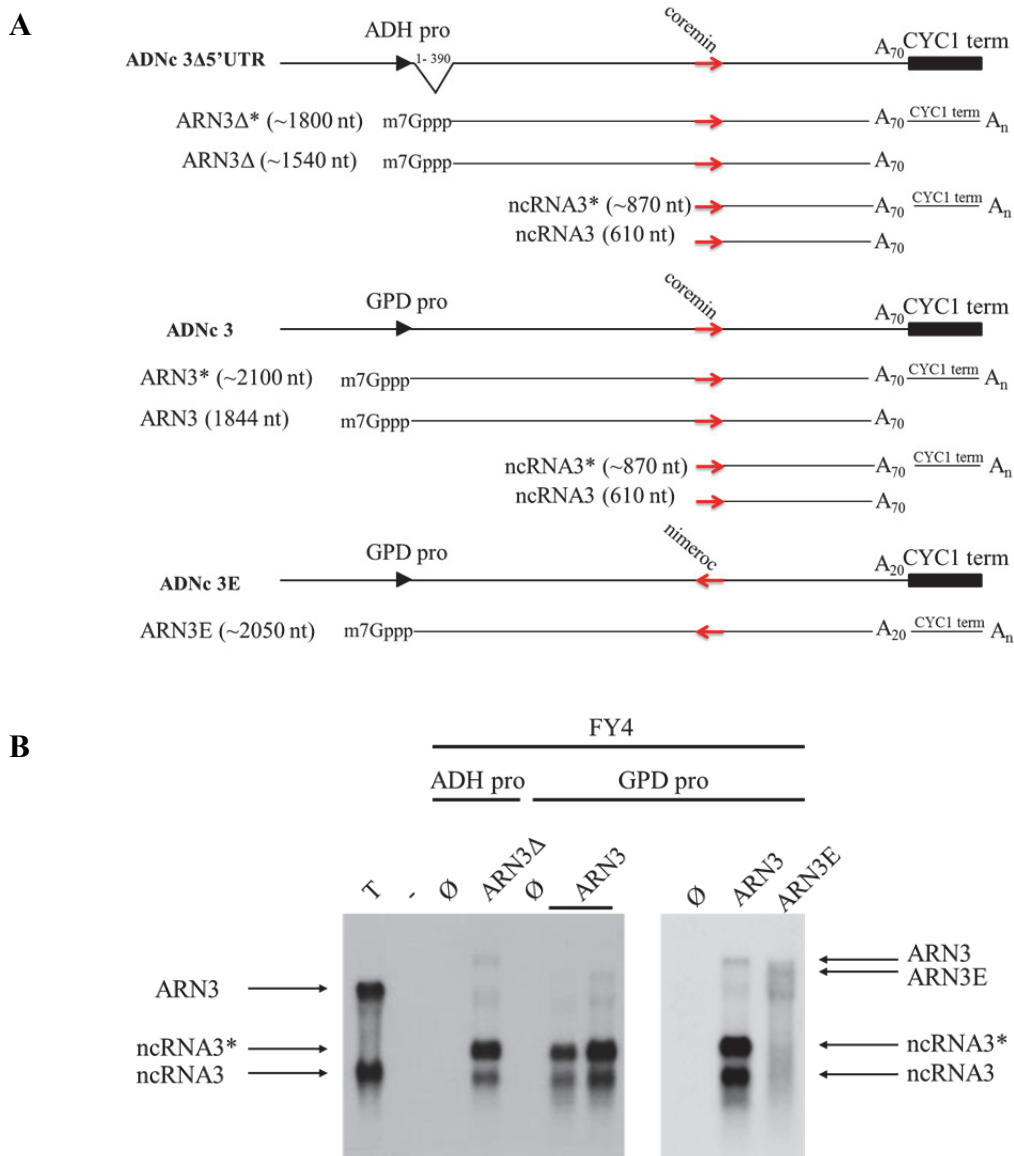


Figure I.1 : Expression ectopique de l'ARN3 chez *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Représentation schématisée des vecteurs d'expression (ADNc) de l'ARN3 dépourvu de sa région 5'UTR (ARN3Δ), de l'ARN3 et de l'ARN3E comportant la séquence complémentaire inversée de « coremin ». m7Gppp, représente la coiffe des ARN transcrits ; A₇₀, A₂₀ et A_n, représentent la taille des queues poly(A) ; CYC1 term, correspond au terminateur de la transcription ; les triangles noirs, indiquent la position du promoteur ADH ou GPD utilisé. La position de la délétion 1-390 est indiquée sur l'ADNc de l'ARN3Δ. Les flèches rouges « sens » et « antisens » représentent respectivement la séquence « coremin » ou sa séquence complémentaire inversée « nimeroc ». La nature et les tailles des ARN sont précisées. (B) Les ARN totaux extraits des souches FY4 transformées par les vecteurs schématisés en A ont été analysés par northern blot en utilisant une sonde ADN spécifique de la région 3'UTR des ARN3. Les positions des différents ARN3 sont indiquées. T, ARN totaux de plante infectée utilisé comme marqueur de position de l'ARN3 et du ncRNA3. (Ø), vecteurs vide ; (-), puits non chargé. Les astérisques (*) marquent les ARN polyadénylés qui portent le terminateur CYC1 et une seconde queue poly(A).

des vecteurs d'expression de levure p426GPD et p426ADH respectivement (**Figure I.1, A**). Des souches de levures FY4 ont été transformées par ces vecteurs ou les vecteurs vides ($\emptyset$), puis les ARN totaux ont été extraits et analysés par northern blot en utilisant une sonde spécifique s'hybridant à la partie 3' UTR de l'ARN3 (**Figure I.1, B**). Aucun signal n'est détecté en présence des vecteurs vides. L'expression d'ARN3 sauvage et ARN3 Δ 5'UTR (ARN3 Δ), conduit à une faible accumulation des transcrits de taille complète et attendue. Cette expression produit également deux ARN de taille inférieure dont l'un co-migre avec le ncRNA3 contrôle (**Figure I.1, B**). Des expériences de 5'RACE ont démontré que les extrémités 5' de ces deux ARN sont *sensu stricto* identiques à celle du ncRNA3 produit dans les plantes infectées ou exprimant transitoirement l'ARN3. La bande de plus petite taille possède la même séquence que le ncRNA3 polyadénylé et celle de plus grande taille correspond au ncRNA3 polyadénylé dont la séquence est fusionnée à celle du terminateur de transcription CYC1 suivi d'une seconde queue de poly(A) (**Figure I.1**). L'ARN3 muté dans la séquence « coremin » (ARN3E) s'accumule faiblement dans la levure et aucun produit majeur de plus petite taille n'est observé (**Figure I.1, B**). Le vecteur d'expression étant identique, cette observation suggère que l'ARN3E est rapidement dégradé après sa transcription et son export nucléaire. Ainsi, ces résultats valident le modèle levure capable de reproduire les données obtenues *in planta* puisque le ncRNA3 est détecté uniquement en présence d'ARN3. Un tel résultat indique également que *S. cerevisiae* exprime une nucléase dont le fonctionnement est identique à celui de la nucléase présente dans la plante. L'expression d'ARN3 dépourvu de l'extrémité 5' UTR conduit à la même observation indiquant que l'extrémité 5' de l'ARN génomique n'est pas nécessaire à la production du ncRNA3.

Afin d'identifier la protéine impliquée dans la production de ncRNA3, quatre mutants affectés dans les gènes codant des nucléases ont été sélectionnés chez la levure, FY4 Δ *rnh1*, Δ *rrp6*, Δ *rex3* et Δ *xrn1*. La protéine *rnh1* (*ribonuclease H1*) intervient dans la suppression des chimères ARN-ADN, comme TERRA (*noncoding telomeric repeat-containing RNA*) qui se fixe aux télomères pour réguler leur taille (Balk *et al.*, 2013). La protéine *rex3* (*RNA exonuclease 3*) est une exoribonucléase 3'→5' impliquée dans la maturation de la molécule d'ARN qui est associée au complexe ribonucléoprotéique RNase MRP (*Ribonuclease mitochondrial RNA processing*) (van Hoof *et al.*, 2000). La protéine *rrp6* est une exoribonucléase 3'→5' associée au complexe exosome nucléaire (cf. **Introduction, partie I, paragraphe 1.3**) et *Xrn1* une exoribonucléase 5'→3' qui a largement été décrite dans l'introduction générale (cf. **Introduction, partie I, paragraphe 1.2.1**). Ces mutants, tous viables

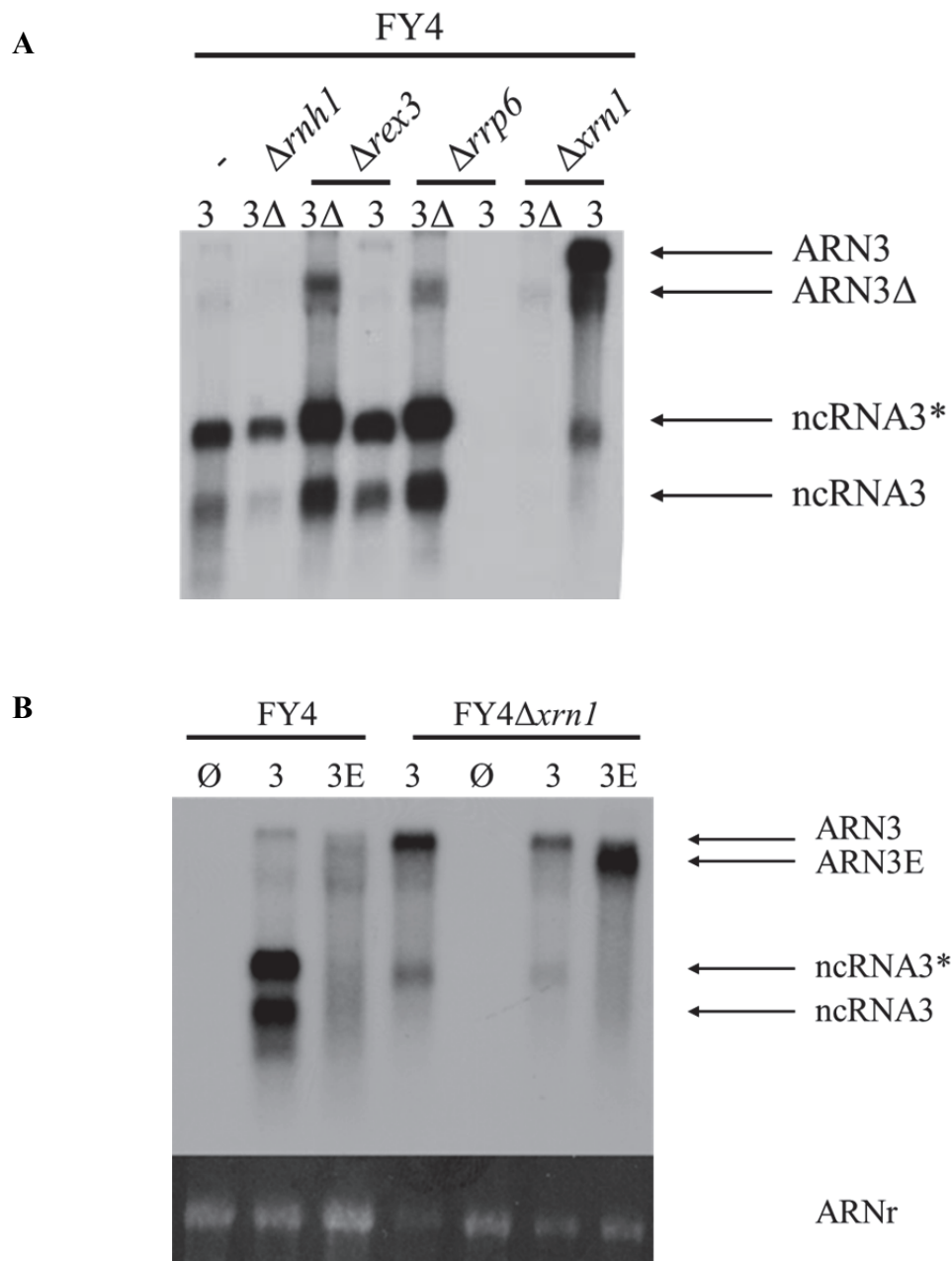


Figure I.2 : Identification de l'exoribonucléase Xrn1 responsable de la dégradation de l'ARN3.
(A) Des souches FY4 sauvages ou mutées dans les gènes *rnh1*, *rex3*, *rrp6* et *xrn1* sont transformés par les vecteurs exprimant l'ARN3 (3) et/ou l'ARN3 délété de sa région 5' UTR (3 Δ) (**Figure 1, A**). Les ARN3 extraits des levures sont révélés par une sonde ADN spécifique de l'extrémité 3'. (-) correspond à la souche sauvage transformée par l'ARN3. **(B)** Analyse par northern blot des ARN extraits des souches sauvages (FY4) ou mutées (FY4 $\Delta xrn1$) transformées par l'ARN3 (3), l'ARN3E (3E) ou le vecteur vide ($\emptyset$). La charge des ARN est visible par un marquage au bromure d'éthidium (ARNr). Les positions des ARN sont indiquées sur la droite. Les astérisques (*) marquent les ARN polyadénylés qui portent le terminateur CYC1 et une seconde queue poly(A).

à l'état homozygote, ont été transformés avec des vecteurs exprimant l'ARN3 et l'ARN3Δ5'UTR (ARN3Δ). Comme précédemment, les ARN totaux ont été extraits et analysés par northern blot (**Figure I.2, A**). Contrairement aux autres mutants qui permettent toujours l'accumulation du ncRNA3, l'accumulation de l'ARN non codant est très fortement affectée dans le fond génétique FY4Δ*xrn1* (**Figure I.2, A**). L'absence d'accumulation de l'ARN3 dans la souche FY4Δ*rrp6* peut s'expliquer par une dégradation ou par la perte des ARN totaux extraits, la visualisation des ARN totaux n'ayant pas été réalisée. Les souches FY4 sauvages ou mutées dans le gène *xrn1* transformées avec l'ARN3, l'ARN3E ou le vecteur vide (Ø) ont été comparées (**Figure I.2, B**). Aucun signal n'est détecté en présence du vecteur vide (Ø). Dans la souche sauvage, les ARN3 et 3E sont difficilement visibles alors qu'ils sont bien détectés dans la souche incapable d'exprimer Xrn1 (**Figure I.2, B**). L'accumulation des deux espèces de ncRNA3 (ncRNA3 et ncRNA3*) est uniquement détectée en présence de l'ARN3 mais pas en présence de l'ARN3E. Il est à noter un faible signal correspondant aux ncRNA3 et ncRNA3* détecté dans la souche FY4Δ*xrn1* dont les extrémités 5' sont identiques à ncRNA3 (**Figure I.2, B**). Ces produits pourraient correspondre à la dégradation de l'ARN3 par l'exoribonucléase 5'→3' Xrn2 (Rat1) qui est nucléaire et complémente partiellement l'absence de Xrn1. La double mutation Xrn2-Xrn1 est létale, nous n'avons pas pu tester la présence de ncRNA3 dans un tel fond génétique. Ces résultats valident l'implication de la protéine Xrn1 dans la dégradation de l'ARN3 et son arrêt au voisinage de la séquence « coremin ».

L'enzyme Xrn1 cible les ARN qui possèdent une extrémité 5' monophosphate, issus du *decapping* par le complexe Dcp1-Dcp2 ou d'un clivage endonucléolytique (cf. **Introduction, partie I, paragraphe 1.2.1**). Pour tester l'implication de la protéine Dcp2 dans la biogenèse de ncRNA3, nous avons transformé les souches de levure W303-1A sauvages ou n'exprimant plus le gène *dcp2*, *xrn1* ou les deux gènes simultanément (W303-1AΔ*dcp2*, Δ*xrn1* ou Δ*xrn1*Δ*dcp2* respectivement) par les vecteurs exprimant les ARN3 et 3E. L'analyse par northern blot révèle que le ncRNA3 est uniquement détecté lorsque l'ARN3 est produit dans une souche sauvage. Aucun signal correspondant au ncRNA3 n'est détecté dans les souches mutées ou lorsque l'ARN3E est exprimé (données non montrées). Ces résultats démontrent que le complexe Dcp1-Dcp2 participe à la production de ncRNA3 suggérant que l'ARN3 subit une étape de *decapping*. Cependant, des produits de clivage 5' terminaux issus de l'ARN3 ont été révélés lors d'expériences réalisées *in vitro*, en présence d'extraits de germes de blé. Aussi, nous ne pouvons pas exclure un éventuel clivage endonucléolytique (Peltier *et*

al., 2012). Néanmoins, ces produits 5' terminaux pourraient également correspondre à des produits de transcription abortive.

L'ensemble de ces données a permis d'identifier l'exoribonucléase 5'→3' responsable de la production du ncRNA3. Afin de mieux comprendre le mécanisme de production de l'ARN non codant et son impact sur le mouvement systémique du BNYVV, j'ai recherché si l'inhibition de l'exoribonucléase par une séquence de flavivirus pouvait maintenir le mouvement systémique. Pour cela, j'ai utilisé un clone chimérique et j'ai comparé ses propriétés à celles de l'ARN3 en utilisant la levure, ainsi que des approches biochimiques réalisées *in vitro* et en contexte viral. Les résultats obtenus sont présentés dans ce chapitre sous forme d'article en révision pour être de nouveau soumis à « *Journal of General Virology* ».

Titre de l'article : « **Benyvirus noncoding RNA production depends on an Xrn activity** ».

II. Article

« Benyvirus noncoding RNA production depends on an Xrn activity »

En révision pour resoumission dans « *Journal of General Virology* ».

1 **Benyvirus noncoding RNA production depends on an Xrn activity**

2 Alyssa Flobinus¹, Nicolas Chevigny¹, Tanja Seissler¹, Elodie Klein^{1, 2}, Claudine Bleykasten-
3 Grosshans³, Claudio Ratti⁴, Salah Bouzoubaa¹ and David Gilmer^{1,*}

4 ¹ Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS UPR2357, Université de Strasbourg,
5 Strasbourg, France

6 ² SESVanderHave, Tienen, Belgium

7 ³ Génétique moléculaire génomique microbiologie, CNRS UMR7156, Strasbourg, France

8 ⁴ DipSA - Plant Pathology, University of Bologna, Bologna, Italy

9 * Corresponding author

10 E-mail: gilmer@unistra.fr - Phone: +33367155362

11 Word count: 5385

12 **Keywords:** viral noncoding RNA; Exoribonuclease; Flavivirus; BNYVV.

13

ABSTRACT

The RNA3 species of the beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), a multipartite positive-stranded RNA phytovirus, contains the ‘core’ nucleotide sequence required for its systemic movement in *Beta macrocarpa*. Within this ‘core’ sequence resides a “coremin” motif of 20 nucleotides that is absolutely essential for long distance movement. RNA3 undergoes processing steps to yield a reduced, noncoding RNA3 (ncRNA3), which is stabilized by “coremin” at its 5’ end. “Coremin” mutants do not accumulate ncRNA3. Expression of wild-type (wt) or mutated RNA3 in *Saccharomyces cerevisiae* allows the accumulation of ncRNA3 only when wt RNA3 is produced. Screening of *S. cerevisiae* ribonuclease mutants identified the exoribonuclease Xrn1 as a key enzyme in RNA3 processing. The yeast $\Delta xrn1$ mutant was successfully complemented by plant *XRN4*. Using *in vitro* biochemical approaches, we showed that ncRNA3 corresponds to a stabilized degradation product of viral genomic RNA3 after processing by Xrn1. Substitution of the BNYVV-RNA3 ‘core’ sequence by a West Nile flavivirus Xrn1-resistant structure (sfRNA) led to the accumulation of a novel ncRNA3 species in both wt and Xrn-complemented yeasts, as well as *in vitro*. However, BNYVV chimeras containing the flavivirus sequence were not able to complement core-associated systemic viral movement.

Introduction

In eukaryotic cells, the cellular RNA decay machinery participates in the control of RNA stability. Nuclear RNA surveillance complexes remove aberrant unprocessed transcripts, while cytoplasmic mRNA degradation is accomplished by mRNA surveillance, RNA-mediated gene silencing or translational repression (Moon and Wilusz, 2013) through deadenylation followed by 3'-5' exosome mediated degradation, decapping and 5'-3' degradation (Adjibade and Mazroui, 2014, Sheth and Parker, 2003, Dickson and Wilusz, 2011). From cleavage of AUF1 by Human enterovirus C (Rozovics et al., 2012) to recruitment of HuR by Sindbis virus (Sokoloski et al., 2010) or suppression of RNA silencing during plant infections (for review (Csorba et al., 2015)), viruses have evolved different strategies to control and stabilize their messengers or genome components (Moon and Wilusz, 2013). While some viruses express proteins or capture host factors to counteract antiviral RNA decay (Dickson and Wilusz, 2011), others like arthropod-borne flaviviruses use a highly structured, nuclease-resistant noncoding RNA generated by the processing of genomic RNAs to subvert the 5'-3' decay machinery of infected cells (Pijlman et al., 2008). Accumulation of subgenomic flavivirus RNA (sfRNAs) is due to the stabilization of genomic 3' UTR sequences by highly structured motifs (Funk et al., 2010) that stall the Xrn1 exoribonuclease in the vicinity of a stem-loop leading to RNA release (Chapman et al., 2014b, Moon et al., 2012, Pijlman et al., 2008, Poole and Stevens, 1997). This sfRNA enhances viral pathogenicity (Pijlman et al., 2008) and inhibits the RNA silencing machinery (Schnettler et al., 2012). In plants, red clover necrotic mosaic virus also uses Xrn stalling to produce SR1f, a ncRNA species that influences the translation of both viral and cellular RNAs. In SR1f, a 58 nt sequence is required to protect the RNA from 5'-to-3' degradation (Iwakawa et al., 2008).

Animal, insect and yeast Xrn1 homologs are cytoplasmic enzymes implicated in mRNA decay pathways that ensure proper homeostasis and cell growth. These enzymes have a 5'-to-

3' exoribonuclease activity and target 5'-monophosphorylated RNAs released after cleavage or Dcp2 decapping action (Adjibade and Mazroui, 2014, Houseley and Tollervey, 2009). In plant cells, whereas mRNA decay involves Dcp2 decapping, 5'-to-3' processing requires the exoribonuclease XRN4, a yeast Xrn2 ortholog with a cytoplasmic localization and Xrn1-like function (Chiba and Green, 2009). XRN4 activity has been implicated in plant defense against viruses because its over-expression was associated with an increase in viral RNA degradation in *N. benthamiana* (Cheng et al., 2007). Furthermore, silencing of *N. benthamiana* XRN4 enhances viral accumulation in local infections of tobacco mosaic virus (TMV) and accelerates its systemic movement in the plant (Peng et al., 2011).

BNYVV belongs to the *Benyviridae* family and is the type member of the *Benyvirus* genus (Gilmer and Ratti, 2012). BNYVV is transmitted by the soil-borne protozoa *Polymyxa betae* and causes the sugar beet Rhizomania disease. The BNYVV genome is composed of 4 to 5 linear, positive-sense, single-stranded, capped and polyadenylated RNAs. BNYVV-RNA1 and RNA2 are necessary and sufficient for viral replication in rub-inoculated laboratory host plants. RNA1 encodes the protein required for replication, while RNA2 ensures the expression of proteins needed for packaging, cell-to-cell movement and RNA silencing suppression. Besides its function as a viral suppressor of RNA silencing (VSR), the p14 protein is also required for the systemic spread of the virus (Chiba et al., 2013). Smaller viral genomic RNAs are required for the natural infection of *Beta* species and for transmission of the virus but are dispensable for laboratory host mechanical infection. BNYVV-RNA3 influences symptom expression in plants (Jupin et al., 1992, Peltier et al., 2011) and is essential for viral long distance movement in *Beta* species. The systemic infection of *B. macrocarpa* absolutely requires a 20 nt long "coremin" sequence that is embedded in the RNA3 'core' region (Lauber et al., 1998). "Coremin" is also observed in BNYVV-RNA5, in beet soil borne mosaic virus small genomic RNAs, in the unrelated Scaevola virus A and in

cucumber mosaic virus subgroup-II genomes without any other obvious sequence conservation (Peltier et al., 2012, Ratti et al., 2009). Our previous studies demonstrated the presence of a subgenomic RNA3 of noncoding nature (ncRNA3) produced via the processing of positive-sense BNYVV-RNA3 by a nuclease activity rather than by the viral polymerase (Peltier et al., 2012). Mutagenesis of the “coremin” motif prevents ncRNA3 accumulation, both during viral infection and in other systems that reconstitute RNA3 expression (ibid). Therefore, ncRNA3 accumulation appears to be the result of a cellular nuclease activity that is conserved in both monocots and dicots. The enzyme responsible for ncRNA3 production was not identified to date and the overall effect of ncRNA3 accumulation on the BNYVV life cycle has yet to be thoroughly investigated.

Here, we use genetic approaches in *Saccharomyces cerevisiae* to show that ncRNA3 production can be achieved by the action of either the yeast exoribonuclease Xrn1 or plant XRN4. Using recombinant Xrn1 protein, we demonstrate that the “coremin” motif extended by ~54 nt of RNA3 is resistant to the enzyme’s exonuclease activity, as is the sfRNA structural motif. This resistance is sufficient to ensure ncRNA3 accumulation *in vitro*. In the context of viral infection, replacement of the ‘core’ domain with an sfRNA-related sequence disrupts systemic spread of the virus, suggesting that the original “coremin” sequence is absolutely required for viral systemic movement in *B. macrocarpa*.

Results

Expression of BNYVV-RNA3 in yeast leads to ncRNA3 accumulation.

We previously showed that cellular proteins (nucleases) were implicated in BNYVV-RNA3 processing leading to ncRNA3 accumulation in a heterologous, non-viral wheat germ extract system (Peltier et al., 2012). To further explore ncRNA3 biogenesis, *Saccharomyces cerevisiae* FY4 strains were transformed with plasmid constructions expressing either the wt

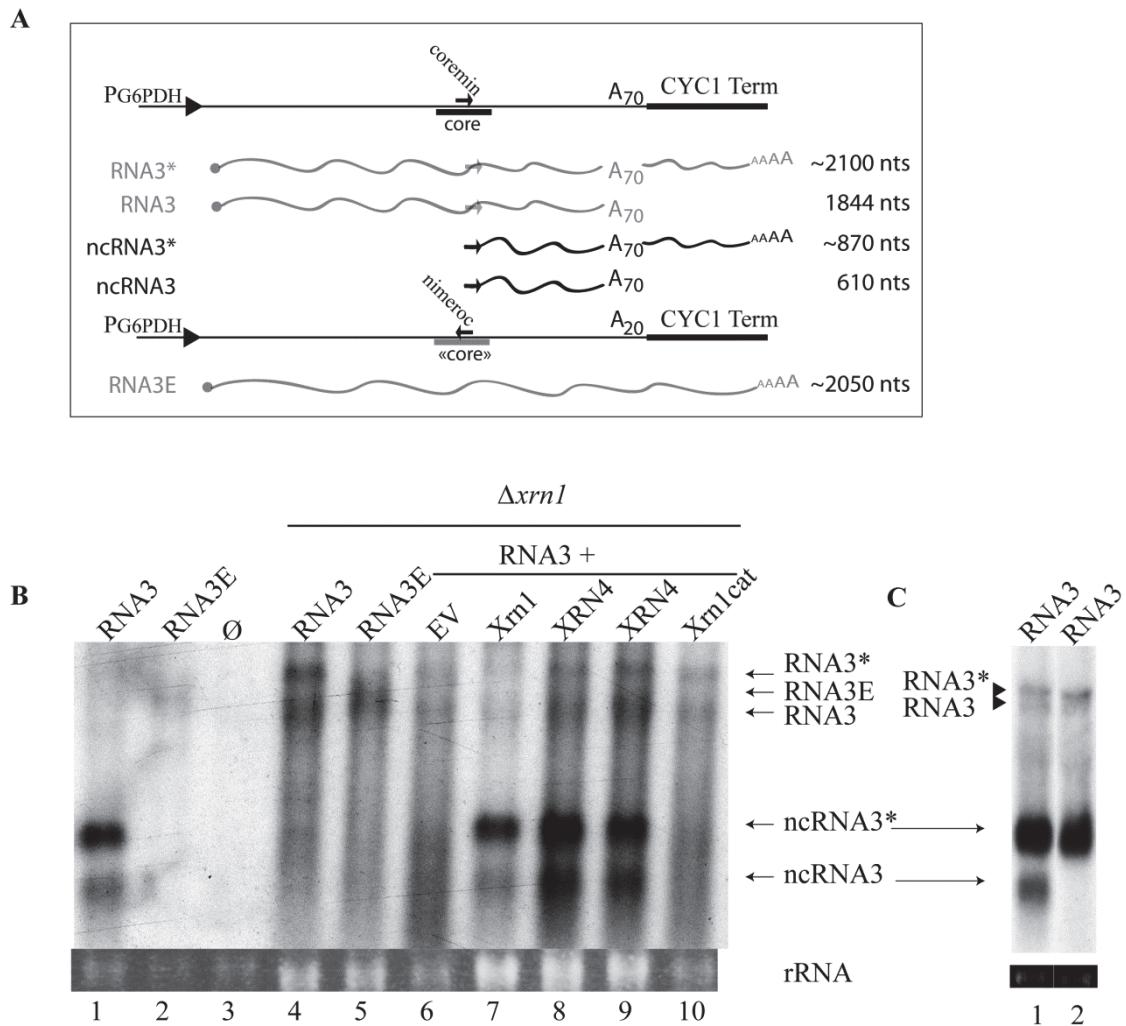


Fig 1. Exoribonucleases are responsible for noncoding RNA3 species accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Representation of the expression vector cassettes (solid lines) used to produce RNA3 and RNA3E species under the control of constitutive G6PDH promoter (black arrowhead). Capped (•) full-length RNAs and ncRNA species are depicted by waved grey and black lines, respectively. Wt 'core' sequence is presented in dark and mutated "core" in grey bold lines. The "coremin" motif and its antisense orientation, "nimeroc", are depicted by black sense and antisense arrows, respectively. RNA sizes are presented on the right. (B) Vectors producing wt RNA3, mutated RNA3E or control vector (Ø) were introduced in *S. cerevisiae* (lanes 1-3) or Xrn1 defective strain ($\Delta xrn1$) (lanes 4-5). Expression of RNA3 (lanes 6-10) was performed in $\Delta xrn1$ strain together with an empty vector (EV, lane 6), or vectors expressing: yeast Xrn1 (lane 7), plant ATXRN4 (XRN4, lanes 8 and 9) or a defective Xrn1 enzyme (Xrn1cat, lane 10). (C) Total RNAs from yeast expressing RNA3 were differentially visualized using two probes (lanes 1 and 2). RNA3, RNA3*, ncRNA3 and ncRNA3* were revealed with a coremin-specific probe (lane 1) while RNA3* and ncRNA3* appeared only when the CYC1 terminator-specific probe was used (lane 2). Black triangles indicate the two full-length RNA3 species. Total RNAs were subjected to northern blot analysis using BNYVV-specific 3' RNA3 probe. Loading was visualized by ethidium-bromide staining (rRNA).

106 RNA3 or RNA3E, a mutated form of RNA3 (Fig 1A) in which the “coremin” motif was
107 switched into its antisense orientation, namely “nimeroc”. Due to construction constraints, the
108 polyA tail of RNA3E was reduced to 20 nt (Fig 1A). The p426GPD vector (Ø) was used as a
109 control. Yeast total RNAs were extracted and analyzed by northern blot using a probe
110 complementary to the 3’ conserved RNA3 (Fig 1B). In the wild-type FY4 strain, full-length
111 species of RNA3 and RNA3E were hardly visible (Figs 1B and 2B, lanes 1, 2) and ncRNA3
112 accumulation was only observed in the strain expressing RNA3 (Figs 1B and 2B, lane 1).
113 This experiment suggested that RNA3 species were degraded in yeast and that the RNA3
114 “coremin” motif was able to prevent its degradation while the “nimeroc” sequence could not,
115 as observed previously in wheat germ extracts (Peltier et al., 2012). Surprisingly, when RNA3
116 was expressed, two ncRNA3 species appeared: one species of the expected size (ncRNA3)
117 and another extended species (ncRNA3*) (Fig 1A, 1B lanes 1, 7-9). We performed 5’ RACE
118 (data not shown) and found that both ncRNA3 species had the same 5’ extremity that is *sensu*
119 *stricto* identical to ncRNA3 produced in during viral infection (Peltier et al., 2012). We
120 concluded that full-length RNA3 was expressed as two species differing in their 3’ termini
121 (see below). Northern blots were performed on total RNA extracted from the strain FY4
122 expressing RNA3, using radiolabelled oligonucleotides either complementary to the
123 “coremin” sequence (Fig 1C, lane 1), or complementary to the *CYC1* terminator sequence
124 (Fig 1C, lane 2). Both ncRNA3 species were detected with the “coremin” specific probe while
125 only the larger ncRNA (ncRNA3*) was detected with a probe complementary to the *CYC1*
126 terminator sequence, indicating that these two ncRNA3 species indeed differed at their 3’
127 termini, as depicted in Fig 1A. Full-length RNA3 (depicted in Fig 1A) was also observed with
128 these two probes, appearing as two species when detected with the viral antisense probe
129 (black triangles, Fig 1C, lane 1) and as one species when detected with the viral terminator
130 probe (Fig 1C, lane 2), respectively, due to two possible transcription termination sites.

5'→3' exoribonuclease activity is responsible of ncRNA3 accumulation in yeast.

Because the *S. cerevisiae* cellular machinery recapitulates accumulation of ncRNA3 observed *in planta*, we screened a collection of viable nuclease mutants to identify gene products responsible for RNA3 processing. Four strains were selected, FY4 Δ *rnh1*, Δ *rrp6*, Δ *rex3* and Δ *xrn1*, and then transformed with the RNA3 construct. Rnh1 is a nuclease protein implicated in RNA degradation from RNA-DNA duplexes (Balk et al., 2013). Rex3 is a 3'-to-5' exoribonuclease involved in the maturation of the RNase MRP complex (van Hoof et al., 2000). Rrp6 is a 3'-to-5' exoribonuclease that belongs to the exosome complex, implicated in 3'-end maturation of stable RNAs and in the degradation of transiently expressed non-coding RNAs (Feigenbutz et al., 2013). Xrn1 was described above (Adjibade and Mazroui, 2014, Houseley and Tollervey, 2009). Total RNA from transformed yeast strains was assayed by northern blotting to detect RNA3 (data not shown). Only FY4 Δ *xrn1* accumulated full-length RNA3 and RNA3E (Fig 1B, lanes 4 and 5) and traces of ncRNA3 species (Fig 1B, lanes 4, 6). These traces of ncRNA3, also detected by 5' RACE (data not shown), probably originated from the nuclear exonuclease activity of Xrn2 (*RAT1* gene product) on nuclear primary transcripts. Unfortunately, the Δ *xrn2* mutant is not available and the double Δ *xrn1*- Δ *xrn2* mutant is not viable and could thus not be tested (Kenna et al., 1993). We then performed complementation assays in Δ *xrn1* yeast strains by co-transforming them with plasmids expressing wt or mutated yeast Xrn1 (Xrn1 or Xrn1cat respectively (Sinturel et al., 2012)), *A. thaliana* XRN4, or an empty vector as control (EV). In the presence of an empty vector, only traces of ncRNA3 species were detected (Fig 1B lane 6). ncRNA3 accumulation was restored when functional Xrn1 or XRN4 was provided *in trans* (Fig 1B, lanes 7, 8 and 9) but not when a non-functional exoribonuclease, Xrn1cat, was used (Fig 1B, lane 10).

Taken together, these results demonstrate that ectopic expression of yeast Xrn1 or plant XRN4 can functionally complement 5'-to-3' processing of RNA3, leading to ncRNA3

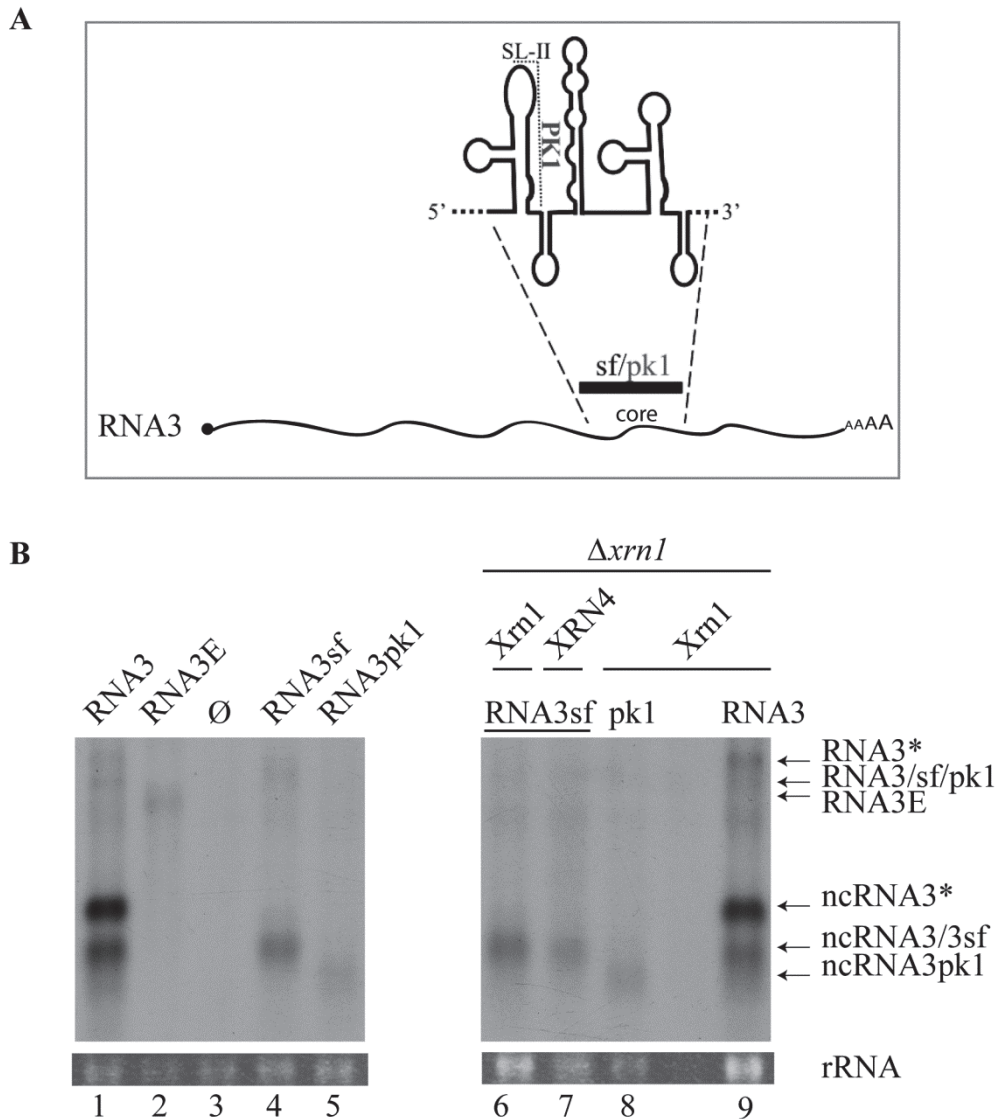


Fig 2. Accumulation of noncoding RNA3sf from chimeric RNA3sf inhibits Xrn1 and ATXRN4 exoribonucleases in *Saccharomyces cerevisiae*. (A) The 'core' sequence was replaced by wt (sf) or mutated (pk1) flavivirus sequence to produce RNA3sf and RNA3pk1, respectively. PK1 pseudoknot involving stem-loop II (SL-II) is shown. (B) Plasmids allowing the expression of RNA species indicated RNA3, RNA3E, RNA3sf, RNA3pk1 or empty vector (Ø) were introduced in wt yeasts (lanes 1-5) or Xrn1-defective yeasts ($\Delta xrn1$, lanes 6-9) complemented with a vector allowing the production of yeast Xrn1 (lanes 6, 8 and 9) or plant XRN4 (lane 7). The RNA3* and ncRNA3* are similar to RNA3 and ncRNA3, respectively, but possess *CYC1* terminator sequence followed by a polyA tail (see Fig 1 and text for details). Positions of the RNA species are indicated on the right. Loading was visualized by ethidium-bromide staining (rRNA). No sample was loaded between lanes 8 and 9.

accumulation *in vivo*. The 5' extremity of ncRNA3 species produced by XRN4 complementation in yeast was found to be identical to those characterized *in planta*, in wild-type FY4 or in Xrn1-complemented yeast strains (data not shown). Similar experiments were performed with the yeast strain W303-1A and with the mutants $\Delta dcp2$, $\Delta xrn1$ and $\Delta dcp2\Delta xrn1$ in that strain (Harigaya and Parker, 2012). Only wild-type W303-1A was able to produce ncRNA3, while all the mutants accumulated only RNA3/3E species, indicating the essential role of Dcp2 prior to Xrn1-dependent processing (data not shown).

Substitution of the BNYVV-RNA3 core sequence by the Xrn1-resistant West Nile virus core sequence produces a new ncRNA3 in *S. cerevisiae* strains expressing Xrn1 or *Arabidopsis thaliana* XRN4.

West Nile virus (WNV, Flavivirus) produces the sfRNA species that causes Xrn1 to stall during genomic RNA degradation. Such sfRNA species promote pathogenesis due to their complex secondary folding structure (Moon et al., 2012, Pijlman et al., 2008, Poole and Stevens, 1997). The sfRNA 5' proximal hairpin structure (SL-II) is involved in the formation of the PK1 pseudoknot, which is abolished by three SL-II nucleotide substitutions in pk1 mutant (Funk et al., 2010). Such substitutions prevent the accumulation of sfRNA and lead to the accumulation of a distinct ncRNAs corresponding to sfRNA2 (Funk et al., 2010). Because the BNYVV-RNA3 'core' sequence and, particularly, the "coremin" motif was shown to be implicated in ncRNA3 stabilization (Peltier et al., 2012), we decided to produce a viral chimeric RNA3 in which the entire 'core' sequence was replaced by 307 nt from Kunjin virus sequence (nt 10422 to 10728 from accession number AY274505) or its pk1-mutated version, to create RNA3sf and RNA3pk1, respectively (Fig 2A). These two chimeras were used to perform a comparative and translational approach with previously published data. Chimeric RNAs (RNA3sf, RNA3pk1), RNA3 and RNA3E had similar viral sequence sizes and were expressed in *S. cerevisiae* FY4 strain (Fig 2B, left) and in the FY4 $\Delta xrn1$ mutant

complemented with *Xrn* genes (Fig 2B, right). It is worth noting that RNA3 possessed a ~70 polyA sequence preceding the terminator sequence while, like RNA3E (Fig 1A), chimeric RNA3sf/pk1 had only 20 A residues due to synthetic construct constraints. As expected, northern blot analyses revealed the accumulation of ncRNA3 when RNA3 was expressed (Fig 2B, lane 1) and not when RNA3E was produced, or when an empty vector was used (Fig 2B, lanes 2 and 3). Expression of RNA3sf resulted in the accumulation of a new ncRNA species together with a faint detection of full-length RNA3 species (Fig 2B, lane 4). 5' RACE analysis of ncRNA3sf identified the sequence 5'-**GGAAGUCAGGCCGGAAA**...3' that corresponds to the 5' terminus of sfRNA species extended by three upstream viral residues (bolded) as compared to the published sfRNA 5' extremity, determined previously by primer extension (Pijlman et al., 2008). Expression of RNA3pk1 resulted in a faint detection of the full-length RNA and the accumulation of a shorter ncRNA species (Fig 2B, lane 5) with a size consistent with the one described by Funk and colleagues (Funk et al., 2010). The ncRNA3pk1 5' extremity has not been characterized in this study. RNA3 and RNA3sf constructs were introduced in FY4Δ*xrn1*, together with vectors expressing Xrn1 (Fig 2B, lanes 9 and 6, respectively) or XRN4 (Fig 2B, lane 7). FY4Δ*xrn1* expressing the RNA3sf construct could not be obtained, probably due to the inhibition of Xrn2. The RNA3pk1 construct was introduced only in FY4Δ*xrn1* complemented with the Xrn1 producing vector (Fig 2B, lane 8). The expected ncRNA species were detected in FY4Δ*xrn1* complemented either with Xrn1 or XRN4 (Fig 2B, lanes 6 and 7), suggesting that the action of sfRNA on yeast Xrn1 (Pijlman et al., 2008) occurs similarly on plant XRN4 expressed in yeast.

Xrn1 produces ncRNA3 *in vitro*.

We confirmed Xrn1 function in ncRNA production using *in vitro* transcripts and purified enzymes, adapting a biochemical assay described for flaviviruses (Chapman et al., 2014a, Chapman et al., 2014b). Full-length (Fig 3A, RNA3sf and RNA3pk1) or truncated (the first

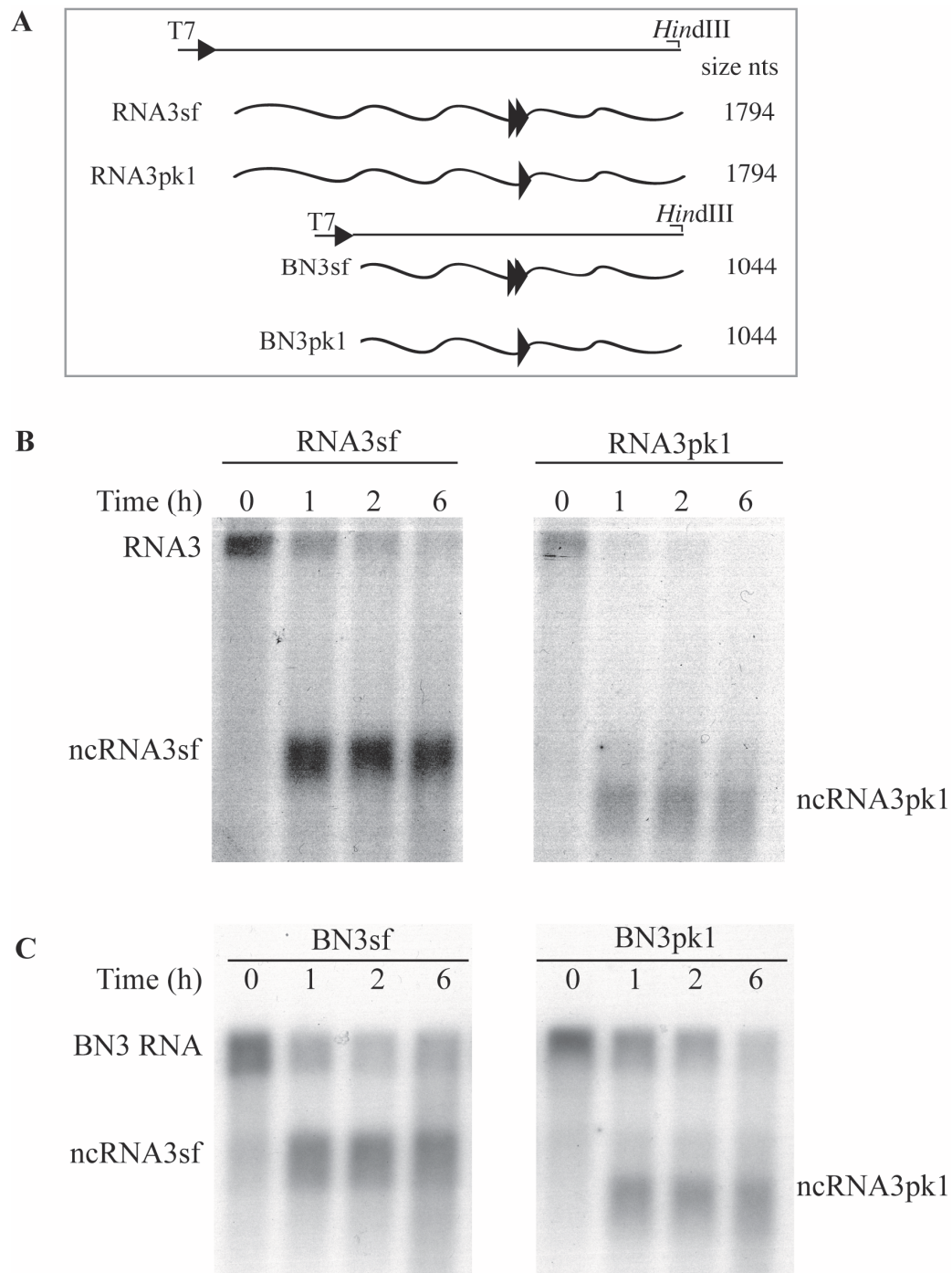


Fig 3. Both ncRNA3sf and ncRNA3pk1 stall Xrn1 processing *in vitro*. (A) Schematic representation of the T7 driven cDNA clones constructs used to produce run-off *in vitro* transcripts depicted in waved lines. Double and single arrowheads correspond to the sf and pk1 structural motifs, respectively. The position of the restriction sites used and the size of the transcripts are indicated. (B) 5' phosphorylated chimeric RNA3sf or RNA3pk1 and (C) BN3sf or BN3pk1 species were mixed with commercial Xrn1 enzyme for 6 h. Aliquots were sampled at the time indicated and RNAs species were detected by northern blot using a specific DNA probe able to reveal both full-length and ncRNA3 species.

206 750 nts 5' extremity) chimeric transcripts (Fig 3A, BN3sf and BN3pk1) were treated with
207 pyrophosphatase and subjected to Xrn1 degradation. In our hands, the use of a commercial
208 Xrn1 enzyme set the reaction time from 0 to 6 h (Fig 3B and 3C).

209 Using chimeric sfRNA substrates (full-length RNA3sf and truncated BN3sf species), we
210 reproduced the accumulation of ncRNA species of expected size (Fig 3B and 3C left panels),
211 which was able to block Xrn1 degradation of full-length RNA species as described (Moon et
212 al., 2012), 2 hours (h) post-treatment. As observed in the yeast experiments above, Xrn1
213 action on the pk1-mutated sfRNA produced a reduced sized ncRNA3pk1 (Fig 3B and 3C,
214 right panels), consistent with previous reports (Funk et al., 2010, Moon et al., 2012). In our
215 hands, the inhibitory effect of ncRNA3pk1 species appeared to be less efficient compared
216 with wt, as the amounts of full-length RNA and ncRNA3pk1 species decreased over time
217 (Fig 3B and 3C, compare left and right panels). These results also indicate that the first 750 nt
218 of RNA3 have no effect on ncRNA production.

219 Having reproduced the *in vitro* accumulation of ncRNAs from chimeric RNA3sf/pk1, we
220 applied the same approach to RNA3 and RNA3E species. We used transcripts lacking the 3'
221 conserved sequence to eliminate the influence of different polyA lengths (Fig 4A). Following
222 a previously described method (Chapman et al., 2014a, Chapman et al., 2014b), RNA3 or
223 RNA3E transcripts were incubated with a mixture of RppH pyrophosphatase and Xrn1 for
224 time course studies (Fig 4B lanes a-c and 4C lanes a'-c', respectively). After 6 h, RNA3E was
225 added (+ RNA3E) in RNA3 and RNA3E reaction tubes and incubated for another 6 h (Fig 4B
226 lanes d-f and 4C lanes d'-f', d-f). In a parallel experiment, RNA3 and RNA3E were mixed
227 and incubated with RppH and Xrn1 for up to 6 h (Fig 4B and 4C lanes g-i). At the time
228 indicated, aliquots of reactions were stopped and analyzed by northern blot to detect RNA3
229 (Fig 4B) and RNA3E (Fig 4C) using specific radiolabelled oligonucleotide probes. Such
230 probes were able to discriminate between RNA3 and RNA3E as evidenced by full-length *in*

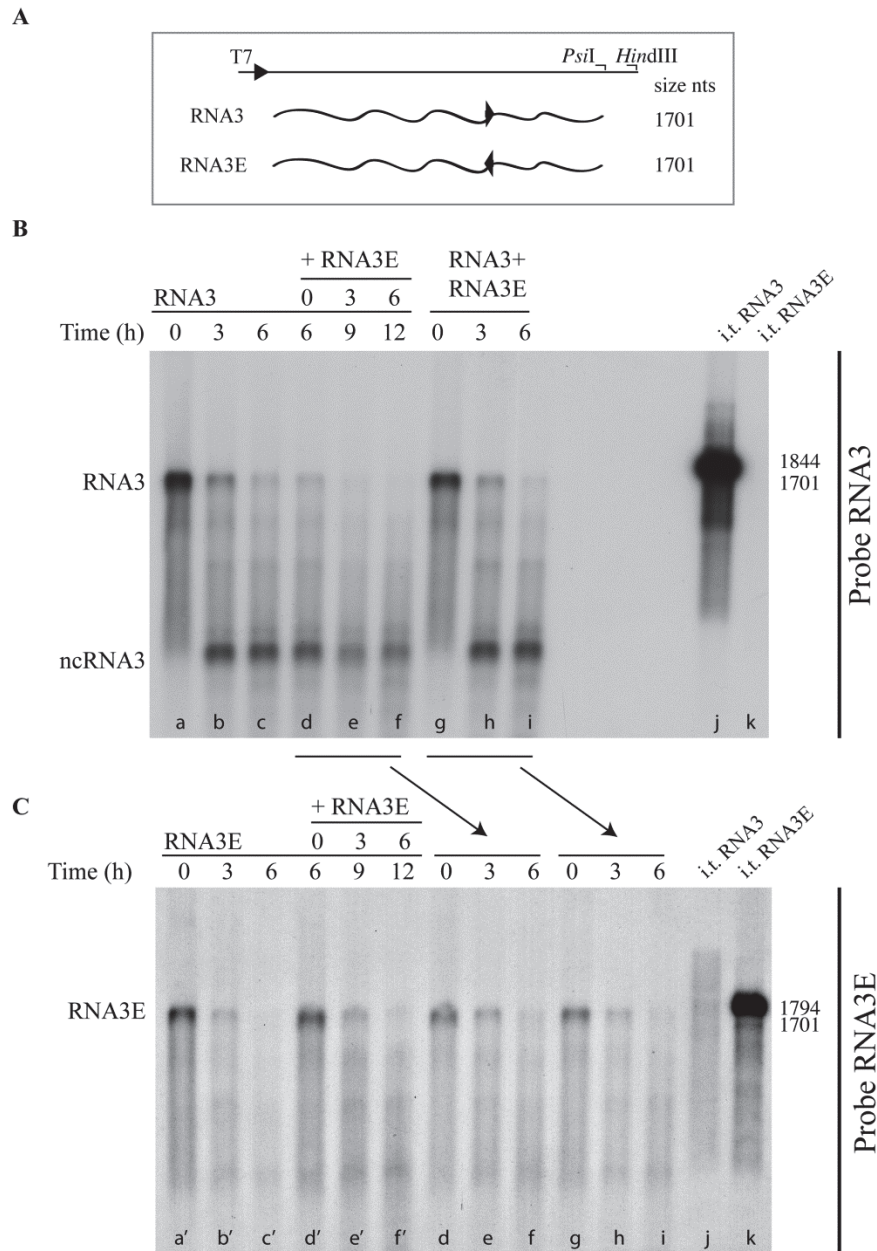


Fig 4. Noncoding RNA3 stalls Xrn1 processing *in vitro*. (A) Schematic representation of the T7 driven cDNA clones constructs used to produce run-off *in vitro* transcripts (i.t.) depicted by waved lines. The position of the *PsiI* restriction site used and the size of the transcripts are indicated. Arrowheads represent the “coremin” sequence in its sense (RNA3) or antisense (RNA3E) orientation. (B) RNA3 or (C) RNA3E mutant was incubated with commercial RppH pyrophosphatase and with Xrn1 enzyme for the time indicated (a-c and a'-c'). After 6 h RNA3E was added (+ RNA3E) in RNA3 (d-f) and RNA3E (d'-f') reaction tubes then the kinetic was followed for another 6 h as indicated. RNA3 and RNA3E were mixed and incubated with RppH and Xrn1 for the time specified (g-i). Reactions were stopped at time indicated and RNAs species were detected by northern blot using RNA3 or RNA3E specific oligonucleotide probes to reveal RNA3 and ncRNA3 species (panel B) or RNA3E (panel C) as exemplified by the detection of *HindIII* run-off transcripts of full-length species (compare i.t. RNA3, lane j; i.t. RNA3E, lane k, panels B and C).

231 *vitro* transcripts loaded as controls (Fig 4B and 4C lanes j and k). Xrn1 nuclease assays
232 performed on RNA3E resulted in a progressive, 90% reduction of the full-length species after
233 6 h without ncRNA accumulation (Fig 4C, lanes a'-c'). Conversely, the experiment
234 performed on RNA3 diminished the amount of full-length species by 80% that was still
235 visible after 12 h with an estimation of 5% RNA3 remaining. ncRNA3 appeared during the
236 first 3 h and its accumulation was slightly stabilized over the 12 hour incubation time,
237 suggesting that the nuclease was still able to process it (Fig 4B, lanes b-f). As both RNA
238 species possess the same sequence except the internal 20 nt, we concluded that the "coremin"
239 motif participates in a yet unknown ternary structure that stabilizes and prevents the rapid
240 degradation of ncRNA3 species by the exoribonuclease.

241 Next, we tested whether ncRNA3 was able to block the action of Xrn1 *in trans*, as was
242 previously shown for flavivirus sfRNAs (Moon et al., 2012). In our hands, Xrn1 did not
243 process GFP or Luciferase control mRNAs efficiently, probably due to the high GC content
244 of their leaders (data not shown). We thus choose RNA3E species as a reporter, because it
245 was almost completely processed by the nuclease (Fig 4C, lane c'). In a first experiment, we
246 added the RNA3E substrate to the reaction tube where ncRNA3 accumulated for 6 h (Fig 4B,
247 lanes d-f) or renewed the substrate in RNA3E reaction tube (Fig 4C, lanes d'-f') and followed
248 the reaction for another 6 h. Renewal of RNA3E led to similar degradation kinetics (Fig 4C,
249 lanes d'-f'). On the contrary, when RNA3E substrate was added to the reaction in which
250 ncRNA3 accumulated, the degradation rate was reduced and 30% of RNA3E species was
251 detected instead of the 10% residual when incubated alone (Fig 4C, lanes c' and f). In a
252 second experiment, we combined RNA3 and RNA3E substrates within the same reaction and
253 followed their processing by Xrn1 for 6 h (Fig 4B and C, lanes g-i). RNA3 processing led to
254 the accumulation of ncRNA in amounts comparable to before (Fig 4B, compare lanes h, i to
255 lanes b, c) and the residual RNA3E full-length species was estimated at 35%. These two

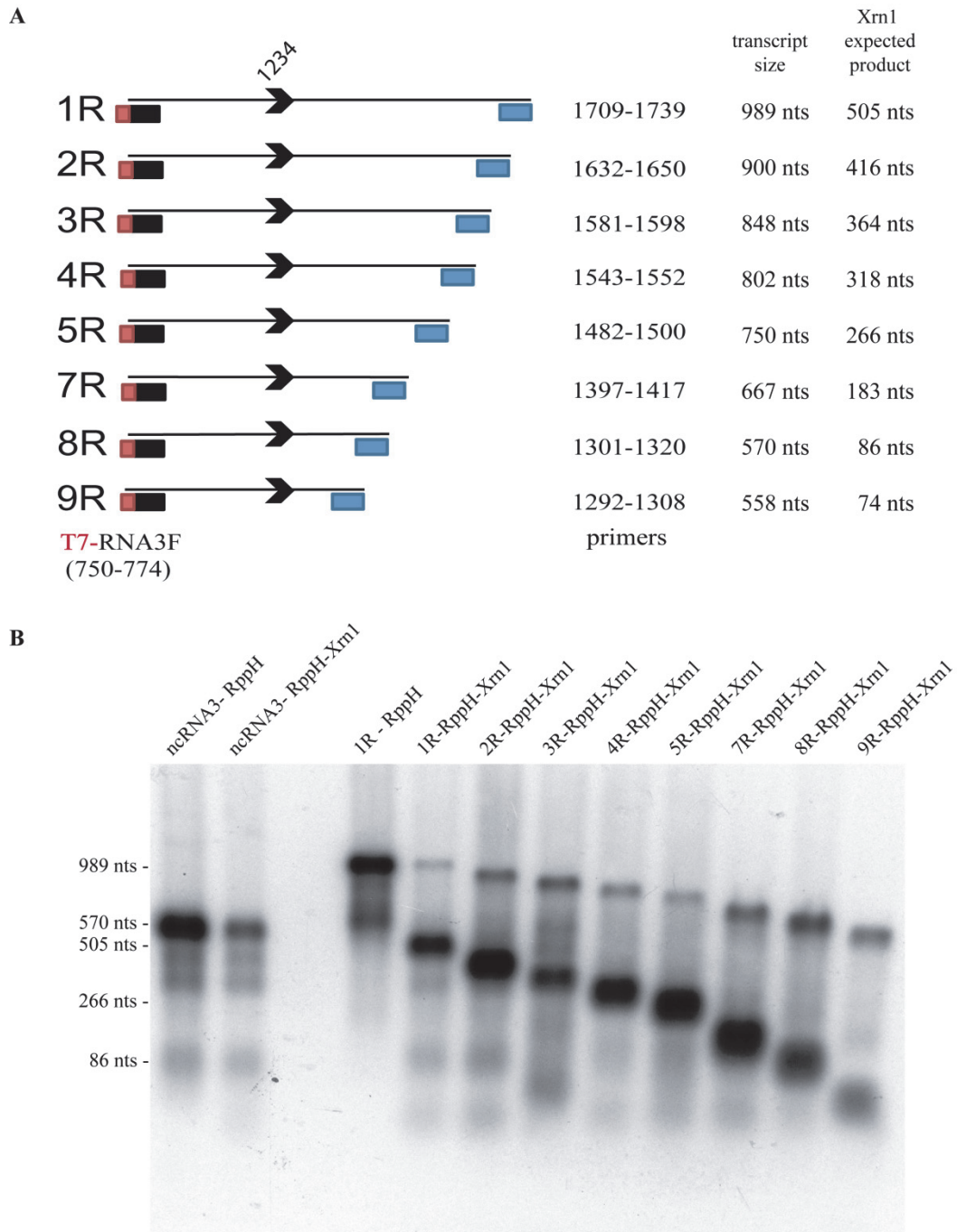


Fig 5. Characterization of the minimal RNA3 3' domain required for the efficient stalling of the Xrn1 enzyme. (A) Representation of the fragments obtained using T7 promoter containing primer (T7-RNA3F) and reverse primers (positions specified by blue boxes) cloned into pUC57 that served as templates for the production of 1R to 9R transcripts, ranging from 989 to 558 nt, possessing the same 5' extremity with decreasing 3' end length. The arrowhead locates the 5' position of the ncRNA3 species (nt 1234). The expected product size after RppH and Xrn1 treatments is specified. Construct 6R was not obtained. (B) After 6 h of RppH/Xrn1 treatment, RNAs were analyzed by northern blot using a radiolabelled oligodesoxyribonucleotide probe complementary to the "coremin" sequence. The ncRNA3 transcripts and 1R transcripts were treated with RppH alone or with RppH and Xrn1. The lengths of some RNA species are specified on the left side.

experiments suggested that ncRNA3 accumulation reduced the activity of Xrn1 *in vitro*, however with a lower efficiency compared to published data on siRNA (Moon et al., 2012).

A 74 nt region is sufficient for Xrn1 stalling

Next, we tested the minimal sequence required for ncRNA accumulation. For this purpose, *in vitro* transcripts possessing 3' shortened ends were produced from plasmid 1R to 9R (Fig 5A). *In vitro* transcripts possessing identical 5' BNYVV-RNA3 sequence starting position 750 and shortened 3' extremities downstream of the "coremin" motif were produced. *In vitro* transcripts together with the one corresponding to ncRNA3 (produced from pUCT7sgWt) were tested in the following Xrn1 resistance assay. RNAs were treated with RppH alone or with RppH supplemented with Xrn1 enzyme. After 6 h of treatment, residual substrates and ncRNAs products were detected by northern blot using a radiolabelled oligonucleotide complementary to the "coremin" sequence (Fig 5B). Unprocessed substrates and ncRNA species of expected sizes were detected for constructs 1R to 8R. Substrate 9R led to the production of a ncRNA product that migrated faster than expected, probably due to a particular folding of the ncRNA species that was still detected with the probe. Interestingly, this 74 nt long ncRNA species was still able to stall the Xrn1 enzyme, as full-length substrate did not completely disappear from the reaction. Therefore, we concluded that the minimal size expected to block RNA3 Xrn1-mediated degradation is comprised of these 74 nt.

Exoribonuclease stalling is not sufficient to induce the systemic spread of the BNYVV in *Beta macrocarpa*.

Because ncRNA3 and ncRNA3sf are produced in a similar way *in vivo* and *in vitro*, we wanted to pursue a translational approach and test whether the production of ncRNA3sf could support the long distance movement of BNYVV in *B. macrocarpa*. Thus, we inoculated *B. macrocarpa* leaves with a helper strain composed of RNA1 and 2 to ensure replication,

Table 1. Effect of the RNA3 derived species on the long distance movement of BNYVV in *B. macrocarpa*.

Plants were inoculated with BNYVV-RNA 1+2 alone or supplemented with RNA3, RNA3E, RNA3sf or RNA3pk1. Viral RNAs detection on systemic leaves was performed 21 days post inoculation. Percentage of plants infected systemically (total infected plants); NT, not tested.

†: In previous experiments, plants showed systemic symptoms that were due to an RNA3 contamination of unknown origin.

Combinations	1st experiment	2nd experiment
RNA1+2	0% (5)	0% (5)
RNA1+2+3	70% (10)	90% (10)
RNA1+2+3E	0% (10)	NT
RNA1+2+3sf [†]	0% (10)	0% (10)
RNA1+2+3pk1	0% (10)	0% (10)

encapsidation, cell-to-cell movement and suppression of post-transcriptional gene silencing functions (Chiba et al., 2013, Peltier et al., 2008) alone, or together with RNA3 or RNA3E as described (Chiba et al., 2013), or with the chimeras RNA3sf or RNA3pk1 *in vitro* transcripts. Inoculated leaves displayed local symptoms 7 days post-inoculation (dpi) and after 21 days, systemic infection was only observed in the presence of wt RNA3 (data not shown). No systemic infection was observed, nor detected by northern blotting, for plants inoculated with the helper strain lacking the wt RNA3 species or supplemented with RNA3E, RNA3sf or RNA3pk1 transcripts (Table 1).

Northern blot analyses performed on infected *B. macrocarpa* inoculated leaves (data not shown) were similar to those presented for *C. quinoa* leaves or protoplasts (Fig 6) and revealed the absence of RNA3sf accumulation. Therefore, we were able to attribute such accumulation deficiency to the absence of the chimera's replication, probably due to the highly structured sfRNA domain. However, when RNA3pk1 transcripts were inoculated together with genomic RNA1 and 2, RNA3pk1 species were able to accumulate in the infected leaves, but in ~10 times lower amounts than for the wt RNA3 inoculations. The production of ncRNA3pk1 species was not detected in the infected tissues or in protoplasts (Fig 6), suggesting its degradation *in planta* by an unknown process. Therefore, this approach did not allow us to draw conclusions about the direct implication of exoribonucleases in the efficient systemic movement of BNYVV.

Discussion

Viral long distance movement within the *B. macrocarpa* host requires a *cis*-active RNA sequence named 'core' and is not based on RNA3 viral expression (Lauber et al., 1998). Long distance movement of BNYVV lacking a RNA3 species was successfully restored with BSBMV-RNA3 (Ratti et al., 2009) and led to the identification of the "coremin", a 20 nt sequence also found in the 3' UTR of other viral species (Peltier et al., 2012). The "coremin"

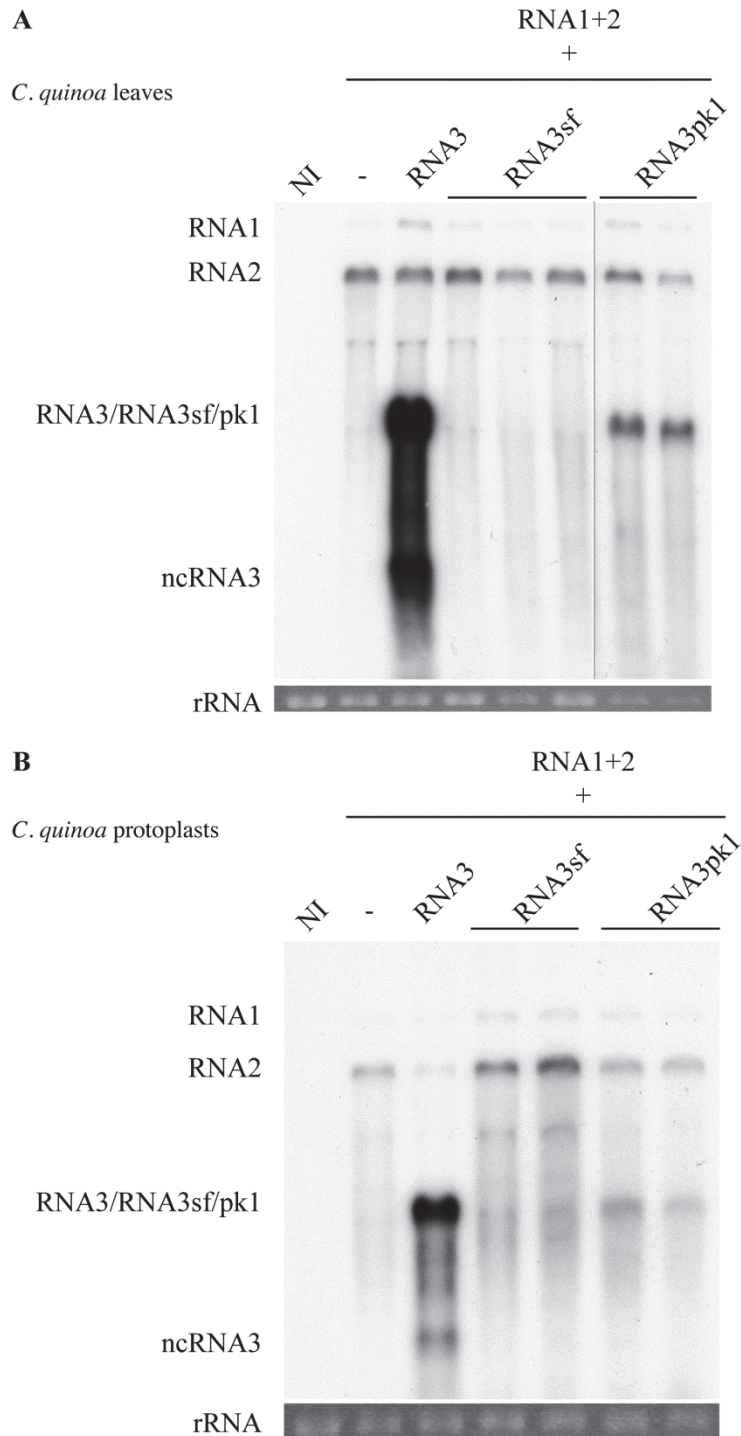


Fig 6. The BNYVV replication machinery is not able to replicate RNA3sf and poorly amplify RNA3pk1. *C. quinoa* leaves were rub-inoculated (**A**) or protoplasts electroporated (**B**) with RNA1+2 alone (-) or supplemented with RNA3, RNA3sf or RNA3pk1. (**A**) Local lesions RNA contents were analyzed 7 dpi by northern blot using BNYVV-RNA specific radiolabeled probes. RNA3pk1 loading was three times lower than the other samples; the membrane was exposed accordingly and visualized with a separation line. (**B**) Protoplasts contents were analyzed 40 hpi as for **A**. Loadings are visualized by ethidium-bromide staining of total RNAs (rRNA). NI, non-infected.

motif is responsible for both the stabilization of ncRNA3 after nuclease processing and the systemic infection of *B. macrocarpa* species. Indeed, mutations introduced within this motif prevented the accumulation of the ncRNA3 species and the viral systemic movement on *Beta* species (ibid).

The disruption of a host gene function either by genetic knockout (KO) and virus-induced gene silencing (VIGS) knock-down are well-described methods for functional validation of cellular pathways required in biological processes. KO mutants are easily obtained in *A. thaliana*, but unfortunately, this plant is not a host for BNYVV and not suitable to set up genetic screens of cellular factors involved in the benyvirus life cycle, whereas *B. macrocarpa* is far from being genetically characterized. The VIGS approach requires a systemic infection of the plant with a non-related virus that expresses a sequence of the gene to be knocked down and then to infect the plant with BNYVV. This situation allows one to draw conclusions on one gene's effect within a mixed infected host. Therefore, we expressed BNYVV-RNA3 in *S. cerevisiae*, outside the context of viral infection, and succeeded in detecting the processing of ncRNA3 to the same 5' terminus as found during viral infection or in other contexts (Peltier et al., 2012), indicating a comparable process involved in ncRNA production in yeast. This allowed us to identify the main actor in ncRNA3 production from ectopically expressed RNA3 or an RNA3 deleted from its 5' UTR. The yeast Xrn1 exoribonuclease was shown to be responsible for RNA3 processing as demonstrated by complementation experiments of *S. cerevisiae* $\Delta xrn1$ mutant strain efficiently complemented with plant XRN4 or yeast Xrn1 (Fig 1). Furthermore, the heterologous complementation assay with plant XRN4 let us draw a correlation between the results obtained in plants and in yeast because the "coremin" motif had the same effect on XRN4 in yeast.

Xrn1 stalling leads to flavivirus sfRNA production thanks to a ternary three-way junction structure (Chapman et al., 2014b, Poole and Stevens, 1997). We replaced the BNYVV-

RNA3-core sequence by the WNV sequence required for the flavivirus ncRNAs accumulation and reproduced the data published for this animal virus (Fig 2), with a slight difference within the 5' extremity of sfRNA that appeared extended by 3 nt in our hands as compared with previous primer extension analyses (Pijlman et al., 2008). Beyond reproducing previous data, we further showed that plant XRN4 is as well inhibited by flavivirus structures in yeast. We used *in vitro* degradation studies with purified Xrn1 and chimeric RNA3sf/BN3sf RNA substrates and reproduced the Xrn1 stalling (Fig 3). We applied a similar method (Moon et al., 2012) to demonstrate that ncRNA3, through its 20 nt “coremin” sequence, blocks *in vitro* RNA processing by Xrn1 leading to ncRNA3 accumulation. However, our data did not demonstrate a clear inhibitory effect of ncRNA3 on Xrn1, because ncRNA3 accumulation plateaued while full-length species continued to be processed (Fig 4). Our experiments demonstrated that while ncRNA3 production appears independent of the 5' sequence upstream of the “coremin” motif (Figs 3 and 5), the minimal length required for exoribonuclease stalling involves an RNA sequence included in a 74 nt domain that contains the “coremin” motif (Fig 5).

While RNA3sf failed to accumulate efficiently in inoculated protoplasts or plant leaves, the chimeric RNA3 species could not be used for gain-of-function experiments to allow the systemic spread of BNYVV on *B. macrocarpa*. Similarly, RNA3pk1 species was able to be replicated in the presence of the RNA1+2 helper strain, but accumulated about ten times less than wt (Fig 6). This RNA species was not able to produce the expected ncRNA3pk1 species detected in yeast and *in vitro* (Fig 2 and 3). This could be a reason why it could not functionally complement systemic viral movement (Table 1). However, RNA3 mutant species, harboring the “coremin” motif and replicating at low levels, still provide systemic movement in *Beta* species (e.g. t35ΔSSst in (Lauber et al., 1998)). Therefore, as pk1 RNA domain acts as RNA3 core domain toward XRN proteins in yeast, these domains are however

not interchangeable to allow viral systemic spread function. Moreover, considering the long-distance movement complementation provided by “coremin” containing BNYVV-RNA5 or BSBMV-RNA3, we suspect a direct role for the “coremin” motif. Further studies will focus on a possible recognition of the “coremin” motif by a key component of the viral long distance movement complex.

Concluding remarks

Our experiments demonstrate the role of the “coremin” sequence in 5’-to-3’ exoribonuclease viral RNA processing, which leads to an accumulation of ncRNA species and to long distance movement of the virus. BNYVV, similar to West Nile virus, tobacco mosaic virus or red clover mosaic virus, interfere with XRN to facilitate viral replication and to favor the infection (Iwakawa et al., 2008, Pijlman et al., 2008, Schnettler et al., 2012). This does not explain how other viruses, such as bamboo mosaic virus, take advantage of a functional XRN pathway to favor their accumulation (Lee et al., 2015). As mentioned above, no tool is yet available to set up genetic screens in *Beta* species or *N. benthamiana*. Moreover, *A. thaliana* is not a host for BNYVV; thus, conventional biochemical approaches will be needed for detailed studies on the intimate effect of the ncRNA3 effector on viral movement.

Materials and Methods

Plasmids

The *EcoRI* restriction site (position 377) of the full-length cDNA clone of BNYVV-RNA3 (pB35) was filled-in with Klenow fragment then self-ligated to produce pB36. pB36 served for site directed mutagenesis (Gilmer et al., 1992) to insert an *EcoRI* site at the 5’ terminus of the genome to produce pB37 infectious clone (unpublished). The resulting cDNA copy of RNA3 was then cloned into *EcoRI-HindIII* digested p426GPD vector to produce p426GPD37. Fragment from pB35E containing the mutated “coremin” sequence (Peltier et

al., 2012) was subcloned into p426GPD37 using *Bam*HI-*Hind*III restriction sites to create the p426GPD37E vector.

BN3sf cDNA clone and its BN3pk1 variant were obtained as synthetic genes products ordered at Genscript® (Piscataway, NJ, USA) and delivered into pUC57 between *Eco*RI and *Hind*III restriction sites. BN3 and 1R to 9R constructs contained an *Eco*RI and a T7 promoter sequence followed by the BNYVV-RNA3 3' end cDNA sequence starting from *Bam*HI (position 750) to *Hind*III (BN3, located after the poly A tail or 1R to 9R, between positions 1739 to 1308). BN3sf/pk1 differed from BN3 by the nt 1147-1477 replacement with nt 10422-10728 from flaviviral sequence (accession number AY274505). The vectors BN3sf and BN3pk1 served for a *Bam*HI-*Hind*III sequence switch with p426GPD37 and pB35 to produce p426GPD-RNA3sf/pk1 and pB35sf/pk1, respectively.

Yeast vectors pRS415 (empty backbone), pAJ152 (expressing Xrn1), pRDK307 (expressing a catalytic mutant of Xrn1) were provided by Pr. L. Benard (Sinturel et al., 2012). Yeast vector pAG423GPD-XRN4 expressing *A. thaliana* XRN4 (ATXRN4) was obtained by Gateway cloning between pDONR207 containing *A. thaliana* XRN4 gene (<http://www.addgene.org/vector-database/2393/>) and the destination vector pAG423GPD-ccdB HA (<https://www.addgene.org/14246/>), using LR Clonase™ enzyme mix (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations.

Yeast transformation

Yeast strains were cultured on YPD complete media and transformed using the method described by Gietz & Schiestl (Gietz and Schiestl, 2007). Transformed yeasts were selected onto appropriate synthetic media depleted with uracil, or uracil and histidine (pAG423GPD-XRN4). Yeast total RNAs were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendation.

***In vitro* transcription, plant infection, protein and RNA extractions**

In vitro production of ncRNA3 was from a pUC19 construct containing the ncRNA3 sequence (nt 1234 to 1774 followed by 15A) downstream of a T7 promoter. Amplicons allowing the synthesis of transcripts possessing 3' shortened ends were from T7 promoter-containing primer starting position 750 together with primers complementary to RNA3, ranging from position 1739 to 1308 (Fig 5). The linearized full-length BNYVV clones of RNA1 (pB15), RNA2 (pB21), RNA2 Δ p14 (pB2-3722), RNA2BA2 (pB2-BA2) (Chiba et al., 2013), RNA3 (pB35), RNA3E (pB35E) and the recombinants RNA3sf (pB35sf) or RNA3pk1 (pB35pk1) served for *in vitro* run-off transcription as described previously (Peltier et al., 2012, Quillet et al., 1989).

RNA1 and RNA2 transcripts supplemented or not with wt, mutated or chimeric RNA3 served for the mechanical infection of *C. quinoa*, *B. macrocarpa* or for the electroporation of *C. quinoa* protoplasts as described before (Guilley et al., 2009, Klein et al., 2007, Veidt et al., 1992). RNA extractions were performed from infected *C. quinoa* local lesions and protoplasts. RNAs were extracted using "Polysomes" buffer (Jupin et al., 1990) followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Pellets were treated with 3 M sodium acetate solution (pH5.5) to solubilize DNA and small RNAs. Remaining RNA pellet was washed with ethanol (70%) before dissolution in sterile water. RNAs were extracted from protoplasts after cell lysis in suspension buffer (Tris-HCl 50 mM, pH7.5, EDTA 1 mM, Macaloïde 0.05%, SDS 1%, NaCl 150 mM) followed by two extractions with phenol/chloroform and ethanol precipitation. Northern blot and 5'RACE experiments were performed as described previously (Peltier et al., 2012).

***In vitro* Xrn1 assays**

*Hind*III-linearized pB35sf, pB35pk1, BN3, BN3sf and BN3pk1 or *Psi*I-linearized pB35 and pB35E plasmids served to produce *in vitro* run-off transcripts without adding Cap analog (Quillet et al., 1989). The DNA templates were eliminated by a DNase treatment followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. For some experiments, RNAs were precipitated with lithium chloride (2M). 5' pyrophosphate was removed by a pyrophosphatase hydrolase treatment (RppH, New England BioLabs, Evry, France) for 1.5 h at 37°C according to the manufacturer's recommendations followed by phenol/chloroform extraction and ethanol purification. Recombinants RNA3 transcripts (40 ng), bearing 5'monophosphate, were incubated with 1 U of commercial Xrn1 (New England BioLabs, Evry, France) for 6 to 12 h at 37°C. At time indicated, aliquots of the reactions were stopped in 8 M urea solution (1:1) and RNAs were analyzed by northern blot. When indicated, purified transcripts (3 µg) were incubated simultaneously with commercial RppH (2 U) and Xrn1 (4 U) for 6 h at 37°C and 2.1 µg of RNA3E were added in the RNA3 and RNA3E containing reaction tubes. Kinetics was followed for 12 h. Parallel experiments were carried out with a mixture of wt RNA3 (3 µg) and RNA3E (3 µg) in the presence of 4 U of RppH and 8 U of Xrn1.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Joseph Schacherer (GMGM, Strasbourg), Dr. Roy Parker (Colorado) who provided yeast strains FY4, W303 and their mutants, respectively; Prof. Lionel Benard (Paris) for his kindness sending the plasmids used for Xrn1 expression; Dr. Frank Martin (IBMC, Strasbourg) for the p426GPD vector; Dr. Thomas Potuschak (IBMP, Strasbourg) for the XRN4 gene copy and Dr. Todd Blevins for his help in language editing.

449 **References**

- 450 ADJIBADE, P. & MAZROUI, R. 2014. Control of mRNA turnover: Implication of cytoplasmic RNA
451 granules. *Semin Cell Dev Biol*, 34C, 15-23.
- 452 BALK, B., MAICHER, A., DEES, M., KLERMUND, J., LUKE-GLASER, S., BENDER, K. &
453 LUKE, B. 2013. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and
454 senescence. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 1199-205.
- 455 CHAPMAN, E. G., COSTANTINO, D. A., RABE, J. L., MOON, S. L., WILUSZ, J., NIX, J. C. &
456 KIEFT, J. S. 2014a. The structural basis of pathogenic subgenomic flavivirus RNA (sfRNA)
457 production. *Science*, 344, 307-10.
- 458 CHAPMAN, E. G., MOON, S. L., WILUSZ, J. & KIEFT, J. S. 2014b. RNA structures that resist
459 degradation by Xrn1 produce a pathogenic Dengue virus RNA. *Elife*, 3, e01892.
- 460 CHENG, C. P., JAAG, H. M., JONCZYK, M., SERVIENE, E. & NAGY, P. D. 2007. Expression of
461 the Arabidopsis Xrn4p 5'-3' exoribonuclease facilitates degradation of tombusvirus RNA and
462 promotes rapid emergence of viral variants in plants. *Virology*, 368, 238-48.
- 463 CHIBA, S., HLEIBIEH, K., DELBIANCO, A., KLEIN, E., RATTI, C., ZIEGLER-GRAFF, V.,
464 BOUZOUBAA, S. & GILMER, D. 2013. The benyvirus RNA silencing suppressor is
465 essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but
466 not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Molecular Plant-Microbe*
467 *Interactions*, 26, 168-81.
- 468 CHIBA, Y. & GREEN, P. J. 2009. mRNA Degradation Machinery in Plants. *Journal of Plant Biology*,
469 52, 114-124.
- 470 CSORBA, T., KONTRA, L. & BURGYÁN, J. 2015. viral silencing suppressors: Tools forged to fine-
471 tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479-480, 85-103.
- 472 DICKSON, A. M. & WILUSZ, J. 2011. Strategies for viral RNA stability: live long and prosper.
473 *Trends Genet*, 27, 286-93.
- 474 FEIGENBUTZ, M., GARLAND, W., TURNER, M. & MITCHELL, P. 2013. The exosome cofactor
475 Rrp47 is critical for the stability and normal expression of its associated exoribonuclease Rrp6
476 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 8, e80752.
- 477 FUNK, A., TRUONG, K., NAGASAKI, T., TORRES, S., FLODEN, N., BALMORI MELIAN, E.,
478 EDMONDS, J., DONG, H., SHI, P. Y. & KHRONYKH, A. A. 2010. RNA structures
479 required for production of subgenomic flavivirus RNA. *J Virol*, 84, 11407-17.
- 480 GIETZ, R. D. & SCHIESTL, R. H. 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS
481 carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2, 31-4.
- 482 GILMER, D. & RATTI, C. 2012. Benyvirus. In: KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B.
483 & LEFKOWITZ, E. J. (eds.) *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses:*
484 *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier.
- 485 GILMER, D., RICHARDS, K., JONARD, G. & GUILLEY, H. 1992. cis-active sequences near the 5'-
486 termini of beet necrotic yellow vein virus RNAs 3 and 4. *Virology*, 190, 55-67.
- 487 GUILLEY, H., BORTOLAMIOL, D., JONARD, G., BOUZOUBAA, S. & ZIEGLER-GRAFF, V.
488 2009. Rapid screening of RNA silencing suppressors by using a recombinant virus derived
489 from beet necrotic yellow vein virus. *Journal of General Virology*, 90, 2536-41.
- 490 HARIGAYA, Y. & PARKER, R. 2012. Global analysis of mRNA decay intermediates in
491 *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 11764-9.
- 492 HOUSELEY, J. & TOLLERVEY, D. 2009. The many pathways of RNA degradation. *Cell*, 136, 763-
493 76.
- 494 IWAKAWA, H. O., MIZUMOTO, H., NAGANO, H., IMOTO, Y., TAKIGAWA, K.,
495 SARAWANEEYARUK, S., KAIDO, M., MISE, K. & OKUNO, T. 2008. A viral noncoding
496 RNA generated by cis-element-mediated protection against 5'->3' RNA decay represses both
497 cap-independent and cap-dependent translation. *J Virol*, 82, 10162-74.
- 498 JUPIN, I., BOUZOUBAA, S., RICHARDS, K., JONARD, G. & GUILLEY, H. 1990. Multiplication
499 of beet necrotic yellow vein virus RNA 3 lacking a 3' poly(A) tail is accompanied by
500 reappearance of the poly(A) tail and a novel short U-rich tract preceding it. *Virology*, 178,
501 281-4.

- JUPIN, I., GUILLEY, H., RICHARDS, K. E. & JONARD, G. 1992. Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J*, 11, 479-88.
- KENNA, M., STEVENS, A., MCCAMMON, M. & DOUGLAS, M. G. 1993. An essential yeast gene with homology to the exonuclease-encoding XRN1/KEM1 gene also encodes a protein with exoribonuclease activity. *Mol Cell Biol*, 13, 341-50.
- KLEIN, E., LINK, D., SCHIRMER, A., ERHARDT, M. & GILMER, D. 2007. Sequence variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res*, 126, 53-61.
- LAUBER, E., GUILLEY, H., TAMADA, T., RICHARDS, K. E. & JONARD, G. 1998. Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J Gen Virol*, 79, 385-93.
- LEE, C. C., LIN, T. L., LIN, J. W., HAN, Y. T., HUANG, Y. T., HSU, Y. H. & MENG, M. 2015. Promotion of Bamboo Mosaic Virus Accumulation in *Nicotiana benthamiana* by 5'→3' Exonuclease NbXRN4. *Front Microbiol*, 6, 1508.
- MOON, S. L., ANDERSON, J. R., KUMAGAI, Y., WILUSZ, C. J., AKIRA, S., KHRROMYKH, A. A. & WILUSZ, J. 2012. A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability. *Rna*, 18, 2029-40.
- MOON, S. L. & WILUSZ, J. 2013. Cytoplasmic viruses: rage against the (cellular RNA decay) machine. *PLoS Pathog*, 9, e1003762.
- PELTIER, C., HLEIBIEH, K., THIEL, H., KLEIN, E., BRAGARD, C. & GILMER, D. 2008. Molecular Biology of the Beet necrotic yellow vein virus. *Plant Viruses*, 2, 14-24.
- PELTIER, C., KLEIN, E., HLEIBIEH, K., D'ALONZO, M., HAMMANN, P., BOUZOUBAA, S., RATTI, C. & GILMER, D. 2012. Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *Journal of General Virology*, 93, 1093-102.
- PELTIER, C., SCHMIDLIN, L., KLEIN, E., TACONNAT, L., PRINSEN, E., ERHARDT, M., HEINTZ, D., WEYENS, G., LEFEBVRE, M., RENOU, J. P. & GILMER, D. 2011. Expression of the Beet necrotic yellow vein virus p25 protein induces hormonal changes and a root branching phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Res*, 20, 443-66.
- PENG, J., YANG, J., YAN, F., LU, Y., JIANG, S., LIN, L., ZHENG, H., CHEN, H. & CHEN, J. 2011. Silencing of NbXrn4 facilitates the systemic infection of Tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Virus Res*, 158, 268-70.
- PIJLMAN, G. P., FUNK, A., KONDRATIEVA, N., LEUNG, J., TORRES, S., VAN DER AA, L., LIU, W. J., PALMENBERG, A. C., SHI, P. Y., HALL, R. A. & KHRROMYKH, A. A. 2008. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe*, 4, 579-91.
- POOLE, T. L. & STEVENS, A. 1997. Structural modifications of RNA influence the 5' exoribonucleolytic hydrolysis by XRN1 and HKE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 235, 799-805.
- QUILLET, L., GUILLEY, H., JONARD, G. & RICHARDS, K. 1989. In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology*, 172, 293-301.
- RATTI, C., HLEIBIEH, K., BIANCHI, L., SCHIRMER, A., AUTONELL, C. R. & GILMER, D. 2009. Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in *Beta macrocarpa*. *Virology*, 385, 392-399.
- ROZOVICS, J. M., CHASE, A. J., CATHCART, A. L., CHOU, W., GERSHON, P. D., PALUSA, S., WILUSZ, J. & SEMLER, B. L. 2012. Picornavirus modification of a host mRNA decay protein. *MBio*, 3, e00431-12.
- SCHNETTLER, E., STERKEN, M. G., LEUNG, J. Y., METZ, S. W., GEERTSEMA, C., GOLDBACH, R. W., VLAK, J. M., KOHL, A., KHRROMYKH, A. A. & PIJLMAN, G. P. 2012. Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and Mammalian cells. *J Virol*, 86, 13486-500.
- SHETH, U. & PARKER, R. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300, 805-8.

557 SINTUREL, F., BRECHEMIER-BAEY, D., KILEDJIAN, M., CONDON, C. & BENARD, L. 2012.
558 Activation of 5'-3' exoribonuclease Xrn1 by cofactor Dcs1 is essential for mitochondrial
559 function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 8264-9.
560 SOKOLOSKI, K. J., DICKSON, A. M., CHASKEY, E. L., GARNEAU, N. L., WILUSZ, C. J. &
561 WILUSZ, J. 2010. Sindbis virus usurps the cellular HuR protein to stabilize its transcripts and
562 promote productive infections in mammalian and mosquito cells. *Cell Host Microbe*, 8, 196-
563 207.
564 VAN HOOF, A., LENNERTZ, P. & PARKER, R. 2000. Three conserved members of the RNase D
565 family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase
566 MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J*, 19, 1357-65.
567 VEIDT, I., BOUZOUBAA, S. E., LEISER, R. M., ZIEGLER-GRAFF, V., GUILLEY, H.,
568 RICHARDS, K. & JONARD, G. 1992. Synthesis of full-length transcripts of beet western
569 yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology*, 186,
570 192-200.

571

Chapitre II

Chapitre II : Etude du mode d'action de la protéine p14 du BNYVV et de son rôle dans le mouvement systémique viral

I. Introduction

Le *RNA silencing* (*RNAi*) est un mécanisme de défense inné utilisé par les plantes et par d'autres organismes eucaryotes contre les pathogènes envahissants tels que les virus (cf. [Introduction, partie I, paragraphe 3.4](#)). Afin de contrôler les infections virales, les plantes, les champignons et les nématodes peuvent amplifier le signal issu du *RNA silencing* par le mécanisme de transitivity en utilisant des ARN polymérases ARN dépendantes (RDR) pour produire des siRNA secondaires (cf. [Introduction, partie I, paragraphe 3.4](#)) (Voinnet, 2008). Chez *A. thaliana*, les protéines RDR1 et RDR6 sont impliquées dans ce mécanisme d'amplification (Wang *et al.*, 2010). Pour assurer une défense antivirale dans l'ensemble de l'organisme et prévenir l'invasion virale, le signal du *RNAi* se déplace dans les cellules voisines à travers les plasmodesmes pour atteindre le phloème et accéder aux cellules des organes distants (Himber *et al.*, 2003, Molnar *et al.*, 2010, Mermigka *et al.*, 2016).

Les virus ont mis en place des stratégies pour contourner ce mécanisme de défense et assurer leur multiplication et leur persistance au sein de leurs hôtes. En effet, la plupart des virus expriment des supresseurs du *RNA silencing* (VSR) qui ciblent, de diverses manières, les facteurs impliqués dans cette voie (cf. [Introduction, partie II](#)). La majorité des protéines virales sont multifonctionnelles. Les VSR ont souvent été caractérisés comme des facteurs de virulence et des éléments essentiels à l'établissement du cycle viral. C'est le cas de la protéine p25 du potato virus X qui intervient à la fois dans la suppression du *RNA silencing* et dans le mouvement inter-cellulaire (Chiu *et al.*, 2010, Yan *et al.*, 2012), ou de la protéine de capsid p38 du turnip crinkle virus (Azevedo *et al.*, 2010). De par leur fonction, ces protéines ciblent une ou plusieurs étapes de la voie de biosynthèse des siRNA. Par exemple, le rice yellow stunt rhabdovirus code la protéine P6 qui inhibe la synthèse des siRNA secondaires en ciblant la protéine RDR6 (Guo *et al.*, 2013). Contrairement à la protéine P19 du tomato bushy stunt virus qui inhibe à la fois la mise en place du *RNA silencing* et son mouvement systémique en fixant les siRNA double brins de 21 nt, la protéine P6 inhibe uniquement le mouvement systémique du *RNA silencing* (Silhavy *et al.*, 2002, Guo *et al.*, 2013).

Le BNYVV code deux protéines supresseur du *RNA silencing*. La protéine p31, exprimée à partir de l'ARN4 viral, présente une activité VSR mise en évidence uniquement dans les racines de *Nicotiana benthamiana* (Rahim *et al.*, 2007). La protéine p14, codée par l'ARN

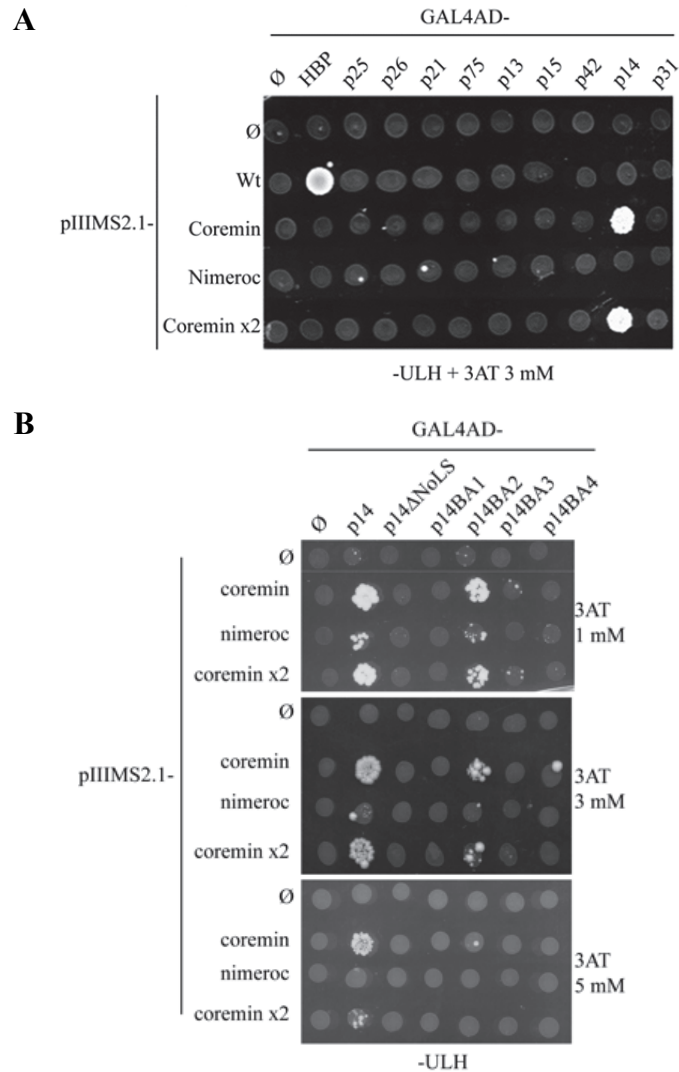


Figure II.1 : Recherche d'interactions entre les protéines virales et la séquence « coremin ». Approche triple hybride visualisant l'expression du rapporteur HIS3 lors de la formation de complexe ternaire Protéine/ARN/Protéine. Les séquences codant les protéines du BNYVV sont fusionnées à celle du domaine d'activation de la transcription de GAL4. La protéine de capsid du phage MS2 (CP-MS2) est fusionnée à LexA capable de reconnaître les séquences UAS en amont du rapporteur HIS3. La séquence nucléotidique « coremin » simple (coremin), en tandem (coremin x2) ou la séquence complémentaire inversée de « coremin » (nimeroc) est exprimée sous la forme d'un ARN chimérique non codant (promoteur Pol-III) possédant deux structures tige-boucle reconnues spécifiquement par la protéine CP-MS2. **(A)** Les protéines de fusion sont exprimées dans une souche de levure de type sexuel MAT α . Les ARN chimériques sont exprimés dans une souche de type sexuel MAT α qui exprime la protéine LexA-CP-MS2. Après « mating », les levures diploïdes sont sélectionnées sur milieu dépourvu d'uracile, de leucine et d'histidine (-ULH) en présence de 3 mM d'un compétiteur de l'histidine (3AT). L'interaction entre les partenaires permet la formation du complexe ternaire et la croissance des levures en absence d'histidine. L'ARN sauvage (WT pour wt-Hairpin) et la protéine HBP (histone *hairpin-binding protein*) sont utilisés comme contrôle positif (Jaeger et al. 2004). **(B)** La même expérience est réalisée en présence de la protéine p14 sauvage ou dépourvue du signal de localisation nucléolaire (p14ΔNoLS) ou mutée dans le motif NoLS (p14BA1, 2, 3 et 4). Ces protéines sont fusionnées au domaine d'activation de GAL4. La sélection se fait en présence de trois concentrations de 3AT (1, 3 et 5 mM).

subgénomique 2Sub-c (Gilmer *et al.*, 1992) est le second suppresseur de *RNA silencing*. C'est cette protéine que j'ai étudiée durant ma thèse (cf. **Introduction, partie III, paragraphe 5**).

La protéine p14 du BNYVV est riche en cystéine et possède un domaine en doigt de zinc (Znf, *zinc finger*) essentiel à sa localisation nucléolaire et cytoplasmique, à sa stabilité et à son activité VSR (Chiba *et al.*, 2013). Le signal de localisation nucléolaire (NoLS, *nucleolar localization signal*) de la protéine est retrouvé dans le domaine Znf. Ainsi, des mutations introduites dans la séquence du NoLS altèrent les différentes fonctions et propriétés de la protéine (ibid). Toutefois, la localisation nucléolaire de la protéine p14 ne semble pas impliquée dans l'activité VSR. En effet, le mutant allélique BA2 présente la même localisation subcellulaire que p14 et une faible activité VSR tandis que les mutants BA1 et BA3, incapables de s'accumuler dans le nucléole, maintiennent également une faible activité VSR (ibid). BA3 reste tout de même capable d'assurer le mouvement à longue distance du virus sur *B. macrocarpa* (ibid). En effet, la protéine p14 et, dans une moindre mesure les mutants alléliques BA1 et BA3, réduisent la production des siRNA primaires et secondaires. Quant au mutant BA2, son effet est moins marqué (ibid). Le mécanisme d'action de la protéine p14 n'est pas encore identifié mais son effet sur la synthèse des siRNA secondaires oriente les recherches vers un mécanisme qui affecterait les étapes situées en aval de la production de ces siRNA primaires.

En plus de son activité de suppresseur du *RNA silencing*, la protéine p14 intervient également dans le mouvement systémique du BNYVV (Chiba *et al.*, 2013). En effet, l'absence d'expression du VSR p14 chez l'hôte *N. benthamiana*, où l'ARN3 n'est pas nécessaire au mouvement, ne permet pas d'accumulation virale dans les feuilles systémiques (ibid). Il en est de même chez l'hôte *B. macrocarpa* en présence de l'ARN3 (ibid). La protéine p14 et l'ARN3 *via* le motif « coremin » étant tous deux impliqués dans le mouvement systémique du BNYVV, Kamal Hleibieh a recherché durant sa thèse s'il existait une protéine virale capable d'interagir spécifiquement avec la séquence « coremin ». Pour cela, il a mis en œuvre des expériences de triple hybride dans la levure (**Figure II.1, A**). A l'exception de la protéine codée par l'ARN1, toutes les protéines virales ont été testées et fusionnées au domaine d'activation de la transcription (AD) de GAL4 dans différents vecteurs d'expression. La séquence « coremin » simple ou double (en tandem) et la séquence complémentaire inversée « nimeroc » ont été fusionnées à la séquence d'un ARN capable de recruter la protéine de capsid CP du phage MS2 (CP-MS2) (SenGupta *et al.*, 1996). Les ARN chimériques formés ont été exprimés grâce au vecteur pIIIMS2.1. Deux souches de levures, dont l'une code la

protéine CP-MS2 fusionnée au domaine de fixation à l'ADN, LexA, ont été transformées par des vecteurs recombinant. Une souche a été transformée par les vecteurs pIIIMS2.1 et l'autre souche par ceux exprimant les protéines virales. Après formation et sélection des diploïdes, les levures capables d'exprimer les facteurs reconstituant un complexe ternaire capable d'activer la transcription du gène rapporteur HIS3 ont été sélectionnées sur milieu sélectif en présence de 3 mM de tri-aminotriazol (3AT, compétiteur de l'histidine). Comme contrôle positif, les constructions décrites par Jaeger *et al.* (Jaeger *et al.*, 2004) ont été utilisées (**Figure II.1, A**). Seule la protéine p14 est capable d'interagir avec la séquence « coremin » simple ou en tandem. Cette interaction est caractérisée par la croissance des levures diploïdes exprimant ces deux vecteurs respectifs. Aucune interaction n'est observée entre p14 et la séquence « nimeroc » ou celle du contrôle positif. L'interaction p14-ARN a été confirmée par des expériences réalisées *in vitro* montrant qu'un dimère de p14 interagit avec l'ARN. Toutefois, *in vitro*, la spécificité de reconnaissance est perdue (données non présentées). K. Hleibieh a également étudié l'effet des mutations introduites dans le signal NoLS sur l'interaction avec la séquence « coremin » par la même approche génétique. Les mutants de p14, délétés du signal de localisation nucléolaire (p14 Δ NoLS) ou porteurs d'une mutation allélique dans le NoLS (BA1, BA2, BA3 et BA4) ont été testés en triple hybride (**Figure II.1, B**). La sélection des souches diploïdes en présence de 1, 3 et 5 mM de 3AT confirme l'interaction de p14 avec « coremin » et indique que seul le mutant BA2 reste capable d'interagir avec « coremin ». Ce mutant est également le seul capable de multimériser en système double hybride (Chiba *et al.*, 2013) (Hleibieh, 2010).

La protéine p14 et la séquence « coremin » sont toutes deux impliquées dans le mouvement systémique. Aussi, K. Hleibieh a initié l'étude du rôle de cette interaction dans l'infection locale de *C. quinoa* et l'infection systémique de *N. benthamiana*. Pour cela l'ARN1 et l'ARN2 sauvage ou muté (mutants ARN2BA1, 2BA2 et 2BA3 ou mutant n'exprimant pas la protéine p14, Δ p14) ont été complémentés ou non par l'ARN3 ou l'ARN3E, muté dans la séquence « coremin » (ARN3E) et inoculés sur plantes.

Chez *C. quinoa*, l'infection par les ARN1 et 2 conduit à la formation de lésions chlorotiques (Chiba *et al.*, 2013). En absence d'expression de p14, les lésions locales sont plus petites et deviennent nécrotiques. L'utilisation des mutants ARN2BA1, 2 et 3 produit des lésions locales chlorotiques possédant un centre nécrotique (ibid). L'absence d'expression de la protéine p14 ou l'expression des mutants BA1 et BA2 affecte considérablement l'accumulation des ARN viraux. Le mutant BA3 se conduit comme le sauvage (ibid). L'ajout

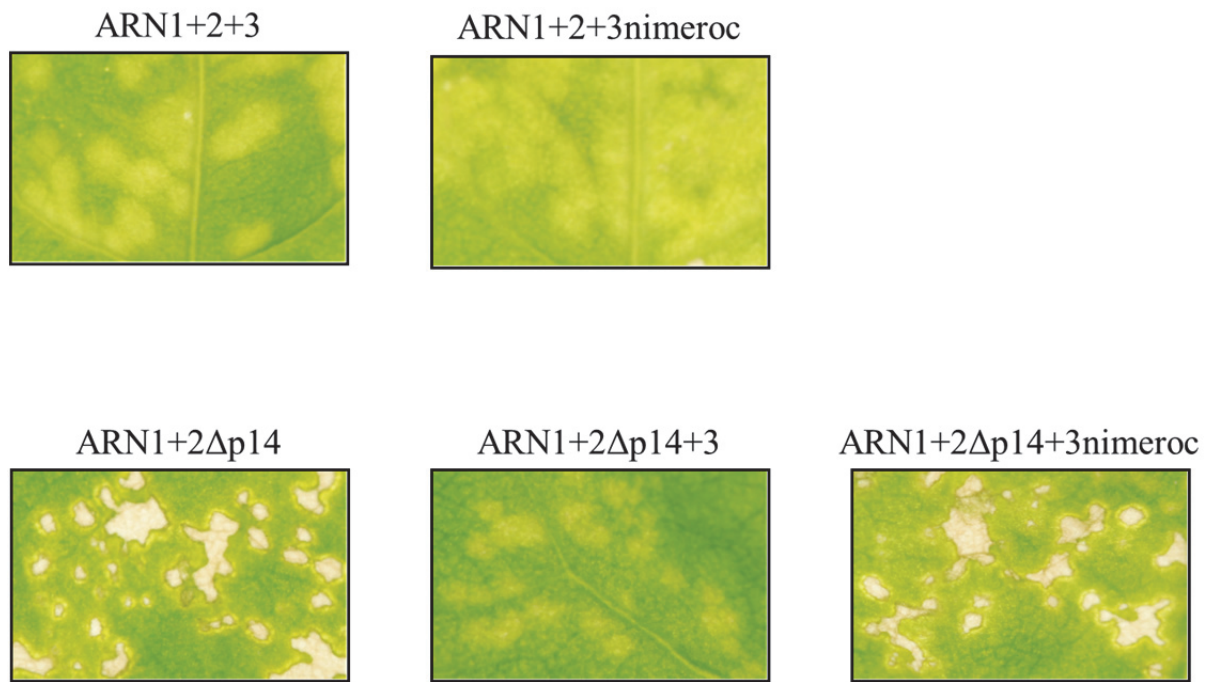


Figure II.2 : Visualisation de la complémentation phénotypique apportée par l'ARN3 en l'absence d'expression de VSR (BNYVV p14). Les lésions locales sont observées sur feuilles de *C. quinoa* 7 jours après inoculation par les ARN1+2 sauvage ou muté (2Δp14) en présence de l'ARN3 ou de l'ARN3 muté (3nimeroc).

d'ARN3 ou d'ARN3E aux ARN1 et 2 viraux accentue le phénotype des lésions qui deviennent jaunes en raison de l'expression de la protéine p25 (Jupin *et al.*, 1992) (**Figure II.2**). La même expérience conduite à l'aide de l'inoculum incapable d'exprimer p14 empêche l'apparition de lésions nécrotiques uniquement lorsque la séquence « coremin » est présente (**Figure II.2**). Cette séquence ou sa fonction est donc responsable de la complémentation phénotypique observée qui a d'ailleurs été validée par l'analyse moléculaire du contenu des lésions locales. L'analyse par northern blot des ARN viraux extraits des lésions locales révèle que l'ARN3 permet de restaurer partiellement l'accumulation des ARN viraux en l'absence de la protéine p14 ou en présence du mutant BA2 mais ne semble pas avoir d'effet en présence du mutant BA3 (données non montrées) (Hleibieh, 2010).

Les mêmes expériences ont été effectuées sur l'hôte systémique, *N. benthamiana*. Rappelons que, sur cet hôte, les ARN1 et 2 sont suffisants pour établir une infection systémique puisqu'ils possèdent les gènes impliqués dans la réplication virale, l'encapsidation, le mouvement de cellule à cellule et la suppression du *RNA silencing* (cf. **Introduction, partie III, paragraphe 5**). En absence du VSR p14, aucune infection systémique n'est possible (Chiba *et al.*, 2013). Il en est de même pour le mutant BA2 qui présente le plus de similarités avec la protéine p14 comparé aux autres mutants (ibid). Par conséquent, je me suis focalisée sur ce mutant BA2 pour poursuivre les travaux décrits par Chiba *et al.* (ibid). Les études entreprises par K. Hleibieh ont montré que la présence de l'ARN3 ne permet pas de compléter l'absence de la protéine p14 dans le mouvement systémique chez *N. benthamiana*, contrairement à ce qui est observé dans les lésions locales sur *C. quinoa*. Toutefois, de façon surprenante, la présence de l'ARN3 permet aux ARN1+2BA2 d'assurer une infection systémique qui n'est pas retrouvée en présence de l'ARN3E. Un tel résultat met une fois de plus en avant le rôle de la séquence « coremin » et son interaction avec la protéine BA2 dans le mouvement systémique (Hleibieh, 2010).

Afin de confirmer ces résultats préliminaires, j'ai reproduit ces expériences de complémentation de façon à obtenir des résultats statistiques et en utilisant des constructions incapables d'exprimer la protéine p25. J'ai également approfondi l'étude du mécanisme d'action du VSR p14 en analysant, d'une part, l'effet de son expression ectopique sur le mouvement systémique du *RNA silencing*, chez *N. benthamiana* par des expériences d'expression transitoire encore appelées « *patch tests* ». D'autre part, j'ai recherché l'effet de l'expression de la protéine p14 sur la synthèse des siRNA secondaires en utilisant des plantes *N. benthamiana* transgéniques exprimant des ARN interférents qui ciblent l'ARNm de RDR6.

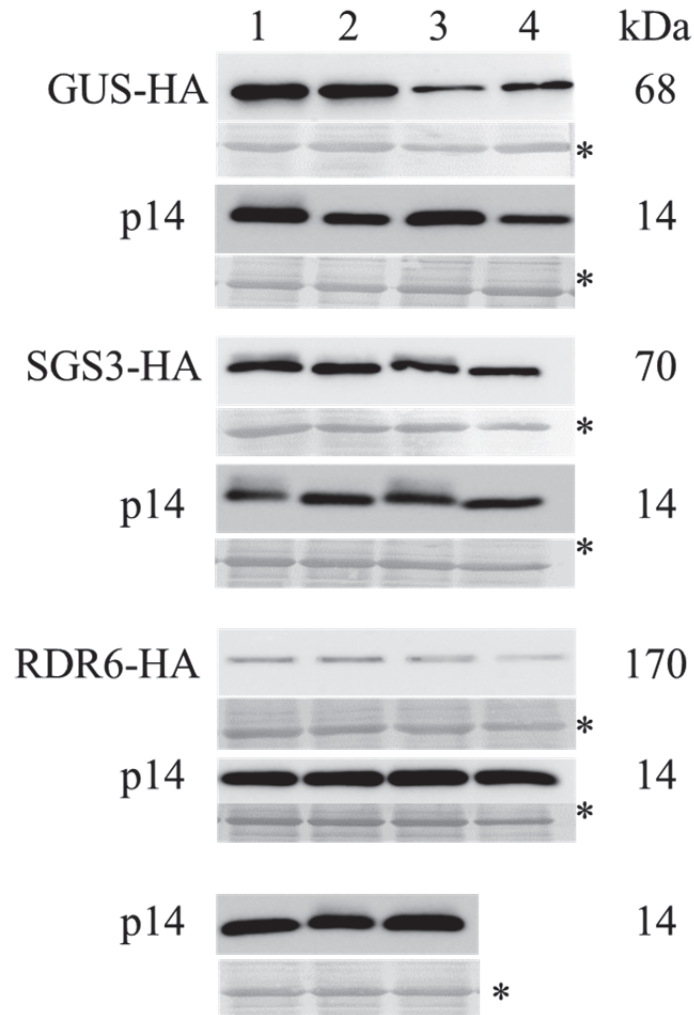


Figure II.3 : Détection des protéines exprimées transitoirement chez *N. benthamiana*. Les protéines totales extraites des tissus infiltrés avec les mélanges d'*A. tumefaciens* porteurs des constructions GUS-HA et p14, SGS3-HA et p14, RDR6-HA et p14 ou p14 seule ont été analysées par western blot. Les protéines GUS-HA, SGS3-HA et RDR6-HA portant une étiquette HA (hémagglutinine), sont révélées par des anticorps polyclonaux anti-HA. La protéine p14 du BNYVV est révélée par des anticorps polyclonaux anti-p14. Les poids moléculaires sont précisés (kDa). Pour chaque condition, quatre plantes ont été infiltrées (chiffres de 1 à 4) excepté pour le contrôle p14 seule où trois plantes ont été infiltrées. (*) correspond à la coloration des membranes au bleu de Coomassie et permet de renseigner sur la charge totale des protéines dans chaque puits.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans ce second chapitre sous forme d'article publié dans « *Viruses* ».

En parallèle à ces études, j'ai entrepris des expériences de co-immunoprécipitation, qui ne seront pas présentées dans l'article, pour déterminer une interaction entre la protéine p14 et les protéines d'*A. thaliana*, RDR6 et SGS3 (*suppressor of gene silencing 3*), ce dernier étant également impliqué dans le mécanisme de la transitivity (Ding and Voinnet, 2007). Les facteurs RDR6 et SGS3 étiquetés avec HA (hémagglutinine) servent d'appâts pour immunoprécipiter la protéine p14, si celle-ci interagit avec l'un de ces facteurs. La protéine GUS (bêta-glucuronidase) étiquetée HA est utilisée comme contrôle négatif. Les protéines totales extraites des tissus de *N. benthamiana*, exprimant transitoirement les protéines GUS-HA et p14, RDR6-HA et p14, SGS3-HA et p14 ou p14 seule, ont été analysées par western blot pour vérifier la présence des protéines dans l'extrait total (**Figure II.3**). Toutes les protéines sont détectées dans les échantillons. Ces derniers ont été utilisés pour réaliser des expériences d'immunoprécipitation. Les protéines totales sont extraites dans un tampon non dénaturant pour préserver les complexes protéiques. Les protéines étiquetées HA ont été immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-HA puis les éluats ont été analysés par spectrométrie de masse (MS/MS) afin d'identifier des partenaires des protéines dites appâts, en fonction de leur masse. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau II.1**). Contrairement à l'analyse par western blot, la protéine GUS-HA n'a pas été identifiée par MS/MS. De manière surprenante, la protéine p14 est détectée dans tous les échantillons en quantité équivalente, y compris dans les contrôles GUS-HA et p14 seule. Par conséquent, nous n'avons pas pu conclure quant à l'interaction entre p14 et RDR6 ou SGS3.

Tableau II.1 : Protéines d'intérêts identifiées par MS/MS suite à l'immunoprécipitation des protéines étiquetées.

Protéines détectées	Echantillons analysés			
	GUS-HA + p14	SGS3-HA + p14	RDR6-HA + p14	p14
GUS	Nd			
SGS3		✓		
RDR6			✓	
p14	✓	✓	✓	✓

✓ Représente la détection de la protéine correspondante dans les échantillons analysés.

Nd : Protéine non détectée

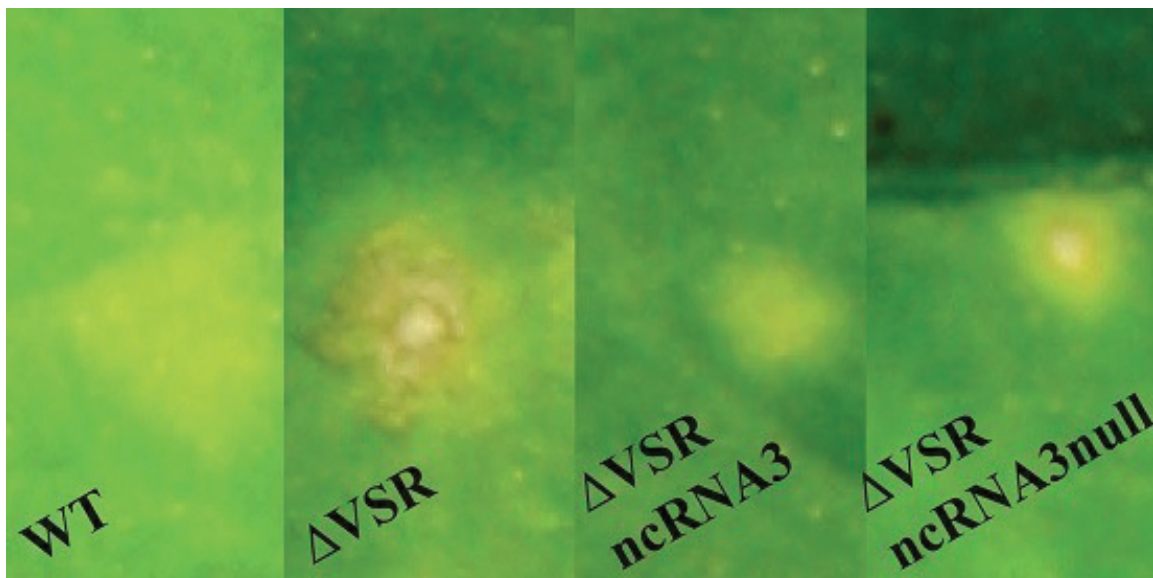
Chaque échantillon a été analysé trois fois par MS/MS.

Titre de l'article : « **A viral noncoding RNA complements a weakened viral RNA silencing suppressor and promotes efficient systemic host infection** ».

II. Article

« A viral noncoding RNA complements a weakened viral RNA silencing suppressor and promotes efficient systemic host infection »

Publié dans « *Viruses* »



Article

A Viral Noncoding RNA Complements a Weakened Viral RNA Silencing Suppressor and Promotes Efficient Systemic Host Infection

Alyssa Flobinus¹, Kamal Hleibieh¹, Elodie Klein^{1,2}, Claudio Ratti³, Salah Bouzoubaa¹ and David Gilmer^{1,*}

¹ Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Integrative Virology, CNRS UPR2367, Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France; alyssa.flobinus@ibmp-cnrs.unistra.fr (A.F.); kamalhleibieh@gmail.com (K.H.); elodie.klein@ibmp-cnrs.unistra.fr (E.K.); salah.bouzoubaa@ibmp-cnrs.unistra.fr (S.B.)

² SESVanderHave, Industriepark soldatenplein, Z2nr15, Tienen B3300, Belgium

³ Dipartimento di Scienze Agrarie, Area Patologia Vegetale, Università di Bologna, Viale Fanin 40, 40127 Bologna, Italy; claudio.ratti@unibo.it

* Correspondence: gilmer@unistra.fr; Tel.: +33-367-155-362

Academic Editor: Thomas Hohn

Received: 13 July 2016; Accepted: 27 September 2016; Published: 4 October 2016

Abstract: Systemic movement of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *Beta macrocarpa* depends on viral RNA3, whereas in *Nicotiana benthamiana* this RNA is dispensable. RNA3 contains a coremin motif of 20 nucleotides essential for the stabilization of noncoding RNA3 (ncRNA3) and for long-distance movement in *Beta* species. Coremin mutants that are unable to accumulate ncRNA3 also do not achieve systemic movement in *Beta* species. A mutant virus carrying a mutation in the p14 viral suppressor of RNA silencing (VSR), unable to move long distances, can be complemented with the ncRNA3 in the lesion phenotype, viral RNA accumulation, and systemic spread. Analyses of the BNYVV VSR mechanism of action led to the identification of the RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) pathway as a target of the virus VSR and the assignment of a VSR function to the ncRNA3.

Keywords: BNYVV; RSS; RNA silencing suppression; systemic movement; viral noncoding RNA

1. Introduction

In eukaryotic cells, antiviral host defenses counteract virus amplification and cell-to-cell transmission. The RNA silencing machinery acts against viral amplification and virus systemic movement in plants [1] and is triggered by the occurrence of double-stranded RNA (dsRNA), which can consist of viral replicative intermediates or highly structured RNA. Dicer-like proteins DCL4 or DCL2 process double-stranded RNAs into 21- to 22-nt-long primary small interfering RNAs (siRNAs), respectively. The siRNAs associate with Argonaute protein-containing RNA-induced silencing complexes (RISC) and guide the complexes to complementary target RNA for endonucleolytic cleavage or translational repression. In plants, fungi, and worms, the process of RNA silencing is amplified by RNA-dependent RNA polymerases (RDR). These enzymes synthesize dsRNAs from targeted RNAs and further processing of these dsRNAs by DCL proteins leads to the production of secondary siRNAs [2]. A remarkable feature of RNA silencing in plants is its non-cell autonomous aspect. In fact, siRNAs move from cell-to-cell through plasmodesmata and their amplification by RDR allows them to reach the phloem and to move systemically [3]. The ability of plants to spread viral siRNAs systemically may play an essential role in antiviral defense.

Viruses overcome host antiviral RNA silencing through the expression of viral RNA silencing suppressors (VSRs) or the production of noncoding RNAs (ncRNAs) acting as RNA silencing decoys

or sponges for cellular factors as described for cauliflower mosaic virus (CaMV) 8S RNA [4,5] or noncoding subgenomic RNAs produced by different viral genus [6]. These VSRs target one or more steps in the antiviral pathway. Tomato bushy stunt virus (TBSV) p19 protein binds 21-nt-long siRNA duplexes and prevents RISC formation [1], whereas Turnip yellows virus (TuYV) P0 protein targets Argonaute 1 (AGO1) to induce its degradation by autophagy [7]. VSR activity of p14 protein of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) has been associated with reduced accumulation of primary and secondary siRNAs [8]. BNYVV belongs to the *Benyviridae* family and is the type member of the *Benyvirus* genus [9]. It is transmitted by the soil-borne protozoa *Polymyxa betae* and causes sugar beet rhizomania disease. The BNYVV genome is composed of four to five linear, positive-sense, single-stranded RNAs that are capped and polyadenylated. RNA1 and RNA2 are essential and sufficient for viral multiplication in rub-inoculated laboratory host plants. RNA1 encodes proteins required for replication, while RNA2 encodes proteins for packaging and cell-to-cell movement, as well as the p14 protein required for RNA silencing suppression and systemic spread of the virus [8]. The smaller RNAs (RNA3, RNA4, and, when present, RNA5) are dispensable for infection of laboratory hosts upon mechanical inoculation but are required for the natural infection of *Beta* species and for transmission of the virus. RNA3 influences symptom expression in host plants through its p25 protein [10,11]. RNA3 is also essential for BNYVV long-distance movement in *Beta* species, but this does not require p25, as p25-deficient RNA3 still moves long distances [12]. The establishment of systemic infection in *Beta macrocarpa* depends on a 20-nt-long coremin sequence [13] embedded in the RNA3 'core' region [12]. Coremin is also found in RNA5 of BNYVV as well as in the small genomic RNAs of the *Benyviridae* species beet soil borne mosaic virus and in two unrelated viral genera [13,14]. Previously, we have shown that RNA3 encodes a subgenomic non-coding RNA (ncRNA3). BNYVV ncRNA3 is produced by nuclease activity and not by the viral polymerase [13]. Mutagenesis of the coremin motif prevents ncRNA3 production and viral systemic spread [13].

The role of ncRNA3 accumulation along the BNYVV life cycle is not fully understood. Since viral systemic spread requires both p14 and ncRNA3, we addressed the synergic effect of both elements by testing the complementation of p14 mutants with wild-type (WT) or mutated RNA3. We show that, in *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*), the p14BA2 mutant of the VSR unable to move long distances [8] is indeed complemented by RNA3, and that ncRNA3 accumulation plays an essential role in systemic infection, acting as a second VSR. Moreover, our data tend to support the activity of p14 in the inhibition of intercellular siRNA movement, which is mandatory in *Beta* species for BNYVV systemic movement and is enhanced by the production of ncRNA3.

2. Materials and Methods

2.1. Plasmids

Plasmids encoding RNA1, RNA2 (WT or mutant for p14), RNA3, and RNA3E full-length infectious complementary DNA clones were described previously [8,13,15].

2.2. In Vitro Transcription, Plant Infection, Protein, and RNA Extractions

The linearized full-length BNYVV clones of RNA1 (pB15), RNA2 (pB2-14), RNA2Δp14 (pB2-3722), RNA2BA2 (pB2-BA2) [8], RNA3 (pB35), RNA3E (pB35E) served for in vitro run-off transcription as described previously [13,15]. RNA3Δp25 (pB35Δaug) and RNA3EΔp25 (pB35EΔaug) do not allow the expression of the p25 protein as the initiation codon has been removed, as described in [12].

RNA1 and RNA2 (RNA2, RNA2Δp14, or RNA2BA2) species, supplemented or not with RNA3 or RNA3E, served for the mechanical infection of *Chenopodium quinoa* (*C. quinoa*) or WT and knockdown RDR6i *N. benthamiana* leaves [16], or the electroporation of *C. quinoa* protoplasts, as described previously [17–19]. RDR6i seeds were kindly provided by D. Baulcombe (Cambridge, UK).

RNAs and proteins were extracted from infected tissues and *C. quinoa* protoplasts. Protein detection was performed by Western blotting using antisera directed against BNYVV coat protein

(CP), p14, and p25, as described previously [8,18]. RNAs were extracted using a “polysomes” buffer [20] followed by phenol/chloroform purification and ethanol precipitation. Pellets were treated with a 3 M sodium acetate solution (pH 5.5) (Promega, Madison, WI, USA) to solubilize DNA and small RNAs. Remaining RNA pellets were washed with 70% ethanol before dissolution in RNase-free water. RNAs were extracted from protoplasts after cell lysis in suspension buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Euromedex, Strasbourg, France), 0.05% macaloïde, 1% sodium dodecyl sulphate (SDS; Euromedex), 150 mM NaCl) followed by two extractions with phenol/chloroform and ethanol precipitation. Northern blots were performed as described previously [13,18].

2.3. Agroinfiltration of *N. benthamiana* 16C

Cultures of *Agrobacterium tumefaciens* cells (strain GV3101) were prepared as described previously [8]. An optical density of 1.5 was used for agroinfiltration in patch test assays [21]. Leaves of the green fluorescent protein (GFP)-expressing *N. benthamiana* line 16C (4–5-week-old seedlings) were co-agroinfiltrated with bacteria transformed with binary vector (based on pBin61) expressing either BNYVV-p14 or mutant p14BA2, TuYV P0, or TBSV p19, or empty vector, together with agrobacteria containing a binary vector encoding GFP messenger RNA (mRNA) to trigger RNA silencing. RNAs and proteins were extracted from agro-infiltrated leaves using TRIzol reagent (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) following the manufacturer’s recommendations and a Laemmli buffer [21].

3. Results

3.1. The ncRNA3 Complements the Absence of BNYVV VSR in *C. quinoa*

The VSR protein of BNYVV (p14) was shown to be essential for long-distance movement of the virus in *Beta* species and for the systemic movement of the genomic RNA1 and RNA2 in *N. benthamiana* [8]. Upon inoculation of *C. quinoa* leaves, RNA1 + RNA2 are sufficient to produce green chlorotic local lesions (Figure 1A). RNA3 that contains the coremin sequence is able to drive the accumulation of ncRNA3, while RNA3E possesses the reverse complement sequence and does not accumulate ncRNA3 [13]. Coexpression of RNA 1 and RNA 2 with RNA3 or RNA3E causes the spots in the leaves to turn yellow (Figure 1B,C). The lesions remained green when p25-deficient RNA3 or RNA3E were present (Figure 1D,E; RNA3Δp25 and RNA3EΔp25, respectively). Inoculation of leaves with RNA1 and p14-deficient RNA2 (p14null mutant, 1 + 2Δp14) leads to the production of small necrotic lesions (Figure 1F). Interestingly, when RNA3 was present, small chlorotic spots were observed without noticeable changes in lesion size (Figure 1G,I). Conversely, no phenotypic change was observed when RNA3E and RNA3EΔp25 were inoculated (Figure 1H,J). This indicates that the symptom attenuation was due to the production of the ncRNA3.

We have previously shown that RNA2 encoding the p14BA2 mutant (KK^{78–79}AA) induces small chlorotic local lesions possessing a necrotic center [8]. Moreover, this mutant is not able to support systemic movement of the virus in *N. benthamiana* despite its residual VSR activity [8]. When we applied the same complementation study to the p14BA2 mutant, we observed lesions lacking the necrotic center only in the presence of RNA3 species producing the ncRNA3 (data not shown). This shows that ncRNA3 prevents the induction of necrosis.

We analyzed the seven-day-old local lesions and searched for variation of viral expression either at the RNA or protein levels (Figure 2A). To ensure a correct interpretation of the data obtained, *C. quinoa* protoplast infection experiments were conducted in parallel, and samples were harvested 40 h post-infection (Figure 2B). The viral ncRNA3 species were produced in all combinations containing either RNA3 or mutant RNA3Δp25 (3 or 3Δ respectively), both in leaves and in protoplasts, irrespective of which RNA2 species was used (Figure 2A,B; lanes 3, 4, 9, 10, and 15).

In local lesions, RNA1 + RNA2 displayed comparable RNA1 and RNA2 accumulation levels and similar amounts of CP and p14 proteins in the absence of the p25 protein (Figure 2A; 3Δ and 3EΔ;

compare lanes 2, 4, and 6). The expression of the p25 protein entailed a faint reduction of genomic RNAs, an increased expression of CP, and no variation in the expression of p14 (Figure 2A; 3 or 3E; lanes 3 and 5). Mutation of the coremin sequence did not affect RNA3E accumulation in leaves (Figure 2A, compare lane 3 to lane 5 or lane 4 to lane 6); however, p25 protein expression was reduced in the absence of ncRNA3 (Figure 2A, lanes 3 and 5, p25). In the absence of the VSR (RNA1 + 2 Δ p14), the accumulation of genomic RNA1 and RNA2 was severely compromised, and the CP was barely detectable in local lesions (Figure 2A, lane 8). The presence of ncRNA3 favored RNA1 and RNA2 species accumulation and enhanced CP accumulation in local lesions independently of p25 (Figure 2A, lanes 9 and 10). Conversely, the presence of RNA3 mutant species (3E and 3E Δ) had a negative effect on genomic RNA and CP accumulations (Figure 2A, compare lanes 11–12 to lanes 9–10). Accumulation of RNA1 + RNA2BA2 (Figure 2A, right panel) ranged between WT and p14-null mutant, and CP expression appeared unchanged (Figure 2A, lanes 14–16). We noticed that the absence of ncRNA3 caused a lower expression of p25 for a yet unknown reason (Figure 2A, compare lanes 3 to 5, 9 to 11, and 15 to 16).

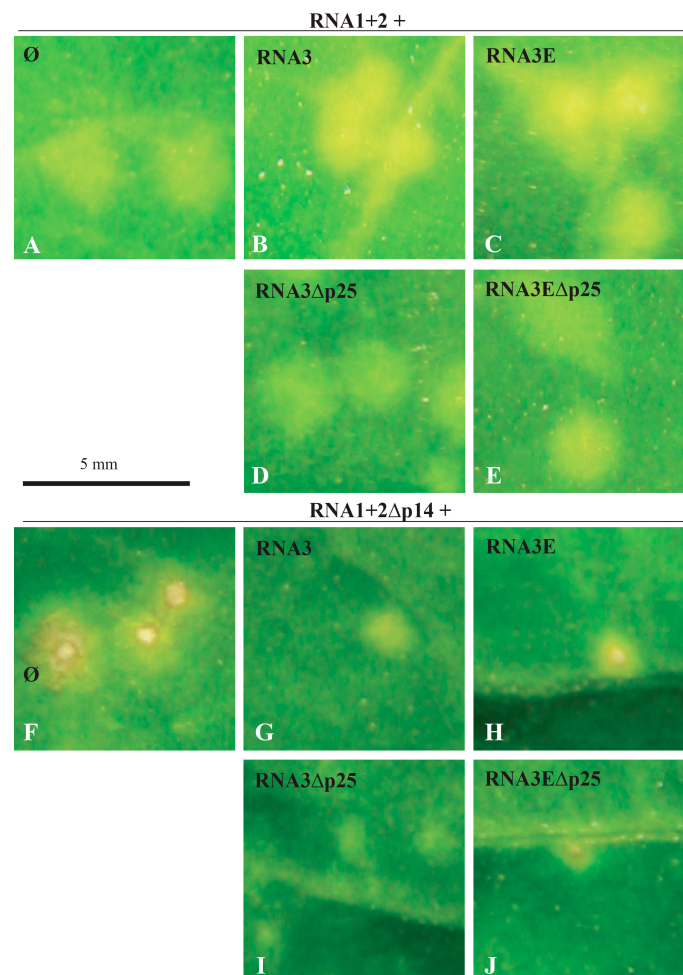


Figure 1. Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) noncoding RNA3 (ncRNA3) complements the absence of the p14 viral suppressor of RNA silencing (VSR) protein independently of expression of the RNA3-encoded p25 protein. The presence of ncRNA3-producing RNA species alleviates the necrosis obtained in the absence of p14. A close-up of *Chenopodium quinoa* local lesions at seven days post-infection (dpi) with genomic RNA1 + 2 (A–E) or RNA1 + 2 Δ p14 (deletion of the VSR) (F–J), in the presence of RNA3 species able to accumulate ncRNA3 (panels B, D, G, and I) or in the presence of RNA3E species unable to accumulate ncRNA3 (panels C, E, H, and J).

Protoplast infection can be compared to a “one-step growth curve” usually described for bacterial viruses [22]. In this cell-autonomous system, both genomic RNA and p14 protein levels were lower when p25 was expressed (Figure 2B, compare lanes 3 and 5 to lanes 2, 4, and 6). In the absence of p14 (Figure 2B, central panel), replication of RNA3 impaired RNA1 accumulation (Figure 2B, lanes 9–12), and production of ncRNA3 increased RNA2 accumulation, but the CP was only detectable in the absence of p25 (Figure 2B, compare lanes 9 and 10). In the absence of ncRNA3, the CP was below detection limit (Figure 2B, lanes 8, 11, and 12). The behavior of RNA1 + RNA2BA2 mutant in protoplasts was as in leaves, albeit with a lower protein accumulation. The results obtained in protoplasts corroborated those obtained through the analysis of local lesions.

Taken together, these observations on the *C. quinoa* host indicated that RNA3 is able to complement lesion phenotype and to some extent restore viral expression through production of ncRNA.

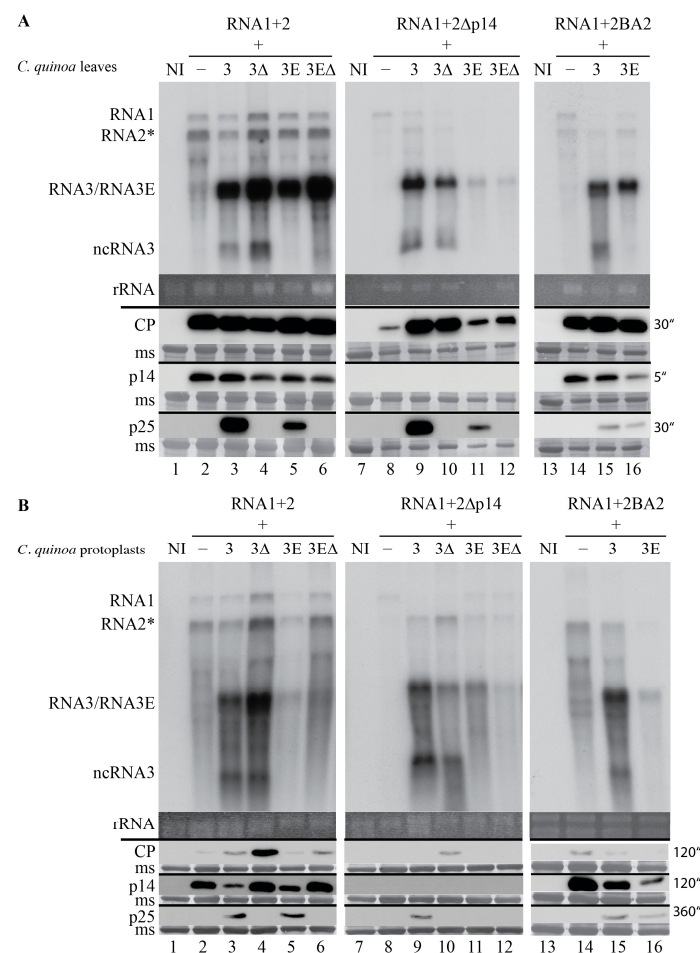


Figure 2. RNAs producing ncRNA3 species partially restore viral RNA and protein accumulation, which is lower in the absence of the p14 VSR or in the presence of the p14BA2 mutant. (A) *C. quinoa* local lesion at 7 dpi and (B) *C. quinoa* protoplast RNA and protein at 40 h post-infection were extracted and analyzed by Northern blot (upper panels) using BNYVV-specific RNA probes, and Western blot (lower panels) using anti-coat protein (CP), anti-p14 and anti-p25 sera. Exposure times for protein detections are indicated. Inoculum consisted of RNA1 + RNA2 (left panels), RNA1 + RNA2Δp14 (middle panels) or RNA1 + RNA2BA2 (right panels) alone (–) or supplemented by wild-type RNA3 (3), RNA3p25null mutant (3Δ) or the same RNA species unable to produce ncRNA3 (3E and 3EΔ). The position of the RNA species is indicated on the left. Ethidium bromide staining of ribosomal RNA (rRNA) and membrane staining (ms) were used as loading controls. Protoplast infection was performed once. Depending on the RNA combination, leaf infections were conducted twice or more and gave comparable results. NI: non-infected.

3.2. The ncRNA3 Promotes Systemic Movement of p14BA2 VSR Mutant in *N. benthamiana*

As stated above, BNYVV systemic movement in *Beta* species requires both RNA2-encoded p14 and RNA3, whereas in *N. benthamiana* RNA3 is dispensable but p14 protein expression remains absolutely required [8]. Since ncRNA3 production was able to complement p14-BA2 VSR mutant in infected cells and tissues, we asked whether the presence of the ncRNA3 could rescue RNA1 + RNA2BA2 long-distance movement [8]. Plants were inoculated with combinations of RNA1 supplemented with WT or RNA2BA2 species alone or combined with RNA3 or RNA3E. Systemic infection was monitored at 21 days post-infection (dpi) by Northern blot analyses performed on total RNAs extracted from upper leaves. Plants infected with RNA1 + RNA2 (namely 12) supplemented with RNA3 (123) or RNA3E (123E) were systemically infected (Figure 3), while RNA1 + RNA2BA2 (namely 12BA2) was not able to move in the absence of ncRNA3 production (Figure 3, 12BA2 and 12BA23E). However, when ncRNA3 was produced, it provided significant complementation of the systemic movement in more than 30% of the plants inoculated with the mutant expressing p14BA2 (Figure 3, 12BA23) ($p < 0.05$, false discovery rate method of Fisher's exact test). When RNA1 + RNA2 Δ p14 was used, no systemic movement was observed even in the presence of RNA3 (data not shown), confirming the absolute requirement of the p14 protein for the long-distance spread of the virus.

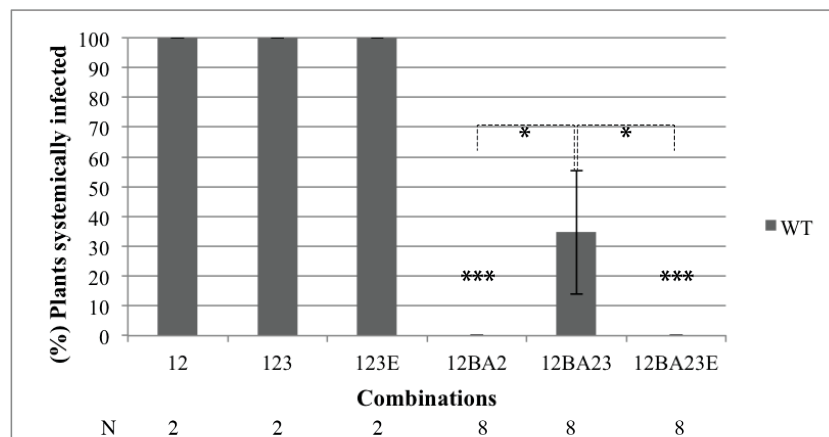


Figure 3. The BNYVV ncRNA3 contributes to systemic movement of the BA2 mutant of the BNYVV VSR. Wild-type (WT) *Nicotiana benthamiana* were infected with RNA1 + 2 (12) or RNA1 + 2BA2 (12BA2) supplemented or not with RNA3 (123, 12BA23) or RNA3E (123E, 12BA23E). Viral RNA detection on upper leaves was performed at 21 dpi. Three independent experiments using specified numbers (N) of plants were performed, and statistical analyses were carried out using Fisher's exact test. The p -values were obtained from the false discovery rate method. * p -value < 0.05 and *** p -value < 0.001 .

3.3. Silencing of *N. benthamiana* RDR6 Allows Systemic Movement of VSR BA2 Mutant Independently of the Presence of RNA3

Since p14 was shown to reduce secondary siRNA production in agroinfiltration patch experiments [8], we wanted to determine whether this protein interferes with RDR6 as presumed previously [23,24]. We thus applied inocula of RNA1 supplemented with RNA2 or RNA2BA2 in the presence of RNA3 or RNA3E to RDR6 knockdown plants (RDR6i) and monitored systemic infection. *N. benthamiana* RDR6i plants were inoculated and analyzed similarly as described above. RNA1 + RNA2 Δ p14 was not able to move in RDR6i upper leaves, even in the presence of RNA3 (data not shown). Interestingly, all viral RNA combinations were able to move independently of the presence of RNA3 (Figure 4). Statistical analyses using Fisher's exact test and false discovery rate did not highlight significant differences between the inocula (p -value > 0.05), even if the presence of RNA3 slightly increased the systemic infection. We concluded from this experiment that the knockdown of RDR6 complemented p14BA2 long-distance movement deficiency. Taken together, the results obtained

using WT and RDR6i plants indicated a functional role of ncRNA3 on the BNYVV VSR as the presence of RNA3 complemented partially the VSR mutant (compare Figures 3 and 4, 12BA2 and 12BA23). This also suggests that p14 inhibits the effect of the RDR6 pathway, presumably by acting on the production or systemic movement of secondary siRNAs as stated above.

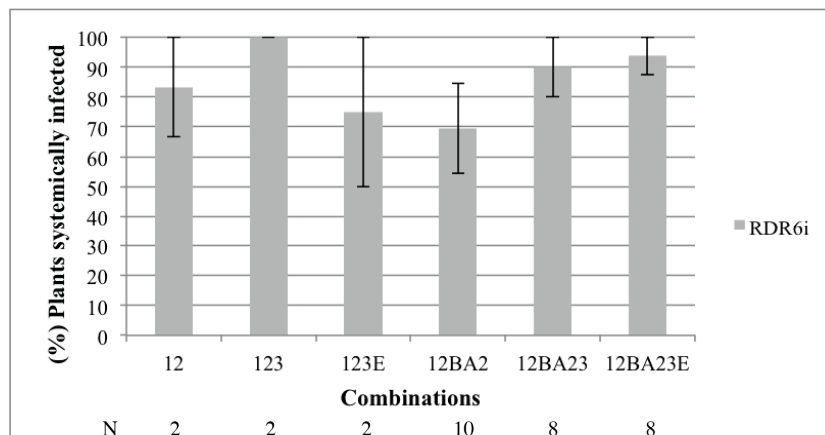


Figure 4. Systemic movement of BNYVV expressing BA2 p14 mutant is restored by a RNA-dependent RNA polymerase 6 knockdown (RDR6i). RDR6i *Nicotiana benthamiana* were infected with RNA1 + 2 (12) or RNA1 + 2BA2 (12BA2) supplemented or not with RNA3 (123, 12BA23) or RNA3E (123E, 12BA23E). Viral RNA detection on upper leaves was performed at 21 dpi. Three independent experiments using specified numbers (N) of plants were performed, and statistical analyses were carried out using Fisher's exact test.

3.4. BNYVV p14 Inhibits the Systemic Spread of RNA Silencing

Agroinfiltration patch tests suggested that p14 could inhibit intercellular silencing signaling (this study and [8]) similarly to tombusvirus p19 [25]. The expression of p14 in the patches peaked 4–5 days post-agroinfiltration (dpa) and then decreased rapidly. As shown in Figure 5, the p14 mRNA was not detectable, while p14-specific siRNAs were found. The GFP mRNA was detected at 5 dpa but disappeared at 10 dpa when GFP siRNAs appeared (Figure 5A, p14, lanes 1–2). In the absence of p14, GFP siRNAs were detected at 5 and 10 dpa (Figure 5B, lanes 21–22). GFP mRNA was only detected at 5 dpa (Figure 5B, lane 21). When the p14BA2 mutant was expressed, reduced accumulation of GFP mRNA and higher amounts of GFP siRNAs were detected at 5 dpa, and the p14BA2 protein was below the detection limit (Figure 5B, BA2, lanes 11–12).

p14 is not stable when expressed outside its viral context [8], and its accumulation decreases rapidly (Figure 5A, lanes 1–2). Therefore, we concluded that this transient expression system does not reflect the situation occurring during genuine viral infection. Indeed, during infection, p14 is constitutively expressed. To stabilize p14 mRNA in infiltrated tissues, we decided to co-express p14 in combination with polerovirus P0, a VSR that acts by inducing degradation of Argonaute proteins and does not inhibit the movement of siRNAs [7,26,27]. Using this approach, p14 and p14BA2 protein expression lingered for 10 days (Figure 5A,B, bottom). This was due to the stabilization of the mRNAs (Figure 5A, lanes 3–10 and Figure 5B, lanes 13–20). At 5 dpa, low amounts of anti-GFP and anti-p14 siRNAs were found in the patches but started to accumulate at 10 dpa (Figure 5A, p14 + P0, lanes 3–10); the same observations were made with the p14BA2 mutant (Figure 5B, BA2 + P0, lanes 13–20). Therefore, co-expression of these VSRs did not interfere with the effect of p14, p14BA2, or P0 on the reduction of siRNAs (Figure 5) or secondary siRNA production (data not shown). We concluded that the expression of P0 was able to grant continuous production of p14 under transient expression conditions.

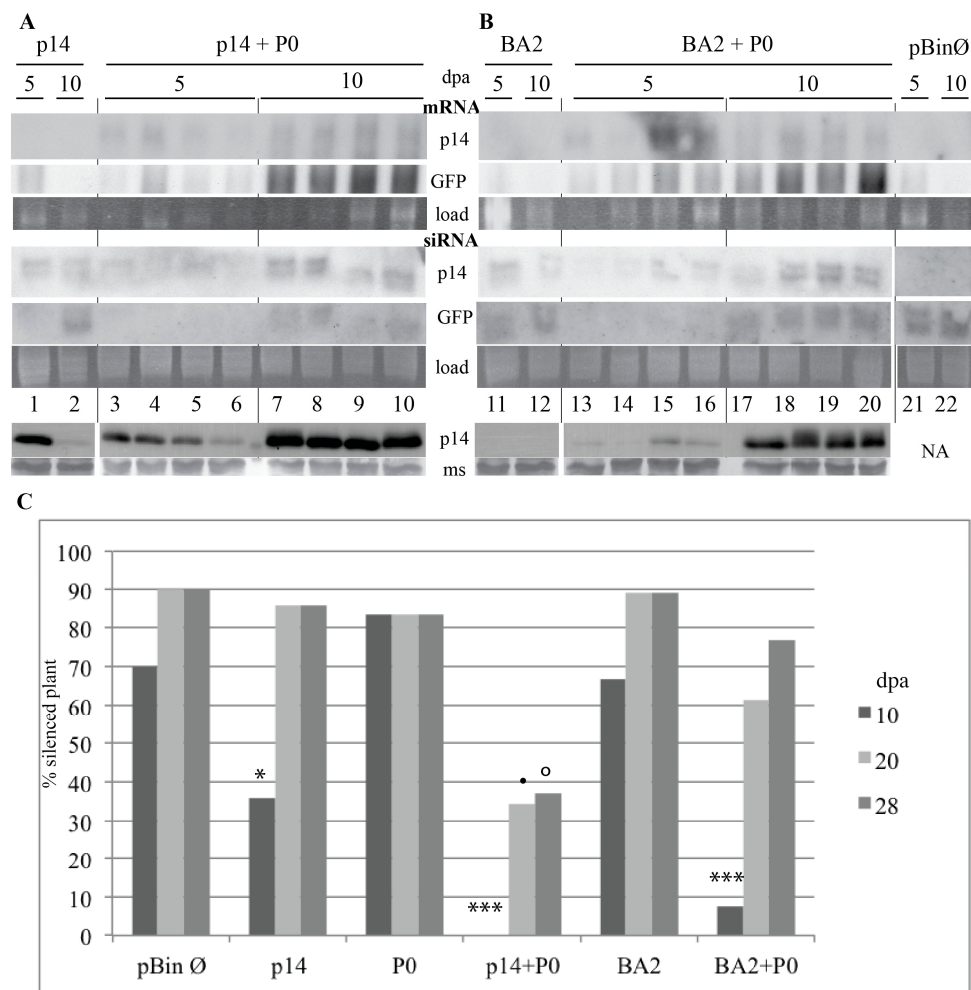


Figure 5. Stabilization of BNYVV VSR ectopic expression reveals its inhibitory effect on systemic movement of RNA silencing in *N. benthamiana* 16C. The expression of p14 in patch tests leads to poor expression, while their co-expression with P0 stabilizes the mRNA and maintains p14 protein function. Plants were infiltrated with a mixture of *Agrobacterium tumefaciens* bacteria carrying a binary vector allowing the expression of the GFP trigger and p14 (**A**) or its mutant BA2 (**B**) alone (lanes 1–2 and 11–12, respectively) or with turnip yellows virus P0 (p14 + P0, lanes 3–10; BA2, lanes 13–20) or in the presence of the empty vector (**B**, pBinØ lanes 21–22). Individual patches were collected at 5 and 10 days post-agroinfiltration (dpa) from infiltrated areas. p14, BA2, and GFP mRNA (upper panels) and siRNA accumulations (middle panels) were tested via Northern blot. p14 and BA2 were detected via Western blot (lower panels). Total proteins were visualized by membrane staining (ms). Spaces between lanes 6–7 and 16–17 correspond to molecular weight markers positions. RNA loading is visualized by ethidium bromide staining (load); (**C**) The histogram represents the percentage of plants systemically silenced for each combination. The systemic movement of RNA silencing was assessed under an ultraviolet (UV) lamp using plants infiltrated with empty vector (Ø, 4 experiments, 10 plants) as a control after 10, 21, and 28 days. Systemic silencing was delayed in the presence of p14 + P0 (4 experiments, 25 plants) and started to appear for some of the plants at 20 dpa and thus differed from p14 (4 experiments, 12 plants) or P0 (3 experiments, 9 plants) alone (p14 + P0, 20 dpa; p -value < 0.05). The stabilization of p14BA2 (3 experiments, 13 plants) decreased systemic silencing compared with BA2 (3 experiments, 9 plants) or P0 alone, and few plants started to present systemic silencing after 10 days (BA2 + P0, 10 dpa; p -value < 0.001). After 20 days, systemic silencing was as the controls (BA2 + P0, 20/28 dpa; p -values > 0.3 compared with P0 or BA2 alone). Statistical analyses were performed using Fisher's exact test. The p -values were obtained using the false discovery rate method. (*, •, and o correspond to 10, 20, and 28 dpa, respectively). p -value < 0.05 and *** p -value < 0.001. NA: not applicable.

We evaluated the movement of the silencing signal on 16C plants infiltrated with different combinations of *A. tumefaciens* strains containing binary vectors expressing the GFP trigger, an empty vector, and a vector encoding the VSR (p19, P0, p14, or p14BA2). We monitored GFP fluorescence of the patch and of upper leaves for 28 days (data not shown) as described [27]. Ten days after agroinfiltration, we observed a red fluorescent area around the agroinfiltrated patch, indicating the spread of RNA silencing from the agroinfiltrated cells into non-agroinfiltrated cells when the empty binary vector, or a vector expressing P0 or p14BA2, was used. Systemic silencing was delayed when p14 was present (Figure 5C, p14, 10 dpa; p -value < 0.05) and was suppressed in the presence of p19 (data not shown) as described [25]. Thus, unlike p19, neither p14 nor P0 suppressed systemic silencing signaling. Interestingly, the red area around infiltration patches seen at 5 dpa was absent when both p14 and P0 proteins were expressed together (data not shown) and subsequent systemic movement of silencing was delayed (Figure 5C, p14 + P0, 10 dpa; p -value < 0.001 and 20/28 dpa; p -value < 0.05). Taken together, these results indicate that p14 is able to interfere with the production or with the movement of the silencing signal when its expression is stabilized.

4. Discussion

The BNYVV RNA3 “core” and particularly the 20-nt coremin motif are RNA sequences required for ncRNA3 accumulation and the systemic spread of the virus in *B. macrocarpa* species [12–14]. The coremin motif resides in the RNA3 core sequence and is involved in stalling exoribonucleases (5′-3′ exoribonuclease 1 (Xrn1) and exoribonuclease 4 (XRN4) in yeast and Xrn1 in vitro) that lead to the production of ncRNA3 [28]. The BNYVV p14 VSR protein expression is also essential for the systemic spread of the virus in *Beta* species and in *N. benthamiana* [8], although in this latter host, the presence of RNA3 is not required for long-distance movement. In the absence of a functional VSR, no complementation of the systemic spread by ncRNA3 is observed. This indicates that either p14 and ncRNA3 act on separate pathways of the RNAi machinery or the strength of ncRNA3 suppression of RNA silencing alone is not sufficient. In such a situation, BNYVV fails to counteract the plant defense silencing machinery and the viral infection remains limited to small necrotic lesions. BNYVV encoding the BA2 mutant of p14 produces small local lesions with a necrotic center in *C. quinoa* and fails to move systemically in *N. benthamiana* [8]. Partial complementation of this local lesion phenotype was observed when RNA3 species able to produce ncRNA3 were used (as shown in Figure 1 for p14-null mutant), since ncRNA3 increased the levels of genomic RNAs and viral proteins particularly for the BA2 mutant (Figure 2). Consequently, the presence of p14 or ncRNA3 increases viral amplification in local tissues. The synergistic effect of ncRNA3 on silencing suppression mediated by p14 was confirmed through complementation of the BA2 mutant by ncRNA3-producing species (Figure 3). We conclude that ncRNA3 acts as a second VSR. Production of ncRNA3 alleviated viral restriction of the BA2 mutant (that fails to inhibit secondary siRNA production [8]) within primary infected cells, probably through direct or indirect suppression of RNA silencing. As secondary siRNAs are the product of RDR6-mediated transitivity [1,2], we tested the systemic spread of RNA1 + RNA2BA2 mutant in *N. benthamiana* RDR6-silenced plants. In a RDR6i host, the RNA1 + RNA2BA2 mutant was able to move to the distal part of the plant even in the absence of ncRNA3 (Figure 4). From these experiments, we conclude that p14 affects the RDR6 pathway, as does tomato chlorosis virus p22 VSR [29], and that ncRNA3 plays a role in this mechanism.

BNYVV infection of GFP-silenced *N. benthamiana* 16C restores the expression of the GFP protein in the infected tissues [8]. However, patch test experiments involving p14 and p14BA2 ectopic expression, because of impaired accumulation of these proteins, did not reveal efficient inhibition of siRNA systemic movement by p14 (Figure 5). This ectopic expression profile is far from the accumulation levels of p14 during infection. We stabilized p14 expression in the presence of TuYV-encoded P0 VSR, which does not interfere with siRNA systemic spread [26,27]. This approach allowed us to clearly demonstrate that p14 is able to block the systemic movement of siRNAs (Figure 5).

Taken together, our previous analyses [8], and these results demonstrate the high efficiency of BNYVV p14 in blocking secondary siRNAs production via the RDR6 pathway. However, the role of ncRNA3 has not been thoroughly assessed. This ncRNA is produced in the absence of RNA3 replication [13] as does red clover necrotic mosaic virus small RNA derived from RNA1 (SR1f RNA) [30] by the action of 5' to 3' exoribonuclease [28] as described for subgenomic flavivirus RNAs (sfRNAs) [31]. Interestingly, ncRNA3, as sfRNAs, does not interfere with viral RNA amplification but increases viral pathogenicity and inhibits RNA interference (RNAi) [31,32]. Moreover, other viral long ncRNA involved in the inhibition of the silencing machinery have been described for adenoviruses virus-associated RNAs (VA-RNAs) [33] and plant viruses [4–6]. These ncRNA species modulate cellular or viral translation or accumulation efficiencies by highjacking cellular proteins to prevent their function, as reviewed in [6].

5. Conclusions

BNYVV long-distance movement requires effective expression of its p14 VSR, which is in turn enhanced by the accumulation of ncRNA during the infection. BNYVV p14 acts on RDR6-dependent transitivity, while ncRNA3 accumulation acts as a second VSR that directly or indirectly targets the silencing machinery. Considering the link between the exoribonuclease (Xrn) requirement for the production of ncRNA3 and its synergistic effect on the p14BA2 mutant, a clear evolutionary role could be assigned to the viral ncRNAs produced to modulate antiviral host responses, a situation not unique to BNYVV, as stated above. Further experiments will aim to identify the cellular factors bound to ncRNA3 and p14. However, as *A. thaliana* is not a host for BNYVV and no genetic tool is yet available for *Beta* species or *N. benthamiana* to set up screens, conventional biochemistry approaches will be needed to further investigate these viral effectors, which act both on the suppression of RNA silencing and on viral systemic movement.

Acknowledgments: A.F. was supported by a French ministry Ph.D. grant. The authors thank David Baulcombe (University of Cambridge, Cambridge, UK) for the *N. benthamiana* RDR6i line. Authors are grateful to Timothée Vincent (Université de Strasbourg, France) for his help with statistical analyses and to Manfred Heinlein (Université de Strasbourg, France) and Marco Incarbone (Université de Strasbourg, France) for their help in English language editing.

Author Contributions: A.F., K.H., S.B., C.R., and D.G. conceived and designed the experiments; A.F., K.H., E.K., and S.B. performed the experiments; A.F., S.B., C.R., and D.G. analyzed the data; D.G. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest and precise that E.K. is employee of SESVanderHave and provided help in the small RNA assays. SESVanderHave had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Incarbone, M.; Dunoyer, P. RNA silencing and its suppression: Novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci.* **2013**, *18*, 382–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ding, S.W.; Voinnet, O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **2007**, *130*, 413–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mermigka, G.; Verret, F.; Kalantidis, K. RNA silencing movement in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **2016**, *58*, 328–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Blevins, T.; Rajeswaran, R.; Aregger, M.; Borah, B.K.; Schepetilnikov, M.; Baerlocher, L.; Farinelli, L.; Meins, F.; Hohn, T.; Pooggin, M.M. Massive production of small RNAs from a non-coding region of cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5003–5014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hohn, T. RNA based viral silencing suppression in plant pararetroviruses. *Front Plant Sci.* **2015**, *6*, 398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Miller, W.A.; Shen, R.; Staplin, W.; Kanodia, P. Noncoding RNAs of plant viruses and viroids: Sponges of host translation and RNA interference machinery. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2016**, *29*, 156–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Derrien, B.; Baumberger, N.; Schepetilnikov, M.; Viotti, C.; De Cillia, J.; Ziegler-Graff, V.; Isono, E.; Schumacher, K.; Genschik, P. Degradation of the antiviral component argonaute1 by the autophagy pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 15942–15946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Chiba, S.; Hleibieh, K.; Delbianco, A.; Klein, E.; Ratti, C.; Ziegler-Graff, V.; Bouzoubaa, S.; Gilmer, D. The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLs basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2013**, *26*, 168–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Gilmer, D.; Ratti, C. Benyvirus. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., Eds.; Elsevier: San Diego, CA, USA, 2012; pp. 1133–1138.
10. Jupin, I.; Guilley, H.; Richards, K.E.; Jonard, G. Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J.* **1992**, *11*, 479–488. [[PubMed](#)]
11. Peltier, C.; Schmidlin, L.; Klein, E.; Taconnat, L.; Prinsen, E.; Erhardt, M.; Heintz, D.; Weyens, G.; Lefebvre, M.; Renou, J.P.; et al. Expression of the Beet necrotic yellow vein virus p25 protein induces hormonal changes and a root branching phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Res.* **2011**, *20*, 443–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lauber, E.; Guilley, H.; Tamada, T.; Richards, K.E.; Jonard, G. Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J. Gen. Virol.* **1998**, *79*, 385–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Peltier, C.; Klein, E.; Hleibieh, K.; D'Alonzo, M.; Hammann, P.; Bouzoubaa, S.; Ratti, C.; Gilmer, D. Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 1093–1102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ratti, C.; Hleibieh, K.; Bianchi, L.; Schirmer, A.; Autonell, C.R.; Gilmer, D. Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in *Beta macrocarpa*. *Virology* **2009**, *385*, 392–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Quillet, L.; Guilley, H.; Jonard, G.; Richards, K. In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* **1989**, *172*, 293–301. [[PubMed](#)]
16. Schwach, F.; Vaistij, F.E.; Jones, L.; Baulcombe, D.C. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.* **2005**, *138*, 1842–1852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Guilley, H.; Bortolamiol, D.; Jonard, G.; Bouzoubaa, S.; Ziegler-Graff, V. Rapid screening of RNA silencing suppressors by using a recombinant virus derived from beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 2536–2541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Klein, E.; Link, D.; Schirmer, A.; Erhardt, M.; Gilmer, D. Sequence variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res.* **2007**, *126*, 53–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Veidt, I.; Bouzoubaa, S.E.; Leiser, R.M.; Ziegler-Graff, V.; Guilley, H.; Richards, K.; Jonard, G. Synthesis of full-length transcripts of beet western yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology* **1992**, *186*, 192–200. [[CrossRef](#)]
20. Jupin, I.; Bouzoubaa, S.; Richards, K.; Jonard, G.; Guilley, H. Multiplication of beet necrotic yellow vein virus RNA 3 lacking a 3' poly(A) tail is accompanied by reappearance of the poly(A) tail and a novel short U-rich tract preceding it. *Virology* **1990**, *178*, 281–284. [[CrossRef](#)]
21. Kozłowska-Makulska, A.; Guilley, H.; Szyndel, M.S.; Beuve, M.; Lemaire, O.; Herrbach, E.; Bouzoubaa, S. P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 1082–1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ellis, E.L.; Delbruck, M. The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **1939**, *22*, 365–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhang, L.; Wang, X.; Li, D.; Han, C.; Zhai, Y.; Yu, J. Two virus-encoded RNA silencing suppressors, p14 of beet necrotic yellow vein virus and s6 of rice black streak dwarf virus. *Chin. Sci. Bull.* **2005**, *50*, 305–310.
24. Wang, X.B.; Wu, Q.; Ito, T.; Cillo, F.; Li, W.X.; Chen, X.; Yu, J.L.; Ding, S.W. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 484–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Silhavy, D.; Molnar, A.; Lucioli, A.; Szittyá, G.; Hornyik, C.; Tavazza, M.; Burgyan, J. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* **2002**, *21*, 3070–3080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Baumberger, N.; Tsai, C.H.; Lie, M.; Havecker, E.; Baulcombe, D.C. The polerovirus silencing suppressor p0 targets argonaute proteins for degradation. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 1609–1614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pfeffer, S.; Dunoyer, P.; Heim, F.; Richards, K.E.; Jonard, G.; Ziegler-Graff, V. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* **2002**, *76*, 6815–6824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Flobinus, A.; Chevigny, N.; Seissler, T.; Klein, E.; Bleykasten-Grosshans, C.; Ratti, C.; Bouzoubaa, A.; Gilmer, D. Benyvirus noncoding RNA production depends on an XRN activity. *J. Gen. Virol.* Unpublished, In revision.
29. Landeo-Rios, Y.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Canizares, M.C. The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus Tomato chlorosis virus preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage. *Virology* **2016**, *488*, 129–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Iwakawa, H.O.; Mizumoto, H.; Nagano, H.; Imoto, Y.; Takigawa, K.; Sarawaneeyaruk, S.; Kaido, M.; Mise, K.; Okuno, T. A viral noncoding RNA generated by *cis*-element-mediated protection against 5'→3' RNA decay represses both cap-independent and cap-dependent translation. *J. Virol.* **2008**, *82*, 10162–10174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Pijlman, G.P.; Funk, A.; Kondratieva, N.; Leung, J.; Torres, S.; van der Aa, L.; Liu, W.J.; Palmenberg, A.C.; Shi, P.Y.; Hall, R.A.; et al. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* **2008**, *4*, 579–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Schnettler, E.; Sterken, M.G.; Leung, J.Y.; Metz, S.W.; Geertsema, C.; Goldbach, R.W.; Vlak, J.M.; Kohl, A.; Khromykh, A.A.; Pijlman, G.P. Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and mammalian cells. *J. Virol.* **2012**, *86*, 13486–13500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Andersson, M.G.; Haasnoot, P.C.; Xu, N.; Berenjian, S.; Berkhout, B.; Akusjarvi, G. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J. Virol.* **2005**, *79*, 9556–9565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conclusion Générale & Perspectives

Conclusion générale et Perspectives

Les résultats présentés dans les chapitres précédents concernent le mécanisme de production de l'ARN non codant issu de l'ARN3 viral, ainsi que le mécanisme d'action du suppresseur de *RNA silencing* p14, tous deux impliqués dans le mouvement systémique du BNYVV.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés au mécanisme de dégradation de l'ARN3 donnant naissance au ncRNA3 et à sa répercussion sur le mouvement à longue distance du BNYVV. Grâce à l'expression de l'ARN3 viral dans *S. cerevisiae* et à l'utilisation de mutants de levure, l'exoribonucléase Xrn1 a été identifiée comme étant l'enzyme responsable du processus de dégradation 5'→3' de l'ARN3. En effet, nos expériences de complémentation de mutant FY4Δ*xrn1* par un plasmide navette dirigeant l'expression de Xrn1, ont confirmé le rôle de Xrn1 dans la maturation de l'ARN3 puisque la même expérience conduite avec un mutant catalytique de Xrn1 est sans effet. De la même manière, nous avons pu relier la production de ncRNA3 à l'action de l'enzyme XRN4, provenant d'*A. thaliana*, qui complémente la déficience de la levure pour l'enzyme Xrn1. Cette approche translationnelle suggère que cet orthologue est responsable de la dégradation de l'ARN3 viral *in planta*. Tous les ncRNA3 produits dans la levure exprimant Xrn1 ou XRN4 présentent une extrémité 5' terminale identique à celle retrouvée en contexte viral. Qui plus est, l'expression de l'ARN3E, muté dans la séquence « coremin », n'accumule aucun ncRNA3 dans les levures, quelle que soit l'exoribonucléase exprimée. L'ensemble de ces résultats suggère le blocage de la progression de l'exoribonucléase par une structure tertiaire de l'ARN3.

Les flavivirus accumulent un ARN non codant (sfRNA) *via* l'inhibition de l'activité de Xrn1, de façon structure dépendante (Pijlman *et al.*, 2008, Funk *et al.*, 2010, Moon *et al.*, 2012, Chapman *et al.*, 2014a). En nous basant sur les études réalisées chez les flavivirus, nous avons étudié l'effet de la présence de la séquence « coremin » sur l'activité de Xrn1 *in vitro*. D'une part, nous avons pu confirmer que l'exoribonucléase Xrn1 seule, était impliquée dans l'accumulation de ncRNA3 suite au blocage de sa progression par une structure indéterminée impliquant « coremin ». D'autre part, contrairement à la situation observée pour les flavivirus, nous avons constaté une faible inhibition de l'activité de Xrn1 par le ncRNA3. Si l'activité de Xrn1 est faiblement diminuée par le ncRNA3 *in vitro*, nous ne pouvons pas exclure qu'*in vivo*, lors de l'infection virale, l'activité de XRN4 soit plus fortement inhibée.

Chez les flavivirus, la structure responsable de l'inhibition de Xrn1 est parfaitement décrite (Chapman *et al.*, 2014a, Chapman *et al.*, 2014b). La structure de l'ARN3 du BNYVV capable de bloquer l'exoribonucléase reste à déterminer. Des expériences préliminaires visant à caractériser les réactivités des nucléotides présents en 5' du ncRNA3 ont été initiées par Nicolas Chevigny en utilisant la méthode SHAPE (*selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*). Les résultats préliminaires obtenus ne permettent pas de définir précisément la structure responsable de la résistance à Xrn1, mais, suggèrent que cette structure se forme lors de la dégradation de l'ARN3. De plus, elle serait comprise dans les 50 premiers nucléotides de ncRNA3. En effet, l'utilisation de constructions dirigeant l'expression de transcrits raccourcis en aval du motif « coremin » permet de déterminer qu'une séquence de 74 nt est suffisante pour bloquer Xrn1 et former le ncRNA3. Cette séquence prend en compte les 50 premiers nucléotides de ncRNA3, ce qui reste cohérent avec les résultats précédents. Aussi, un clone synthétique possédant la séquence de 74 nt bordée par deux ribozymes a été construit pour produire le ncRNA3 en grande quantité et initier l'étude cristallographique comme dans le cas des flavivirus (Chapman *et al.*, 2014a).

La séquence « coremin » ou la production du ncRNA3 est indispensable au mouvement systémique du BNYVV chez l'hôte *B. macrocarpa* (Ratti *et al.*, 2009). Cependant, nous ne savons pas si c'est la séquence nucléotidique « coremin » *per se* ou bien le blocage de XRN4 et l'accumulation de ncRNA3 qui sont impliqués dans la systémie du virus. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé des clones chimériques de l'ARN3 dans lesquels la séquence « core » (contenant « coremin ») a été remplacée par la séquence sauvage ou mutée des flavivirus (ARN3sf et ARN3pk1, respectivement), responsable de la formation de sfRNA (Funk *et al.*, 2010). Ces clones dirigent l'accumulation d'un ARN non codant chimérique de taille attendue *in vivo*, dans la levure et *in vitro*. La structure adoptée par la séquence de flavivirus dans l'ARN3sf semble incompatible avec la réplication de l'ARN puisqu'il n'est pas amplifié en présence des ARN1 et 2. En revanche, l'ARN3pk1 est capable d'être répliqué en contexte viral, mais plus faiblement que l'ARN3. Si l'expression ectopique de l'ARN3pk1 produit un ARN non codant de taille attendue dans la levure complémentée par XRN4, il n'en est rien en contexte viral. Cette construction est incapable d'apporter la fonction de mouvement systémique dans *B. macrocarpa*, ce qui pourrait être lié à sa faible accumulation. Cependant, certains mutants d'ARN3, toujours capables d'accumuler le ncRNA3, apparaissent faiblement répliqués et assurent tout de même l'infection systémique chez l'hôte *B. macrocarpa* (Lauber *et al.*, 1998). Ainsi, l'absence de systémie pourrait

s'expliquer par l'absence d'accumulation de ncRNA3pk1 ou l'absence d'inhibition de XRN4, *in planta*. Les données actuelles ne nous permettent donc pas de conclure sur l'élément responsable du mouvement systémique du BNYVV. Néanmoins, il est nécessaire de rappeler la complémentation effective du mouvement systémique par l'ARN3 du BSBMV qui implique le rôle direct de « coremin » dans le mouvement à longue distance (Ratti *et al.*, 2009). Ces ARN3 de benyvirus sont tous deux capables de produire un ncRNA3 (Peltier *et al.*, 2012). Ces ARN génomiques diffèrent par leurs séquences, mais possèdent des structures terminales comparables. Il est possible que des interactions à longue distance impliquant « coremin » soient nécessaires à la fonction de mouvement systémique. De telles interactions seraient perdues sur la construction chimérique. Par conséquent, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour élucider le mécanisme d'action intime de « coremin ». L'utilisation de virus chimériques incapables d'induire un mouvement à longue distance sur *B. macrocarpa*, combinée à des expériences de gain de fonction pourrait permettre de caractériser les éléments responsables du transport viral à longue distance.

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes focalisés sur l'implication de l'ARN3 et de la protéine p14 dans la systémie du virus et sur le mécanisme d'action de la protéine p14. La protéine p14, suppresseur de *RNA silencing* est le second élément indispensable au mouvement systémique du BNYVV (Chiba *et al.*, 2013). Durant sa thèse, K. Hleibieh a recherché, par une approche triple-hybride, si l'une ou l'autre des protéines du BNYVV était capable d'interagir avec la séquence d'ARN « coremin ». Il a pu ainsi démontrer que seule la protéine p14 était capable d'interagir spécifiquement avec la séquence « coremin » et non avec la séquence complémentaire inversée (nimeroc) ou des structures d'ARN hétérologues utilisées comme contrôles négatifs et positifs. Suite à cela, K. Hleibieh s'est intéressé à l'effet de cette interaction à la fois dans l'infection locale chez *C. quinoa* et dans l'infection systémique chez *N. benthamiana*. Pour cela, il a utilisé des combinaisons de transcrits infectieux capables ou non de produire la protéine p14 avec des ARN3 possédant ou pas « coremin ». J'ai pu confirmer les résultats préliminaires décrits initialement par K. Hleibieh, en effectuant une analyse plus statistique. Ainsi, grâce à la production de ncRNA3, l'ARN3, complémente partiellement le phénotype lié à l'absence de la protéine p14 ou de son mutant allélique BA2 chez *C. quinoa*. Cette complémentation est également génétique, puisque le niveau d'accumulation des ARN viraux se rapproche de ceux trouvés en présence du VSR. Enfin, l'ARN3 complémente le mouvement systémique du mutant allélique BA2 incapable de produire seul l'infection à longue distance chez *N. benthamiana* (ibid). Parmi les mutants

alléliques de p14, BA2 est le seul mutant capable d'interagir avec la séquence « coremin ». Toutefois, les mutants alléliques BA1 et BA3 ont perdu leur capacité d'interaction avec « coremin » (dans la levure) mais restent capables de systémie sur *N. benthamiana* en absence d'ARN3 (ibid). Ces résultats ne permettent donc pas de conclure quant au rôle de l'interaction de la protéine p14 avec la séquence « coremin » sur le mouvement systémique. Ces données nous orientent vers l'hypothèse d'un effet synergique de l'action de l'ARN3 et de la protéine p14 pour l'établissement du mouvement systémique. Selon l'hôte, seule la protéine p14 peut suffire, comme par exemple pour *N. benthamiana*, ou alors les deux éléments sont requis, comme par exemple pour *B. macrocarpa*.

La protéine p14 étant autonome pour la mise en place de la systémie chez *N. benthamiana*, nous avons poursuivi la caractérisation de sa fonction VSR qui, rappelons-le, conduit à une réduction des siRNA secondaires (Chiba *et al.*, 2013). L'utilisation de plantes *N. benthamiana* RDR6i, a permis de mettre en avant un éventuel effet du VSR p14 sur RDR6, puisque le mutant BA2, incapable d'établir une infection systémique chez *N. benthamiana*, permet la mise en place de la systémie du BNYVV. Nous avons recherché si la protéine p14 était capable d'interagir avec la protéine RDR6. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine RDR6 étiquetée. Les résultats obtenus ne sont pas interprétables puisque la protéine p14 est retrouvée dans tous les éluats y compris dans les contrôles effectués (GUS-HA et p14 seule). Une autre approche, visant à immunocapturer directement la protéine p14, sera entreprise pour rechercher la présence d'ARN et de protéines associées à ce VSR, puis à ses versions alléliques.

La protéine p14 était décrite comme étant incapable de bloquer le signal systémique de *RNA silencing*. Les travaux de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2005) semblent indiquer un effet sur la progression du signal. Nous avons donc revisité les expériences et constaté que l'expression ectopique du VSR chute rapidement dans les plantes infiltrées. Cette chute d'expression est liée à l'instabilité du messager de p14. Pour stabiliser ce messager, nous avons co-exprimé le VSR p14 avec la protéine P0 du TuYV, caractérisée comme un VSR incapable d'affecter le mouvement des siRNA (Baumberger *et al.*, 2007). Dans ces conditions, nos résultats indiquent clairement l'inhibition significative du mouvement systémique du *RNA silencing* par la protéine p14. Les études d'immunocapture de p14 décrites ci-dessus pourront nous permettre de déterminer si le VSR du BNYVV est capable d'interagir avec les siRNA.

Si certains aspects de la biologie du BNYVV ont pu être précisés au cours de cette thèse, de nombreuses questions restent en suspens et pourront être abordées comme décrit ci-dessous.

Le ncRNA3 a-t-il une action sur l'activité de XRN4 *in planta* ? XRN4 est responsable de la dégradation des ARNm dépourvus de coiffe (cf. Introduction, partie I, paragraphe 1.2.1.1). L'analyse de l'accumulation des ARNm non coiffés de *N. benthamiana* au cours de l'infection par le BNYVV possédant un ARN3 sauvage ou muté peut être entreprise par la technique du RNA-seq (NGS, *Next-generation sequencing*) (Wang *et al.*, 2009). La présence du ncRNA3 pourrait être ainsi corrélée à une variation d'une accumulation d'ARNm non dégradés, cibles de XRN4, traduisant son effet inhibiteur sur la fonction de l'enzyme. Une approche RT-qPCR sera nécessaire pour confirmer les résultats obtenus. Parallèlement, l'utilisation de la version allélique de p14 (BA2) pourrait permettre de mettre en évidence l'effet synergique des deux éléments viraux sans pour autant conclure sur le mécanisme intime de la synergie.

Une inhibition de XRN4 affecte-t-elle le mouvement à longue distance du BNYVV chez *N. benthamiana* ? La technique du VIGS (*virus-induced gene silencing*) couramment utilisée chez *N. benthamiana* se base sur l'interférence par l'ARN pour étudier la fonction d'un gène d'intérêt suite à son extinction post-transcriptionnelle (Lu *et al.*, 2003). Durant sa thèse, Claire Peltier a tenté, sans succès, de mettre en évidence un rôle de XRN4 dans le processus de dégradation de l'ARN3 du BNYVV en utilisant une approche VIGS assurée par le réplicon5 comportant une séquence dérivée du messenger codant XRN4. Aucune extinction du messenger n'a pu être visualisée, tout comme pour le contrôle exprimant la séquence PDS (*phytoene desaturase*). Comme l'approche VIGS ne semble pas fonctionner pour les benyvirus, pour réduire l'expression de XRN4, C. Peltier a exprimé transitoirement une séquence double brin (« *hairpin* ») induisant la production de siRNA dirigés contre les ARNm codant XRN4 avant d'infecter les tissus infiltrés par le BNYVV. Ici encore, cette approche n'a pas permis de conclure quant au rôle de XRN4 dans le processus de dégradation de l'ARN3 *in planta* et les résultats n'étaient pas reproductibles d'une plante à l'autre (Peltier, 2010). Aussi, je vais utiliser l'approche décrite par Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2015) pour induire un VIGS de XRN4 chez *N. benthamiana* grâce à l'infection des plantes par le tobacco rattle virus (TRV) recombinant porteur d'un fragment du gène *xrn4*. Les plantes seront ensuite infectées par le BNYVV sauvage ou par le mutant allélique BA2 complémenté ou non par l'ARN3 ou l'ARN3E. Comme contrôle, j'utiliserai une version TRV comportant la séquence de PDS pour visualiser la progression du *RNA silencing* dans les plantes contrôles.

Est-il possible de distinguer le rôle de la séquence « coremin » de celui du ncRNA3 dans le mouvement systémique du BNYVV ? Durant sa thèse, Claire Peltier a poursuivi les travaux de Balmori *et al.* (Balmori *et al.*, 1993) et étudié le rôle de l'insertion d'une seconde séquence « core » au milieu de la séquence de l'ARN3 ou de l'ARN3E. Puis elle a recherché l'effet de cette insertion sur la production de ncRNA et sur le mouvement systémique dans *B. macrocarpa*. Ses résultats semblent indiquer l'importance de la position de la séquence « core » pour le mouvement à longue distance du virus (Peltier, 2010). La position de « coremin » à l'extrémité 3' UTR de l'ARN5 conforte également ce résultat puisque les plantes infectées par un virus renfermant les ARN1, 2 et l'ARN5 ne présentent des symptômes de systémie que pour 5 % des plantes inoculées (Peltier *et al.*, 2012).

Aussi, j'ai entrepris le clonage de « coremin » (20 nt) et d'un domaine de 74 nt renfermant « coremin » dans le réplicon dérivé de l'ARN3, dans l'ARN3pk1 et dans l'ARN3 muté dans la séquence « coremin » (mutant K, (Peltier *et al.*, 2012)). L'apport de la séquence de 20 ou 74 nt en amont ou en aval du domaine sfRNA3pk1 ou dans l'ARN3K devrait permettre de produire des nouveaux ncRNA renfermant ou non « coremin ». Le rôle de ces nouveaux ncRNA dans le mouvement systémique sera étudié.

Le ncRNA3 peut-il interférer avec le *RNA silencing* ? L'ARN3 complémente la fonction de suppresseur de *RNA silencing* du mutant BA2 chez *N. benthamiana*. Ceci laisse à penser que le ncRNA3 peut également se comporter comme un suppresseur de *RNA silencing* et permettre le mouvement du mutant BA2. Pour vérifier cette hypothèse, l'impact de ncRNA3 sur le *RNA silencing* pourra être évalué dans des feuilles de *N. benthamiana* 16C infiltrées à l'aide de constructions permettant l'expression de l'ARN1, de l'ARN3 ou 3E et de l'inducteur du *RNA silencing*, GFP. L'analyse de l'accumulation des siRNA ou de l'expression de la protéine GFP, dans la zone infiltrée, pourra nous donner une indication sur le rôle éventuel du ncRNA3 dans la voie du *RNAi*. Nous pourrons également nous baser sur l'approche décrite par Guilley *et al.* (Guilley *et al.*, 2009), qui consiste à valider l'activité d'un VSR sur l'hôte *C. quinoa*. Cette approche repose sur la production d'un virus recombinant dérivé du BNYVV constitué de l'ARN1, du réplicon Rep3-p30 qui exprime la protéine de mouvement du tobacco mosaic virus (Rep3-p30) supplémenté du réplicon Rep5 exprimant le VSR d'intérêt. Sachant que le réplicon Rep5 renferme le motif « coremin » dans sa région 3' terminale, nous pourrons utiliser un réplicon dérivé de l'ARN4 du BSMV pour exprimer le ncRNA3. En l'absence de VSR, aucun symptôme n'est observé en présence du virus recombinant malgré la production d'un ncRNA5 de plus petite taille (230 nt) (Peltier *et al.*, 2012). Ainsi, si le

ncRNA3, produit par la dégradation du replicon4 chimérique, interfère avec le *RNA silencing*, il permettra de rétablir l'infection locale qui se traduira par l'apparition de lésions chlorotiques sur les feuilles de *C. quinoa*.

La protéine p14 interagit-elle avec le ncRNA3 ? L'interaction entre la séquence « coremin » et la protéine p14 a été mise en évidence par la technique du triple hybride. Cependant, cette interaction ne prend pas en compte la structure adoptée par « coremin » à la fois dans l'ARN3 génomique et dans le ncRNA3. Pour déterminer si la protéine p14 interagit avec l'ARN3 et/ou le ncRNA3, la technique du retard sur gel (EMSA, *Electrophoretic mobility shift assay*) sera utilisée (Hellman and Fried, 2007) et confirmée par ITC (*Isothermal titration calorimetry*) afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction.

La protéine p14 fixe-t-elle les petits ARN ? Pour répondre à cette question, l'expérience de co-immunoprécipitation décrite précédemment pourra servir à produire une banque de petits ARN qui sera ensuite caractérisée par NGS. De la même manière, des plantes d'*A. thaliana* exprimant de manière constitutive la protéine p14 sont disponibles au laboratoire et doivent être caractérisées. La caractérisation du profil des petits ARN pourrait être entreprise dans ces plantes pour évaluer l'impact de l'expression de p14 sur RDR6, en caractérisant le profil des tasiRNA qui sont générés par cette enzyme ou sur le développement de façon générale. De même, les partenaires protéiques de p14 pourraient être recherchés après co-immunoprécipitation.

Si la protéine p14 fixe la séquence « coremin » *in vivo*, que devient le complexe p14-« coremin » ? La protéine p14 possède une localisation nucléolaire et cytoplasmique, et interagit avec le motif « coremin ». Il serait judicieux de caractériser la localisation subcellulaire du ncRNA3, voire de l'ARN3, en présence et en absence de la protéine p14, puis de comparer leur localisation à celle de la protéine XRN4 *in planta*. Une approche similaire pourrait être entreprise dans la levure qui, rappelons-le, ne possède pas le mécanisme de l'interférence par l'ARN.

Bibliographie

Bibliographie

- Abernathy, E. & Glaunsinger, B. (2015).** Emerging roles for RNA degradation in viral replication and antiviral defense. *Virology* **479-480**, 600-8.
- Adjibade, P. & Mazroui, R. (2014).** Control of mRNA turnover: implication of cytoplasmic RNA granules. *Semin Cell Dev Biol* **34**, 15-23.
- Akiyama, B. M., Eiler, D. & Kieft, J. S. (2016).** Structured RNAs that evade or confound exonucleases: function follows form. *Curr Opin Struct Biol* **36**, 40-7.
- Alhusaini, N. & Coller, J. (2016).** The deadenylase components Not2p, Not3p, and Not5p promote mRNA decapping. *RNA* **22**, 709-21.
- Arribas-Layton, M., Wu, D., Lykke-Andersen, J. & Song, H. (2013).** Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 580-9.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M. A., Lagrange, T. & Voinnet, O. (2010).** Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* **24**, 904-15.
- Balk, B., Maicher, A., Dees, M., Klarmund, J., Luke-Glaser, S., Bender, K. & Luke, B. (2013).** Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 1199-205.
- Balmori, E., Gilmer, D., Richards, K., Guilley, H. & Jonard, G. (1993).** Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* **75**, 517-21.
- Baulina, N. M., Kulakova, O. G. & Favorova, O. O. (2016).** MicroRNAs: The Role in Autoimmune Inflammation. *Acta Naturae* **8**, 21-33.
- Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E. & Baulcombe, D. C. (2007).** The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* **17**, 1609-14.
- Bhuvanagiri, M., Schlitter, A. M., Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. (2010).** NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem J* **430**, 365-77.
- Bouzoubaa, S., Niesbach-Klosgen, U., Jupin, I., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1991).** Shortened forms of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 and -4: internal deletions and a subgenomic RNA. *Journal of General Virology* **72**, 259-66.

- Braun, J. E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C. T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M. & Izaurralde, E. (2012).** A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1324-31.
- Burgess, D. J. (2013).** Small RNAs: antiviral RNAi in mammals. *Nat Rev Genet* **14**, 821.
- Chapman, E. G., Costantino, D. A., Rabe, J. L., Moon, S. L., Wilusz, J., Nix, J. C. & Kieft, J. S. (2014a).** The structural basis of pathogenic subgenomic flavivirus RNA (sfRNA) production. *Science* **344**, 307-10.
- Chapman, E. G., Moon, S. L., Wilusz, J. & Kieft, J. S. (2014b).** RNA structures that resist degradation by Xrn1 produce a pathogenic Dengue virus RNA. *Elife* **3**, e01892.
- Chekanova, J. A., Gregory, B. D., Reverdatto, S. V., Chen, H., Kumar, R., Hooker, T., Yazaki, J., Li, P., Skiba, N., Peng, Q., Alonso, J., Brukhin, V., Grossniklaus, U., Ecker, J. R. & Belostotsky, D. A. (2007).** Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the Arabidopsis transcriptome. *Cell* **131**, 1340-53.
- Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S. & Gilmer, D. (2013).** The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 168-81.
- Chiba, Y. & Green, P. J. (2009).** mRNA Degradation Machinery in Plants. *Journal of Plant Biology* **52**, 114-124.
- Chiu, M. H., Chen, I. H., Baulcombe, D. C. & Tsai, C. H. (2010).** The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol Plant Pathol* **11**, 641-9.
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T. H. & Dziembowski, A. (2013).** RNA decay machines: the exosome. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 552-60.
- Chowdhury, A., Kalurupalle, S. & Tharun, S. (2014).** Pat1 contributes to the RNA binding activity of the Lsm1-7-Pat1 complex. *RNA* **20**, 1465-75.
- Cui, Y. & Denis, C. L. (2003).** In vivo evidence that defects in the transcriptional elongation factors RPB2, TFIIS, and SPT5 enhance upstream poly(A) site utilization. *Mol Cell Biol* **23**, 7887-901.

- de Wispelaere, M. & Rao, A. L. (2009).** Production of cucumber mosaic virus RNA5 and its role in recombination. *Virology* **384**, 179-91.
- Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J. & Canard, B. (2012).** Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol* **10**, 51-65.
- Derrien, B., Baumberger, N., Schepetilnikov, M., Viotti, C., De Cillia, J., Ziegler-Graff, V., Isono, E., Schumacher, K. & Genschik, P. (2012).** Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 15942-6.
- Ding, S. W. & Voinnet, O. (2007).** Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-26.
- Doma, M. K. & Parker, R. (2006).** Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**, 561-4.
- Du, T. & Zamore, P. D. (2005).** microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* **132**, 4645-52.
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E. & Seraphin, B. (2007).** A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 15-22.
- Erhardt, M., Dunoyer, P., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. & Bouzoubaa, S. (2001).** Beet necrotic yellow vein virus particles localize to mitochondria during infection. *Virology* **286**, 256-62.
- Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. (2010).** Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* **79**, 351-79.
- Fenger-Gron, M., Fillman, C., Norrild, B. & Lykke-Andersen, J. (2005).** Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol Cell* **20**, 905-15.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. (2008).** Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**, 102-14.
- Finnegan, E. F. & Pasquinelli, A. E. (2013).** MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**, 51-68.
- Fiorenza, A. & Barco, A. (2016).** Role of Dicer and the miRNA system in neuronal plasticity and brain function. *Neurobiol Learn Mem*.
- Franks, T. M. & Lykke-Andersen, J. (2008).** The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol Cell* **32**, 605-15.

Frischmeyer, P. A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrerrio, A. L., Parker, R. & Dietz, H. C. (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**, 2258-61.

Funk, A., Truong, K., Nagasaki, T., Torres, S., Floden, N., Balmori Melian, E., Edmonds, J., Dong, H., Shi, P. Y. & Khromykh, A. A. (2010). RNA structures required for production of subgenomic flavivirus RNA. *J Virol* **84**, 11407-17.

Garneau, N. L., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 113-26.

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

Gilmer, D. & Ratti, C. (2012). Benyvirus. In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (ed. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz), pp. 1133-1138. Elsevier: San Diego.

Gonzalez, C. I., Bhattacharya, A., Wang, W. & Peltz, S. W. (2001). Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **274**, 15-25.

Grudzien-Nogalska, E., Jiao, X., Song, M. G., Hart, R. P. & Kiledjian, M. (2016). Nudt3 is an mRNA decapping enzyme that modulates cell migration. *RNA* **22**, 773-81.

Guilley, H., Bortolamiol, D., Jonard, G., Bouzoubaa, S. & Ziegler-Graff, V. (2009). Rapid screening of RNA silencing suppressors by using a recombinant virus derived from beet necrotic yellow vein virus. *J Gen Virol* **90**, 2536-41.

Guo, H., Song, X., Xie, C., Huo, Y., Zhang, F., Chen, X., Geng, Y. & Fang, R. (2013). Rice yellow stunt rhabdovirus protein 6 suppresses systemic RNA silencing by blocking RDR6-mediated secondary siRNA synthesis. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 927-36.

Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M. & Conti, E. (2013). The yeast ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell* **154**, 814-26.

Harigaya, Y. & Parker, R. (2010). No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**, 132-41.

Harvey, J. J., Lewsey, M. G., Patel, K., Westwood, J., Heimstadt, S., Carr, J. P. & Baulcombe, D. C. (2011). An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* **6**, e14639.

Hellman, L. M. & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* **2**, 1849-61.

- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. & Voinnet, O. (2003).** Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* **22**, 4523-33.
- Hirayama, T., Matsuura, T., Ushiyama, S., Narusaka, M., Kurihara, Y., Yasuda, M., Ohtani, M., Seki, M., Demura, T., Nakashita, H., Narusaka, Y. & Hayashi, S. (2013).** A poly(A)-specific ribonuclease directly regulates the poly(A) status of mitochondrial mRNA in Arabidopsis. *Nat Commun* **4**, 2247.
- Hleibieh, K. (2010).** Etude des propriétés biologiques de la protéine p25, de l'ARN3 et de la protéine p14 du beet necrotic yellow vein virus : vers de nouvelles stratégies de lutttes antivirales. *Thèse, Université de Strasbourg*.
- Hwang, J. & Maquat, L. E. (2011).** Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: to die or not to die, that is the question. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 422-30.
- Inada, T. & Aiba, H. (2005).** Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J* **24**, 1584-95.
- Incarbone, M. & Dunoyer, P. (2013).** RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci* **18**, 382-92.
- Isken, O., Kim, Y. K., Hosoda, N., Mayeur, G. L., Hershey, J. W. & Maquat, L. E. (2008).** Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **133**, 314-27.
- Isken, O. & Maquat, L. E. (2007).** Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* **21**, 1833-56.
- Iwakawa, H. O., Mizumoto, H., Nagano, H., Imoto, Y., Takigawa, K., Sarawaneeyaruk, S., Kaido, M., Mise, K. & Okuno, T. (2008).** A viral noncoding RNA generated by cis-element-mediated protection against 5'->3' RNA decay represses both cap-independent and cap-dependent translation. *J Virol* **82**, 10162-74.
- Jaeger, S., Eriani, G. & Martin, F. (2004).** Critical residues for RNA discrimination of the histone hairpin binding protein (HBP) investigated by the yeast three-hybrid system. *FEBS Letters* **556**, 265-270.
- Jinek, M., Coyle, S. M. & Doudna, J. A. (2011).** Coupled 5' nucleotide recognition and processivity in Xrn1-mediated mRNA decay. *Mol Cell* **41**, 600-8.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Bartel, B. (2006).** MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 19-53.

Jupin, I., Guilley, H., Richards, K. E. & Jonard, G. (1992). Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J* **11**, 479-88.

Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G. & Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* **20**, 355-67.

Kastenmayer, J. P. & Green, P. J. (2000). Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13985-90.

Kervestin, S., Li, C., Buckingham, R. & Jacobson, A. (2012). Testing the faux-UTR model for NMD: analysis of Upf1p and Pab1p competition for binding to eRF3/Sup35p. *Biochimie* **94**, 1560-71.

Khanna, R. & Kiledjian, M. (2004). Poly(A)-binding-protein-mediated regulation of hDcp2 decapping in vitro. *EMBO J* **23**, 1968-76.

Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 126-39.

Klauer, A. A. & van Hoof, A. (2012). Degradation of mRNAs that lack a stop codon: a decade of nonstop progress. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 649-60.

Koenig, R., Jarausch, W., Li, Y., Commandeur, U., Burgermeister, W., Gehrke, M. & Luddecke, P. (1991). Effect of recombinant beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *Journal of General Virology* **72**, 2243-6.

Kumakura, N., Otsuki, H., Tsuzuki, M., Takeda, A. & Watanabe, Y. (2013). Arabidopsis AtRRP44A is the functional homolog of Rrp44/Dis3, an exosome component, is essential for viability and is required for RNA processing and degradation. *PLoS One* **8**, e79219.

Lange, H., Holec, S., Cognat, V., Pieuchot, L., Le Ret, M., Canaday, J. & Gagliardi, D. (2008). Degradation of a polyadenylated rRNA maturation by-product involves one of the three RRP6-like proteins in Arabidopsis thaliana. *Mol Cell Biol* **28**, 3038-44.

Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K. E. & Jonard, G. (1998). Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in Beta macrocarpa is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J Gen Virol* **79**, 385-93.

- Lee, C. C., Lin, T. L., Lin, J. W., Han, Y. T., Huang, Y. T., Hsu, Y. H. & Meng, M. (2015). Promotion of Bamboo Mosaic Virus Accumulation in *Nicotiana benthamiana* by 5'-->3' Exonuclease NbXRN4. *Front Microbiol* **6**, 1508.
- Li, S. & Wilkinson, M. F. (1998). Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* **8**, 135-41.
- Lim, J., Ha, M., Chang, H., Kwon, S. C., Simanshu, D. K., Patel, D. J. & Kim, V. N. (2014). Uridylation by TUT4 and TUT7 marks mRNA for degradation. *Cell* **159**, 1365-76.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A. M., Peart, J. R., Malcuit, I. & Baulcombe, D. C. (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* **30**, 296-303.
- Maldonado-Bonilla, L. D. (2014). Composition and function of P bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* **5**, 201.
- Malecki, M., Viegas, S. C., Carneiro, T., Golik, P., Dressaire, C., Ferreira, M. G. & Arraiano, C. M. (2013). The exoribonuclease Dis3L2 defines a novel eukaryotic RNA degradation pathway. *EMBO J* **32**, 1842-54.
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E. Z., Tan, H. C., Sessions, O. M., Ward, A. M., Gubler, D. J., Harris, E., Garcia-Blanco, M. A. & Ooi, E. E. (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science* **350**, 217-21.
- Mas, A., Alves-Rodrigues, I., Noueir, A., Ahlquist, P. & Diez, J. (2006). Host deadenylation-dependent mRNA decapping factors are required for a key step in brome mosaic virus RNA replication. *J Virol* **80**, 246-51.
- McGrann, G. R., Grimmer, M. K., Mutasa-Gottgens, E. S. & Stevens, M. (2009). Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Mol Plant Pathol* **10**, 129-41.
- Merai, Z., Benkovics, A. H., Nyiko, T., Debreczeny, M., Hiripi, L., Kerenyi, Z., Kondorosi, E. & Silhavy, D. (2013). The late steps of plant nonsense-mediated mRNA decay. *Plant J* **73**, 50-62.
- Mermigka, G., Verret, F. & Kalantidis, K. (2016). RNA silencing movement in plants. *J Integr Plant Biol* **58**, 328-42.
- Molnar, A., Melnyk, C. W., Bassett, A., Hardcastle, T. J., Dunn, R. & Baulcombe, D. C. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* **328**, 872-5.

- Moon, S. L., Anderson, J. R., Kumagai, Y., Wilusz, C. J., Akira, S., Khromykh, A. A. & Wilusz, J. (2012).** A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability. *RNA* **18**, 2029-40.
- Moon, S. L., Dodd, B. J., Brackney, D. E., Wilusz, C. J., Ebel, G. D. & Wilusz, J. (2015).** Flavivirus sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery. *Virology* **485**, 322-9.
- Mullen, T. E. & Marzluff, W. F. (2008).** Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. *Genes Dev* **22**, 50-65.
- Nagarajan, V. K., Jones, C. I., Newbury, S. F. & Green, P. J. (2013).** XRN 5'→3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 590-603.
- Narayanan, K. & Makino, S. (2013).** Interplay between viruses and host mRNA degradation. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 732-41.
- Nissan, T., Rajyaguru, P., She, M., Song, H. & Parker, R. (2010).** Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Mol Cell* **39**, 773-83.
- Nyiko, T., Kerenyi, F., Szabadkai, L., Benkovics, A. H., Major, P., Sonkoly, B., Merai, Z., Barta, E., Niemiec, E., Kufel, J. & Silhavy, D. (2013).** Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex. *Nucleic Acids Res* **41**, 6715-28.
- Ozgun, S., Chekulaeva, M. & Stoecklin, G. (2010).** Human Pat1b connects deadenylation with mRNA decapping and controls the assembly of processing bodies. *Mol Cell Biol* **30**, 4308-23.
- Pakdel, A., Mounier, C., Klein, E., Hleibieh, K., Monsion, B., Mutterer, J., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Ratti, C. & Gilmer, D. (2015).** On the interaction and localization of the beet necrotic yellow vein virus replicase. *Virus Res* **196**, 94-104.
- Parker, R. (2012).** RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 671-702.
- Parker, R. & Song, H. (2004).** The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 121-7.
- Pedro-Segura, E., Vergara, S. V., Rodriguez-Navarro, S., Parker, R., Thiele, D. J. & Puig, S. (2008).** The Cth2 ARE-binding protein recruits the Dhh1 helicase to promote the decay of succinate dehydrogenase SDH4 mRNA in response to iron deficiency. *J Biol Chem* **283**, 28527-35.

- Peltier, C. (2010).** Etude du rôle de la protéine p25 et des séquences non codantes de l'ARN-3 du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave dans la pathogénicité virale. *Thèse, Université de Strasbourg*.
- Peltier, C., Hleibieh, K., Thiel, H., Klein, E., Bragard, C. & Gilmer, D. (2008).** Molecular Biology of the Beet necrotic yellow vein virus. *Plant Viruses* **2**, 14-24.
- Peltier, C., Klein, E., Hleibieh, K., D'Alonzo, M., Hammann, P., Bouzoubaa, S., Ratti, C. & Gilmer, D. (2012).** Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *J Gen Virol* **93**, 1093-102.
- Peltier, C., Schmidlin, L., Klein, E., Taconnat, L., Prinsen, E., Erhardt, M., Heintz, D., Weyens, G., Lefebvre, M., Renou, J. P. & Gilmer, D. (2011).** Expression of the Beet necrotic yellow vein virus p25 protein induces hormonal changes and a root branching phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Res* **20**, 443-66.
- Peng, J., Yang, J., Yan, F., Lu, Y., Jiang, S., Lin, L., Zheng, H., Chen, H. & Chen, J. (2011).** Silencing of NbXrn4 facilitates the systemic infection of Tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Virus Res* **158**, 268-70.
- Piccirillo, C., Khanna, R. & Kiledjian, M. (2003).** Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2. *RNA* **9**, 1138-47.
- Pijlman, G. P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., Liu, W. J., Palmenberg, A. C., Shi, P. Y., Hall, R. A. & Khromykh, A. A. (2008).** A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* **4**, 579-91.
- Popp, M. W. & Maquat, L. E. (2013).** Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Annu Rev Genet* **47**, 139-65.
- Qu, J., Kang, S. G., Wang, W., Musier-Forsyth, K. & Jang, J. C. (2014).** The *Arabidopsis thaliana* tandem zinc finger 1 (AtTZF1) protein in RNA binding and decay. *Plant J* **78**, 452-67.
- Rahim, M. D., Andika, I. B., Han, C., Kondo, H. & Tamada, T. (2007).** RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *Journal of General Virology* **88**, 1611-9.
- Ratti, C., Hleibieh, K., Bianchi, L., Schirmer, A., Autonell, C. R. & Gilmer, D. (2009).** Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in *Beta macrocarpa*. *Virology* **385**, 392-399.

- Rissland, O. S. & Norbury, C. J. (2009).** Decapping is preceded by 3' uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 616-23.
- Roux, M. E., Rasmussen, M. W., Palma, K., Lolle, S., Regue, A. M., Bethke, G., Glazebrook, J., Zhang, W., Sieburth, L., Larsen, M. R., Mundy, J. & Petersen, M. (2015).** The mRNA decay factor PAT1 functions in a pathway including MAP kinase 4 and immune receptor SUMM2. *EMBO J* **34**, 593-608.
- Saito, S., Hosoda, N. & Hoshino, S. (2013).** The Hbs1-Dom34 protein complex functions in non-stop mRNA decay in mammalian cells. *J Biol Chem* **288**, 17832-43.
- Schmid, M. & Jensen, T. H. (2008).** Quality control of mRNP in the nucleus. *Chromosoma* **117**, 419-29.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. & Zamore, P. D. (2003).** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208.
- Schweingruber, C., Rufener, S. C., Zund, D., Yamashita, A. & Muhlemann, O. (2013).** Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 612-23.
- Scott, D. D. & Norbury, C. J. (2013).** RNA decay via 3' uridylation. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 654-65.
- Sement, F. M., Ferrier, E., Zuber, H., Merret, R., Alioua, M., Deragon, J. M., Bousquet-Antonelli, C., Lange, H. & Gagliardi, D. (2013).** Uridylation prevents 3' trimming of oligoadenylated mRNAs. *Nucleic Acids Res* **41**, 7115-27.
- SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. & Wickens, M. (1996).** A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8496-501.
- Sheth, U. & Parker, R. (2003).** Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805-8.
- Sidahmed, A., Abdalla, S., Mahmud, S. & Wilkie, B. (2014).** Antiviral innate immune response of RNA interference. *J Infect Dev Ctries* **8**, 804-10.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M. & Burgyan, J. (2002).** A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* **21**, 3070-80.
- Siwaszek, A., Ukleja, M. & Dziembowski, A. (2014).** Proteins involved in the degradation of cytoplasmic mRNA in the major eukaryotic model systems. *RNA Biol* **11**, 1122-36.

-
- Sommer, P. & Nehrbass, U. (2005).** Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 294-301.
- Song, M. G., Bail, S. & Kiledjian, M. (2013).** Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity. *RNA* **19**, 390-9.
- Song, M. G., Li, Y. & Kiledjian, M. (2010).** Multiple mRNA decapping enzymes in mammalian cells. *Mol Cell* **40**, 423-32.
- Suzuki, Y., Arae, T., Green, P. J., Yamaguchi, J. & Chiba, Y. (2015).** AtCCR4a and AtCCR4b are Involved in Determining the Poly(A) Length of Granule-bound starch synthase 1 Transcript and Modulating Sucrose and Starch Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **56**, 863-74.
- Svobodova, E., Kubikova, J. & Svoboda, P. (2016).** Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Pflugers Arch*.
- Tamada, T., Schmitt, C., Saito, M., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1996).** High resolution analysis of the readthrough domain of beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology* **77**, 1359-67.
- Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T. & Saito, M. (1999).** RNA 3 Deletion Mutants of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Do Not Cause Rhizomania Disease in Sugar Beets. *Phytopathology* **89**, 1000-1006.
- Teixeira, D. & Parker, R. (2007).** Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **18**, 2274-87.
- Tharun, S. (2009).** Lsm1-7-Pat1 complex: a link between 3' and 5'-ends in mRNA decay? *RNA Biol* **6**, 228-32.
- Tharun, S., He, W., Mayes, A. E., Lennertz, P., Beggs, J. D. & Parker, R. (2000).** Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* **404**, 515-8.
- Thompson, J. R., Buratti, E., de Wispelaere, M. & Tepfer, M. (2008).** Structural and functional characterization of the 5' region of subgenomic RNA5 of cucumber mosaic virus. *J Gen Virol* **89**, 1729-38.
- Tian, B., Hu, J., Zhang, H. & Lutz, C. S. (2005).** A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* **33**, 201-12.
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I. & Inada, T. (2012).** Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol Cell* **46**, 518-29.

-
- Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R. & Kazemzadeh-Bavili, M. (2014).** Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics* **2014**, 970607.
- van Dijk, E., Le Hir, H. & Seraphin, B. (2003).** DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12081-6.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C. & Parker, R. (2002).** Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **295**, 2262-4.
- van Hoof, A., Lennertz, P. & Parker, R. (2000).** Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J* **19**, 1357-65.
- van Mierlo, J. T., Bronkhorst, A. W., Overheul, G. J., Sadanandan, S. A., Ekstrom, J. O., Heestermans, M., Hultmark, D., Antoniewski, C. & van Rij, R. P. (2012).** Convergent evolution of argonaute-2 slicer antagonism in two distinct insect RNA viruses. *PLoS Pathog* **8**, e1002872.
- van Mierlo, J. T., Overheul, G. J., Obadia, B., van Cleef, K. W., Webster, C. L., Saleh, M. C., Obbard, D. J. & van Rij, R. P. (2014).** Novel Drosophila viruses encode host-specific suppressors of RNAi. *PLoS Pathog* **10**, e1004256.
- Vetter, G., Hily, J. M., Klein, E., Schmidlin, L., Haas, M., Merkle, T. & Gilmer, D. (2004).** Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol* **85**, 2459-69.
- Vlasova-St Louis, I. & Bohjanen, P. R. (2016).** Feedback Regulation of Kinase Signaling Pathways by AREs and GREs. *Cells* **5**.
- Voinnet, O. (2008).** Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci* **13**, 317-28.
- Voinnet, O. (2009).** Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**, 669-87.
- Wang, X. B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W. X., Chen, X., Yu, J. L. & Ding, S. W. (2010).** RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 484-9.
- Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. (2009).** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**, 57-63.
- Weber, C., Nover, L. & Fauth, M. (2008).** Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J* **56**, 517-30.

Wilson, J. A. & Sagan, S. M. (2014). Hepatitis C virus and human miR-122: insights from the bench to the clinic. *Curr Opin Virol* **7**, 11-8.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* **11**, 228-34.

Xu, J. & Chua, N. H. (2009). Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *Plant Cell* **21**, 3270-9.

Xu, J., Yang, J. Y., Niu, Q. W. & Chua, N. H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell* **18**, 3386-98.

Yan, F., Lu, Y., Lin, L., Zheng, H. & Chen, J. (2012). The ability of PVX p25 to form RL structures in plant cells is necessary for its function in movement, but not for its suppression of RNA silencing. *PLoS One* **7**, e43242.

Zare, B., Niazi, A., Sattari, R., Aghelpasand, H., Zamani, K., Sabet, M. S., Moshiri, F., Darabie, S., Daneshvar, M. H., Norouzi, P., Kazemi-Tabar, S. K., Khoshnami, M. & Malboobi, M. A. (2015). Resistance against rhizomania disease via RNA silencing in sugar beet. *Plant Pathology* **64**, 35-42.

Zhang, L., Wang, X., Li, D., Han, C., Zhai, Y. & Yu, J. (2005). Two virus-encoded RNA silencing suppressors, P14 of Beet necrotic yellow vein virus and S6 of Rice black streak dwarf virus. *Chinese science bulletin* **50**, 305-310.

Zhang, W., Murphy, C. & Sieburth, L. E. (2010). Conserved RNaseII domain protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses Arabidopsis decapping mutant phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15981-5.

Zuber, H., Scheer, H., Ferrier, E., Sement, F. M., Mercier, P., Stupfler, B. & Gagliardi, D. (2016). Uridylation and PABP Cooperate to Repair mRNA Deadened Ends in Arabidopsis. *Cell Rep* **14**, 2707-17.

Annexe

Annexe

Les travaux réalisés au cours de mon master sont présentés dans l'article suivant :

**« Stability and antiviral activity against human cytomegalovirus of
artemisinin derivatives »**

Publié dans « *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* »

Stability and antiviral activity against human cytomegalovirus of artemisinin derivatives

Alyssa Flobinus^{1†}, Nicolas Taudon^{2,3†}, Marc Desbordes^{2,3}, Béatrice Labrosse^{4,5}, François Simon^{1,4,6}, Marie-Christine Mazon^{1,4,6,7} and Nathalie Schnepf^{1,4,7*}

¹Laboratoire de Microbiologie, APHP, Hôpital Saint-Louis, Paris 75010, France; ²Laboratoire de Bioanalyse et Pharmacocinétique, UMR-MD3 Infections Parasitaires, Aix-Marseille Université, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France; ³Centre National de Référence du Paludisme, Marseille, France; ⁴Inserm, UMR941, Paris 75010, France; ⁵Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris Diderot, Hôpital Saint-Louis, Paris 75010, France; ⁶Université Denis Diderot, Paris, France; ⁷Laboratoire associé au CNR cytomégalo-virus, Paris 75010, France

*Corresponding author. Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France. Tel: +33-1-42499470; Fax: +33-1-42499200; E-mail: nathalie.schnepf@sls.aphp.fr

†These authors equally contributed to this work.

Received 24 May 2013; returned 3 July 2013; revised 25 July 2013; accepted 31 July 2013

Objectives: Artesunate, a derivative of dihydroartemisinin, itself a product of artemisinin, inhibits the replication of cytomegalovirus *in vitro*. *In vivo*, artesunate undergoes rapid conversion into the active metabolite dihydroartemisinin. The *in vitro* stability of the compounds and the antiviral activity of dihydroartemisinin are of great concern for the interpretation of *in vitro* testing. The aim of the study was to measure artesunate conversion into dihydroartemisinin in culture medium and to evaluate the stability and antiviral activity of artemisinin derivatives, according to culture conditions.

Methods: Conversion of artesunate into dihydroartemisinin was measured in culture medium with or without fetal calf serum, in the presence or absence of fibroblast monolayers, at different times. The stability of artemisinin derivatives was determined in serum-enriched medium. Concentrations of each compound inhibiting viral DNA synthesis by 50% were determined in fibroblasts cultured in serum-free or serum-enriched medium, after addition of compound as a single dose or fractional doses.

Results: Conversion of artesunate into dihydroartemisinin in serum-free or serum-enriched medium was non-equimolar. The half-lives of artesunate, dihydroartemisinin and artemisinin were 10.3 ± 0.9 , 5.2 ± 0.5 and 11.2 ± 1.2 h, respectively. Activity of dihydroartemisinin and artesunate was markedly reduced in serum-starved cells. Unexpectedly, dihydroartemisinin displayed a lower activity than artesunate. Addition of both compounds as fractional doses increased their activity. Artemisinin had no anticytomegaloviral activity.

Conclusions: Artemisinin derivatives were shown to be unstable *in vitro* and their addition as fractional doses could partly compensate for this instability. Importantly, the cellular physiological condition was a determinant of their antiviral activity.

Keywords: antiviral therapy, metabolism, HPLC, drug susceptibility

Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) is a widespread opportunistic pathogen in immunocompromised individuals, including allograft recipients and patients with AIDS. It remains the leading cause of congenital viral infections and may be responsible for severe disease leading to death or serious neurodevelopment sequelae in infants infected *in utero*. Antiviral drugs currently available in clinical practice include ganciclovir (and its prodrug valganciclovir),

foscarnet and cidofovir, which all target the viral DNA polymerase. Their clinical use is limited by severe adverse side effects and the possible emergence of resistance.¹ Artesunate, an antimalarial drug, has been shown to inhibit the replication of both HCMV reference strains and clinical isolates susceptible or resistant to ganciclovir in fibroblasts and U373MG astrocytoma cells.^{2–7} The intensive use of artesunate in patients with malaria has demonstrated its high safety and tolerability profile.^{8,9} Thus, it has been proposed as an alternative to the currently available antiviral drugs in

patients failing therapy.^{1,10,11} Artesunate can be administered orally, intramuscularly, intravenously and by the rectal route.^{12,13}

Artesunate is a hemisuccinate derivative of dihydroartemisinin, itself obtained by the reduction of artemisinin, a natural sesquiterpene lactone extracted from *Artemisia annua*, a Chinese herbal medicine used as a traditional antimalarial.^{14–16} The pharmacophore of artemisinin derivatives is a 1,2,4-trioxane ring incorporating an endoperoxide bridge essential for antimalarial activity.^{13,17} Within the infected erythrocyte, the reduction of the peroxide bridge, favoured by ferrous iron (Fe^{2+}), and the generation of carbon-centred radical molecules and reactive oxygen intermediates are thought to be crucial to the antimalarial activity.^{17–19} In addition to their antimalarial activity, artemisinin and its derivatives also have anticancer properties.^{13,20–23}

The *in vitro* antiviral activity of artemisinin derivatives was described in 1982.²⁴ Their mechanism of action on the replication of HCMV is incompletely known. Artesunate inhibits the *in vitro* replication of HCMV at an early stage, by mechanisms linked to cellular activation pathways.^{4,5} The products of the major immediate early (MIE) *IE2* and *IE1* genes, which are multifunctional proteins involved in regulating both viral and cellular gene expression, are essential for the progression of the replication cycle.²⁵ Their transcription is driven by the complex and potent MIE promoter (MIEP), which contains binding sites for a diverse set of signal-regulated stimulatory and inhibitory transcription factors. Among these, cellular factors NF- κ B and Sp1, which are overexpressed through the initial binding of viral envelope glycoproteins to cellular receptors, activate the MIEP. Artesunate was shown to markedly reduce both the protein level and the binding activity of these virus-induced cellular factors and to inhibit *IE2* expression.^{4,5} However, He *et al.*²⁶ did not find a significant effect of artesunate on MIE gene transcripts. The peroxide bridge is thought to play a role in anti-HCMV activity, as (i) suppression of HCMV replication is enhanced by the addition of Fe^{2+} ,^{5,6} (ii) dimers derived from artemisinin with two endoperoxide bridges have been reported to be more effective at inhibiting HCMV replication than their monomeric counterparts² and (iii) a deoxy dimer lacking the endoperoxide bridge did not have any anti-HCMV activity.²⁷

In vivo, artesunate is rapidly and almost completely converted into dihydroartemisinin, mainly by plasmatic and cellular esterases.^{28–30} After artesunate intravenous injection, plasmatic artesunate and dihydroartemisinin half-lives are <15 and 60 min, respectively.^{12,28,30} Thus, artesunate acts as an ester prodrug and its main metabolite, dihydroartemisinin, is considered the active compound *in vivo*. Unexpectedly, the *in vitro* anti-HCMV activity of dihydroartemisinin was shown to be much lower than that of artesunate³ and in spite of a chemical structure close to that of artesunate, inconsistent results concerning artemisinin anticytomegaloviral activity have been reported by Arav-Boger *et al.*² and Chou *et al.*³ The basis for all these discrepancies is unknown. Artemisinin derivatives are known to be unstable compounds, especially dihydroartemisinin.¹⁴ *Ex vivo*, artesunate can also form dihydroartemisinin through chemical hydrolysis and plasma esterase-mediated hydrolysis. In culture medium, the stability of the artemisinin derivatives as well as the level of artesunate conversion into dihydroartemisinin are unknown, however, they are of major concern for the interpretation of *in vitro* antiviral activity testing. The aims of the study were to measure artesunate conversion into dihydroartemisinin in culture medium as well as hydrolysis catalysed by fetal calf serum (FCS) esterases and to

evaluate the stability and antiviral activity of artemisinin derivatives in different experimental conditions.

Materials and methods

Cells and viruses

Human lung fibroblasts (MRC-5; FreshFrozenCells®, Diagnostics Hybrids)—purchased from bioMérieux-Argène (Verniolles, France)—were grown in minimum essential medium (Invitrogen, Saint-Aubin, France) containing variable amounts of inactivated FCS (Pan Biotech, distributed by Dutscher, Brumath, France). FCS inactivation was achieved by heating at 56°C for 30 min.

Reference HCMV strain AD169 (ATCC VR-538; Rockville, MD, USA) and a clinical isolate (VI1210) susceptible to antiviral drugs were propagated in MRC-5 cells.

Compounds

Ganciclovir, artesunate, dihydroartemisinin and artemisinin were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Ganciclovir was prepared as a 10 mM aqueous solution. Artesunate, dihydroartemisinin and artemisinin were dissolved in DMSO to constitute 100 mM solutions. All compound stocks were stored at –80°C.

Antiviral assay

Antiviral activity was assessed by measuring viral DNA synthesis in the presence and the absence of the drug after 4 days of incubation. The drug concentration inhibiting viral DNA synthesis by 50% (IC_{50}) was determined by a previously described real-time PCR-based assay.³¹ Briefly, MRC-5 fibroblasts grown as monolayers in 24-well plates were inoculated with cell-associated virus (5000 cells per well) or cell-free virus (multiplicity of infection 0.1). After virus adsorption, cells were fed with medium containing serial 2-fold dilutions of each test compound. Each drug concentration was tested in quadruplicate.

To test the influence of the FCS concentration upon drug antiviral activity, experiments were carried out in parallel with culture medium containing no serum, 2% FCS or 10% FCS (inactivated or not).

To test the influence of the mode of drug addition on the cell cultures, experiments were conducted in parallel to compare single dosing (as described above) with fractional dosing. Fractional dosing was performed as follows: after virus adsorption, cells were fed with medium containing one-quarter of the final dose of the test drug and three additional fractional doses were consecutively added to the cell culture medium at 24, 48 and 72 h post-infection in a 10 μL volume for a total medium volume of 1 mL per well.

After 4 days of incubation, the cells were lysed. The number of HCMV genomes was quantified in cellular lysates by real-time PCR. Determination of the IC_{50} values and statistical analysis were carried out using the computer package Pk-fit.³² Growth inhibition (*I*) and the corresponding drug concentrations (*C*) were fitted according to a sigmoid model, described as: $I = (I_{\text{max}} \cdot C^\gamma) / (C^\gamma + \text{IC}_{50}^\gamma)$, where I_{max} is the maximum growth inhibition and γ is the sigmoid factor of the curve.

Cytotoxicity assay

The cellular cytotoxicity of the drugs was measured using the CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Charbonnières, France) as reported by Efferth *et al.*⁴ The assay determines lactate dehydrogenase (LDH) activity in the residual cells after incubation with increasing concentrations of the test compound. Briefly, fibroblasts were grown in 24-well plates to confluence as for antiviral assays and then incubated at 37°C for 4 days in culture medium containing serial dilutions of artesunate,

dihydroartemisinin, artemisinin or ganciclovir. The supernatants were discarded and then the cells were rinsed in PBS and lysed in 100 µL per well of the lysis buffer provided in the kit. After incubation for 45 min at 37°C, cellular debris was removed by centrifugation and 10 µL of each lysate was added to 50 µL of PBS in the wells of a 96-well flat-bottomed plate. A volume of 50 µL of substrate was added to each well and the mixtures were incubated for 30 min at room temperature in the dark. Then, 50 µL of stop solution was added to each well and the colour reaction was quantified using an ELISA reader [optical density (OD) at 490 nm].

Effect of FCS concentration on cellular metabolism

To evaluate the effect of the serum concentration on cell metabolism, LDH activity was measured as indicated above in mock-infected cells cultured for 4 days in drug-free medium containing 0%, 2% or 10% inactivated FCS. LDH activity was also measured in cell culture supernatants by using the CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. Supernatants (50 µL per well of a 24-well plate) were transferred to the wells of a 96-well flat-bottomed plate and mixed with an equal volume of substrate. The mixtures were incubated for 30 min at room temperature in the dark before recording absorbance at 490 nm. The results were expressed in OD units×1000. The means (±SD) of the ODs obtained in three independent experiments were calculated.

Effect of FCS concentration on viral genome synthesis

Fibroblast monolayers grown to confluence in 24-well plates were inoculated with strain AD169 and then incubated in parallel in the presence of 2% or 10% inactivated FCS, or in the absence of FCS. After 4 days of incubation in the three culture conditions tested, cells were lysed and the number of HCMV genomes was quantified in cellular lysates by real-time PCR.³¹ The significance of the differences in genome synthesis for the three percentages of FCS was evaluated using the Friedman test (non-parametric repeated measure ANOVA).

Determination of artesunate and dihydroartemisinin in culture medium

Dilutions of artesunate (1.88 and 30 µM) were prepared in culture medium containing 0% or 10% (inactivated or not) FCS. For each condition, a 600 µL aliquot was immediately stored at -80°C. Dilutions of artesunate were distributed in the wells of 24-well plates free from cells or containing confluent

fibroblast monolayers. The plates were incubated at 37°C and culture medium aliquots were withdrawn after 30 min of incubation and then every hour until 8 h and every day until 4 days. The aliquots were immediately stored at -80°C.

Concentrations of artesunate and dihydroartemisinin in culture medium aliquots were measured by HPLC with electrochemical detection. The procedure involved solid-phase extraction on an Oasis™ HLB 1 cc/30 mg cartridge (Waters, Milford, MA, USA) and artemisinin was used as the internal standard. Independent of the concentrations, the extraction ratios were >85% for the three analytes. Chromatographic separation of the analytes was achieved on an analytical 150×4.6 mm i.d. Thermo BDS Hypersil Cyano column, 5 µm particle size (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) with a mobile phase of acetonitrile/0.01 M sodium acetate buffer at pH 4.65 (30:70, v/v) and at a flow rate of 1 mL/min. The column eluate was monitored in reductive mode at -800 mV (Decade II, Antec Leyden, The Netherlands). Linearity over the concentration ranges of 5-500 and 10-500 ng/mL was obtained for dihydroartemisinin and artesunate, respectively. The back-calculated concentrations of the calibration standards were within ±10% of the nominal value with a coefficient of variation value of <10%. Data were acquired and analysed using Chromeleon® 6.80 software (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). The impact of the medium composition (i.e. presence of FCS and/or cells) on the stability of artesunate was compared by using area under the concentration versus time curves (AUCs) from 0 to time *t*. AUC_{0-t} was determined according to the trapezoidal rule. The degradation rate (*k*_e) was obtained as the slope of the linear regression of the log-transformed concentration versus time data in the terminal portion of the curve. The half-life (*t*_{1/2}) was estimated from the *k*_e constant using *t*_{1/2}=0.693/*k*_e. One-way ANOVA and a simple contrast test were used to compare experimental conditions. A *P* value <0.05 was considered as statistically significant.

In addition, to assess the stability of artemisinin derivatives, media containing artesunate, dihydroartemisinin and artemisinin (1.88 µM) and 10% inactivated FCS were incubated at 37°C without fibroblasts. Drug concentrations were measured at different incubation times.

Results

Antiviral activity of artesunate, dihydroartemisinin and artemisinin according to FCS concentrations

The results are presented in Table 1. AD169 replication suppression by artesunate was significantly reduced in the absence of FCS

Table 1. Activity of artemisinin derivatives against HCMV reference strain AD169 and clinical isolate VI1210 according to the percentage of inactivated FCS in the cell culture medium

Strain	Drug	IC ₅₀ (µM) ^a			Comparison between 0%, 2% and 10% FCS ^b			
		0% FCS	2% FCS	10% FCS	0%, 2% and 10% ^b	0% versus 2%	0% versus 10%	2% versus 10%
AD169	ART	22.19±9.89	5.57±2.91	3.46±1.14	<0.001	<0.001	<0.001	0.077
	DHA	47.06±13.79	22.56±7.22	16.51±7.29	<0.001	0.006	<0.001	0.169
	GCV	0.65±0.24	0.37±0.21	0.96±0.70	0.199			
VI1210	ART	9.50±7.73	5.17±2.29	2.16±1.08	0.012	0.313	0.006	0.004
	DHA	10.62±7.74	ND	4.37±2.78	ND	ND	0.075	ND
	GCV	1.37±0.41	ND	1.58±0.62	ND	ND	0.812	ND

ART, artesunate; DHA, dihydroartemisinin; GCV, ganciclovir; ND, not determined.

Ganciclovir was tested in parallel as a control.

^aMeans ± SD from at least four independent experiments.

^bA one-way ANOVA was used to compare the three culture conditions (0%, 2% and 10% FCS) and a Mann-Whitney test to compare culture conditions two by two. Significant *P* values (<0.05) are indicated in bold.

as compared with suppression in the presence of 2% or 10% inactivated FCS. For isolate VI1210, artesunate IC_{50} values were significantly lower in the presence of 10% FCS versus 0%. For both strains, dihydroartemisinin activity was also markedly reduced in the absence of FCS, but the difference was significant only for the AD169 strain. Artesunate and dihydroartemisinin were more effective at inhibiting the replication of the clinical isolate VI1210 than the AD169 strain (in medium with 10% FCS, $P=0.03$ and $P=0.001$, respectively). Artemisinin had no antiviral activity and this result was confirmed by testing artemisinin purchased from another source (Sao Kim Pharma Co., Vinh Phuc, Vietnam) (data not shown). For ganciclovir, tested as control, IC_{50} values for AD169 and VI1210 were similar whatever the concentration of FCS in the culture medium. Serum inactivation had no effect upon the antiviral activity of artesunate, dihydroartemisinin and ganciclovir, as the respective IC_{50} values of these compounds were similar whether FCS was inactivated or not (data not shown).

To check whether the reduction of antiviral activity in the absence of serum was due to the cytotoxicity of artesunate or dihydroartemisinin, an LDH-based cytotoxicity assay was applied. LDH activity was measured in serum-starved cells in the presence and the absence of the compounds. No reduction in LDH activity was observed in the presence of the compounds in the relevant range of concentrations between 1.88 and 60 μM when compared with the LDH activity in control cells not treated with the drugs (data not shown).

Effect of FCS concentration on cellular metabolism

LDH activity was significantly reduced ($P=0.001$) in serum-starved mock-infected cells ($OD=633.33 \pm 102.64$) as compared with LDH activity in cells cultured in the presence of 2% FCS ($OD=792.50 \pm 79.49$) or 10% FCS ($OD=1431.17 \pm 62.36$). LDH activity was unchanged in supernatants, whatever the FCS concentration in the culture medium (data not shown).

Effect of FCS concentration on viral genome synthesis

After 4 days of incubation of the infected cells in serum-free or serum-enriched medium (2% or 10%), genome synthesis was measured in cellular lysates in six independent experiments. The mean number of HCMV genomes was $10.15 \pm 0.56 \log_{10}$ copies/mL in the absence of FCS, and $9.99 \pm 0.67 \log_{10}$ copies/mL and $9.67 \pm 0.72 \log_{10}$ copies/mL in the presence of 2% and 10% FCS, respectively ($P=0.068$; data not shown).

Stability of artemisinin derivatives in medium

The degradation of artesunate followed first-order kinetics independently of the experimental conditions (concentration of FCS in culture medium, presence or absence of fibroblasts) and the initial concentration of the compound (1.88 or 30 μM). For an initial artesunate concentration equal to 30 μM in medium supplemented with 10% inactivated FCS, the AUC values were 662 ± 15 and $532 \pm 18 \text{ h} \cdot \mu M$ without and with fibroblasts, respectively (Figure 1). At 1.88 μM , these values were 44.3 ± 2.03 and $33.4 \pm 2.1 \text{ h} \cdot \mu M$, respectively. Thus, the AUC values were $27.6\% \pm 4.0\%$ higher in the absence of cells than in their presence. The corresponding half-life values were 14.4 ± 1.8 versus $12.4 \pm 1.6 \text{ h}$ ($P=0.019$) in the absence and in the presence of cells, respectively

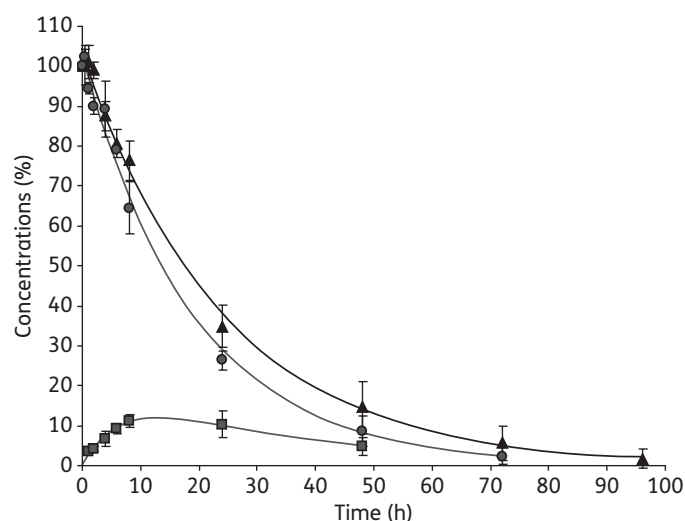


Figure 1. Concentration versus time curves representing artesunate degradation in the culture medium. Culture medium contained 10% inactivated FCS. Mean concentrations ($\pm$ SD) of artesunate were expressed as percentages of the initial artesunate concentration (30 μM); they were measured in the absence (triangles) or presence (circles) of fibroblasts. Mean ($\pm$ SD) concentrations of dihydroartemisinin were also measured in the culture medium (squares) and expressed as percentages of the initial artesunate concentration; they were similar without or with fibroblasts.

(Figure 1). No statistically significant difference was observed between medium enriched or not with 10% FCS, inactivated or not (data not shown). Whatever the experimental conditions, the elimination kinetics was slightly faster in the presence of cells ($P<0.05$).

Dihydroartemisinin concentrations were low, whatever the initial artesunate concentration and the medium composition. The concentration versus time curves of dihydroartemisinin, expressed as percentages of the initial artesunate concentration, were not influenced by any experimental condition (data not shown). For initial artesunate concentrations of both 30 and 1.88 μM , a steady-state with maximal dihydroartemisinin concentrations (representing $10.3\% \pm 0.5\%$ of the initial artesunate concentration) was obtained in a range of 6–24 h (Figure 1).

To assess the stability of dihydroartemisinin (independently of artesunate) and artemisinin, an additional study was performed. The stability of artemisinin derivatives was evaluated in medium supplemented with 10% inactivated FCS at 37°C over a 48 h period. The half-life values were 10.3 ± 0.9 , 5.2 ± 0.5 and $11.2 \pm 1.2 \text{ h}$ for artesunate, dihydroartemisinin and artemisinin, respectively.

Effect of addition of artesunate and dihydroartemisinin as fractional doses on antiviral activity

Antiviral assay was performed as described above, except that artesunate and dihydroartemisinin were not applied as a single dose but as fractional doses (one-quarter of the final dose) consecutively added post-infection for 4 days. The results are shown in Table 2. Comparison between the modes of drug addition was performed in experiments carried out in parallel to rule out variability due to cell passages, inoculum calibration or medium preparation. For AD169, the IC_{50} values were significantly lower when

Table 2. Effect on antiviral activity of addition of artesunate or dihydroartemisinin as fractional doses in the culture medium

Strain	Drug	IC ₅₀ (μM) ^a		Comparison between the two culture conditions ^c
		single dose ^b	fractional doses ^b	
AD169	ART	6.13 ± 0.87	4.01 ± 0.60	0.007
	DHA	20.17 ± 9.58	2.88 ± 1.88	0.012
	GCV	1.48 ± 0.18	2.87 ± 1.10	0.046
V11210	ART	1.94 ± 1.30	1.22 ± 0.74	0.377
	DHA	5.18 ± 2.89	1.49 ± 0.62	0.046
	GCV	1.24 ± 0.28	1.69 ± 0.45	0.141

ART, artesunate; DHA, dihydroartemisinin; GCV, ganciclovir.
Ganciclovir was tested in parallel as a control.
^aMeans ± SD from four independent experiments.
^bDrug addition in the culture medium: as single dose or four fractional doses.
^cSignificant *P* values (<0.05) are indicated in bold.

artesunate or dihydroartemisinin was added as fractional doses. For V11210, the IC₅₀ values of artesunate and dihydroartemisinin were also lower when the drug was added as fractional doses; however, the difference was significant only for dihydroartemisinin. Considering ganciclovir, IC₅₀ values were higher when the drug was added as fractional doses. However, the difference attained significance only for strain AD169 (*P*=0.046).

Discussion

Numerous studies have shown the ability of artesunate to inhibit HCMV replication *in vitro*.²⁻⁷ *In vivo*, dihydroartemisinin is the main artesunate metabolite.²⁸⁻³⁰ *In vitro*, only a partial artesunate conversion into dihydroartemisinin was observed in tissue culture medium whether FCS was present or not. With or without serum, the sum of the respective concentrations of artesunate and dihydroartemisinin decreased rapidly, suggesting degradation of the molecules due to their intrinsic chemical instability. Dihydroartemisinin is particularly unstable because of the lactole function present in its chemical structure. The transition from conformation α to conformation β (flip-flop) generates constraints on the endoperoxide bridge, which can then break.¹⁴ In the presence of cells, the artesunate concentration in the medium decreased significantly faster than in the absence of cells, whereas dihydroartemisinin concentration did not increase, suggesting weak intracellular uptake of artesunate. Unfortunately, methods to measure intracellular artemisinin-derivative concentrations are not yet available. To date, fibroblast uptake of artesunate has not been studied. An earlier study reported Caco-2 intestinal cell uptake of artesunate by passive diffusion.³³ In the present study, the degradation kinetics of dihydroartemisinin and artesunate had similar profiles under all the conditions tested. A striking finding of the study is the influence of the amount of FCS in the tissue culture medium on the antiviral activity of artesunate and dihydroartemisinin. In the absence of FCS, artesunate was shown to inhibit the replication of both reference strain AD169 and a clinical isolate at concentrations higher than those inhibiting replication in the presence of 10% FCS. A similar result was found for dihydroartemisinin when testing

the AD169 strain. The addition of FCS enhanced replication suppression. The absence of FCS in the culture medium alters cellular metabolism, as reflected by the reduction of LDH activity without enzyme release in the supernatant in FCS-starved cells compared with cells cultured in the presence of 10% FCS. Furthermore, HCMV DNA synthesis remained unchanged whether or not FCS was present in the culture medium. As the artesunate conversion rate was similar in the presence or the absence of serum, these results confirm that artesunate as well as dihydroartemisinin activity depends on the physiological condition of the infected cell. In contrast, the antiviral activity of ganciclovir, which specifically inhibits the viral DNA polymerase, remained similar in the absence of FCS. *In vivo*, HCMV infects a wide variety of cells. A major problem is therefore whether artesunate is able to inhibit HCMV replication in these target cells, whatever their physiological condition.

Dihydroartemisinin was less efficient than artesunate in suppressing AD169 replication, as shown by their respective IC₅₀s. Dihydroartemisinin has been reported to be even less efficient by Chou *et al.*,³ who observed 25% inhibition of AD169 replication at 15 μM. Methodological differences between both studies, such as the type of cells, culture time and mode of revelation, might have contributed to these differences. The lower antiviral activity of dihydroartemisinin was unexpected, since once inside the cells artesunate is hydrolysed to dihydroartemisinin and hemisuccinic acid by cellular esterases. However, dihydroartemisinin is more unstable than artesunate in culture medium. Moreover, cellular uptake of dihydroartemisinin is likely lower as its chemical structure lacks a hemisuccinate moiety. Altogether, these facts could explain the less efficient suppression of HCMV replication *in vitro* by dihydroartemisinin. Applying artesunate or dihydroartemisinin in fractional doses increased their antiviral activity. This finding is consistent with the report by Chou *et al.*,³ who found artesunate to be more potent against AD169 when applied as fractional doses. However, the difference in the artesunate activity according to the mode of dosing was not significant for the clinical isolate studied, whereas the increase of dihydroartemisinin antiviral activity was marked for both strains. These facts could result from both the high susceptibility of V11210 to artesunate and the great

instability of dihydroartemisinin. In contrast, ganciclovir was less efficient in suppressing HCMV replication when applied as fractional doses. These findings suggest that fractional dosing could partly compensate for the instability of the molecules, in particular that of dihydroartemisinin.

The chemical structures of artesunate, dihydroartemisinin and artemisinin are very similar and the three molecules contain the same endoperoxide bridge. However, artemisinin had no antiviral activity. Our results are in agreement with those of Chou *et al.*³ However, they are inconsistent with those reported by Arav-Boger *et al.*,² who showed similar IC₅₀ values for artesunate and artemisinin. It is unclear why artemisinin does not inhibit the replication of HCMV with the same efficiency as artesunate in the present study. Both molecules had similar stability in the culture medium. Neither induced cytotoxicity in the relevant range of concentrations tested for phenotyping. In the cell culture conditions, very poor cell uptake of artemisinin might be implied.

Seven immunocompromised patients have received artesunate to treat HCMV infection.^{10,11,34} In two of them, viral replication was controlled, whereas in the other five, treatment was ineffective. Six of them received oral artesunate and one intravenous artesunate. Regarding the *in vivo* short half-lives of artesunate (15 min) and dihydroartemisinin (60 min)^{12,28,30} and our experimental data, which are in favour of a time-dependent effect of artemisinin derivatives on HCMV, artesunate oral administration twice or thrice daily could be more effective than artesunate administration once daily. Although artesunate has been shown to be well tolerated when administered for the treatment of malaria,^{8,9} the safety of a new administration schedule should be assessed, in particular for long-term therapies.^{21,35,36} Thus, artesunate, a molecule with anti-HCMV activity, could contribute to a better management of HCMV-related diseases in immunocompromised patients.

Funding

This work was supported by the 'Institut National de Veille Sanitaire'.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010; **23**: 689–712.
- Arav-Boger R, He R, Chiou CJ *et al.* Artemisinin-derived dimers have greatly improved anti-cytomegalovirus activity compared to artemisinin monomers. *PLoS One* 2010; **5**: e10370.
- Chou S, Marousek G, Auerochs S *et al.* The unique antiviral activity of artesunate is broadly effective against human cytomegaloviruses including therapy-resistant mutants. *Antiviral Res* 2011; **92**: 364–8.
- Efferth T, Marschall M, Wang X *et al.* Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med (Berl)* 2002; **80**: 233–42.
- Efferth T, Romero MR, Wolf DG *et al.* The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin Infect Dis* 2008; **47**: 804–11.
- Kaptein SJ, Efferth T, Leis M *et al.* The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 2006; **69**: 60–9.
- Schnepf N, Corvo J, Pors MJ *et al.* Antiviral activity of ganciclovir and artesunate towards human cytomegalovirus in astrocytoma cells. *Antiviral Res* 2011; **89**: 186–8.
- Adjuik M, Babiker A, Garner P *et al.* Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet* 2004; **363**: 9–17.
- Sinclair D, Donegan S, Isba R *et al.* Artesunate versus quinine for treating severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; **issue 6**: CD005967.
- Lau PK, Woods ML, Ratanjee SK *et al.* Artesunate is ineffective in controlling valganciclovir-resistant cytomegalovirus infection. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 279.
- Shapira MY, Resnick IB, Chou S *et al.* Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 1455–7.
- Morris CA, Duparc S, Borghini-Fuhrer I *et al.* Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar J* 2011; **10**: 263.
- Dhingra V, Vishweshwar Rao K, Lakshmi Narasu M. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci* 2000; **66**: 279–300.
- Jansen FH. The pharmaceutical death-ride of dihydroartemisinin. *Malar J* 2010; **9**: 212.
- Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 1985; **228**: 1049–55.
- Tu Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med* 2011; **17**: 1217–20.
- Haynes RK, Krishna S. Artemisinins: activities and actions. *Microbes Infect* 2004; **6**: 1339–46.
- Meshnick SR. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol* 2002; **32**: 1655–60.
- Meshnick SR, Yang YZ, Lima V *et al.* Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 1108–14.
- Berger TG, Dieckmann D, Efferth T *et al.* Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma—first experiences. *Oncol Rep* 2005; **14**: 1599–603.
- Crespo-Ortiz MP, Wei MQ. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *J Biomed Biotechnol* 2012; **2012**: 247597.
- Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A *et al.* The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol* 2001; **18**: 767–73.
- Singh NP, Panwar VK. Case report of a pituitary macroadenoma treated with artemether. *Integr Cancer Ther* 2006; **5**: 391–4.
- Qian RS, Li ZL, Yu JL *et al.* The immunologic and antiviral effect of qinghaosu. *J Trad Chin Med* 1982; **2**: 271–6.
- Stinski MF, Isomura H. Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Med Microbiol Immunol* 2008; **197**: 223–31.
- He R, Park K, Cai H *et al.* Artemisinin-derived dimer diphenyl phosphate is an irreversible inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 3508–15.

- 27** He R, Mott BT, Rosenthal AS *et al.* An artemisinin-derived dimer has highly potent anti-cytomegalovirus (CMV) and anti-cancer activities. *PLoS One* 2011; **6**: e24334.
- 28** Davis TM, Phuong HL, Ilett KF *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous artesunate in severe falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 181–6.
- 29** Gautam A, Ahmed T, Batra V *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of endoperoxide antimalarials. *Curr Drug Metab* 2009; **10**: 289–306.
- 30** Miller RS, Li Q, Cantilena LR *et al.* Pharmacokinetic profiles of artesunate following multiple intravenous doses of 2, 4, and 8 mg/kg in healthy volunteers: phase 1b study. *Malar J* 2012; **11**: 255.
- 31** Schnepf N, Boiteau N, Petit F *et al.* Rapid determination of antiviral drug susceptibility of human cytomegalovirus by real-time PCR. *Antiviral Res* 2009; **81**: 64–7.
- 32** Farenc C, Fabreguette JR, Bressolle F. Pk-fit: a pharmacokinetic/pharmacodynamic and statistical data analysis software. *Comput Biomed Res* 2000; **33**: 315–29.
- 33** Augustijns P, D'Hulst A, Van Daele J *et al.* Transport of artemisinin and sodium artesunate in Caco-2 intestinal epithelial cells. *J Pharm Sci* 1996; **85**: 577–9.
- 34** Wolf DG, Shimon A, Resnick IB *et al.* Human cytomegalovirus kinetics following institution of artesunate after hematopoietic stem cell transplantation. *Antiviral Res* 2011; **90**: 183–6.
- 35** Efferth T, Kaina B. Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives. *Crit Rev Toxicol* 2010; **40**: 405–21.
- 36** Gordi T, Lepist EI. Artemisinin derivatives: toxic for laboratory animals, safe for humans? *Toxicol Lett* 2004; **147**: 99–107.

Alyssa FLOBINUS

Rôle de la protéine p14 du BNYVV et de l'ARN-3 viral dans la suppression de l'interférence par l'ARN et le mouvement à longue distance

Résumé : Le beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) est un phytovirus qui possède un génome segmenté à ARN de polarité positive. L'ARN3 viral renferme le domaine « coremin », indispensable au mouvement systémique du virus chez *Beta macrocarpa*. L'ARN3 subit un processus de dégradation qui conduit à la formation d'un ARN non codant (ncRNA3) correspondant à son extrémité 3'. Ce dernier est stabilisé par la séquence « coremin » à son extrémité 5'. Grâce à l'outil génétique levure, l'exoribonucléase Xrn1 puis l'exoribonucléase XRN4 de plante ont été identifiées comme étant responsable de l'accumulation du ncRNA3 à partir d'ARN3. Nous avons démontré *in vitro* que l'accumulation de ncRNA3 est liée au blocage de Xrn1 par « coremin ».

La protéine virale p14, un suppresseur du *RNA silencing* codée par l'ARN2, est aussi nécessaire au mouvement systémique du virus et interagit avec la séquence « coremin ». Nos travaux confirment que l'ARN3 est capable de compléter partiellement un mutant allélique de p14 dans l'infection locale et systémique. Nos résultats mettent en évidence un effet de la protéine p14 sur la systémie du *RNA silencing* et sur une éventuelle cible cellulaire RDR6.

Mots clés : ARN non codant viral, Exoribonucléases, BNYVV, *RNA silencing*, mouvement systémique

Role of the BNYVV -p14 protein and the viral RNA-3 in the RNA silencing suppression and the long distance movement

Abstract: The beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) is a multipartite positive-stranded RNA phytovirus. The RNA3 contains a « core » sequence in which resides the « coremin » motif of 20 nucleotides absolutely required for the viral systemic movement in *Beta macrocarpa*. The RNA3 undergoes a process that produces a noncoding RNA3 (ncRNA3), stabilized by « coremin » at its 5' end. Using a yeast genetic approach, the exoribonuclease Xrn1 and plant XRN4 have been identified as being responsible for the ncRNA3 accumulation from RNA3 processing. *In vitro*, we showed that the ncRNA3 accumulation is due to the stalling of Xrn1 by “coremin”.

The viral p14 protein, an RNA silencing suppressor encoded by the RNA2, is also required for the systemic movement and interacts with the “coremin” sequence. Our studies demonstrated the ability of RNA3 to partially complement an allelic p14 mutant in local and systemic infections. Our data highlighted an effect of the p14 protein on the RNA silencing movement and on the potential cellular target RDR6.

Keywords: viral noncoding RNA, Exoribonucleases, BNYVV, *RNA silencing*, systemic movement