



HAL
open science

Etude des facteurs viraux du LMV (Lettuce mosaic virus) impliqués dans le contournement de la résistance conférée par eIF4E chez la laitue: rôle de la protéine d'inclusion cylindrique (CI)

Anas Abdul-Razzak

► **To cite this version:**

Anas Abdul-Razzak. Etude des facteurs viraux du LMV (Lettuce mosaic virus) impliqués dans le contournement de la résistance conférée par eIF4E chez la laitue: rôle de la protéine d'inclusion cylindrique (CI). Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2010. Français. NNT : 2010AVIG0630 . tel-00672558

HAL Id: tel-00672558

<https://theses.hal.science/tel-00672558>

Submitted on 21 Feb 2012

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

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

Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

THESE

pour le

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE
VAUCLUSE**

Spécialité : Sciences Agronomiques

Présentée et soutenue publiquement le :

09 Décembre 2010

Par

ABDUL-RAZZAK Anas

Né le 16 juin 1976

**Etude des facteurs viraux du LMV (*Lettuce mosaic virus*) impliqués dans
le contournement de la résistance conférée par eIF4E chez la laitue:
rôle de la protéine d'inclusion cylindrique (CI)**

Membres du Jury

M. LECOQ H.	Directeur de recherche, INRA	Rapporteur
M. DRUCKER M.	Chargé de Recherche, INRA	Rapporteur
Mme Hébrard E.	Chargé de Recherche, IRD	Examinatrice
M. BELZUNCES L.	Directeur de Recherche, INRA	Directeur de thèse/Examineur
Mme GERMAN-RETANA S.	Chargé de Recherche, INRA	Co-directrice de thèse

*La nature ne se perd pas.
Ce qui se défait d'un côté
se refait d'un autre.
(Marcel Aymé)*

Remerciements

Le travail présenté dans ce rapport a été effectué au sein de l'UMR "Génétique et Diversité du Pouvoir Pathogène" de l'INRA-Aquitaine (Villenave d'Ornon).

Je tiens tout d'abord à manifester ma gratitude aux directeurs de thèse : M. Olivier Le Gall, de m'avoir accueilli au sein de son groupe "Interaction Plante-Virus" au cours de mes 5 années de thèse, et M. Luc Belzunces, de m'avoir aidé dans les démarches administratives m'ayant mené à la réalisation de cette thèse.

Je tiens également à adresser ma profonde gratitude à Mme Sylvie German-Retana, co-directrice de thèse, pour la bienveillance et la disponibilité qu'elle n'a cessé de me témoigner au cours de l'élaboration de ce travail, ainsi que pour la diligence et l'attention sans faille qu'elle a portées à celui-ci.

Je remercie très sincèrement M. Thierry Candresse, directeur du laboratoire, qui m'a fait l'honneur de m'accueillir et m'a permis de réaliser ce travail dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissant pour ses remarques et son soutien scientifique.

Je suis très honoré par la participation de M. Hervé LECOQ, M. Martin DRUCKER, Mme Eugénie Hébrard, à ce jury et je les remercie très sincèrement.

J'adresse mes très sincères remerciements à Carole Couture, Geneviève Roudet-Tavert, Bénédicte Doublet, Laurence Svanella qui ont contribué par leur aide technique à faire avancer ce travail.

Je tiens aussi à remercier Jocelyne Walter et Thierry Michon pour leur aide et leurs précieux conseils en purification des protéines.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à Mme Véronique Decroocq qui a accepté de lire et de commenter l'introduction bibliographique de ce manuscrit.

Je remercie également le gouvernement Syrien de m'avoir accordé un financement pour la réalisation de cette thèse.

Un merci particulier à Fater, pour son soutien ainsi que pour nos échanges à la fois scientifiques et politiques. Nos vacances « obligatoires » à Montréal restera un souvenir mémorable !

Je tiens à remercier tous les thésards et les post-docs que j'ai eu l'occasion de côtoyer pendant cette thèse pour leur ambiance fort sympathique. Je pense tout particulièrement à Anne-sophie, Grégoire, Valérie, Ophélie, Flavio, Claire, Salma....

J'aimerais remercier et saluer chaleureusement tous ceux qui m'ont entouré pendant mes « années thèse » : Luc, Chantal, Fred, Armelle, valérie, Noëlle, patrick, Marie-Christine Maryline, Marie-Lou, Claudine, Gaëlle, David, Stéphanie Cette liste n'est bien sûr pas exhaustive, et que les personnes non mentionnées veuillent bien m'excuser.

Je remercie chaleureusement ma chère épouse pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Amani, Ce travail n'aurait jamais été possible sans ton soutien et ton aide. Merci pour ton amour, ton soutien, ta patience, ton réconfort que tu m'as apportés durant cette période. Hazem et Mahmoud ont vraiment la chance de t'avoir comme mère. Eux aussi je voudrais souligner qu'ils ont été mes moteurs.

Enfin, je dédie ce travail à ma famille, mes parents, mes sœurs et frères. Ils m'ont toujours accompagnée et poussée à aller de l'avant.

Production scientifique

Publications à comité de lecture

Abdul Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Walter, J., Houvenaghel, M. C., Candresse, T., Le Gall, O. & German-Retana, S. (2009). Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against *Lettuce mosaic potyvirus*. *Molecular Plant Pathology* 10, 109-113.

Roudet-Tavert, G., Abdul-Razzak, A., Walter, J., Doublet, B., Delaunay, T., German-Retana, S., Michon, T., Le Gall, O. and Candresse, T. The C-terminus of Lettuce mosaic potyvirus CI helicase interacts with the viral VPg and with cellular translation initiation factors 4E. *à soumettre à Journal of Virology*

Communications orales

Abdul Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Roudet-Tavert, G., Walter, J., Houvenaghel, M. C., Candresse, T., Le Gall, O. & German-Retana, S. (2009). Implication de la CI (Inclusion Cytoplasmique) du virus de la mosaïque de la laitue (LMV) dans le contournement de la résistance médiée par eIF4E chez la laitue. In *12èmes Rencontres de virologie végétale*. Aussois (FRA).

Abdul-Razzak, A., Svanella, L., Roudet-Tavert, G., Houvenaghel, M.C., Walter, J., Michon, T., Le Gall, O., Candresse, T., & German-Retana, S. (2010). A new potyvirus virulence determinant: the CI (Cytoplasmic Inclusion) C-terminus modulates pathogenicity of *Lettuce mosaic virus* in lettuce. In *9ème Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale SVS*. Arcachon (FRA). In *EMBO Workshop, 12-16 June*, Fenestrelle, (ITA).

Posters

Abdul Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Le Gall, O. & German-Retana, S. (2007). Identification des acides aminés de la CI du virus de la mosaïque de la laitue (LMV), impliqués dans le contournement du gène de résistance *mol* chez la laitue. In *11èmes Rencontres de virologie végétale*. Aussois (FRA).

Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Candresse, T., Le Gall, O. & German-Retana, S. (2008). Involvement of the cytoplasmic inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against *Lettuce mosaic virus*. In *International RESISTVIR Conference "Genetic control of plant pathogenic viruses and their vectors: towards new resistance strategies"*. Cadiz (ESP).

Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Le Gall, O. & German-Retana, S. (2008). Cartographie des déterminants viraux du LMV (virus de la mosaïque de la laitue) impliqués dans le contournement du gène de résistance *mo1* chez la laitue. In *8ème Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale SVS*. Arcachon (FRA).

Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Candresse, T., Le Gall, O. & German-Retana, S. (2009). Involvement of the cytoplasmic inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against *Lettuce mosaic virus*. In *14th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Quebec (CAN).

Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Tavert-Roudet, G., Walter, J., Houvenaghel, M.C., Candresse, T., Le Gall, O. & German-Retana, S. (2009). Involvement of the cytoplasmic inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against *Lettuce mosaic virus*. In *9ème Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale SVS*. Arcachon (FRA).

Abdul-Razzak, A., Svanella, L., Roudet-Tavert, G., Houvenaghel, M.C., Walter, J., Michon, T., Le Gall, O., Candresse, T., & German-Retana, S. (2010). A new potyvirus virulence determinant: the CI (Cytoplasmic Inclusion) C-terminus modulates pathogenicity of *Lettuce mosaic virus* in lettuce. In *9ème Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale SVS*. Arcachon (FRA). In *EMBO Workshop, 12-16 June*, Fenestrelle, (ITA).

Abréviations

PRODUITS ET REACTIFS

Amp	ampicilline
APS	persulfate d'ammonium
BEt	bromure d'éthidium
BSA	sérum albumine bovine
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
DIECA	diéthylthiocarbamate
DTT	dithiothreitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
Gen	Gentamycine
IgG	immunoglobuline G
IPTG	isopropyl-b-D-thiogalactoside
Kan	kanamycine
LB	milieu Luria-Bertani
MES	acide 2N-morphinoethane sulfonique
MOPS	acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique
MS	milieu Murashige et Skoog
PBS	tampon phosphate salin
PEG	polyéthylène glycol
PVP	polyvinyl pyrrolidone
Rif	Rifampycine
RNase	ribonucléase
SDS	dodécyl-sulfate de sodium
Spec	Spectinomycine
SVF	sérum de veau fœtal
TBE	Tris borate EDTA
TEMED	tétraméthyl éthylène diamine
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TritonX100	Octylphenol polyethoxylate
UV	lumière ultraviolette
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside
YPD	milieu Yeast extract, Peptone, Dextrose

CELLULES, FACTEURS CELLULAIRES ET PROTEINES VIRALES

BS	cellule du parenchyme périvasculaire
CC	cellules compagnes
CI	protéine d'inclusion cylindrique
CP	protéine de capsid
eIF	facteur d'initiation de la traduction
HcPro	facteur assistant / protéase
HSP	protéine de choc thermique
MP	protéine de mouvement
MS	mésophylle
NIa	protéine d'inclusion nucléaire a
NIb	protéine d'inclusion nucléaire b
PABP	<i>polyA binding protein</i>
PIPO	<i>Pretty Interesting Potyviridae ORF</i>
PP	cellules de parenchyme phloémien
PPU	plasmodesmes branchés (<i>unités pore-plasmodesma</i>)
Pro	protéinase
PVIP	(<i>Potyvirus VPg-Interaction Protein</i>)
RdRp	ARN polymérase ARN dépendante
RE	membrane du réticulum endoplasmique
SE	cellules des tubes criblés
SEL	seuil d'exclusion limite
VPg	protéine virale liée au génome

ACIDES NUCLEIQUES, NUCLEOTIDES, GENES ET CLONAGE

A	adénosine
C	cytidine
G	guanosine
T	thymidine
U	uridine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	acide ribonucléique double brin
ARNm	ARN messenger
ARNsb	acide ribonucléique simple brin
ARNt	ARN de transfert
ATP	adénosine triphosphate
CIRE	éléments régulateurs de la traduction indépendante de la coiffe (<i>cap-independent translation regulatory elements</i>)
dNTP	désoxynucléoside 5' triphosphate (dont dATP, dCTP, dGTP et dTTP)
GTP	Guanosine triphosphate
IRES	site interne d'entrée des ribosomes (<i>Internal ribosome entry site</i>)
miRNA	<i>micro-RNA</i>
MSC	multisite de clonage
NOS	terminateur de transcription du gène de la nopaline synthétase
nt	nucléotide
ORF	cadre ouvert de lecture (<i>Open Reading Frame</i>)
P	promoteur
pb	paire de bases
PCR	réaction en chaîne de la polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RT	transcription inverse (<i>Reverse transcription</i>)
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
TM	température de fusion
35S	promoteur de transcription du CaMV
5'ou 3'UTR	région 5' ou 3' non traduite (<i>untranslated region</i>)

ACIDES AMINES

aa acide aminé

A	Ala	alanine	I	Iso	isoleucine	Q	Gln	glutamine
C	Cys	cystéine	K	Lys	lysine	R	Arg	arginine
D	Asp	aspartate	L	Leu	leucine	S	Ser	sérine
E	Glu	glutamate	M	Met	méthionine	T	Thr	thréonine
G	Gly	glycine	N	Asn	asparagine	V	Val	valine
H	His	histidine	P	Pro	proline	Y	Tyr	tyrosine

UNITES

Facteurs de multiplication

k	kilo- (10^3),
c	centi- (10^{-2}),
m	milli- (10^{-3}),
μ	micro- (10^{-6}),
n	nano- (10^{-9}),
p	pico- (10^{-12})

% p/v	pourcent (poids par volume)
% v/v	pourcent (volume par volume)
A	ampère
°C	degré Celsius
Ci	curie
Da	dalton
DOx	densité optique à x nm
F	farrad
g	gramme
h	heure
L	litre
Ω	ohm
m	mètre
M	mole par litre
min	minute
mol	mole
pH	potentiel hydrogène
rpm	tour par minute (g accélérateur de la pesanteur)
s	seconde
t°	température
u	unité enzymatique
V	volt
Ø	diamètre

VIRUS CITES

		GENRE	FAMILLE
BaMMV	<i>Barley mild mosaic virus</i>	<i>Bymovirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BaYMV	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	<i>Bymovirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BBWV	<i>Broad bean wilt virus</i>	<i>Fabavirus</i>	<i>Secoviridae</i>
BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BiMoV	<i>Bidens mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>	<i>Bromovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>
BWYV	<i>Beet western yellows virus</i>	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
ChiVMV	<i>Chilli Veinal Mottle Virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
CIYVV	<i>Clover yellow vein virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Closteroviridae</i>
DaYMV	<i>Dandelion yellow mosaic virus</i>	<i>Sequivirus</i>	<i>Sequiviridae</i>
ENMV	<i>Endive necrotic mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
JGMV	<i>Johnsongrass mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
LBVV	<i>Lettuce big vein virus</i>	<i>Varicosavirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>
LIYV	<i>lettuce infectious yellows virus</i>	<i>Crinivirus</i>	<i>Closteroviridae</i>
LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
MiLV	<i>Mirafiori lettuce virus</i>	<i>Ophiovirus</i>	<i>Ophioviridae</i>
MNSV	<i>Melon necrotic spot virus</i>	<i>Carmovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>
PepMoV	<i>Pepper mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PLRV	<i>Potato leaf roll virus</i>	<i>Luteovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PSbMV	<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PVA	<i>Potato virus A</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PVMV	<i>Pepper veinal mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
RCNMV	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>	<i>Dianthovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>
RTSV	<i>Rice tungro spherical virus</i>	<i>Waikavirus</i>	<i>Sequiviridae</i>
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i>	<i>Sobemovirus</i>	/
SCSMV	<i>Sugarcane streak mosaic virus</i>	/	<i>Potyviridae</i>
SINV	<i>Sindbis virus</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Togaviridae</i>
SMV	<i>Soybean mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
SpMoV	<i>Spartina mottle virus</i>	/	<i>Potyviridae</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tombusviridae</i>
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>	<i>Carmovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>
TomMMoV	<i>Tomato mild mottle virus</i>	/	<i>Potyviridae</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Bunyaviridae</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>	<i>Tymovirus</i>	<i>Tymoviridae</i>
WLMV	<i>White lupin mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>

Sommaire

Introduction

I. Avant propos	18
II. Les Potyvirus	19
II.1. Généralités	19
II.2. Organisation du génome	20
II.3. L'architecture du virion	22
II.4. Les différentes étapes de l'infection virale	23
II.4.1. L'entrée des virions dans la cellule et la décapsidation.....	23
II.4.2. La traduction et la réplication virale	23
II.4.2.1. L'initiation de la traduction	23
II.4.2.2. La réplication du génome viral.....	25
II.4.3. L'encapsidation.....	27
II.4.4. Le mouvement dans la plante.....	28
II.4.4.1. Le mouvement de cellule à cellule.....	28
II.4.4.2. Le mouvement à longue distance	30
II.4.5. Propagation de plante à plante	32
II.4.5.1. La transmission horizontale par puceron	32
II.4.5.2. La transmission verticale par la graine.....	34
III. Les résistances aux virus des plantes	35
III.1. Les résistances actives contre les virus de plantes	36
III.1.1. Les gènes de résistance dominante aux virus : les gènes R	36
III.1.2. Mécanisme de défense antivirale impliquant l'ARN silencing.....	38
III.1.3. Le système ubiquitine/26S protéasome : impliqué dans les mécanismes de défense antivirale chez les plantes ?.....	40
III.2. Les mécanisme de résistance passive contre les virus de plantes : mode d'action des gènes de résistance récessive	42
III.2.1. Le rôle clé des facteurs d'initiation de la traduction dans les résistances récessives des plantes	43
III.2.2. Très peu de mutations dans eIF4E suffisent à conférer la résistance.....	45
III.2.3. Diversité des phénotypes de résistance conférée par eIF4E selon les pathosystèmes.....	46
III.2.4. Facteur viral de contournement de la résistance conférée par eIF4E ?.....	47
III.2.5. Rôle de l'interaction VPg-eIF4E dans le cycle des potyvirus ?.....	50
III.2.6. D'autres facteurs de l'hôte potentiellement impliqués dans les mécanismes de résistance conférée par eIF4E ?.....	51
IV. Le pathosystème Laitue-LMV : un modèle d'étude des interactions plante-potyvirus	52
IV.1. La laitue et ses ressources génétiques	52
IV.2. Les virus de la laitue	53
IV.3. Les gènes de résistance au LMV chez la laitue	54
IV.4. Le gène de résistance récessive <i>mol</i> code pour eIF4E chez la laitue	55

IV.5. Originalité de la résistance conférée par eIF4E chez la laitue par rapport aux autres résistances médiée par eIF4E	56
IV.5.1. Diversité des phénotypes de résistance	56
IV.5.2. Le facteur viral de contournement de la résistance <i>mol</i> -eIF4E n'est pas seulement la VPg.....	57
V. Contexte et objectifs de l'étude	57

*Chapitre 1 : Etude du déterminisme moléculaire de la virulence du LMV vis-à-vis du gène de résistance récessive *mol* chez la laitue*

I. Introduction	60
II. Implication de la protéine d'inclusion cytoplasmique (CI) dans le contournement de la résistance récessive conférée par eIF4E chez la laitue vis-à-vis du LMV	62
Publication 1: Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against <i>Lettuce mosaic potyvirus</i>	62
III. Résultats complémentaires	68
III.1. Le mutant LMV-0-S621T contourne partiellement la résistance <i>mol</i> ¹	68
III.2. La Valine 602 et la Thréonine 621 n'ont pas un effet synergique sur le contournement de <i>mol</i> ¹	69
III.3. La variété Floribibb porteuse de l'allèle <i>mol</i> ¹ comporte des facteurs modulant le phénotype de l'infection	69

Chapitre 2 : Vers l'identification d'autres acides aminés dans la région CI-C-ter du LMV impliqués dans le contournement de la résistance conférée par eIF4E

I. Exploitation de la variabilité naturelle du LMV	72
II. Approche par mutagenèse aléatoire	73
II.1. Mise au point des conditions de mutagenèse aléatoire par PCR	74
II.2. Obtention du clone LMV-0ΔCI : un outil moléculaire crucial pour le clonage de la banque de fragments PCR mutés.	75
II.3. Validation de la méthode de criblage de la banque de mutants dérivés de LMV-0	75
II.4. Criblage de la banque de mutants dérivés de LMV-0.	76
III. Les acides aminés 617 et 627 dans la CI-C-ter du LMV jouent-ils un rôle dans la virulence du LMV vis à vis de <i>mol</i> ?	78

Chapitre 3 : Caractérisation fonctionnelle des interactions entre la protéine eIF4E de laitue et ses interacteurs viraux: CI et VPg

I. Introduction	83
II. Mise au point d'un protocole de purification des protéines CI-C-ter chez <i>E.coli</i>.....	83
II.1. Purification en conditions non dénaturantes	84
II.2. Purification en conditions dénaturantes	84
III. Mise en évidence des interactions CI-eIF4E <i>in vitro</i>	85
IV. Mise en évidence des interactions CI-eIF4E <i>in planta</i>	86
IV.1. Expression transitoire en cellules d'oignon : inoculation par biolistique	87
IV.2. Expression transitoire chez <i>N. Benthamiana</i> : transformation par agroinfiltration d'<i>A. tumefaciens</i>.....	88
Publication 2: The C-terminus of Lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion (CI) interacts with the viral VPg and lettuce eIF4E.....	89

Chapitre 4 : Discussion Générale et perspectives

I. Le contournement de la résistance <i>mo1</i> chez la laitue par le LMV n'est pas gouverné par la relation « gène pour gène ».....	120
II. Rôle d'autres mutations ponctuelles dans les deux régions de virulence du LMV, CI-C-ter et VPg, dans le contournement de la résistance <i>mo1</i> ?.....	122
II.1. Dans la région CI-C-ter ?	122
II.2. Dans la région 6K2 et la VPg ?.....	124
III. Des mutations naturelles et artificielles affectent-elles les interactions entre eIF4E et ses partenaires viraux ?.....	125
IV. Vers l'identification d'autres facteurs impliqués dans la compatibilité du LMV et les variétés de laitue résistantes.	127
V. Rôle du complexe formé entre le facteur eIF4E et les facteurs viraux identifiés CI-Cter et VPg dans le cycle viral ?.....	129
V.1. Rôle dans l'initiation de la traduction/réplication ?	129
V.2. Rôle dans le noyau ?.....	131
V.3. Rôle dans le mouvement de cellule à cellule ?	131

Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique et conditions de culture	135
--	------------

I.1. Matériel végétal	135
I.2. Isolats de LMV	135
I.2.1. Inoculation mécanique des virus	136
I.2.2. Inoculation biolistique d'acides nucléiques correspondant aux ADNc complets infectieux du LMV	136
I.3. Souches bactériennes	137
I.3.1. Bactéries utilisées pour le clonage	137
I.3.2. Bactéries utilisées pour la transformation de plantes.....	138
I.3.3. Milieux de culture	138
I.4. Les levures	139
I.4.1. Souche de levure utilisée.....	139
I.4.2. Milieux de culture	139
II. Techniques de clonage et de transformation utilisées lors de ce travail	139
II.1. Clonage « classique » par digestion-ligation	139
II.1.1. Principe et mode opératoire.....	139
II.1.2. Vecteurs de clonage « classiques »	140
II.2. Clonage « Gateway » (Invitrogen)	141
II.2.1. Principe et mode opératoire.....	141
II.2.2. Vecteurs de clonage gateway	143
II.3. Clonage par recombinaison homologue chez la levure	143
II.3.1. Principe et mode opératoire.....	143
II.3.2. Vecteur de clonage dans la levure dérivé de pLMV-0.....	144
II.4. Transformation bactérienne	145
II.4.1. Transformation par électroporation.....	145
II.4.2. Transformation par choc thermique	145
III. Techniques de manipulation des acides nucléiques	145
III.1. Extraction d'acides nucléiques	146
III.1.1. Extraction d'ARN totaux de plante (selon la méthode dite de Bertheau).....	146
III.1.2. Extraction d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	146
III.1.3. Extraction d'ADN plasmidique de levure	146
III.2. Séparation des acides nucléiques par électrophorèse en gel d'agarose	147
III.3. Purification d'acides nucléiques	148
III.3.1. Purification de fragments d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose	148
III.3.2. Purification de fragments PCR ou de produits de digestion	148
III.4. Déprotéinisation des acides nucléiques	148
III.5. Précipitation des acides nucléiques	149
III.6. Modifications enzymatiques	149
III.6.1. Les enzymes de restriction	149
III.6.2. L'ADN ligase du bactériophage T4.....	149
III.6.3. Les ADN polymérases ADN dépendantes	150
III.6.4. Les reverse transcriptases.....	151
III.6.5. Les nucléases.....	151
III.6.6. La phosphatase alcaline.....	151
III.7. Techniques d'amplification de séquence par PCR	152
III.7.1. La PCR	152
III.7.2. Mutagenèse dirigée par fusion-PCR	152
III.7.3. Mutagenèse aléatoire par PCR	153

III.7.4. La RT-PCR.....	153
IV. Technique de quantification de l'accumulation virale dans les plantes...	153
IV.1. Technique ELISA.....	153
IV.2. RT-PCR quantitative.....	154
V. Technique de manipulation des protéines.....	154
V.1. Expression et purification des protéines recombinantes chez <i>E.coli</i>	154
V.1.1. Vecteurs d'expression bactérienne.....	154
V.1.2. Induction de l'expression des protéines.....	155
V.1.3. Extraction et solubilisation des protéines insolubles.....	155
V.1.4. Purification de protéines recombinantes sur colonne de nickel.....	156
V.2. Electrophorèse en gel d'acrylamide.....	156
V.3. Coloration au bleu de Coomassie.....	156
V.4. Immunoblotting.....	157
V.5. Mise en évidence d'interactions protéine-protéine <i>in vitro</i> par ELISA.....	157
VI. Caractéristiques des anticorps utilisés.....	158
VII. Mise en évidence d'interactions protéines-protéines <i>in vivo</i> par BiFC	159
VII.1. Principe du BiFC.....	159
VII.2. BiFC par inoculation biolistique de cellules d'oignon.....	159
VII.2.1. Vecteurs de clonage Gateway compatibles.....	159
VII.2.2. Mode opératoire.....	160
VII.3. BiFC par agroinfiltration d' <i>A. tumefaciens</i> chez <i>N. Benthamiana</i>	161
VII.3.1. Vecteurs binaires Gateway pour BiFC.....	161
VII.3.2. Mode opératoire.....	161
VIII. Outils informatiques.....	162
<i>Références bibliographiques.....</i>	163

Annexes

<i>Annexe 1: Mise en place d'un test de détection du LMV par RT-PCR</i>	
<i>quantitative.....</i>	189
I. Principe de la PCR en temps réel.....	190
II. Les méthodes de détection des produits amplifiés.....	190
II.1. Méthode de détection en Sybr Green I.....	190
II.2. Méthode de détection en sonde TaqMan®.....	191

III. Mise au point et optimisation des systèmes de détection, quantification et identification du LMV	192
III.1. Système de détection et quantification du LMV par Sybr Green I.....	193
III.2. Système de détection et quantification simultanées de isolats du LMV par TaqMan®	194
III.3. Validation des tests développés	195
<i><u>Annexe 2:</u></i>	196
<i><u>Annexe 3:</u></i>	201

Introduction

I. Avant propos

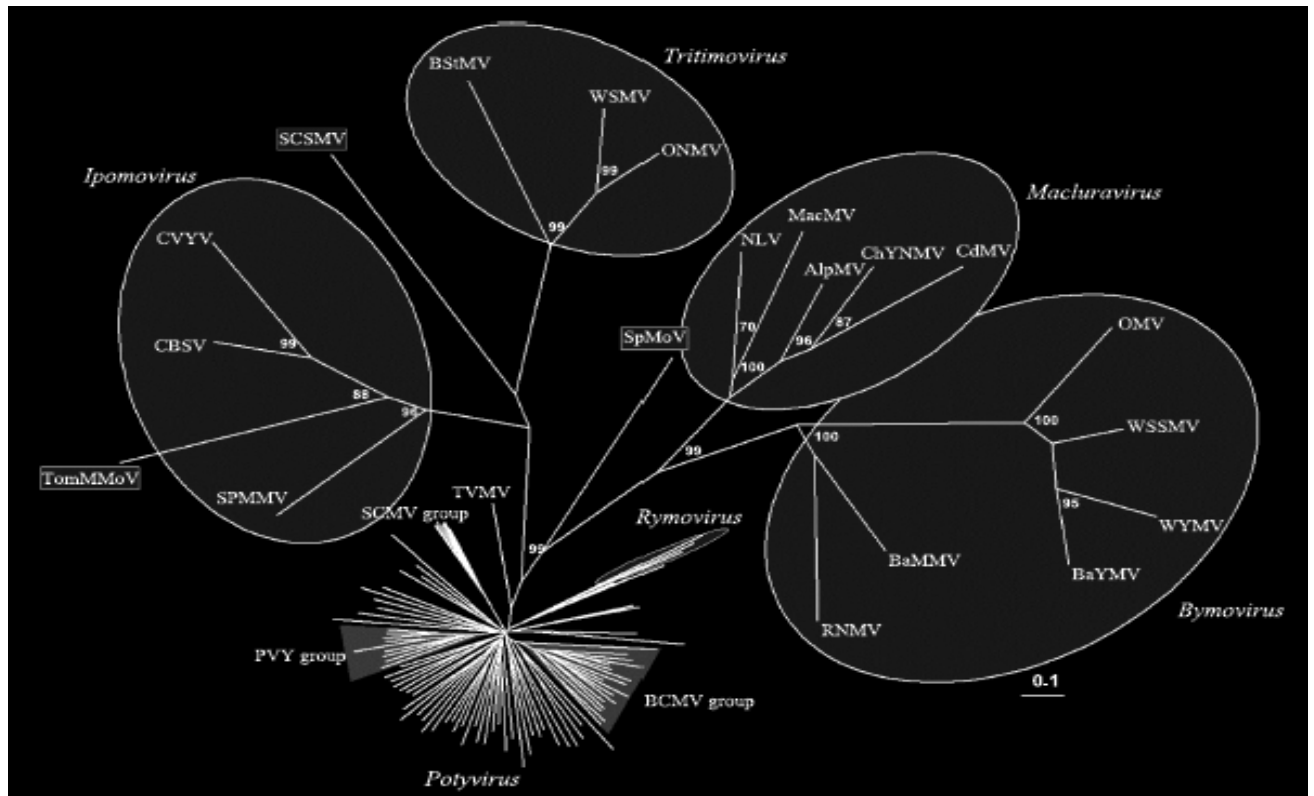
Parmi les maladies émergentes des plantes, celles causées par les virus ont une grande incidence économique, en particulier dans les pays en voie de développement. Elles provoquent des dommages considérables en réduisant la vigueur, le rendement mais aussi la qualité des produits végétaux. Elles peuvent également augmenter la sensibilité des plantes malades à d'autres agents pathogènes ou à des facteurs abiotiques.

Un certain nombre de stratégies de contrôle sont mises en œuvre pour prévenir ou atténuer l'impact des phytovirus. Ainsi, les mesures de quarantaine et les programmes de certification de semences et de matériel de propagation végétative, jouent un rôle essentiel pour limiter l'introduction et la dissémination de maladies virales dans un pays ou une région. Par ailleurs, les pratiques culturales, le contrôle des vecteurs ainsi que la protection croisée basée sur la préinoculation par une souche de virus peu pathogène réduisent le taux de propagation de virus dans les régions où les épidémies peuvent être problématiques. La lutte chimique contre les virus est indirecte car elle cible les vecteurs de transmission de ces agents pathogènes (insectes, nématodes,...). Elle est d'autant plus inefficace dans le cas des virus transmis très rapidement selon le mode non-persistant (c'est-à-dire courte durée de rétention et non circulant dans le vecteur).

Toutefois, l'approche idéale et la plus efficace pour lutter contre les virus repose sur la lutte génétique, et en particulier, l'utilisation de variétés résistantes. Déjà utilisée avec succès, la lutte génétique trouve cependant ses limites dans l'adaptation progressive des pathogènes aux résistances variétales lors de la mise en culture à grande échelle.

Les virus de plantes sont des parasites obligatoires qui possèdent un génome relativement petit, codant pour un nombre limité de protéines qui bien que souvent multi fonctionnelles, ne permettent pas l'accomplissement total du cycle viral. Pour compenser cette limitation, les virus séquestrent des facteurs d'hôte pour se reproduire et se multiplier dans la plante. Les virus de plantes doivent aussi neutraliser les mécanismes de défense déployée par leurs hôtes. Par conséquent, les interactions spécifiques entre des facteurs viraux et cellulaires jouent un rôle clé dans l'établissement de l'infection virale.

Le développement de nouvelles stratégies de contrôle des maladies virales chez les plantes nécessite donc d'approfondir nos connaissances sur les caractéristiques moléculaires des



D'après (Adams et al., 2005b)

Figure 1. Un exemple d'analyse phylogénétique de la famille *Potyviridae*. L'analyse phylogénétique est basée sur la séquence nucléotidique de la protéine de capsid. L'échelle correspond à 0,1 substitution par site. Les virus (SCSMV, *Sugarcane streak mosaic virus*; SpMoV, *Spartina mottle virus*; TomMMoV, *Tomato mild mottle virus*) présentés dans les rectangles gris sont des membres non classés de la famille des Potyviridae.

interactions des virus avec leurs hôtes, ainsi que sur les différents mécanismes par lesquels les virus évoluent et s'adaptent.

II. Les Potyvirus

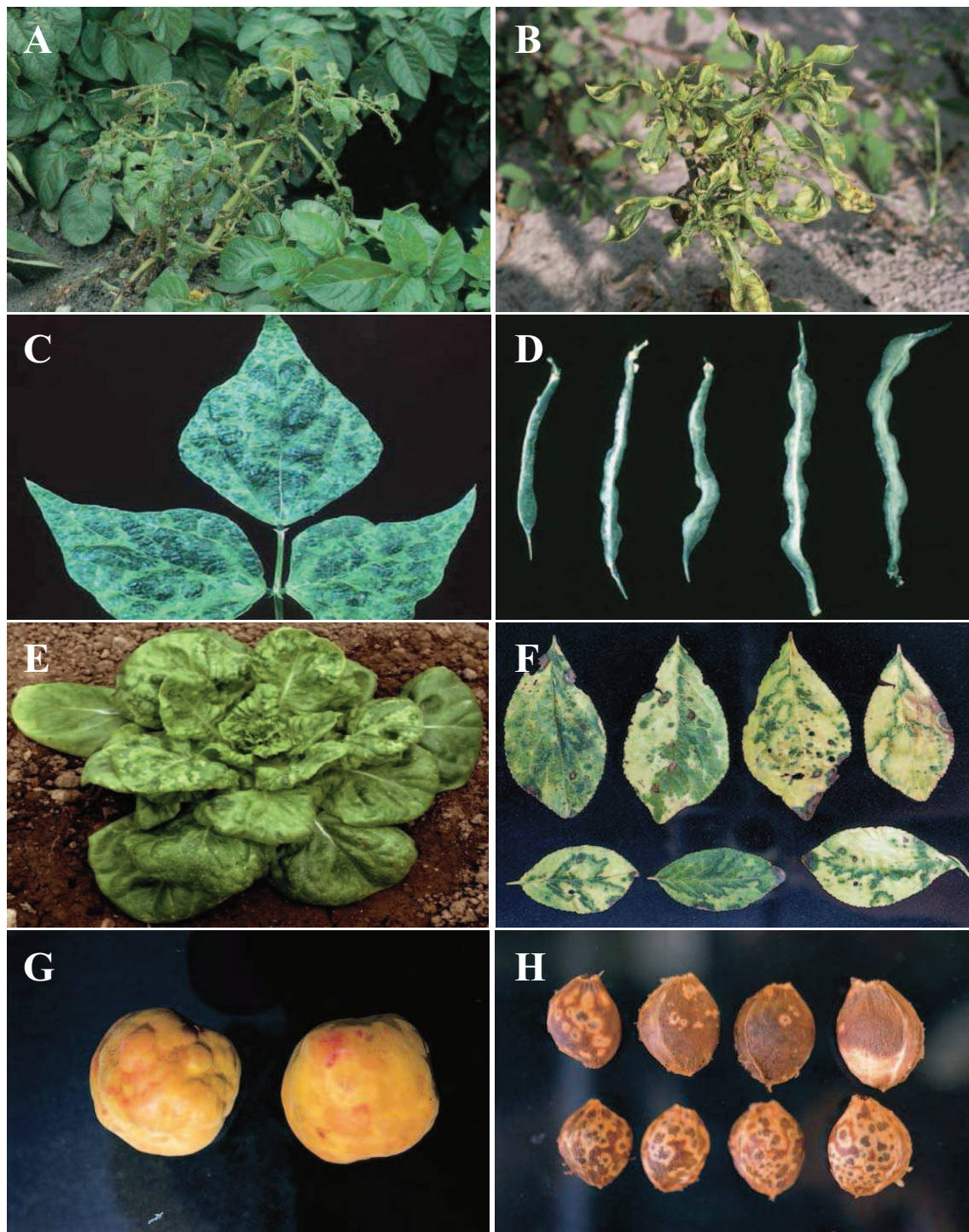
II.1. Généralités

Les potyvirus (du nom de leur membre-type, *Potato virus Y* ou PVY), appartiennent à la famille des *Potyviridae* qui comprend six genres: *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Macluravirus*, *Ipomovirus*, *Bymovirus* et *Tritimovirus* (**Figure 1**). Les potyvirus sont transmis par puceron et possèdent un génome monopartite, tandis que les bymovirus sont transmis par champignons et possèdent un génome composé de deux molécules d'ARN simple brin encapsidées séparément. Les rymovirus et les tritimovirus ont un génome monopartite et sont transmis par acariens. Les ipomovirus et les macluravirus ont également un génome monopartite, mais sont transmis respectivement par mouches blanches et pucerons (Regenmortel *et al.*, 2000).

Le genre *Potyvirus* regroupe actuellement plus de 100 espèces décrites (environ 30 % des virus de plantes connus) (Adams *et al.*, 2005a, Regenmortel *et al.*, 2000) qui provoquent des maladies graves chez de nombreuses espèces végétales et dans des environnements très divers (Agrios, 1997b). Ces maladies se manifestent par l'apparition de symptômes de mosaïques, marbrures, ou anneaux chlorotiques sur les feuilles, et les fruits (**Figure 2**). Certains potyvirus induisent des déformations foliaires, des nécroses nervaires pouvant conduire à la nécrose de la plante entière, et des réductions importantes de la taille de la plante malade affectant fortement sur la productivité (**Figure 2**).

La gravité des épidémies des potyvirus est généralement liée à l'abondance des foyers initiaux d'infection, la dynamique des populations des vecteurs ainsi que d'autres facteurs, comme la présence de mauvaises herbes jouant le rôle de réservoirs de virus (López-Moya & Garcia, 1999). L'intervention humaine est responsable, dans de nombreux cas, de l'introduction des maladies dans de nouveaux territoires.

Le contrôle des potyvirus le plus efficace se fait par le déploiement de variétés résistantes. Cependant l'emploi de semences certifiées sans virus lorsque le virus est transmis par les semences est souvent très efficace. L'élimination des plantes infectées ou les mauvaises



Photos issues de (Agrios, 1997b) et du site www.dpvweb.net

Figure 2. Exemples de symptômes induits par les potyvirus. (A, B) Symptômes induits par des isolats de *Potato virus Y* (PVY) : Mosaïque chlorotique et taches nécrotiques sur les feuilles de pomme de terre (A), mosaïque chlorotique et déformations foliaires sur piment (B). (C, D) Symptômes induits par le *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) : Mosaïque sur les feuilles d'haricot (C), déformation de gousses d'haricot (D). (E) Symptômes induits par le *Lettuce mosaic virus* (LMV) : Mosaïque observée sur laitue. (F,G,H) Symptômes induits par le *Plum pox virus* (PPV) : Mosaïque sur les feuilles de prunier (F), taches en anneaux, décoloration et malformation sur abricot (G), décolorations blanches et taches en anneaux sur des noyaux d'abricot (H).

herbes présentes dans et autour des champs de culture peut être utile. Depuis les années 1990, le contrôle de plusieurs potyvirus a été réalisé grâce à la production de plantes transgéniques exprimant des gènes dérivés du virus lui-même (résistance dérivée des pathogènes) (Dasgupta *et al.*, 2003, Fuchs & Gonsalves, 2007, Scholthof *et al.*, 1993).

II.2. Organisation du génome

Les potyvirus ont un ARN génomique monocaténaire de polarité positive, d'environ 10000 nucléotides. L'ARN génomique possède à son extrémité 5', une petite protéine virale liée de façon covalente (*Viral genome linked protein* ou VPg), et une queue polyadénylée à son extrémité 3'. Le principal cadre ouvert de lecture (ORF-0) de l'ARN génomique code pour une grande polyprotéine d'environ 3000 acides aminés (**Figure 3A**) qui est clivée ultérieurement en dix protéines fonctionnelles par trois protéases codées par l'ARN viral (Riechmann *et al.*, 1992) (**Figure 3B**). Récemment, un second cadre ouvert de lecture (cadre +2) chevauchant l'ORF codant pour la protéine P3 a été identifié : cet ORF coderait pour une petite protéine de 7 kD nommée (PIPO) pour « *Pretty Interesting Potyviridae ORF* » (Chung *et al.*, 2008, Wen & Hajimorad, 2010) qui serait produite lors de la traduction de la polyprotéine après décalage du cadre de lecture, sous la forme d'une fusion P3N-ter-PIPO.

Deux des protéases virales, P1 et HC-Pro (*Helper Component Proteinase*), sont codées par la région 5' du génome viral. La protéase P1 est une protéase à sérine de type chymotrypsine (Verchot *et al.*, 1992, Verchot *et al.*, 1991), alors que la protéase HC-Pro est une protéase à cystéine de type papaïne (Carrington *et al.*, 1989). Chacune de ces deux protéases clive la polyprotéine *en cis* à son extrémité C-terminale (Adams *et al.*, 2005a).

La troisième protéase (NIa-Pro) correspond à la partie C-terminale de la protéine d'inclusion nucléaire (NIa). La NIa-Pro est classée parmi les protéases à cystéine et s'apparente à la protéase 3C des picornavirus (Ziebuhr *et al.*, 2003). Elle clive la polyprotéine au niveau des jonctions entre P3/6K1, 6K1/CI, CI/6K2, 6K2/VPg, VPg/NIa-Pro, NIa-Pro/NIb et NIb/CP (**Figure 3B**). Dans la plupart des cas, NIa-Pro clive entre les acides aminés Gln et Ser, Gly ou Ala (Shukla *et al.*, 1994) *en cis* et *en trans*, mais le clivage *en cis* semble être préféré (Merits *et al.*, 2002). Le clivage par NIa-Pro est régulé par une séquence heptapeptide conservée flanquant le site de clivage (Adams *et al.*, 2005a).

Des variations sont observées dans la vitesse de protéolyse de ces sites de clivage. Ainsi, au contraire de la plupart des sites protéolytiques qui subissent un clivage rapide, les jonctions

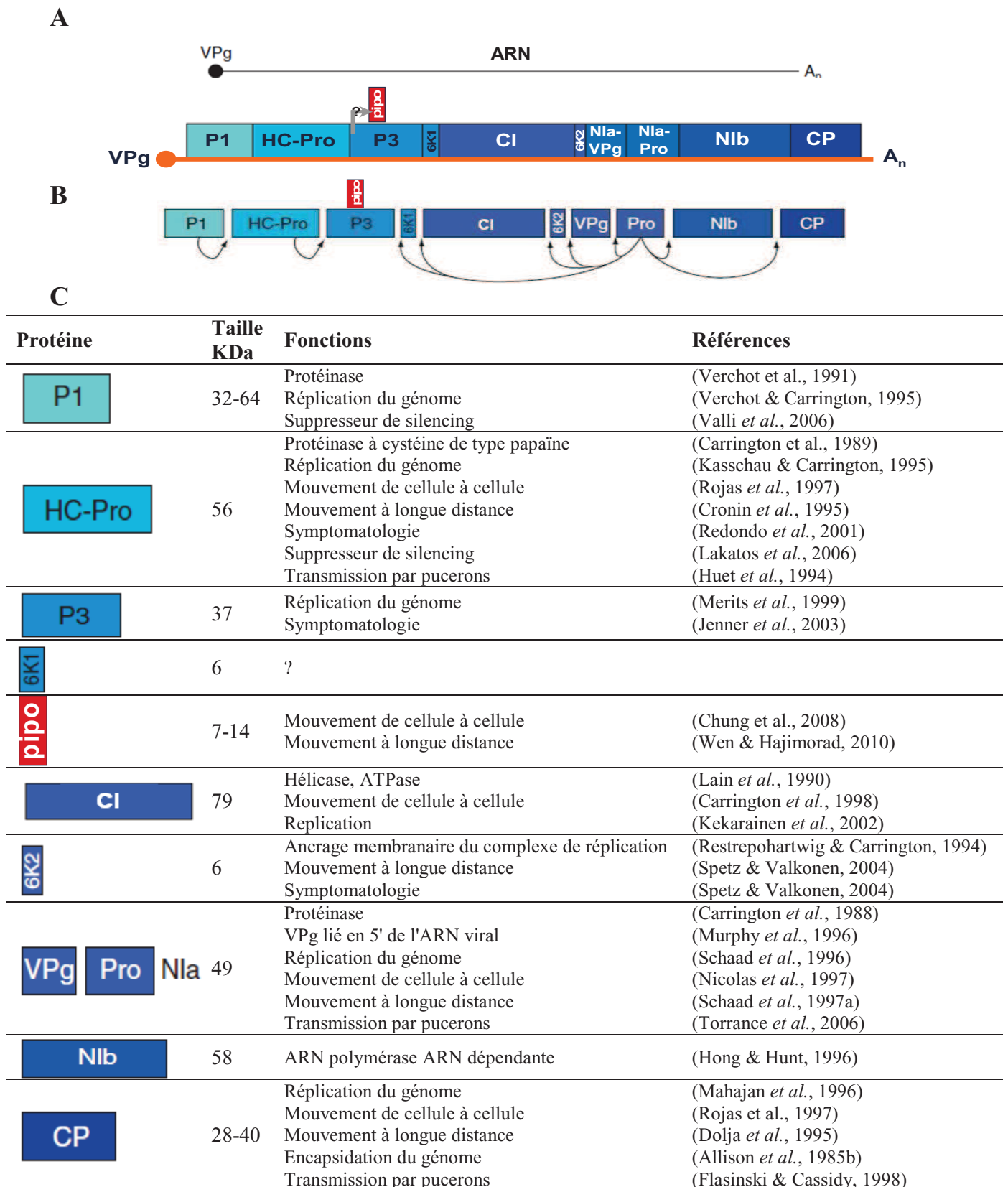


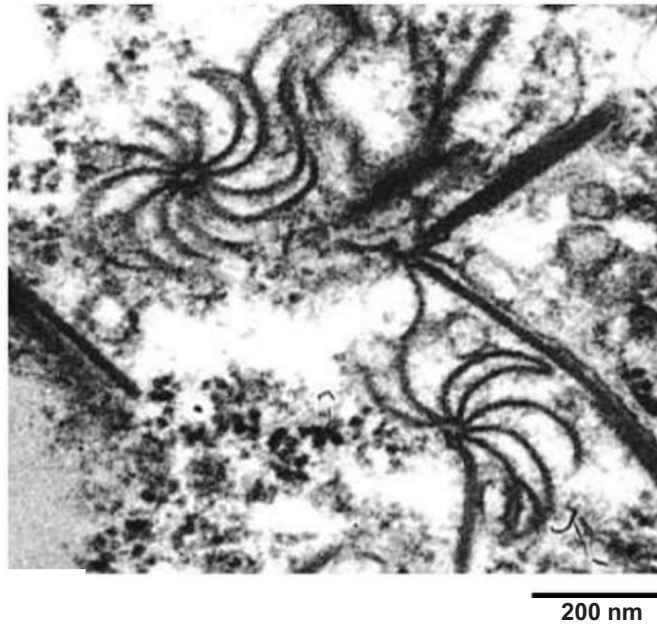
Figure 3. Organisation du génome des potyvirus et fonction des différentes protéines virales. **A.** Le génome (ARNsb) est schématisé par une ligne horizontale, et la VPg est représentée par un cercle solide à l'extrémité 5' (An : queue poly-A à l'extrémité 3'). La polyprotéine codée par l'ARN génomique est représentée par le rectangle. **B.** Les sites de clivage de la polyprotéine sont représentés par des flèches. **C.** Fonctions attribuées à chacune des protéines.

P3/6K1, CI/6K2 ainsi que VPg/NlA-Pro peuvent être clivés à une vitesse plus lente (Merits et al., 2002, Schaad et al., 1996). En outre, l'amplification efficace du génome exige un processing lent du site de clivage suboptimal Glu/Gly entre la VPg et la NlA-Pro de NlA (Schaad et al., 1996). La vitesse de clivage de la polyprotéine pendant le cycle d'infection constitue un moyen de réguler les activités des protéines virales.

Les processus de protéolyse vont ensuite donner naissance à dix protéines multifonctionnelles (**Figure 3C**). Toutes ces protéines ainsi que les deux régions non traduites de l'ARN viral (3'UTR et 5'UTR) sont essentielles à l'infection de la plante par le virus (Kekarainen et al., 2002). De plus, toutes ces protéines à l'exception de P3 se lient *in vitro* à l'ARN viral (Merits *et al.*, 1998). La fonction de la protéine PIPO est actuellement inconnue. Cependant, son implication dans la réplication, le mouvement ou la suppression du mécanisme du silencing a été proposée (Chung et al., 2008). Un aperçu des propriétés biologiques et biochimiques de l'ensemble des protéines des potyvirus est donné dans la figure 3C.

Les protéines de potyvirus sont produites en quantités équimolaires en raison de la stratégie d'expression du génome, basée sur la traduction suivie du clivage d'une polyprotéine. Comme environ 2000 unités de protéines de capsid (CP) sont nécessaires pour encapsider le génome viral, d'autres protéines virales matures sont probablement présentes en excès au dernier stade de l'infection. Certaines de ces protéines forment différents types d'inclusions cytoplasmique ou nucléaire qui peuvent être observés dans la cellule en microscopie électronique (Shukla et al., 1994). Ainsi, la morphologie en « roue à aube » des inclusions cytoplasmiques formées par la protéine d'inclusion cylindrique (CI) est une caractéristique propre aux potyvirus (**Figure 4**). Les maladies provoquées par les potyvirus peuvent ainsi être diagnostiquées par l'observation de ces corps d'inclusion cytoplasmiques en microscopie électronique (Edwardson, 1992).

La protéine d'inclusion nucléaire b (NIb) et le domaine VPg de la NlA contiennent un signal de localisation nucléaire. C'est pourquoi ces deux protéines sont trouvées principalement dans le noyau aux derniers stades de l'infection (Li *et al.*, 1997, Rajamaki & Valkonen, 2003, Schaad et al., 1996). La régulation de la localisation de la NlA dans le noyau est très importante pour l'infection du PVA (*Potato virus A*) chez les nicotianées (Rajamaki & Valkonen, 2009). La P3 peut aussi être localisée dans le noyau (Langenberg & Zhang, 1997). Par contre, la signification fonctionnelle de la localisation nucléaire de ces protéines n'est pas encore connue.



D'après (López-Moya & Garcia, 1999)

Figure 4. Observation en microscopie électronique des inclusions cytoplasmique formées par la protéine CI, en forme de « roues à aube» (pinwheels), dans les cellules de *Nicotiana benthamiana* infectées par le *Plum pox virus* (PPV).



D'après (López-Moya & Garcia, 1999)

Figure 5. Observation en microscopie électronique des particules purifiées du *Tobacco etch potyvirus* (TEV).

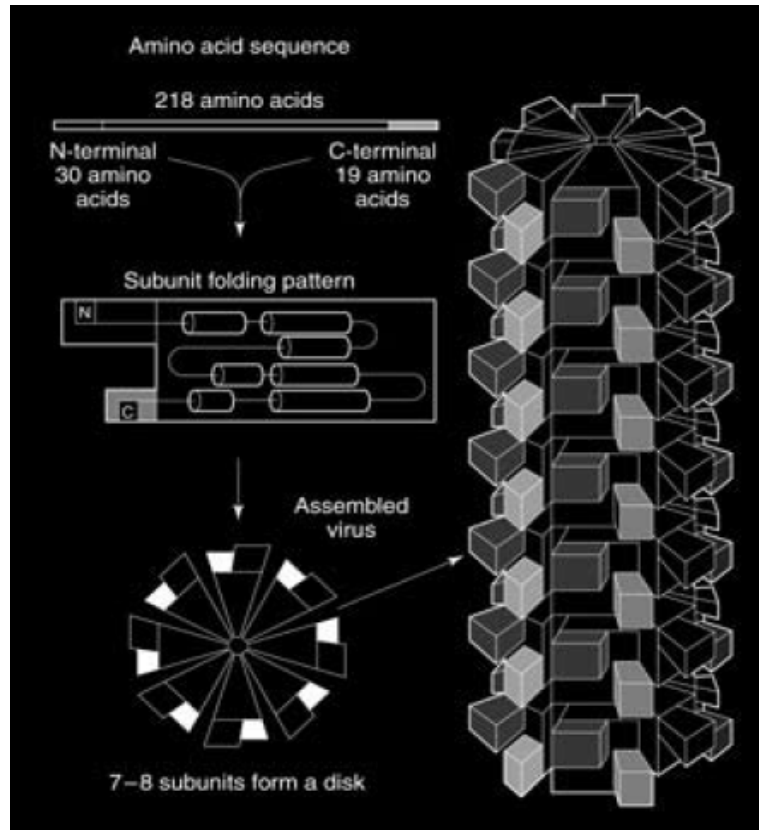
II.3. *L'architecture du virion*

Les potyvirus consistent en des virions filamenteux flexueux à symétrie hélicoïdale, de 680 à 900 nm de longueur et 11 à 15 nm de largeur (**Figure 5**) (Matthews, 1991). Le virion est composé d'environ 2000 copies d'une seule protéine de capsid (CP) qui encapsident l'ARN viral simple brin (ARNsb). Le pas de l'hélice du virion est de 3.4-3.5 nm avec 7-9 sous-unités de CP par tour. Le poids moléculaire de chaque sous-unité varie de 30 à 47 kDa selon les potyvirus, et les sous-unités sont arrangées de façon hélicoïdale autour de l'acide nucléique (Astier *et al.*, 2001) (**Figure 6**). La taille de la séquence protéique de la capsid varie en fonction de la longueur de la région amino-terminale variable, tandis que la région centrale composée de 220 acides aminés et impliquée dans l'architecture des particules est très conservée au sein des potyvirus.

Shukla *et al.* (1988) ont montré que le domaine central de la CP est insensible à un traitement à la trypsine, et que les régions N- et C-terminales sont exposées à la surface du virion (Shukla *et al.*, 1988) (**Figure 6**). Pourtant, cette structure n'a pas été retrouvée dans une étude plus récente visant à analyser la structure secondaire de la capsid (Baratova *et al.*, 2001). Ces dernières analyses ont révélé l'existence de huit hélices α et sept feuillets β distribués dans trois régions de structure tertiaire: (i) une région N-terminale non structurée exposée à la surface (N-ter non structurée suivie par quatre feuillets β consécutifs et une hélice α) (ii) une région C-terminale incluant deux hélices α , et trois feuillets β (domaine de liaison à l'ARN et non exposé à la surface) et (iii) une région centrale comprenant un paquet de cinq hélices α qui jouent potentiellement un rôle dans les interaction entre les deux domaines N et C terminale de la protéine (**Figure7**).

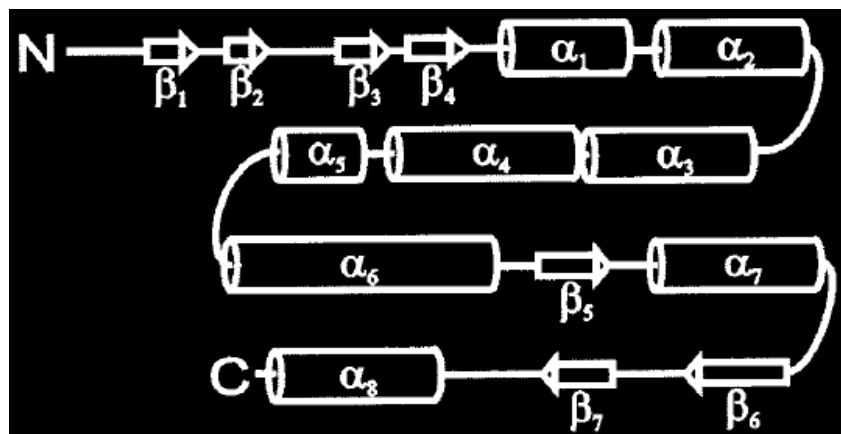
La protéine de capsid peut être la cible d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation qui a été montrée en conditions *in vitro* et *in vivo* (Ivanov *et al.*, 2003, Ivanov *et al.*, 2001) pour le PVA. Les auteurs ont montré que la protéine de capsid est phosphorylée par une protéine kinase Caséine II de la plante, et que cette phosphorylation est importante pour l'infection virale.

Un autre type de modification post-traductionnelle, la mono-O-glycosylation, a été montrée pour deux thréonines présentes en N-ter de la protéine de capsid du PPV (*Plum pox virus*) (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2002, Perez *et al.*, 2006). Ces deux acides aminés étant très conservés entre les différentes souches de PPV, les auteurs suggèrent que cette glycosylation serait importante pour le virus en conditions d'infection naturelle



D'après (López-Moya & Garcia, 1999)

Figure 6. Modèle de structure des particules de potyvirus. Le repliement prédit d'une sous-unité de capsid (CP) est montré. Les parties centrales (cœurs) de CP s'assemblent pour construire le virion, laissant les extrémités N-et C-terminales exposées à la surface de la particule virale.



D'après (Baratova et al., 2001)

Figure 7. Représentation schématique de la structure secondaire de la sous-unité de la protéine de capsid du PVA, montrant la distribution des hélices α (les cylindres), et des feuillets β (les flèches).

(Perez et al., 2006). De plus, il a été récemment montré que HC-Pro et VPg sont associées à environ 10% des particules purifiées du PVY et colocalisent avec l'extrémité 5' du génome viral (Torrance et al., 2006). En outre, il a été montré que la protéine CI du PVA se lie également à une sous-population de particules virales via une interaction avec la protéine de capsid virale (Gabrenaitė-Verkhovskaya *et al.*, 2008).

II.4. Les différentes étapes de l'infection virale

II.4.1. L'entrée des virions dans la cellule et la décapsidation

La paroi des cellules végétales représente une barrière physique que les virions franchissent à la faveur de blessures lors des piqûres de pucerons. Une fois entré dans la cellule végétale, le virus va détourner la machinerie cellulaire afin de réaliser son cycle infectieux au sein de l'organisme hôte (**Figure 8**). Celui-ci peut être divisé en quatre étapes principales: la décapsidation, la traduction, la réplication et le mouvement dans la plante.

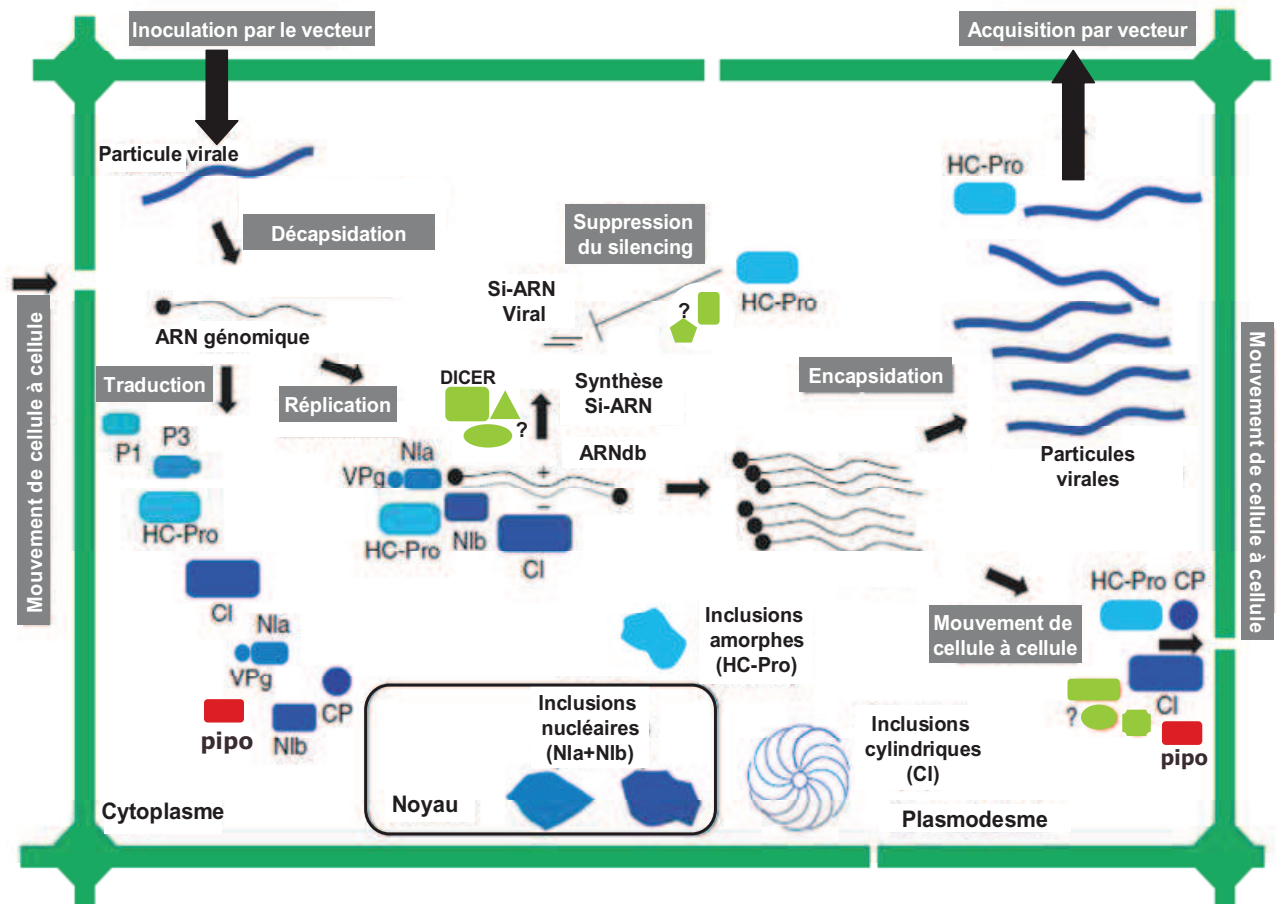
La décapsidation des virions et la libération de l'ARN génomique dans le cytoplasme sont des événements critiques pour l'initiation de l'infection qui sont encore mal connus chez les potyvirus. Ces événements précèdent généralement la traduction de la polyprotéine virale. Cependant, on suppose que les potyvirus utilisent la stratégie de «décapsidation co-traductionnelle» montrée chez le TMV (*Tobacco mosaic virus*) (Tobamovirus) dans laquelle l'étape de décapsidation est couplée à celle de la traduction de l'ARN viral (Saunal *et al.*, 1993).

II.4.2. La traduction et la réplication virale

II.4.2.1. L'initiation de la traduction

Une fois libéré de la particule virale, l'ARN viral est pris en charge par la machinerie de traduction, comme ceci est le cas pour les ARN messagers (ARNm) cellulaires.

Les ARNm de la cellule présentent à l'extrémité 5', une structure constituée d'une guanine modifiée (m⁷G^{5'}ppp^{5'}N_mpN_m) appelée coiffe, et une queue poly(A) à l'extrémité 3' associée à la protéine PABP (*poly(A) binding protein*) (**Figure 9**) (Dever, 1999). Ces structures dans les



Adaptée de (López-Moya & Garcia, 2008)

Figure 8. Représentation schématique des différentes étapes du cycle d'infection d'une cellule végétale par un potyvirus. Les couleurs et les formes correspondant aux protéines virales sont ceux de la Figure 3. L'accumulation possible de protéines sous forme d'inclusions dans certains compartiments intracellulaires est également indiquée. Les facteurs de l'hôte potentiellement impliqués dans le cycle viral sont représentés en vert clair.

ARNm cellulaires permettent la formation d'un « pont protéique », conséquence de l'interaction entre la PABP et le facteur d'initiation de la traduction eIF4G, lui-même lié au facteur d'initiation de la traduction eIF4E qui reconnaît et se lie spécifiquement à la coiffe des ARNm, menant ainsi à la circularisation de l'ARNm (**Figure 9**). L'eIF4E et eIF4G correspondent à deux sous-unités du complexe eIF4F qui contient en plus la sous-unité eIF4A. L'activité hélicase d'eIF4A permet de dérouler les structures secondaires présentes au niveau de la région 5' non traduite de l'ARNm. Chez les plantes, la PABP interagit également avec eIF4B (Le *et al.*, 1997). eIF4B est une protéine de liaison à l'ARN qui favorise l'activité ATPase et ARN-hélicase de eIF4A (Bi *et al.*, 2000).

L'interaction entre eIF4G et eIF3 entraîne le recrutement du complexe de pré-initiation 43S (sous-unité ribosomique 40S, eIF2-GTP-ARNt^{met}, eIF3, eIF5) (**Figure 9**) (Gallie, 2002). Ce complexe va « scanner » l'ARNm dans la direction 5'→3' jusqu'au codon d'initiation AUG avec lequel il se lie par l'intermédiaire de l'ARN de transfert initiateur (ARNt^{met}). La reconnaissance du site d'initiation est assistée par les facteurs eIF1 et eIF1A (Pestova *et al.*, 1998). Enfin, grâce à l'activité GTPasique d'eIF5, la sous-unité ribosomale 60S s'associe à la 40S pour former le ribosome entier au niveau du codon initiateur du cadre de lecture (**Figure 9**). La phase d'initiation est alors suivie des phases d'élongation et de terminaison (Gallie, 2002).

Moins de 20% des genres viraux regroupent des virus dont les ARN ont une structure comparable à celle de l'ARNm cellulaire (Dreher & Miller, 2006). Les virus ont donc mis en place des stratégies basées sur des structures particulières dans les parties 5' et/ou 3'UTR dans le but de détourner la machinerie de traduction à leur avantage (Thivierge *et al.*, 2005).

Chez les potyvirus, la coiffe de l'ARNm est remplacée par une protéine virale liée de manière covalente à l'extrémité 5', la VPg (**Figure 3A**). La liaison entre la VPg et l'ARN viral est nécessaire à l'infectivité du TVMV (*Tobacco vein mottling virus*) (Murphy *et al.*, 1996). La VPg de plusieurs potyvirus est capable d'interagir avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et/ou eIF(iso)4E (Leonard *et al.*, 2000, Roudet-Tavert *et al.*, 2007, Michon *et al.*, 2006, Schaad *et al.*, 2000, Wittmann *et al.*, 1997) et cette interaction est nécessaire pour l'infection (Lellis *et al.*, 2002, Leonard *et al.*, 2000). En outre, il a été montré que le précurseur de la VPg (NIa ou VPg-Pro) du TuMV (*Turnip mosaic virus*) interagit *in planta* avec eIF(iso)4E (Beauchemin *et al.*, 2007) et eIF4E (Leonard *et al.*, 2004), ainsi qu'avec la PABP (Leonard *et al.*, 2004) suggérant ainsi que l'interaction entre VPg-Pro et eIF(iso)4E ou eIF4E aussi bien qu'avec PABP pourrait promouvoir la circularisation de l'ARN viral. L'ensemble de ces données montre que la VPg pourrait être impliquée dans la

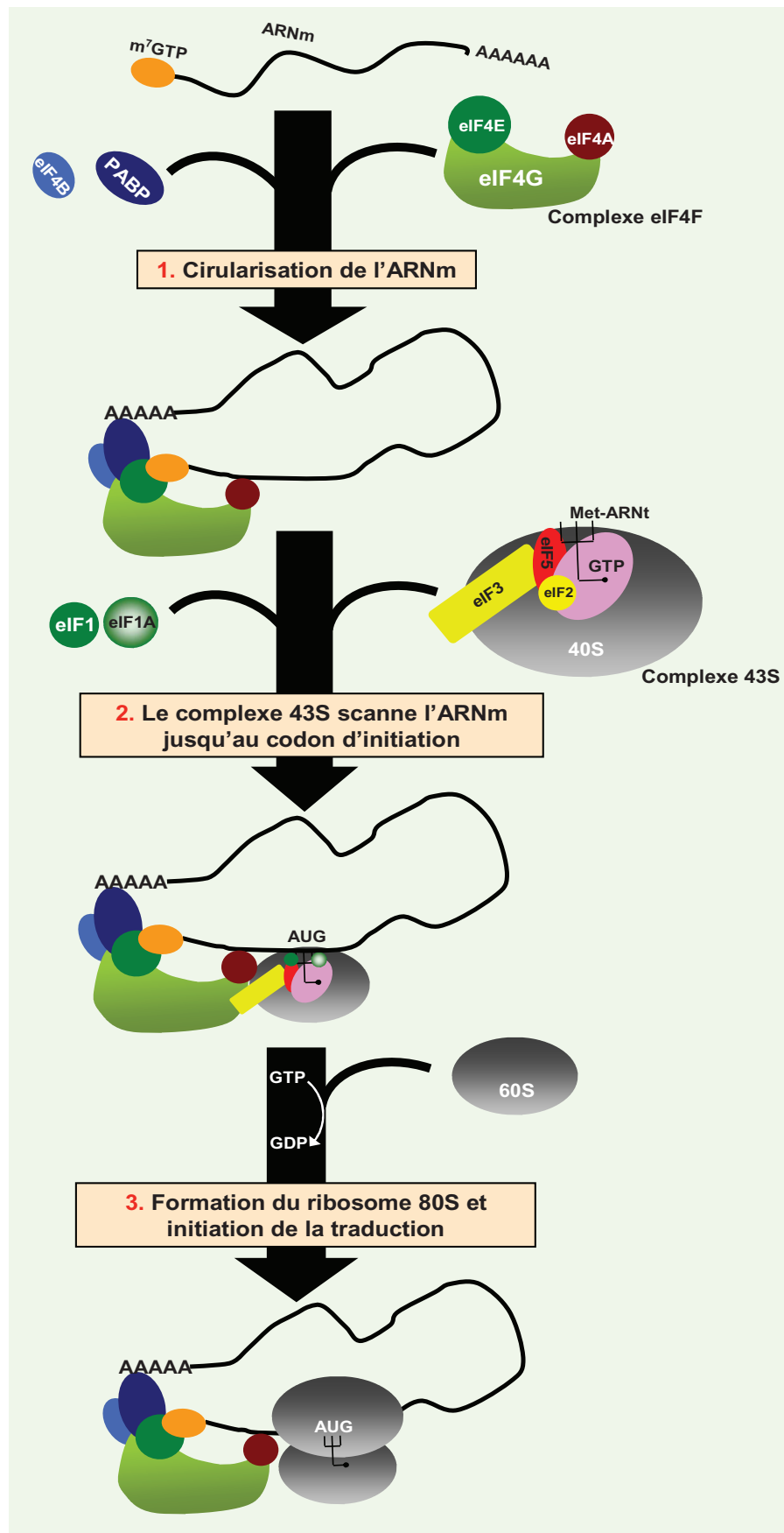


Figure 9. Principales étapes de l'initiation de la traduction cellulaire chez les eucaryotes.

traduction de l'ARN viral (Oruetebarria *et al.*, 2001).

Toutefois, l'initiation de la traduction de l'ARN génomique des potyvirus peut aussi avoir lieu par un mécanisme indépendant de la présence d'une structure de type coiffe. Dans ce cas, la région 5'UTR dirige la traduction en coopération avec la queue poly(A) à l'extrémité 3' (Gallie *et al.*, 1995). Cette région 5' non traduite contient un site d'entrée interne du ribosome appelé IRES (*internal ribosome entry site*) (Basso *et al.*, 1994) ainsi que des éléments régulateurs de la traduction indépendante de la coiffe appelés CIRE (*cap-independent translation regulatory elements*) (Niepel & Gallie, 1999), dont IRES dirige la traduction indépendante de la coiffe par un mécanisme impliquant le facteur d'initiation de la traduction eIF4G (Gallie, 2001). Cette traduction a été décrite pour un seul potyvirus, le TEV (*Tobacco etch potyvirus*) (Gallie, 2001), et cela reste à ce jour le seul exemple mentionnant une activité de traduction indépendante de la coiffe chez les potyvirus.

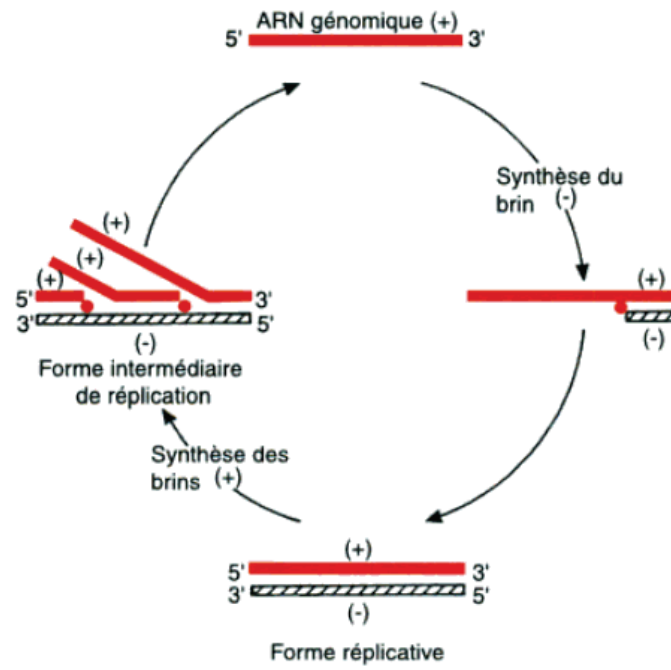
Dans le cas de l'initiation de la traduction de l'ARN du PPV (*Plum pox virus*), un mécanisme de type « leaky scanning » peut se mettre en place, sachant que ce mécanisme est tributaire de la présence d'un codon AUG en amont du codon d'initiation (SimonBuela *et al.*, 1997).

II.4.2.2. La réplication du génome viral

Les étapes de traduction et de réplication de l'ARN viral sont des processus liés et se font simultanément dans les cellules infectées. Il est ainsi difficile d'étudier ces processus comme des fonctions séparées. En effet, l'ARN viral de polarité positive est probablement utilisé simultanément en tant qu'ARNm matriciel pour la traduction de la polyprotéine mais aussi comme matrice pour la synthèse du brin complémentaire de polarité négative.

La réplication de l'ARN des potyvirus se fait en deux étapes (**Figure 10**): la réplicase virale N1b (l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp)) synthétise une molécule d'ARN complémentaire (de polarité négative) à l'ARN génomique. Une forme répllicative d'ARN double brin est ainsi produite. Par la suite, l'ARN de polarité négative sert de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN⁺ équivalentes à l'ARN génomique parental (Wang & Maule, 1995).

Les données concernant la réplication chez les potyvirus sont peu nombreuses. Les hypothèses sur cette étape du cycle viral se basent sur les connaissances acquises pour d'autres virus à ARN similaires aux potyvirus pour leur organisation génomique et leur stratégie d'expression du génome, tels que les virus animaux de la famille des *Picornaviridae*



D'après (Astier et al., 2001)

Figure 10. Cycle de réplication du génome des virus à ARN+. Le complexe de réplication composé de protéines cellulaires et de protéines virales est représenté par un rond rouge.

(Andino *et al.*, 1999, Agol *et al.*, 1999). La VPg des *picornaviridae* serait uridylinée et servirait d'amorce lors de la synthèse du brin positif d'ARN (Murray & Barton, 2003, Paul *et al.*, 1998). L'uridylation de la VPg par la NIB a été démontrée aussi pour un potyvirus, le PVA. Les auteurs ont ainsi proposé que la VPg des potyvirus jouerait le même rôle que chez les picornavirus lors de la réplication (Puustinen & Makinen, 2004). De plus, il a été proposé que l'interaction entre la réplicase virale NIB et des structures secondaires de l'ARN du TEV (Haldeman-Cahill *et al.*, 1998) et la PABP de l'hôte (Wang *et al.*, 2000), à l'extrémité 3' de l'ARN viral, permettrait le positionnement du complexe de réplication. La reconnaissance de l'extrémité 3' de l'ARN viral et l'initiation de la synthèse du brin négatif peuvent être réalisées *en trans* par la NIB de potyvirus hétérologues (Teycheney *et al.*, 2000). En effet, les structures secondaires de l'extrémité 3' de l'ARN sont conservées parmi les sous-groupes des potyvirus (Spetz *et al.*, 2003).

La nature du complexe de réplication de potyvirus n'est pas encore bien identifiée. Cependant, il contiendrait au moins la NIB (RdRp) (Martin *et al.*, 1995), l'helicase virale (CI) (Lain *et al.*, 1990) mais aussi la NIa qui interagit avec la NIB via la VPg (Hong *et al.*, 1995) ou via le domaine NIa-Pro (Guo *et al.*, 2003, Li *et al.*, 1997).

L'interaction NIa-NIB stimule l'activité polymérase (Fellers *et al.*, 1998) et est nécessaire pour l'infectivité du TEV (Daros *et al.*, 1999). La NIB (Li & Carrington, 1995) et la P1 (Verchot & Carrington, 1995) peuvent réaliser *en trans* des fonctions importantes dans l'amplification du génome du TEV, indiquant ainsi l'implication d'un complexe de réplication formé via des interactions protéine-protéine. À la différence de P1 et NIB, les protéines NIa (ou la VPg) (Schaad *et al.*, 1996) et HC-Pro (Kasschau & Carrington, 1995) sont requises *en cis* pour maintenir la viabilité du TEV. Les fonctions de réplication médiées par ces protéines ne peuvent pas être complétées par des protéines fonctionnelles correspondantes fournies *en trans*. Ces exemples révèlent la complexité du processus d'amplification du génome des potyvirus.

La synthèse de l'ARN des potyvirus est associée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Martin *et al.*, 1995). L'ancrage des protéines de réplication dans le réticulum endoplasmique se fait grâce à un domaine hydrophobe intra-membranaire de la protéine 6K2 qui induit la formation de vésicules provenant du RE pour la réplication du TEV (Restrepohartwig & Carrington, 1994). Les protéines virales nécessaires à la réplication ainsi que plusieurs facteurs de l'hôte tels que le facteur d'initiation de la traduction eIF(iso)4E, la PABP, le facteur d'élongation 1A ainsi que la protéine analogue de choc thermique 70-3

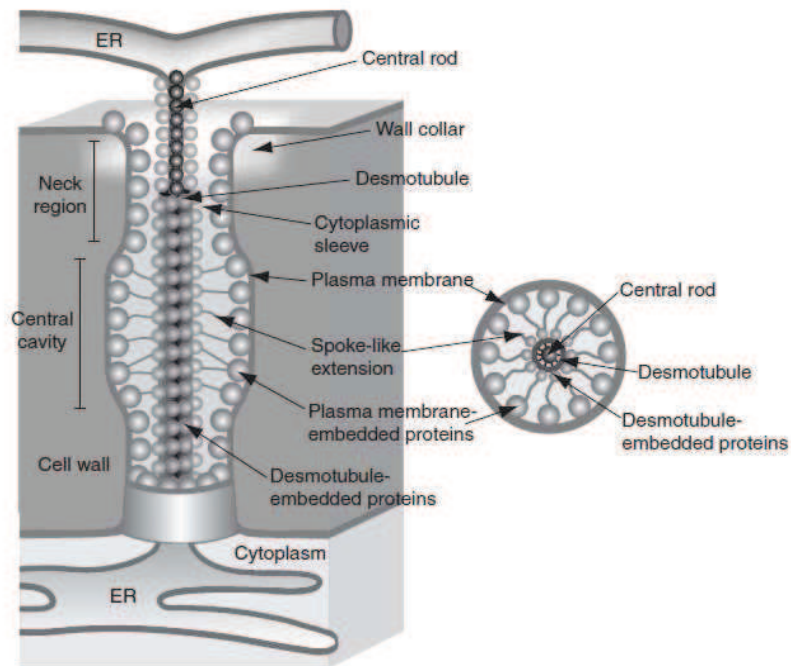
(Hsp70-3) sont associés aux vésicules induites par la 6K2 du TuMV (Cotton *et al.*, 2009, Thivierge *et al.*, 2008). Récemment, il a été montré que ces vésicules sont produites aux sites de sortie du RE, sur la membrane du réticulum (Wei & Wang, 2008), et qu'elles transitent par l'appareil de Golgi pour atteindre les chloroplastes où elles s'agrègent et induisent des invaginations de l'enveloppe externe du chloroplaste (Wei *et al.*, 2010a). Les vésicules induites par la 6K2 associées au chloroplaste contiennent des composants viraux : la réplicase virale, la protéine d'inclusion cylindrique (CI), des formes répliquatives d'ARN double brin ainsi que de l'ARN viral. L'ensemble de ces données suggère que les potyvirus recruteraient successivement le réticulum endoplasmique et les chloroplastes pour répliquer leur génome (Wei *et al.*, 2010a).

La réplication des potyvirus ne dépend pas de la synthèse *de novo* de protéines d'hôte dans les cellules infectées. Par contre, l'expression de gènes de la plante hôte est largement interrompue pendant le stade le plus actif de la réplication virale du PSbMV (*Pea seed-borne mosaic virus*) (Wang & Maule, 1995). Cependant, la synthèse de polyubiquitine et de protéines de choc thermique (HSP) est induite pendant la réplication, ce qui laisse penser que ces protéines soutiendraient la réplication virale (Aranda *et al.*, 1996).

Une étude récente a permis d'identifier deux ARN hélicase « à boîte DEAD » (DDX) : la AtRH8 chez *Arabidopsis thaliana*, et la PpDDXL chez le pêcher (*Prunus persica*), comme étant capables d'interagir avec la VPg du PPV en système double hybride chez la levure (Huang *et al.*, 2010). Bien que la protéine AtRH8 ne soit pas indispensable à la croissance et au développement d'*A. thaliana*, elle est nécessaire à l'infection par deux potyvirus, le PPV et le TuMV. En outre, AtRH8 co-localise avec le complexe de réplication viral au niveau des vésicules induites par la 6K2 dans les feuilles infectés, suggérant le rôle éventuel joué par AtRH8 dans le cycle d'infection virale. De plus, la surexpression du domaine de fixation à la VPg de la protéine AtRH8 ou de PpDDXL entraîne une inhibition de l'accumulation virale. Les auteurs ont suggéré que cet inhibition serait due à la compétition entre le domaine surexprimé et les protéines fonctionnelles (AtRH8 ou PpDDXL) pour se lier à la VPg, détériorant ainsi leur accumulation dans les vésicules. (Huang *et al.*, 2010).

II.4.3.L'encapsidation

Très peu de données sur l'assemblage des particules de potyvirus sont disponibles. En 1993, Jagadish *et al.* ont montré que les protéines de capsid du JGMV (*Johnsongrass mosaic virus*) exprimées dans des bactéries se polymérisent pour former des particules similaires à



D'après (Roberts, 2005)

Figure 11. Représentation schématique d'un plasmodesme. Coupes longitudinale (à gauche) et transversale (à droite) faites au niveau du centre d'un plasmodesme. ER : réticulum endoplasmique.

celles des potyvirus (VLP) en l'absence de l'ARN viral. Ils ont montré que deux acides aminés dans la région centrale de la CP sont essentiels à la formation de VLP (Jagadish *et al.*, 1993). Le mélange de l'ARN viral / protéine de capsid dans une solution de faible force ionique (pH 6.0–9.0) conduit à la formation de VLP qui ne sont cependant pas infectieuses (McDonald & Bancroft, 1977). L'encapsidation de vrais virions infectieux a seulement été observée dans les cellules infectées. L'origine de l'encapsidation peut être la région 5'-terminale de l'ARN viral synthétisé (Wu & Shaw, 1998).

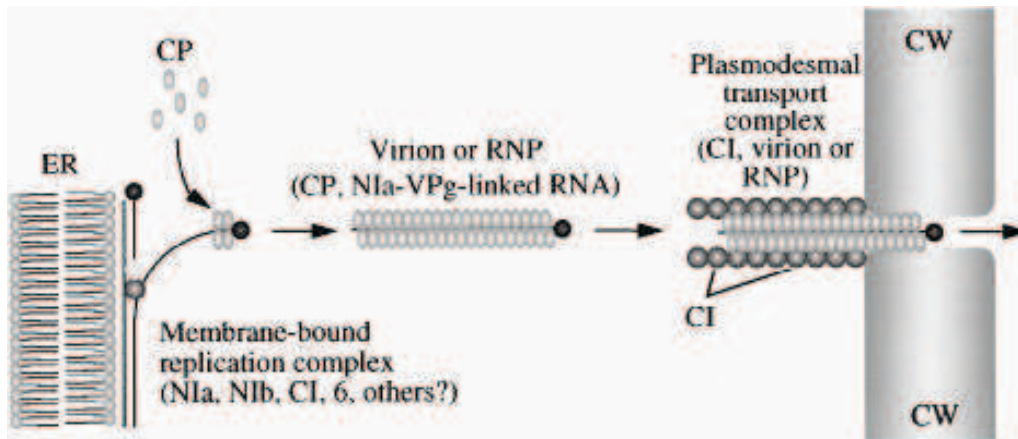
II.4.4. Le mouvement dans la plante

II.4.4.1. Le mouvement de cellule à cellule

La réplication du génome viral est suivie par le mouvement intracellulaire de l'ARN viral sous une forme inconnue, depuis le site de réplication jusqu'aux plasmodesmes (Lucas & Wolf, 1993), probablement facilité par les éléments du cytosquelette (Wright *et al.*, 2007).

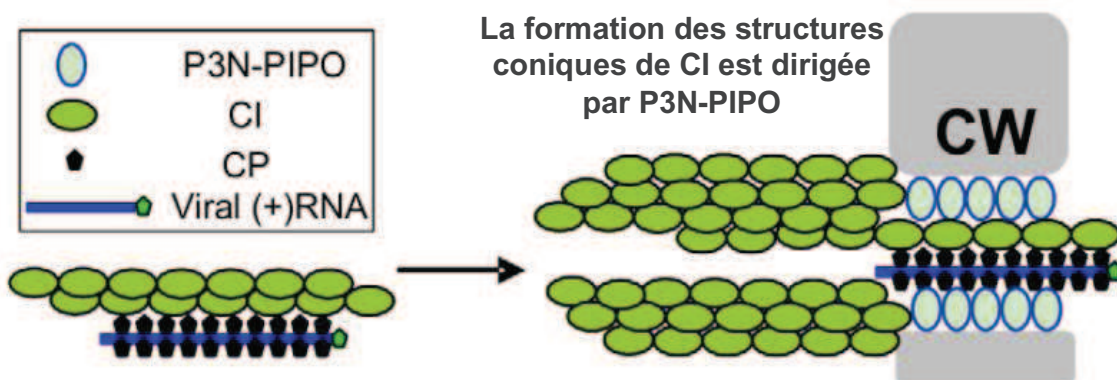
Les plasmodesmes sont des canaux complexes traversant la paroi cellulaire végétale, qui permettent une continuité cytoplasmique entre les cellules adjacentes (le symplaste). L'ultrastructure des plasmodesmes a été définie grâce à de nombreuses études de microscopie électronique (**Figure 11**) (Ding *et al.*, 1992, Botha, 1992). Les plasmodesmes sont traversés par une structure tubulaire appelée desmotubule, qui relie le réticulum endoplasmique des cellules contiguës. Le canal intradesmotubulaire ainsi formé à l'intérieur du desmotubule permet le passage contrôlé de molécules entre les cellules adjacentes. Le desmotubule est entouré d'un « annulus » de protéines globulaires sur toute l'épaisseur du plasmodesme (Ding *et al.*, 1992). Aux extrémités du desmotubule on observe un col qui permet l'ouverture ou la fermeture des plasmodesmes, permettant le contrôle de la circulation de molécules à travers le canal (Overall & Blackman, 1996).

Les plasmodesmes ont un diamètre d'environ 2,5 nm limitant ainsi le transport moléculaire intercellulaire à de petites molécules de poids moléculaire d'environ 800 à 1000 Da, cette limite étant appelée le seuil d'exclusion limite (SEL) (Lucas & Lee, 2004). Par conséquent, le diamètre de plasmodesmes est dans la plupart des cas trop petit pour permettre le passage passif de particules virales ou de génomes viraux. Cependant le seuil d'exclusion limite (SEL) des plasmodesmes peut être augmenté sous l'action de protéines de mouvement virales (MP) permettant ainsi le mouvement intercellulaire de grandes protéines endogènes ou des particules virales (Wolf *et al.*, 1989).



D'après (Carrington et al., 1998)

Figure 12. Modèle proposé pour le passage du TEV de cellule à cellule au travers un plasmodesme. CW : paroi cellulaire, CP : protéine de capsid, CI : protéine d'inclusion cylindrique, Nla : protéine d'inclusion nucléaire a, NIb : protéine d'inclusion nucléaire b, VPg : protéine liée au génome viral, RNP : ribonucléoprotéine.



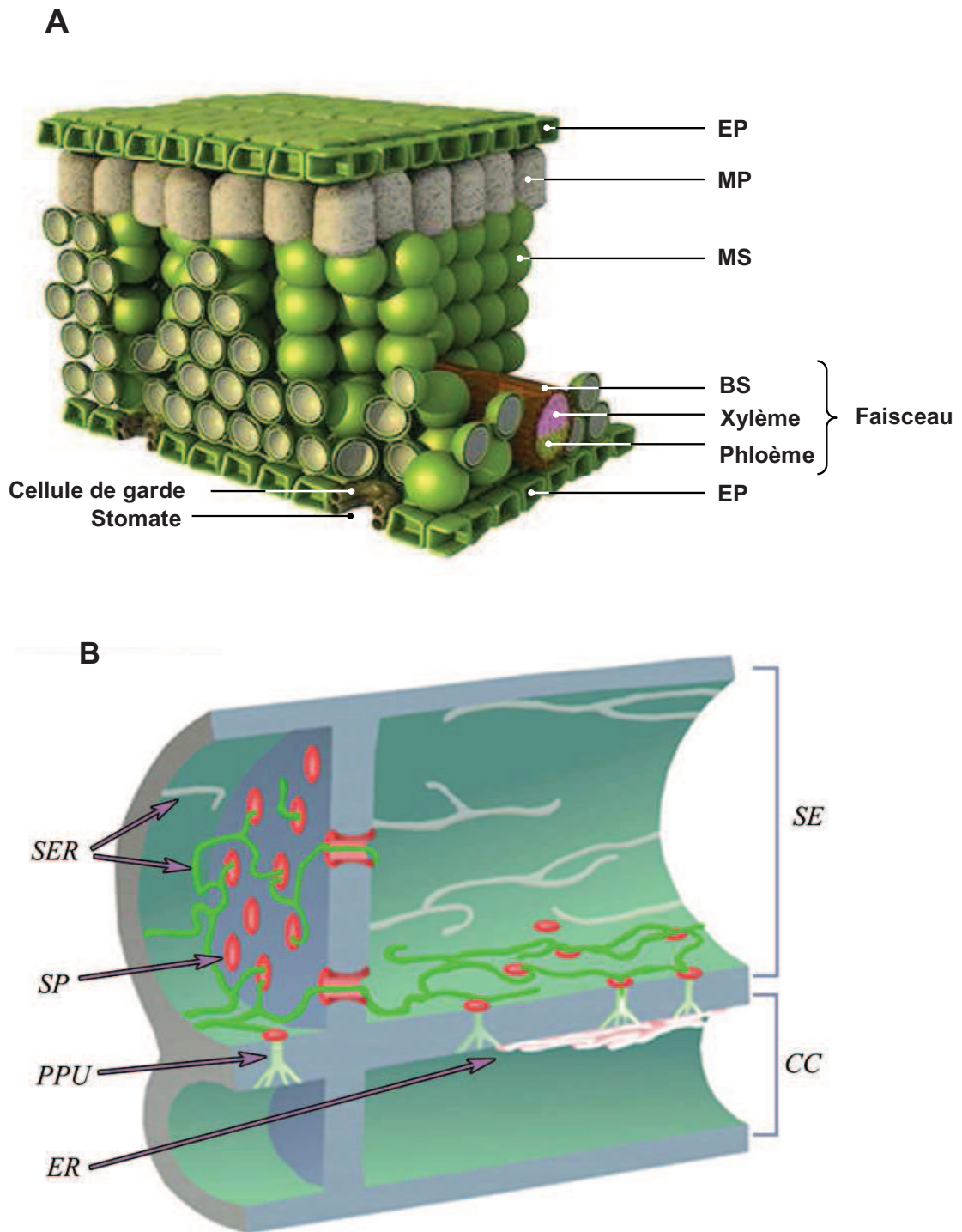
D'après (Wei et al., 2010b)

Figure 13. Dernier modèle proposé pour le passage des potyvirus de cellule à cellule impliquant le rôle de la protéine P3N-PIPO. Le « complexe » virion-CI serait transporté jusqu'au plasmodesme modifié où la CI s'agrège sous la forme de structures coniques ancrées par la P3N-PIPO localisée dans le plasmodesme. Le virion est ensuite transporté via des interactions CI-P3N-PIPO dans le plasmodesme pour entrer dans la cellule adjacente. CW : paroi cellulaire.

Si la plupart des virus disposent d'une (des) protéine(s) de mouvement (MP), codée(s) par leur génome, chez les *potyvirus*, près de la moitié des protéines virales multifonctionnelles seraient impliquées dans le mouvement de cellule à cellule (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). En particulier, Carrington *et al.* (1998) ont muté par « alanine scanning » le gène codant pour la CI du TEV et ont montré que des mutations situées dans l'un des motifs « hélicase » abolissent la réplication virale dans des protoplastes de tabac, et que la région N-ter de la CI serait impliquée dans le déplacement du virus de cellule à cellule. Grâce à des études d'ultrastructure en microscopie électronique réalisées sur des cotylédons de pois infectés par le PSbMV, Roberts *et al.* (1997) ont montré que la CI est localisée au niveau des plasmodesmes, de façon temporaire au niveau du front d'infection, sous forme de structures coniques. Un modèle impliquant la CP, HC-Pro, VPg et CI dans le mouvement de cellule à cellule du TEV avait été proposé (Carrington *et al.*, 1998, Nicolas *et al.*, 1997, Rojas *et al.*, 1997) (**Figure 12**). Le virion, ou ribonucléoprotéine, serait guidé vers le plasmodesme au travers d'un canal formé de protéines CI, l'interaction entre le virus et le plasmodesme ayant lieu via la CP (**Figure 12**) (Carrington *et al.*, 1998).

Très récemment, Wei *et al.* (2010b) ont montré que la protéine P3N-PIPO nouvellement identifiée chez les *potyvirus*, est localisée au niveau des plasmodesmes et interagit avec la CI du TuMV. Cette interaction conduirait à l'accumulation de la CI sous forme de structures coniques au niveau des plasmodesmes, nécessaires au mouvement de cellule à cellule (Wei *et al.*, 2010b). Les auteurs ont ainsi proposé un modèle impliquant à la fois la CI et la P3N-PIPO dans le mouvement de cellule à cellule de *potyvirus* (**Figure 13**). D'après ce modèle, les événements initiaux du mouvement impliqueraient le recrutement de particules virales par la CI. Le complexe ainsi formé du virion et CI pourrait se lier soit à la P3N-PIPO libre dans le cytoplasme avant qu'il ne soit transporté jusqu'aux plasmodesmes, ou à la P3N-PIPO déjà associée aux plasmodesmes. Le virion est ensuite transmis à travers les structures coniques de CI ancrées par la P3N-PIPO sur les plasmodesmes (Wei *et al.*, 2010b).

Au sein de la cellule, l'association avec le cytosquelette permettrait au virus de se déplacer sous forme de complexe ribonucléoprotéique (MP-ARN viral), ou de virions, dans le cytoplasme et à travers les plasmodesmes (Wright *et al.*, 2007). Dans le cas des *potyvirus*, cette interaction pourrait se faire via eIF4E et eIF4G (Lellis *et al.*, 2002), de façon indépendante de la traduction et/ou de la réplication (Gao *et al.*, 2004b). Cependant, Wei *et al.* (2010b) ont récemment montré que P3N-PIPO utiliserait la voie de sécrétion intracellulaire plutôt que le cytosquelette pour sa localisation au niveau des plasmodesmes.



D'après (Fitzgibbon et al., 2010)

Figure 14. (A). Représentation schématique d'une section transversale de feuille. EP: cellule épidermique, MP : cellule du mésophylle palissadique, MS : cellule du mésophylle, BS : Cellule du parenchyme périvasculaire. **(B). Coupe longitudinale d'un faisceau de phloème.** SE : élément criblé, CC : cellule compagne, SER : réticulum d'élément criblé, SP : pore d'élément criblé, PPU : unité pore-plasmodesme, ER : réticulum endoplasmique.

La forme de transport des potyvirus est encore inconnue, mais le mouvement sous forme de complexe ribonucléoprotéique semble le plus probable parce qu'il protégerait l'ARN du silencing (Carrington et al., 1998, Carrington *et al.*, 1996, Rajamaki & Valkonen, 2004). De plus, des mutations dans la région centrale conservée de la CP préviennent l'assemblage du virion et le mouvement de cellule à cellule, allant dans le sens d'un transport sous forme de virions (Dolja *et al.*, 1994).

II.4.4.2. Le mouvement à longue distance

Après s'être répliqués et déplacés de cellule à cellule au sein des feuilles inoculées, initiant à chaque fois un nouveau cycle de multiplication, les virus atteignent le phloème, où ils sont transportés par le flux de sève élaborée (photoassimilats) depuis les tissus « sources » vers un point de déchargement (tissus « puits ») où une infection secondaire peut avoir lieu (Van Bel, 2003). Cette étape, qui implique le chargement et le déchargement dans et depuis le système vasculaire, est appelée mouvement en systémie ou à longue distance. Durant cette étape du cycle viral, le virus traverse différents types de tissus incluant le mésophylle (MS), la gaine périvasculaire (BS) et le phloème (**Figure 14A**).

L'organisation du phloème repose sur plusieurs types cellulaires très spécialisés : les cellules compagnes (CC), les cellules de parenchyme phloémien (PP) et les cellules des tubes criblés (SE) (**Figure 14B**). La sève élaborée est transportée au sein des éléments criblés qui sont composés de cellules organisées en longues files cellulaires dont les parois transversales sont perforées de nombreuses ouvertures (les pores), permettant ainsi la circulation libre de la sève phloémienne. L'épaississement des parois latérales des tubes criblés (appelés dépôts nacrés) est lié à une modification des plasmodesmes entre les tubes criblés et les cellules compagnes (plasmodesmes branchés ou « *unités pore-plasmodesma* » (PPU)) (vanBel, 1995). Ces PPU ont exceptionnellement un grand seuil d'exclusion limite (SEL), permettant le passage de molécules de l'ordre de 10 à 40 kDa (Kempers & vanBel, 1997). Le complexe cellule compagne–tube criblé (SE-CC) est considéré comme une seule unité fonctionnelle en raison des relations structurelles et fonctionnelles entre les SE et les CC (**Figure 14B**) (Oparka & Turgeon, 1999).

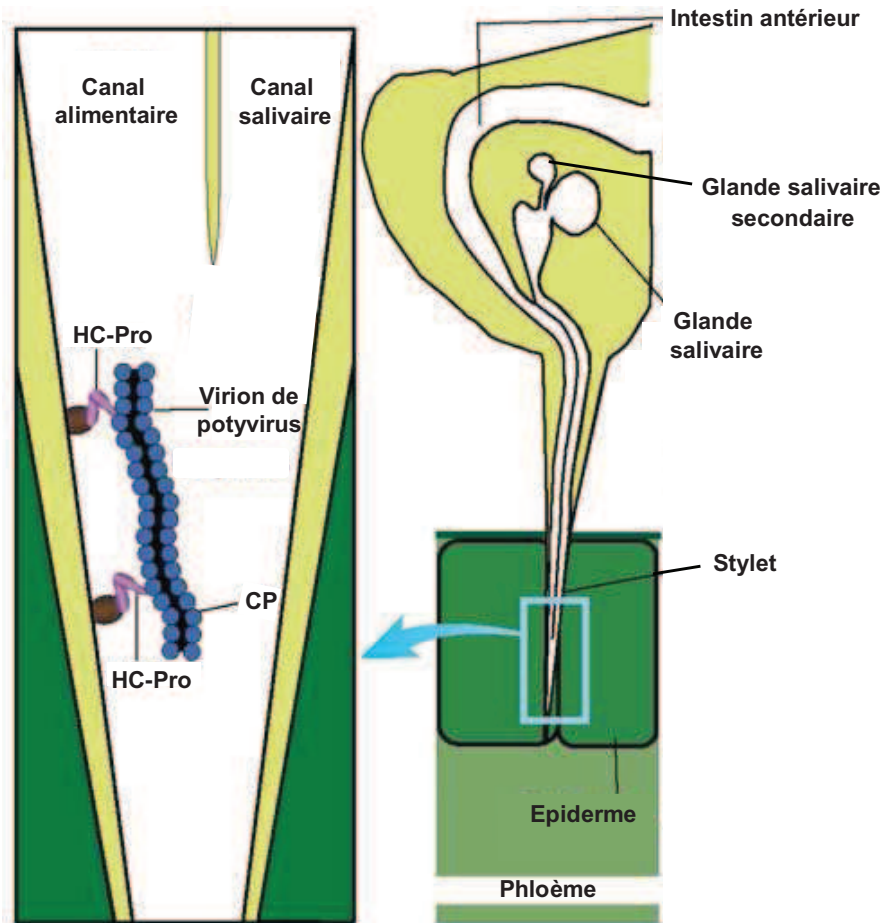
Les modalités exactes de l'entrée des potyvirus dans le phloème et du transport à longue distance ne sont toutefois pas bien connues en raison de la structure complexe des plantes vasculaires (Haywood *et al.*, 2002). Carrington *et al.* (1996) ont suggéré que le passage de la cellule compagne vers les tubes criblés ferait appel à des mécanismes – et donc probablement

des facteurs – différents suivant l'hôte ou le virus. Ceci semble confirmé par l'infection virale qui peut être locale ou généralisée selon l'hôte infecté (Saenz *et al.*, 2002).

Ainsi, le rôle d'une protéine cellulaire appelée PVIP (*Potyvirus VPg-Interaction Protein*) dans le mouvement systémique du TuMV a été proposé (Dunoyer *et al.*, 2004). Ces auteurs ont montré que l'abolition de l'interaction entre la VPg du TuMV et la PVIP conduit à une forte diminution du mouvement systémique et du mouvement de cellule à cellule plus qu'à la diminution de la réplication virale. De plus, la réduction de l'expression du gène *PVIP* chez *A. thaliana* est corrélée à une baisse de l'infectivité du TuMV (Dunoyer *et al.*, 2004).

Côté virus, trois protéines virales ont été impliquées dans le mouvement à longue distance des potyvirus : la CP, HC-Pro, et la VPg. En effet, la délétion de la région C-terminale de la CP du TEV ne peut pas être complétée *en trans* et inhibe le mouvement en systémie (Dolja *et al.*, 1994, Dolja *et al.*, 1995). De même, la protéine HC-Pro fonctionne *en trans* dans le mouvement à longue distance (Cronin *et al.*, 1995) et possède un domaine central impliqué dans le mouvement vasculaire ainsi que dans la suppression du silencing, suggérant ainsi que le mouvement vasculaire nécessite la suppression du silencing (Kasschau & Carrington, 2001). Il a été proposé que ce processus du silencing se fait dans les cellules compagnes (Marathe *et al.*, 2000) (voir § III.1.2. sur le silencing). Alamillo *et al.* (2006) ont par ailleurs montré que la restriction du mouvement du PPV chez *N. tabacum* était due à l'action conjointe de l'acide salicylique et des mécanismes d'ARN silencing. Ils ont suggéré que l'ARN silencing bloquerait le mouvement du virus au travers des tissus vasculaires alors que la réponse modulée par l'acide salicylique contribuerait à la restriction de l'infection du PPV dans les tissus non vasculaires (Alamillo *et al.*, 2006).

La région centrale de la VPg est elle aussi impliquée dans le mouvement vasculaire des potyvirus : des mutations dans cette région affectent le mouvement vasculaire du PVA et du TEV (Rajamaki & Valkonen, 1999, Rajamaki & Valkonen, 2002, Schaad *et al.*, 1997a). De plus, des mutations dans la région C-terminale de la VPg affectent l'accumulation virale et/ou le mouvement à longue distance du PVA (Rajamaki & Valkonen, 2002) et interfèrent avec la phosphorylation de la VPg (Puustinen *et al.*, 2002). Par ailleurs, la VPg du PVA s'accumule dans les cellules compagnes des feuilles non-infectées, situées au dessus des feuilles inoculées, en l'absence d'autres protéines virales et de l'ARN viral (Rajamaki & Valkonen, 2003). Ainsi, ces données suggèrent que la VPg serait transportée dans le système vasculaire « à l'avant » du front de l'infection virale, pour réprimer les réponses de défense de l'hôte qui empêcheraient ainsi le passage du virus dans les cellules compagnes et par conséquent l'infection systémique.



Adaptée de (Ng & Falk, 2006)

Figure 15. Représentation schématique du mode de transmission non persistant par puceron. Le facteur assistant de la transmission « *Helper Component* » (Hc-Pro) permet la formation d'un pont moléculaire entre le récepteur localisé au niveau du stylet du puceron et la particule virale.

D'autres protéines virales ont un rôle moins clair dans le mouvement. Ainsi, des mutations dans la CI (Carrington et al., 1998) et la 6K2 (Rajamaki & Valkonen, 1999, Spetz & Valkonen, 2004) interfèrent avec l'infection systémique du TEV et du PVA respectivement, par des mécanismes encore inconnus.

II.4.5. Propagation de plante à plante

II.4.5.1. La transmission horizontale par puceron

La majorité des virus de plantes dépend d'un vecteur pour leur transmission efficace de plante à plante. Dans le cas des potyvirus, ce sont les pucerons qui transmettent les virus selon le mode dit « non persistant », car les durées d'acquisition et d'inoculation du virus par le puceron sont très courtes (**Figure 15**) (Collar *et al.*, 1997, Martin *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 1996). Les pièces buccales du puceron, de type « piqueur-suceur », permettent une acquisition efficace de la sève chez les plantes et les stylets sont le lieu de rétention des potyvirus.

La nécessité d'un facteur assistant pour la transmission, « *Helper component* » (HC-Pro) a été montrée par des expériences de complémentation. En effet, la souche C du PVY non transmissible par puceron retrouvait sa transmissibilité quand les pucerons sont nourris au préalable sur une plante infectée avec une souche transmissible du PVY (Kassanis & Govier, 1971). De plus, des études ultérieures ont montré que les protéines de capsid (CP) et HC-Pro jouent un rôle crucial dans la transmission par pucerons du PVY, TEV, TVMV et ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) (Atreya & Pirone, 1993, Blanc *et al.*, 1998, Blanc *et al.*, 1997, Govier & Kassanis, 1974, Peng *et al.*, 1998). Ces études ont révélé l'existence de motifs conservés chez HC-Pro et la CP, nécessaires à la transmission des potyvirus par pucerons. La comparaison des séquences de souches transmissibles ou non du PVY a mis en évidence, au niveau de la protéine de capsid, une séquence fortement conservée chez les isolats transmissibles : le triplet d'acides aminés DAG. Ce triplet, situé 10 à 15 acides aminés en aval de l'extrémité N-terminale de la CP, pourrait interagir avec des composés de l'environnement extérieur, car cette extrémité est exposée à la surface de la particule virale (Allison *et al.*, 1985a, Atreya *et al.*, 1990, Lopez-Moya *et al.*, 1999).

Deux autres séquences nécessaires à la transmission ont été identifiées sur la protéine HC-Pro: le motif KITC (Lys-Ile-Thr-Cys) localisé dans la partie N-terminale de la HC-Pro (Atreya & Pirone, 1993) et le motif PTK (Pro-Thr-Cys) situé dans la partie centrale de la protéine HC-Pro, responsable de la fixation au triplet DAG de la CP (Peng et al., 1998). Des

substitutions d'acides aminés affectant l'un de ces motifs empêchent la transmission par pucerons (Atreya *et al.*, 1992, Atreya *et al.*, 1991, Granier *et al.*, 1993, Huet *et al.*, 1994, Lopez-Moya *et al.*, 1999, Peng *et al.*, 1998). Il faut noter que les séquences DAG, KITC et PTK ne sont pas conservées de manière stricte chez les potyvirus mais correspondent aux séquences retrouvées le plus fréquemment.

En outre, plusieurs études ont suggéré que d'autres d'acides aminés localisés dans les deux extrémités de la HC-Pro et de la CP joueraient un rôle crucial dans la transmission des potyvirus (Dombrovsky *et al.*, 2005, Flasinski & Cassidy, 1998, Llave *et al.*, 2002, Seo *et al.*, 2010). La fonction d'HC-Pro dans la transmission serait sous forme oligomérique plutôt que monomérique (Plisson *et al.*, 2003, Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005, Thornbury *et al.*, 1985). L'hypothèse du pont moléculaire a été proposée pour expliquer l'interaction entre le virion et son vecteur (**Figure 15**) (Froissart *et al.*, 2002, Peng *et al.*, 1998). Dans ce modèle, HC-Pro possède un domaine qui interagit avec le virion (implication des motifs PTK de HC-Pro et DAG de la CP (Blanc *et al.*, 1997, Peng *et al.*, 1998)) et un domaine (KITC) qui interagit avec le récepteur potentiel des stylets (Blanc *et al.*, 1998).

Récemment, le rôle potentiel de la VPg dans la transmission par pucerons a été suggéré. En effet, certains virions du PVY et du PVA présentent une « pointe saillante » à l'une des extrémités des particules virales, probablement associée à l'extrémité 5' du génome viral, qui contient la VPg ainsi que HC-Pro (Torrance *et al.*, 2006). Il a été suggéré que HC-Pro interagirait avec la VPg et la CP pour former cette structure et que ce complexe jouerait le rôle de pont moléculaire (Torrance *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats montre que le « pont moléculaire » établi entre les particules virales et le stylet des pucerons implique des interactions moléculaires complexes plutôt qu'une simple implication de HC-Pro.

Côté puceron, peu de données sur les récepteurs potentiels de HC-Pro sont disponibles. En 2007, Dombrovsky *et al* ont identifié par une approche de « Far-Western » neuf protéines cuticulaires du puceron *Myzus persicae* (Sulzer) capables d'interagir avec le HC-Pro du *Zucchini Yellow mosaic virus* (ZYMV). De plus, ces protéines cuticulaires sont incapables d'interagir avec la protéine HC-Pro mutée dans le motif KLSC (qui ne permet pas la transmission du ZYMV), suggérant une corrélation entre la liaison de HC-Pro aux protéines de la cuticule et la transmission par pucerons (Dombrovsky *et al.*, 2007).

Très récemment, suivant une méthode similaire de « Far-Western » en utilisant le HC-Pro du TEV comme appât, Fernandez-Calvino *et al* ont pu identifier de nouveaux interacteurs d'HC-Pro parmi les protéines extraites de têtes de pucerons *Myzus persicae*. En particulier, les auteurs se sont focalisés sur l'étude de la protéine ribosomique S2 (RPS2), en raison de

son homologie avec le précurseur du récepteur laminine, connu pour agir en tant que récepteur de plusieurs virus animaux (Fernandez-Calvino *et al.*, 2010). L'interaction spécifique entre RPS2 et HC-Pro du TEV a été confirmée après le clonage et l'expression hétérologue du gène correspondant du puceron *Myzus persicae*. De plus, l'implication éventuelle de la RPS2 dans le processus de transmission a également été suggérée après avoir montré qu'une forme de HC-Pro non-fonctionnelle pour la transmission (mutation dans le motif KITC conservé) est incapable d'interagir avec la RPS2 (Fernandez-Calvino *et al.*, 2010).

II.4.5.2. La transmission verticale par la graine

Certains potyvirus sont transmis par la graine en plus d'être transmis par pucerons comme le PSbMV, le LMV (*Lettuce mosaic virus*) et le BCMV (*Bean common mosaic virus*) (Astier *et al.*, 2001). Ce type de transmission peut reposer sur l'invasion directe de l'embryon immature après la fécondation ou par l'invasion indirecte via les gamètes infectés (Johansen *et al.*, 1994). Les potyvirus infectent généralement les organes reproducteurs de la plante, y compris le tégument de la graine, mais en général ils ne sont pas transmis par la graine car ils n'infectent pas l'embryon (Rajamaki & Valkonen, 2004, Roberts *et al.*, 2003).

La transmission par la graine des potyvirus a été particulièrement bien étudiée lors de l'infection du pois par le PSbMV (Johansen *et al.*, 1996, Wang & Maule, 1994). Le PSbMV envahit l'embryon de pois directement via le suspenseur. Cette structure transitoire communiquant par des plasmodesmes avec l'embryon joue un rôle d'acheminement nutritif à un stade précoce du développement de l'embryon mais dégénère dès que les cotétydons se développent (Wang & Maule, 1992). Pour entrer dans le suspenseur, le PSbMV s'accumule dans l'endosperme à la base du suspenseur (Roberts *et al.*, 2003).

Par conséquent, le virus n'a qu'une « fenêtre physiologique » étroite pour atteindre l'embryon avant la dégénérescence du suspenseur, et c'est pourquoi les plantes doivent être infectées à un stade précoce du développement (Wang & Maule, 1994). Par exemple, le PSbMV doit infecter les plantes de pois avant la floraison pour être transmissible par les semences (Wang & Maule, 1992). En général, l'efficacité de la transmission du virus par la graine dépend des facteurs génétiques de l'hôte (Wang & Maule, 1994) et du virus (Johansen *et al.*, 1996), ainsi que de facteurs environnementaux (Roberts *et al.*, 2003). La construction de virus hybrides entre les isolats du PSbMV DPD-1 (transmissible par la graine) et NY (non transmissible par la graine) a permis de localiser les déterminants viraux de transmission dans les régions 5' UTR, HC-Pro et CP du génome (Johansen *et al.*, 1996).

III. Les résistances aux virus des plantes

Nous venons de voir les différentes étapes du cycle viral et comment les virus qui ne peuvent pas se multiplier à l'extérieur des cellules vivantes sont capables d'une fabuleuse capacité d'adaptation à l'égard de leur hôte. S'instaure ainsi un véritable dialogue à travers des interactions qui visent, selon que l'on se place du point de vue du virus ou de celui de la plante, à détourner les principales fonctions cellulaires au cours du cycle viral ou à éliminer l'agent pathogène.

Tout processus qui, chez une plante, interdit ou limite le développement d'un pathogène est appelé résistance. La résistance non-hôte est une forme d'immunité des plantes dans laquelle toutes les accessions ou les variétés d'une espèce donnée sont résistants à toutes les souches d'un virus. Il est généralement admis que la plupart des espèces de plantes sont non-hôtes pour la plupart des virus et que la sensibilité est une exception à cette règle (Kang *et al.*, 2005b). Ce type de résistance non-hôte est encore mal connu au contraire de la résistance hôte souvent gouvernée par des gènes de résistance spécifiques (les gènes-R) et/ou les systèmes de défense généralisés de l'hôte (Cohn *et al.*, 2001). Le principe de la non-compatibilité de la résistance non-hôte pourrait être intéressant à exploiter et à transférer dans des espèces d'intérêt agronomique, mais les bases génétiques de cette résistance sont difficiles à étudier du fait de l'absence de génotypes sensibles au sein de l'espèce végétale non-hôte.

Deux principales catégories de défense des plantes ont été observées. **Les résistances dites « actives »** sont souvent gouvernées par des gènes de résistance dominante. La reconnaissance du pathogène induit le déclenchement de réactions de défense, qui se traduit localement par une réaction hypersensible (HR), et par l'induction de la résistance systémique acquise (SAR), mécanisme de défense non spécifique du pathogène (Vlot *et al.*, 2008). **Les résistances dites « passives »** représentent la majorité des phénomènes connus de résistance dans le monde vivant. Ce type de résistance à l'infection peut résulter de l'absence d'interaction entre des facteurs du pathogène et des facteurs cellulaires de l'hôte, laquelle est indispensable à l'établissement du cycle infectieux. Dans ce cas, les déterminants cellulaires responsables de la résistance sont souvent codés par des gènes de résistance récessive.

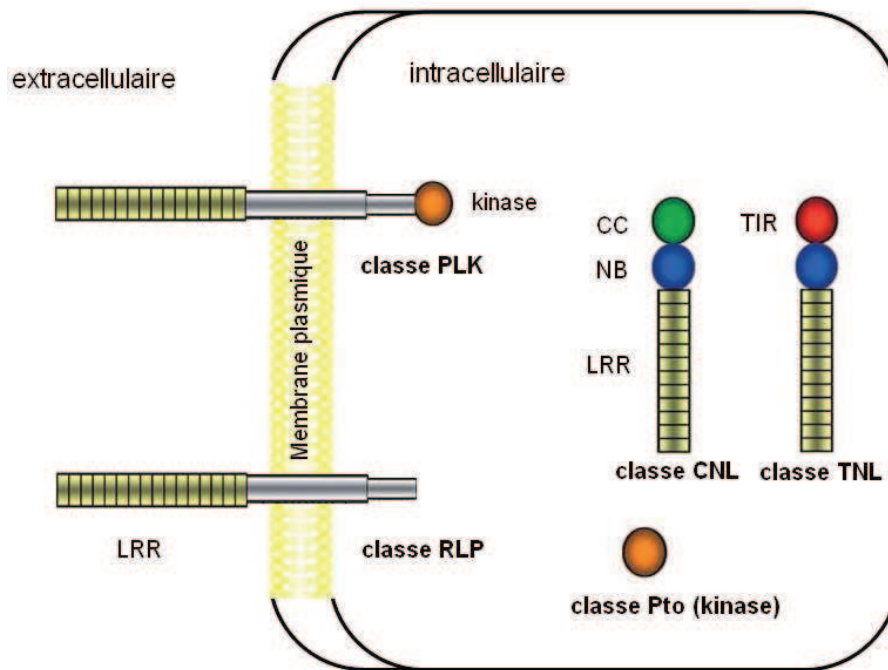


Figure 16. Représentation schématique des cinq classes de protéines codées par les gènes R et de leur localisation cellulaire. Les protéines conférant la résistance aux virus appartiennent aux classes CC-NBS-LRR (CNL) et TIR-NBS-LRR (TNL). Ces protéines possèdent un domaine central de fixation des nucléotides (*Nucleotide binding site*, NB) et une région C-terminale riche en leucine LRR (*Leucinerich repeat*). Le domaine N-terminal présente un domaine "coiled-coil" (CC) ou TIR (*Toll Interleukin Receptor*). A ce jour, aucun gène R codant pour des protéines des classes PLK (*receptor-like kinase*), RLP (*receptor-like protein*) ou Pto (*kinase*) n'a été identifié comme conférant la résistance aux virus.

III.1. Les résistances actives contre les virus de plantes

III.1.1. Les gènes de résistance dominante aux virus : les gènes *R*

La résistance hôte ou « spécifique » implique des mécanismes de reconnaissance du pathogène conduisant à l'induction d'un vaste ensemble de réactions de défense. Le concept de Flor (1971), appelé "modèle gène à gène", permet d'expliquer la grande majorité des résistances monogéniques dominantes et a été confirmé au niveau moléculaire pour le pathosystème lin / *Melampsora lini* (Agrios, 1997a). Les mécanismes de résistance sont induits, si et seulement si, la protéine codée chez la plante par un gène de résistance *R* "reconnaît" la protéine codée chez l'agent pathogène par un gène dominant dit "d'avirulence" (gène *Avr*) (Cohn et al., 2001). L'interaction physique, directe ou non, des produits de ces gènes a pour conséquence l'activation d'une cascade de signalisation qui va coordonner les réponses de défense de la plante, visant à bloquer l'invasion des tissus végétaux par le pathogène (Bent & Mackey, 2007) en induisant dans la majorité des cas le développement d'une HR (réaction d'hypersensibilité) (Belkhadir *et al.*, 2004, Nimchuk *et al.*, 2003) au niveau local et l'induction de la résistance systémique acquise (SAR), mécanisme de défense non spécifique du pathogène (Vlot et al., 2008).

De façon intéressante, les progrès récents dans l'élucidation des mécanismes moléculaires de la fonction des gènes *R* ont révélé une similarité frappante entre les composants du système immunitaire inné chez les animaux et les protéines *R* ainsi que leurs molécules de signalisation associées chez les plantes (Holt *et al.*, 2003).

Les protéines codées par les gènes *R* appartiennent à 5 classes de protéines incluant des protéines transmembranaires possédant des domaines extracellulaires comportant des répétitions riches en leucine (LRR), ainsi que d'un petit nombre de protéines intracellulaires ayant une région C-terminale de répétitions riches en leucine (LRR) et un site central de liaison de nucléotides (NBS) (NBS-LRR) (Belkhadir et al., 2004, Martin *et al.*, 2003) (**Figure 16**). L'extrémité N-terminale de ces protéines intracellulaires se composent soit d'une séquence spécifique possédant une structure de type coiled-coil (CC) ou d'une protéine Toll ainsi qu'une séquence du récepteur à l'interleukine-1, distinguant ainsi deux classes de protéines de résistance CC-NBS-LRR (CNL) ou TIR-NBS-LRR (TNL) (Hulbert *et al.*, 2001). Il existe une douzaine de gènes dominants impliqués dans la résistance aux virus identifiés à ce jour chez les plantes cultivées (pomme de terre, tomate, tabac, soja et pois) et chez *A.*

Gene	Classe	Plante	Virus	Avr ^e	Référence
<i>HRT</i> ^a	CNL	<i>A. thaliana</i>	<i>Turnip crinkle virus</i> (<i>Carmovirus</i>)	CP	(Cooley <i>et al.</i> , 2000)
<i>RCY1</i> ^a	CNL	<i>A. thaliana</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i> (<i>Cucumovirus</i>)	CP	(Takahashi <i>et al.</i> , 2002)
<i>Rx</i>	CNL	Pomme de terre	<i>Potato virus X</i> (<i>Potexvirus</i>)	CP	(Baures <i>et al.</i> , 2008, Bendahmane <i>et al.</i> , 1999)
<i>Rx2</i>	CNL	Pomme de terre	<i>Potato virus X</i> (<i>potexvirus</i>)	CP	(Bendahmane <i>et al.</i> , 2000, Querci <i>et al.</i> , 1995)
<i>Sw-5</i>	CNL	Tomate	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (<i>Tospovirus</i>)	ND	(Brommonschenkel <i>et al.</i> , 2000)
<i>Tm-2, Tm-2</i> ²	CNL	Tomate	<i>Tomato mosaic virus</i> (<i>Tobamovirus</i>)	MP (1-30K)	(Lanfermeijer <i>et al.</i> , 2003, Lanfermeijer <i>et al.</i> , 2005, Weber <i>et al.</i> , 1993)
<i>L1, L2, L3, L4</i> ^b	CNL	Piment	<i>Tobacco mosaic virus</i> (<i>Tobamovirus</i>)	CP	(Tomita <i>et al.</i> , 2008)
<i>Rsv1</i> ^b	CNL	Soja	<i>Soybean mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	P3	(Hajimorad <i>et al.</i> , 2005, Hayes <i>et al.</i> , 2004)
<i>Pvr4</i> ^b	ND	Piment	<i>PVY et PepMoV</i> (<i>Potyvirus</i>)	RdRP	(Janzac <i>et al.</i> , 2010)
<i>Ctv</i> ^b	CNL	Citronnier épineux	<i>Citrus tristeza virus</i> (<i>Closterovirus</i>)	ND	(Rai, 2006, Yang <i>et al.</i> , 2003)
<i>I</i> ^b	TNL	Haricot	<i>Bean common mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	ND	(Vallejos <i>et al.</i> , 2006)
<i>N</i>	TNL	<i>Nicotiana glutinosa</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> (<i>Tobamovirus</i>)	Hélicase: sous-unité p50	(Erickson <i>et al.</i> , 1999)
<i>Y-1</i>	TNL	Pomme de terre	<i>Potato virus Y</i> (<i>Potyvirus</i>)	ND	(Vidal <i>et al.</i> , 2002, Whitham <i>et al.</i> , 1994)
<i>RT4-4</i>	TNL	Haricot	<i>Cucumber mosaic virus</i> (<i>Cucumovirus</i>)	Protéine 2a	(Seo <i>et al.</i> , 2006)
<i>RTM1</i>	Jacalin-like ^c	<i>A. thaliana</i>	<i>Tobacco etch virus, Plum pox virus, lettuce mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	CP	(Chisholm <i>et al.</i> , 2000, Decroocq <i>et al.</i> , 2006)
<i>RTM2</i>	HSP ^d -like	<i>A. thaliana</i>	<i>Tobacco etch virus, Plum pox virus, lettuce mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	CP	(Decroocq <i>et al.</i> , 2006, Whitham <i>et al.</i> , 2000)
<i>RTM3</i>	Meprin and TRAF homology domain-containing (MATH) protein	<i>A. thaliana</i>	<i>Tobacco etch virus, Plum pox virus, lettuce mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	CP	(Cosson <i>et al.</i> , 2010, Decroocq <i>et al.</i> , 2006)

Tableau 1. Gènes de résistance aux virus de plantes de type R clonés et caractérisés.

CP, protéine de capsid; MP, protéine de mouvement; ND, non déterminé.

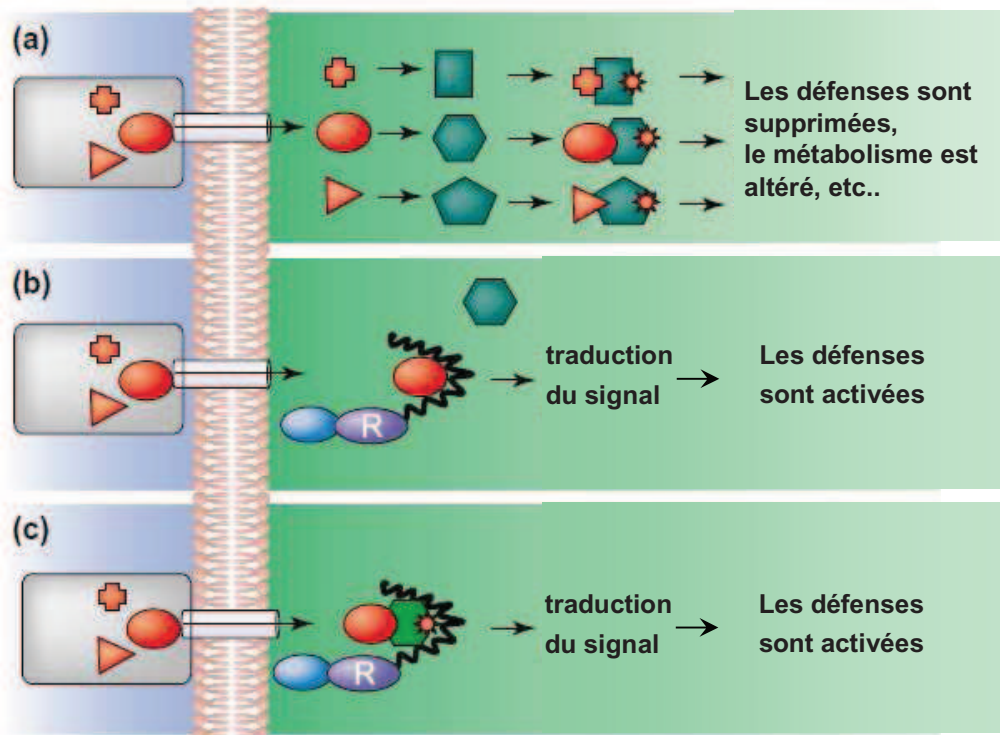
^aAllèles d'un même locus dans *A. thaliana*. ^bGènes non clonés à ce jour. ^cjacalin: une D-galactose-specific lectin. ^dHSP, protéine de choc thermique. ^eDéterminant viral d'aviorulence.

thaliana (Andrew J *et al.*, 2007). La majorité des gènes *R* identifiés appartient à la classe des protéines intracellulaires NBS-LRR cytoplasmiques (Martin *et al.*, 2003) où elles interagissent probablement avec des protéines virales (**Tableau 1**).

En outre, certaines résistances dominantes aux virus de plantes échappent au modèle de type gène pour gène décrit ci-dessus. C'est le cas, chez *A. thaliana*, de la résistance dominante appelée RTM (*Restricted TEV Movement*) qui bloque le mouvement à longue distance du TEV, du PPV et du LMV (Decroocq *et al.*, 2006). A ce jour, trois gènes, *RTM1*, *RTM2* et *RTM3*, ont été identifiés (Cosson *et al.*, 2010). La présence simultanée d'allèles de résistance à ces trois loci est requise pour que la plante soit résistante. Le mécanisme de la résistance RTM n'implique ni la mort cellulaire hypersensible, ni la résistance systémique acquise (Chisholm *et al.*, 2000, Whitham *et al.*, 2000).

Les trois gènes *RTM* (*RTM1*, *RTM2* et *RTM3*) ont été clonés par une approche de clonage positionnel. La protéine RTM1 présente des homologies de séquence avec des lectines (D-galactose-specific lectin) alors que RTM2 est homologue à des protéines de choc thermique (HSP) (Chisholm *et al.*, 2001). La protéine RTM3 appartient à une famille de protéines non décrites de 29 membres ayant un domaine homologue à meprin et TRAF (MATH) à son extrémité N-terminale et un domaine de type « coiled-coil » (CC) à son extrémité C-terminale (Cosson *et al.*, 2010) (**Tableau 1**). Par ailleurs, les protéines RTM1 et RTM2 sont associées au phloème, ce qui va dans le sens de leur rôle probable dans la prévention du mouvement à longue distance du TEV (Chisholm *et al.*, 2001). Les protéines RTM pourraient former un complexe multiprotéique bloquant le mouvement à longue distance des potyvirus. Ainsi, Cosson *et al.* (2010) ont récemment montré que la protéine RTM3 est capable d'auto-interagir ainsi que d'interagir avec RTM1.

De nombreux couples R-Avr ont été identifiés chez les pathosystèmes plantes/virus (**Tableau 1**). Parmi les plus connus, les gènes *Rx* chez la pomme de terre et les gènes *HRT* et *RCY1* d' *A. thaliana* sont spécifiques de la capsid du PVX (*Potato virus X*, genre *Potexvirus*) (*Rx*), du TCV (*Turnip crinkle virus*, genre *Carmovirus*) (*HRT*) et du CMV (*Cucumber mosaic virus*, genre *Cucumovirus*) (*RCY1*) (Bendahmane *et al.*, 1999, Bendahmane *et al.*, 1995, Maule *et al.*, 2007). Dans le cas de la résistance contrôlée par *Rx*, l'infection par le PVX entraîne une résistance extrême (résistance induite sans réaction d'hypersensibilité) chez la pomme de terre et *Nicotiana benthamiana*, tandis que l'expression ectopique de la protéine de capsid du PVX dans des *N. benthamiana* transgéniques déclenche une HR (Bendahmane *et al.*, 1999). Le mécanisme exact de la reconnaissance *Rx*/CP est encore inconnu. Récemment Tameling *et al.* (2007) ont montré que le phénotype de résistance extrême contrôlée par *Rx*



D'après (McDowell & Woffenden, 2003)

Figure 17. Interactions entre les protéines Avr de pathogènes et les protéines R de plante. (a) Un agent pathogène hypothétique (gris) exprime un ensemble de protéines de virulence (en rouge), qui, une fois dans la cellule, ciblent les protéines de l'hôte (en vert) qui contrôlent les réactions de défense, le métabolisme ou d'autres processus. Dans ce cas, la maladie résulte de l'action collective des protéines de virulence. (b) Hypothèse du "récepteur-ligand" : la protéine R se lie directement (via son domaine LRR en noir sur la figure) avec une des protéines de virulence. Cet événement de reconnaissance déclenche la cascade de signalisation qui déclenche les réactions de défense. (c) Hypothèse de garde : la protéine R est une protéine qui n'interagit pas directement avec la protéine de virulence mais qui détecte une modification de la protéine de l'hôte (gardée, en vert), interagissant avec la protéine de virulence.

est conditionné par l'interaction entre la protéine Rx et la protéine RanGAP2 (protéine activatrice de GTPase impliquée dans le trafic nucléo cytoplasmique). Les auteurs émettent l'hypothèse du modèle de garde : Rx « garderait » la protéine RanGAP2 qui serait la cible du facteur d'avirulence, la CP du PVX (Tameling & Baulcombe, 2007).

Bien que dans de nombreux cas, la protéine de capsid virale soit le déclencheur de la résistance, il est généralement admis que pratiquement tous les produits des gènes viraux peuvent déclencher des mécanismes de résistance dans les plantes (Baures et al., 2008). Ainsi, les protéines viraux impliquées dans l'expression du génome, la réplication, le mouvement ainsi que l'encapsidation ont toutes été identifiées comme des protéines Avr (**Tableau 1**).

En dépit de la caractérisation de nombreux gènes *R* ainsi que de nombreux déterminants d'avirulence dans les interactions plantes-virus, le mécanisme par lequel les protéines Avr sont reconnues par les produits des gènes *R* n'est pas encore élucidé (Soosaar *et al.*, 2005). Il a initialement été pensé que la protéine Avr et la protéine R interagissent directement l'une avec l'autre dans un modèle d'interaction récepteur-ligand (Dodds *et al.*, 2006) (**Figure 17**). Ce modèle propose que les domaines variables LRR des protéines NBS-LRR confèreraient la spécificité de reconnaissance dans les interactions protéine-protéine. Une interaction directe entre le produit du gène de résistance *N* chez le tabac et la réplicase virale (Avr) du TMV a été identifiée, mais il semble qu'une interaction indirecte entre ces deux protéines, via l'intervention d'un troisième partenaire, NIP-1, puisse également avoir lieu (Andrew J et al., 2007). Par conséquent, un modèle plus complexe appelé "hypothèse de garde" est proposé (van der Biezen & Jones, 1998) (**Figure 17**). La protéine R appartiendrait à un complexe protéique cellulaire où se trouve également la molécule cible du gène d'avirulence. La protéine Avr interagit avec sa molécule végétale cible, modifiant au passage la conformation du complexe qui est détectée par la protéine R (Van der Hoorn *et al.*, 2002, Chisholm *et al.*, 2006).

III.1.2. Mécanisme de défense antivirale impliquant l'ARN silencing

Il s'agit d'un mécanisme de défense contre les virus de plante, qui est basé sur l'activation par l'infection virale d'une machinerie complexe conduisant à la dégradation spécifique des ARN viraux (Brodersen & Voinnet, 2006, Roth *et al.*, 2004). Les ARN viraux double brin (ARNdb) produits lors du cycle de réplication du virus sont les « déclencheurs » communs du « gene silencing » (ou « extinction génique ») (Molnar *et al.*, 2005). Ces ARNdb sont reconnus par une RNase de type III, Dicer, qui les dégrade en petits ARN doubles

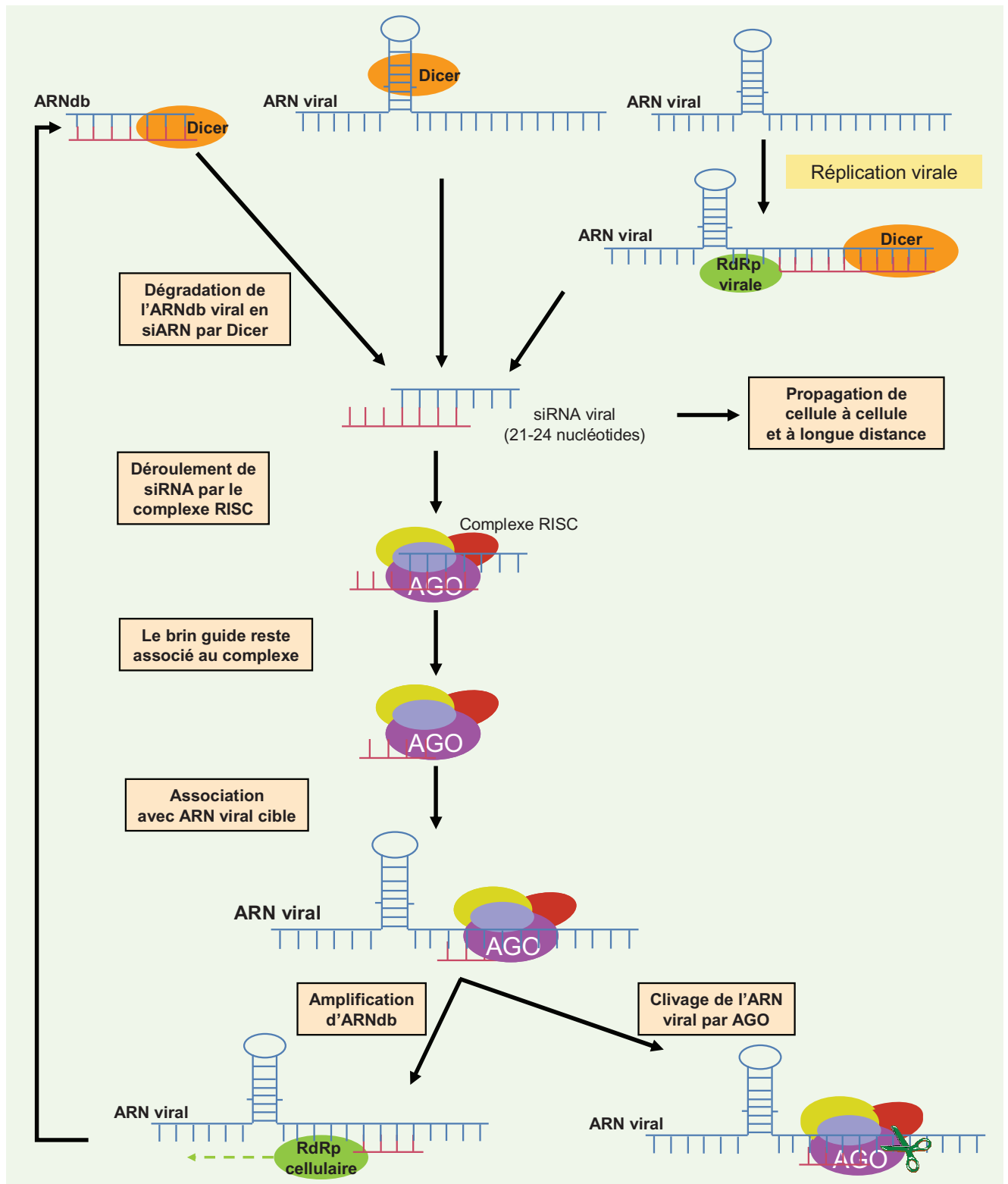
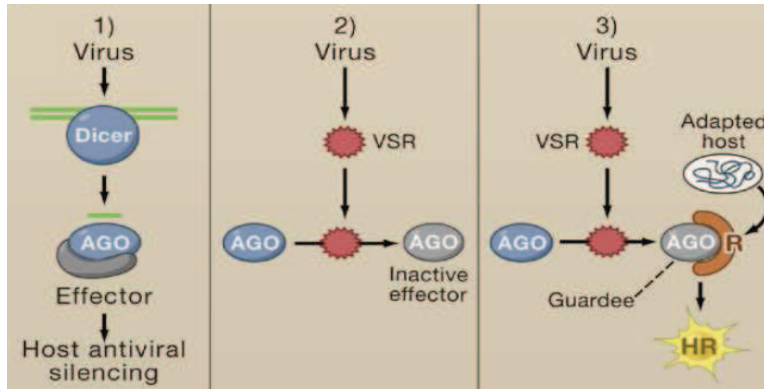


Figure 18. Modèle moléculaire d'action du RNA silencing dans la défense antivirale.
 RdRp : Réplicase virale (l'ARN polymérase ARN-dépendante), AGO : Argonaute.

brins appelés siRNA (*short interference RNA*) de 21-24 nucléotides (Xie & Guo, 2006) (**Figure 18**). Ces fragments ont la particularité de présenter à chaque extrémité 3' deux nucléotides libres (non appariés). Les siRNAs sont ensuite pris en charge par un complexe enzymatique dénommé RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) porteur d'une activité hélicase ATP-dépendante et RNase. Un seul des deux brins des siRNAs, le brin guide, reste associé au complexe et va s'hybrider à son ARN cible possédant une séquence complémentaire. La protéine Argonaute (AGO) du complexe RISC, possédant une activité endonucléolytique, clive ensuite cet ARN cible (**Figure 18**) et les fragments générés sont clivés et dégradés par des RNases cellulaires (Roth et al., 2004). En parallèle, le mécanisme de silencing est amplifié via une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) cellulaire qui permet la synthèse d'un nouveau ARNdb et la maintenance du mécanisme. En outre, l'existence de signaux mobiles permet la diffusion du silencing dans la plante entière à travers les plasmodesmes et les tissus vasculaires (Mlotshwa *et al.*, 2008). Cette amplification assure qu'une fois le processus est initié, il peut continuer même après la dégradation de toutes les molécules d'ARN double brin initiatrices.

Le système d'ARN silencing est efficacement déclenché par l'ARN viral et peut efficacement réprimer ou même prévenir complètement l'infection virale (Ratcliff *et al.*, 1997). Cependant, le fait que les virus soient capables d'infecter les plantes démontre qu'ils ont su s'adapter et contrecarrer ce mode de défense de la plante. En effet, la plupart des phytovirus code pour des suppresseurs de silencing (Roth et al., 2004), dont les mécanismes d'action sont variés. Ainsi, des suppresseurs viraux tels que HC-Pro de potyvirus (Anandalakshmi *et al.*, 1998) peuvent réprimer l'activation du complexe RISC en interférant indirectement avec certaines activités de Dicer, telles que le déroulement de duplex (Chapman *et al.*, 2004) ou en régulant l'accumulation de siRNA et miRNA (*micro-RNA*) dans les plantes (Mallory *et al.*, 2002). D'autres, comme les protéines P19, P25 et 2b de tombusvirus, potexvirus et cucumovirus, respectivement, peuvent bloquer la généralisation du signal de silencing (Qu & Morris, 2005). La P19 est, par exemple, capable de se lier directement aux siRNA double-brin, bloquant ainsi leur recrutement par le complexe RISC (Lakatos *et al.*, 2004). La protéine P0 suppresseur viral d'ARN silencing, codée par les poléovirus, fonctionnerait comme une protéine à F-box, ciblant et dirigeant un composant essentiel du PTGS (*Post-transcriptional gene silencing*), la protéine Argonaute (AGO), protéine clef du complexe RISC, vers la machinerie E3 ubiquitine ligase, ce qui conduirait à sa dégradation par le protéasome 26S (Pazhouhandeh *et al.*, 2006). La protéine de capsid du *Turnip crinckle virus* (TCV), la P38, suppresseur du silencing, agit sous forme d'homodimères,



D'après (Ding & Voinnet, 2007)

Figure 19. Adaptation du modèle de garde : les VSR (suppresseurs viraux de silencing) pourraient induire une réaction d'hypersensibilité (HR). **1)** Mise en place du silencing antiviral. **2)** contre-attaque du virus via les supresseurs viraux de silencing (VSR). **3)** Gènes R « spécialisés » dans la reconnaissance de cette perturbation et déclenchement de la HR selon le modèle de garde.

et « mimerait » des protéines de la plante riches en répétitions glycine/tryptophane (GW), nécessaires à l'assemblage et à la fonction du complexe RISC (Azevedo et al., 2010). Les résidus GW de la P38 permettraient la fixation spécifique à la protéine AGO1 d'*A. thaliana*. Azevedo et al (2010) ont montré également que des mutations ponctuelles ciblant les résidus GW de P38 sont suffisantes pour abolir la virulence du TCV, qui est restaurée chez des mutants hypomorphes (codant d'une protéine fonctionnelle mais moins active) d'AGO1 d'*A. thaliana*.

Il apparaît que la voie de défense par l'ARN silencing forme la base d'un système immunitaire sophistiqué activé par et ciblé contre les virus. Cependant, cette voie serait liée aux autres voies de défense de l'hôte contre les virus impliquant des gènes *R*. De même que les gènes *R* sont impliqués dans une « course-poursuite » constante face à l'évolution des pathogènes, il est probable que les différents composants de la voie de l'ARN silencing soient aussi soumis à une telle pression de sélection liée aux supresseurs viraux de silencing. Or, certains de ces supresseurs sont capables d'induire des réactions de type HR, et des mutations qui empêchent l'inhibition du silencing par ces supresseurs empêchent l'induction de HR (Li *et al.*, 1999, Ding & Voinnet, 2007). Ces auteurs ont donc proposé que certains gènes *R* auraient évolué pour reconnaître les « dommages » apportés aux composants de silencing par les supresseurs viraux, et que cette reconnaissance indirecte (via le modèle de garde) induirait une réaction de type HR dans certains écotypes de plantes (**Figure 19**).

III.1.3. Le système ubiquitine/26S protéasome : impliqué dans les mécanismes de défense antivirale chez les plantes ?

La voie ubiquitine/protéasome 26S, de par son implication dans la dégradation des protéines, représente un élément central des relations entre plante et pathogène et plus particulièrement lors des interactions plante/virus. Ce rôle crucial revêt deux facettes, le protéasome pouvant être impliqué dans les mécanismes de défense de la plante comme dans les mécanismes de contre-attaque des agents pathogènes (Dielen *et al.*, 2010a).

Chez les eucaryotes, le protéasome 26S est un complexe macromoléculaire protéique de 2500 kDa constitué du protéasome 20S et de structures régulatrices, le complexe 19S (Zwickl *et al.*, 1999), fixées à chaque extrémité du 20S (**Figure 20A**). En microscopie électronique, le complexe 20S (720 kDa) se présente sous la forme d'un cylindre (15 nm de long et 11 nm de diamètre) composé de 4 anneaux constitués de 7 sous-unités α pour les anneaux externes et de 7 sous-unités β pour les anneaux internes (Davy *et al.*, 2001) (**Figure 20A**). Les données de

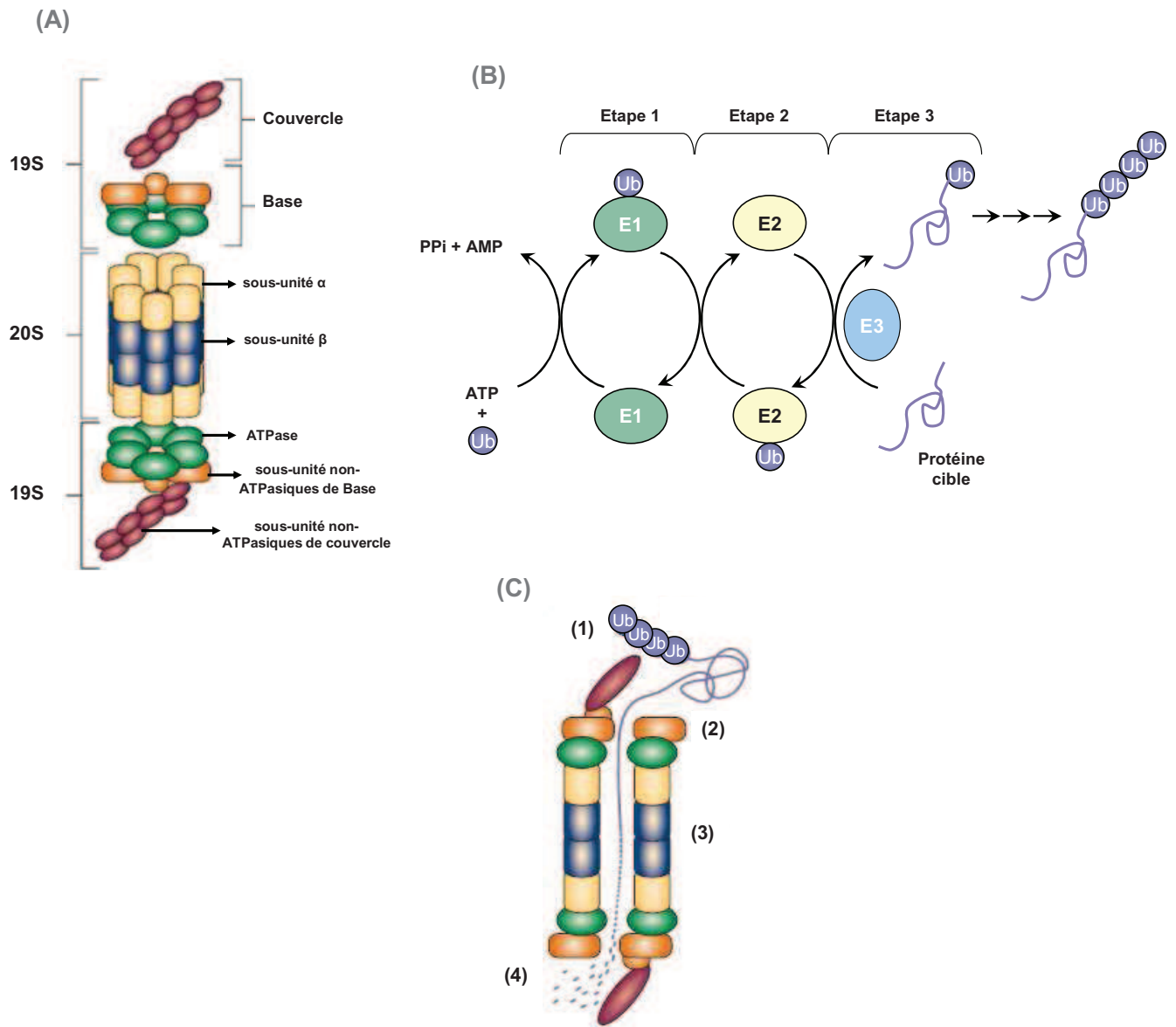


Figure 20. Le système ubiquitine/26S protéasome. **A.** Organisation du protéasome 26S. **B.** Ubiquitination des protéines ciblées pour le protéasome. Une enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1) se lie à l'ubiquitine, qui est alors transférée à une enzyme conjugatrice de l'ubiquitine (E2) ; une ubiquitine-ligase (E3) aide au transfert de l'ubiquitine à la cible substrat. Plusieurs molécules d'ubiquitine sont attachées aux protéines avant leur reconnaissance et dégradation par le protéasome 26S. **C.** Les étapes de la dégradation des protéines ubiquitinylées. Les protéines marquées à l'ubiquitine sont reconnues par le complexe régulateur 19S (1), où elles sont déubiquitinylées et dénaturées. Les protéines pénètrent ensuite dans la cavité centrale du 20S (2), où elles sont protéolysées (3). Les produits de protéolyse sont ensuite dégradés en acides aminés par des carboxypeptidases et des aminopeptidases cellulaires (4).

structure 3D disponibles pour le protéasome 20S de levure et de bovin (Yang *et al.*, 2004) montrent que les deux anneaux β forment une cavité centrale, qui héberge les sites actifs de l'activité protéasique portée par trois des sous-unités β . Les sept sous-unités α constituent les deux anneaux externes contrôlant l'entrée dans la « chambre » catalytique et interagissent avec les complexes régulateurs du protéasome. Le complexe régulateur 19S est constitué de deux parties : la base constituée par 6 sous-unités ATPasiques qui se fixe aux sous-unités α , et le couvercle constitué d'au moins 10 sous-unités non ATPasiques (Zwickl *et al.*, 1999).

Les sous-unités ATPasiques de la base du 19S interviennent dans la perte des structures tertiaires et secondaires du substrat et permettent l'ouverture du 20S en interagissant avec les anneaux α , modulant ainsi l'entrée du substrat et la sortie des produits de dégradation (Adams, 2003, Heinemeyer *et al.*, 2004). La dégradation médiée par le protéasome peut se faire via la voie ubiquitine ATP dépendante dans le cytosol. La liaison covalente de plusieurs ubiquitines à une protéine cible (polyubiquitinylation) (**Figure 20B**) entraîne la dégradation de celle-ci par le protéasome 26S (**Figure 20C**).

Il a été montré que des protéines de virus de plante sont ciblées par le système ubiquitine/protéasome 26S : la dégradation de protéines de mouvement virales apparaît comme un événement fréquent lors des interactions plante/virus. Par exemple, la protéine 69K du TYMV (*Turnip yellow mosaic virus*, genre *Tymovirus*) est dégradée par le protéasome 26S après marquage à l'ubiquitine (Drugeon & Jupin, 2002), de même que la protéine de mouvement du PLRV (*Potato leaf roll virus*, genre *Luteovirus*) (Vogel *et al.*, 2007). L'inhibition du protéasome entraîne une stabilité accrue de la protéine 30K du TMV, qui s'accumule alors sous forme polyubiquitinylée dans le réticulum endoplasmique (Reichel & Beachy, 2000). Cette dégradation par le protéasome peut être considérée à la fois comme un mécanisme de défense de l'hôte mais également comme un détournement de la machinerie cellulaire par le virus à son profit, contrôlant ainsi son cycle infectieux et le turnover de ses protéines.

L'implication du protéasome dans les réactions de défense de la plante a été démontrée chez des tabacs porteurs du gène de résistance *N*, où l'infection par le TMV entraîne la production de calmodulines impliquées dans la transduction de voies de défense. Certaines de ces calmodulines sont régulées de façon post-transcriptionnelle via une dégradation par le protéasome (Yamakawa *et al.*, 2001). De même, il a été montré que l'expression de deux enzymes « *ubiquitin-activating* » (E1A et E1B) impliquées dans la voie de l'ubiquitine-protéasome était induite par l'infection par plusieurs virus de plantes : le TMV, le ToMV (*Tomato mosaic virus*) et dans une moindre mesure par le CMV qui appartient à un genre

viral éloigné (Takizawa *et al.*, 2005). Il a aussi été montré que l'inhibition par VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*) de l'expression de la sous-unité RPN9 du complexe régulateur 19S du protéasome chez *N. benthamiana* empêche la migration dans les feuilles non inoculées de deux virus appartenant à des groupes taxonomiques différents, le TMV et le TuMV (Jin *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2003).

Outre ses activités protéolytiques, le protéasome est porteur d'une autre activité catalytique, de nature endonucléasique. Cette activité RNasique, moins bien connue que les activités protéolytiques, a été décrite comme étant capable, à la fois chez les animaux (Pouch *et al.*, 1995) et les végétaux (Ballut *et al.*, 2003), de dégrader *in vitro* des ARN viraux. Le potyvirus LMV figure parmi les virus de plantes dont l'ARN peut être l'une des cibles de cette activité catalytique. De façon intéressante, il a été montré que la protéine HC-Pro de ce virus, connue pour être un suppresseur de silencing, est capable d'interférer *in vitro* avec ces processus de dégradation (Ballut *et al.*, 2005). Récemment, il a été montré au laboratoire que la sous-unité α -5 du protéasome 20S chez *A. thaliana* est porteuse de cette activité RNasique *in vitro*, que cette sous-unité interagit *in vivo* avec la protéine HC-Pro du LMV et qu'elle est en partie relocalisée dans des inclusions cytoplasmiques formées par HC-Pro en cas d'infection par le LMV (Dielen *et al.*, 2010b). De plus, des mutants « knock-out » (KO) d'*A. thaliana* pour l'une des copies codant pour α -5, est plus sensible à l'infection par le LMV (Dielen *et al.*, 2010b). Ces résultats suggèrent d'une part l'existence d'une voie inconnue de défense antivirale associée au protéasome et, d'autre part, que les potyvirus ont évolué pour inhiber cette voie, en utilisant la même protéine que celle qui inhibe la défense associée au « gene silencing ».

III.2. Les mécanisme de résistance passive contre les virus de plantes : mode d'action des gènes de résistance récessive

Contrairement aux résistances contre les bactéries, les champignons, les nématodes ou les insectes, qui sont majoritairement dominantes, près de la moitié des résistances monogéniques vis-à-vis des virus de plantes sont récessives (Diaz-Pendon *et al.*, 2004, Kang *et al.*, 2005b). Cette caractéristique est particulièrement marquée pour les potyvirus. En effet, près de 50% des gènes de résistance aux potyvirus sont récessifs, alors que cette fréquence atteint rarement 20% pour les autres agents pathogènes (Kang *et al.*, 2005b).

Contrairement à la plupart des résistances dominantes aux virus qui entraînent une réponse hypersensible ou un phénotype de résistance extrême, les résistances récessives présentent une grande diversité de phénotypes (Andrew J et al., 2007). Ces phénotypes vont de la résistance totale au niveau cellulaire, à une diminution de l'accumulation virale, au blocage du mouvement de cellule à cellule ou à longue distance, ou à un retard dans l'expression des symptômes.

En 1990, Fraser propose deux hypothèses pour expliquer les mécanismes moléculaires des résistances récessives (Fraser, 1990). La première, nommée le « modèle négatif », suggère que la résistance est la conséquence d'une perte (allèle nul) ou d'une mutation d'un facteur spécifique de l'hôte indispensable à l'accomplissement d'une étape du cycle viral. D'après cette hypothèse, la résistance serait passive et « non défensive », l'allèle dominant codant pour un facteur de sensibilité. Cette hypothèse est en accord avec le fait que les virus codent pour un nombre limité de protéines, et qu'ils doivent donc détourner les composants cellulaires de l'hôte pour accomplir leur cycle d'infection. La deuxième hypothèse propose que la résistance résulte d'un mécanisme actif, impliquant un allèle de résistance codant pour un inhibiteur qui interfère avec le cycle viral. Dans ce cas, l'allèle de sensibilité code pour un régulateur de résistance négatif et dominant. A ce jour, cette hypothèse a été reportée dans l'interaction plante-champignon, impliquant le gène *mlo* chez l'orge, qui confère une résistance récessive contre l'oïdium (*Erysiphe graminis*) (Buschges *et al.*, 1997) mais pas dans le cadre des interactions plantes-virus.

En 2002 le clonage du premier gène naturel de résistance récessive contre un virus de plante a permis de valider la première hypothèse de Fraser : des mutations dans le facteur d'initiation de la traduction eIF4E sont responsables, chez le piment, de la résistance récessive contrôlée par le gène *pvr2* à l'infection par le PVY et le TEV (Ruffel *et al.*, 2002).

III.2.1. Le rôle clé des facteurs d'initiation de la traduction dans les résistances récessives des plantes

Dans les cellules eucaryotes, le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (*eukaryotic Initiation Factor 4E*) intervient au tout début de la phase d'initiation de la traduction en se liant à la coiffe (résidu 7-méthyl guanosine triphosphate) des ARNm (voir § II.4.2.1) (**Figure 9**). Chez les plantes, eIF4E est capable de se lier à la protéine eIF4G pour former le complexe eIF4F tandis que eIF(iso)4E interagit préférentiellement avec la protéine eIF(iso)4G pour former le complexe eIF(iso)4F. Ces deux complexes montrent *in vivo* des spécificités pour

Gène/allèle	Virus	Genre viral	Espèce végétale	Facteur d'initiation de la traduction	Référence	Gène Avr	Référence
Naturel^a							
<i>pvr1</i>	PVY, TEV, PepMoV	<i>Potyvirus</i>	Piment	eIF4E	Kang <i>et al.</i> , 2005 a	VPg	Perez <i>et al.</i> , 2007
<i>pvr2¹</i>	PVY	<i>Potyvirus</i>	Piment	eIF4E	Ruffel <i>et al.</i> , 2002	VPg	Kang <i>et al.</i> , 2005 a
<i>pvr2²</i>	PVY, TEV	<i>Potyvirus</i>	Piment	eIF4E	Ruffel <i>et al.</i> , 2002	VPg	Kang <i>et al.</i> , 2005 a
<i>pvr2²+pvr6</i>	PVMV ChiVMV	<i>Potyvirus</i>	Piment	<i>pvr2²</i> : eIF4E <i>pvr6</i> : eIF(iso)4E	Ruffel <i>et al.</i> , 2006 Hwang <i>et al.</i> , 2009		
<i>mol¹</i>	LMV	<i>Potyvirus</i>	Laitue	eIF4E ¹	Nicaise <i>et al.</i> , 2003	region CI, VPg, NIa	Redondo <i>et al.</i> , 2001
<i>mol²</i>	LMV	<i>Potyvirus</i>	Laitue	eIF4E ²	Nicaise <i>et al.</i> , 2003	region CI, VPg, NIa	Redondo <i>et al.</i> , 2001
<i>sbm1</i>	PSbMV	<i>Potyvirus</i>	Pois	eIF4E	Gao <i>et al.</i> , 2004	VPg	Keller <i>et al.</i> , 1998
<i>wlv (=sbm1)</i>	BYMV	<i>Potyvirus</i>	Pois	eIF4E	Provvidenti et Hampton, 1993	VPg	Bruun-Rasmussen <i>et al.</i> , 2007
<i>cyv-2 (=sbm1)</i>	CIYVV	<i>Potyvirus</i>	Pois	eIF4E	Andrade <i>et al.</i> , 2009	P1	Nakahara <i>et al.</i> , 2010
<i>pot-1</i>	PVY, TEV	<i>Potyvirus</i>	Tomate	eIF4E	Ruffel <i>et al.</i> , 2005	VPg	Moury <i>et al.</i> , 2004
<i>rym4</i>	BaMMV, BaYMV	<i>Bymovirus</i>	Orge	eIF4E	Kanyuka <i>et al.</i> , 2005	VPg	Kuehne <i>et al.</i> , 2003
<i>rym5</i>	BaMMV, BaYMV, BaYM-2	<i>Bymovirus</i>	Orge	eIF4E	Stein <i>et al.</i> , 2005	VPg	Kanyuka <i>et al.</i> , 2004
<i>rymv1</i>	RYMV	<i>Sobemovirus</i>	Riz	eIF(iso)4G	Albar <i>et al.</i> , 2006	VPg	Hebrard <i>et al.</i> , 2008
<i>nsv</i>	MNSV	<i>Carmovirus</i>	Melon	eIF4E	Nieto <i>et al.</i> , 2006	3'UTR	Diaz <i>et al.</i> , 2004
Mutant^b							
<i>At-eIF(iso)4E</i>	TuMV, LMV, TEV, PPV	<i>Potyvirus</i>	<i>A. thaliana</i>	eIF(iso)4E	Lellis <i>et al.</i> , 2002; Duprat <i>et al.</i> , 2002; Decroocq <i>et al.</i> , 2006; Nicaise <i>et al.</i> , 2007		
<i>At-eIF4E (cum1-1)</i>	CIYVV	<i>Potyvirus</i>	<i>A. thaliana</i>	eIF4E	Sato <i>et al.</i> , 2005		
<i>At-eIF4E (cum1-1)</i>	CMV	<i>Cucumovirus</i>	<i>A. thaliana</i>	eIF4E	Yoshii <i>et al.</i> , (1998a, 2004)		
<i>At-eIF4G (cum2-1)</i>	CMV	<i>Cucumovirus</i>	<i>A. thaliana</i>	eIF4G	Yoshii <i>et al.</i> , (1998b, 2004)		
<i>At-eIF4G (cum2-1)</i>	TCV	<i>Carmovirus</i>	<i>A. thaliana</i>	eIF4G	Yoshii <i>et al.</i> , (1998b, 2004)		
Co-ségrégation génétique des facteurs de résistance récessive et eIF4E ou eIF4G^c							
<i>retr01</i>	TuMV	<i>Potyvirus</i>	Chou chinois	eIF(iso)4E	Rusholme <i>et al.</i> , 2007		
QTL	PPV	<i>Potyvirus</i>	<i>Prunus davidiana</i>	eIF(iso)4E	Marandel <i>et al.</i> , 2009		
-	ZYMV	<i>Potyvirus</i>	Melon	eIF4E	Ling <i>et al.</i> , 2009		
<i>bc-3</i>	BCMV	<i>Potyvirus</i>	Haricot	eIF4E	Naderpour <i>et al.</i> , 2010		
<i>tsv1</i>	RTSV	<i>Waikavirus</i>	Riz	eIF4G	Lee <i>et al.</i> , 2010		

Tableau 2. Résumé de l'implication de facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et eIF4G dans la résistance naturelle aux virus de plantes à ARN positif.

^a Gènes de résistance récessive naturels clonés et leurs déterminants viraux d'aviorulence (Avr).

^b Mutants d'*A. thaliana* caractérisés

^c Co-ségrégation

certaines ARNm cellulaires (Gallie, 2001). eIF4F permettrait préférentiellement la traduction d'ARNm présentant des structures secondaires en 5' et d'ARNm non coiffés et/ou dicistroniques, alors que eIF(iso)4F traduirait préférentiellement des ARNm présentant peu de structures secondaires et liés à des coiffes hyperméthylées (Gallie, 2001).

Ces dernières années, plusieurs gènes de résistance récessive naturels ont été clonés chez une large gamme d'espèces de plantes cultivées incluant les mono- et dicotylédones (piment, laitue, pois, tomate, orge, riz, melon) ; tous codent pour des facteurs du complexe d'initiation de la traduction eIF4F ou eIF(iso)4F. Parmi ces huit gènes clonés, six codent pour eIF4E, un pour eIF(iso)4E et un gène code pour eIF(iso)4G (Truniger & Aranda, 2009) (**Tableau 2**). Toutes ces résistances sont dirigées contre des virus à ARN et la majorité sont dirigées contre les potyvirus, le facteur eIF4E étant cependant aussi impliqué dans la résistance de l'orge à un *bymovirus* ainsi que dans la résistance du melon à un *Carmovirus*. Le facteur eIF(iso)4G est impliqué dans la résistance du riz à un *Sobemovirus* (**Tableau 2**). Le genre des *Bymovirus* est proche de celui des *Potyvirus* au sein de la famille des *Potyviridae*, au contraire des genres *Carmovirus* et *Sobemovirus*, beaucoup plus distants.

En parallèle, la caractérisation de mutants d'*A. thaliana* pour les différents gènes des complexes eIF4F a permis de confirmer l'importance de ces gènes dans le cycle viral : Il apparaît que des mutations induites par EMS (Ethyl Methyl Sulfonate) ou insertion de T-DNA dans les différents gènes *eIF4E* affectent la sensibilité aux potyvirus. Des mutations KO (obtenues par insertion de T-DNA) du gène *eIF(iso)4E* chez *A. thaliana* n'entraînent pas de modifications morphologiques ou de développement de la plante mais confèrent une résistance à l'infection par les potyvirus TEV, TuMV, LMV et PPV (Decroocq et al., 2006, Duprat et al., 2002, Lellis et al., 2002) (**Tableau 2**). Le mutant EMS *At-eIF4E1 (cum1-1)* est résistant au CIYVV (*Clover yellow vein virus*), alors que ce virus est capable de se multiplier dans les plantes mutées pour le gène *eIF(iso)4E* (Sato et al., 2005). Enfin, cette mutation *cum1-1*, qui provoque l'apparition d'un codon stop dans la région codante du gène *eIF4E1*, réduit également l'accumulation du CMV (*cucumovirus*) chez *A. thaliana* (Yoshii et al., 2004, Yoshii et al., 1998a).

D'autres travaux ont évalué la sensibilité de plantes mutées dans les gènes *eIF4G* vis à vis de plusieurs potyvirus. Chez *A. thaliana*, 3 gènes codent pour des membres de la famille eIF4G: *eIF4G*, *eIF(iso)4G1* et *eIF(iso)4G2*. Le mutant *cum2-1* d'*A. thaliana*, résultant d'une seule substitution en acide aminé dans la protéine eIF4G, est associé à la résistance au CMV et au TCV (Yoshii et al., 2004, Yoshii et al., 1998b). La propagation du CMV dans les feuilles inoculées est retardée, mais l'accumulation de l'ARN viral dans les protoplastes

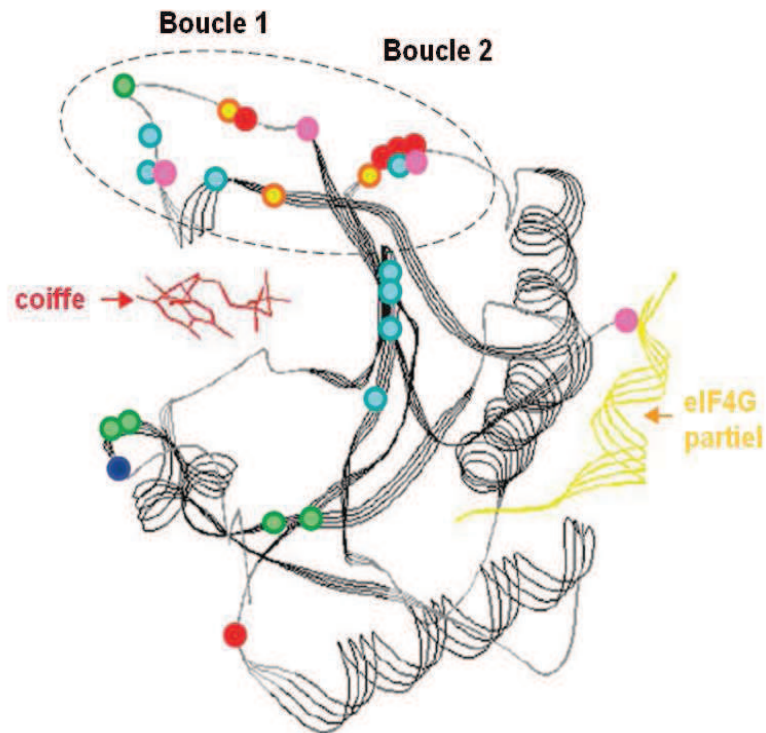
infectés n'est pas modifiée. En revanche, l'accumulation de l'ARN génomique du TCV est réduite dans les protoplastes dérivés du mutant *cum2-1* par rapport au type sauvage (Yoshii et al., 2004, Yoshii et al., 1998b).

D'un autre côté, il apparaît que le mutant KO *eIF4G* d'*A. thaliana* est résistant au CIYVV, le mutant *eIF(iso)4G1* est résistant au PPV et au LMV et enfin le double mutant *eIF(iso)4G1* x *eIF(iso)4G2* est résistant au TuMV (Nicaise et al., 2007). Si on fait un parallèle entre ces résultats et ceux obtenus avec les mutants eIF4E / eIF(iso)4E énoncés précédemment, il apparaît que le CIYVV utilise le complexe eIF4F tandis que les autres potyvirus semblent plutôt interagir avec le complexe eIF(iso)4F. Ces données argumentent donc en faveur d'un rôle de eIF4E et eIF4G (et/ou de leurs isoformes) sous forme de complexe eIF4F dans le cycle infectieux des potyvirus.

A côté des gènes contrôlant des résistances récessives naturelles et des mutants identifiés chez *A.thaliana*, la co-ségrégation génétique entre des facteurs de résistance récessive et des gènes codant pour eIF4E ou eIF4G a été mise en évidence chez plusieurs espèces végétales. Les co-ségrégations suivantes ont été montrées entre un QTL (*quantitative trait loci*) de résistance au PPV et le gène codant pour eIF(iso)4E chez *Prunus davidiana* (Marandel et al., 2009), entre le gène *retr01* de résistance au TuMV et *eIF(iso)4E* chez le chou chinois (Rusholme et al., 2007), entre le gène *tsv1* au RTSV (*Rice tungro spherical virus*) et *eIF4G* chez le riz (Lee et al., 2010), entre le gène *bc-3* au BCMV et *eIF4E* chez le haricot (Naderpour et al., 2010) et finalement, entre le facteur de résistance récessive au ZYMV et *eIF4E* chez le melon (Ling et al., 2009) (**Tableau 2**). Ces gènes contrôlent la résistance à des potyvirus, sauf le gène *tsv1* qui contrôle la résistance au RTSV (*Waikavirus*) et qui présente un polymorphisme de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) dans le gène eIF4G (Lee et al., 2010).

III.2.2. Très peu de mutations dans eIF4E suffisent à conférer la résistance

Excepté le gène de résistance *pvr6* chez le piment dont l'allèle de résistance code pour une forme tronquée de la protéine eIF(iso)4E (Hwang et al., 2009, Ruffel et al., 2006), toutes les résistances conférées par eIF4E aux potyvirus résultent d'un à cinq changements en acides aminés dans la protéine codée par l'allèle de résistance. En effet, les mutations conférant la résistance aux potyvirus (Gao et al., 2004b, Kang et al., 2005a, Nicaise et al., 2003, Ruffel et al., 2002, Ruffel et al., 2005, Ruffel et al., 2006) ou aux bymovirus



D'après (Nicaise & Revers, 2006)

Figure 21. Localisation sur la structure tridimensionnelle d'eIF4E des acides aminés impliqués dans la résistance aux virus.

Les acides aminés impliqués dans la résistance aux virus sont représentés par des cercles colorés en rouge pour la laitue (Nicaise et al., 2003), en orange pour le piment (Kang et al., 2005a), en bleu clair pour le pois (Gao et al., 2004b), en rose pour la tomate (Ruffel et al., 2005), en vert pour l'orge (Stein *et al.*, 2005), et en bleu foncé pour le melon (Nieto *et al.*, 2006). L'analogue de la coiffe est représenté en rouge. Le domaine d'interaction d'eIF4G avec eIF4E est représenté en jaune. L'ellipse en pointillés représente les domaines d'eIF4E impliqués dans la résistance aux potyvirus (boucles 1 et 2). La structure a été prédite en se basant sur la structure 3D d'eIF4E de souris et en utilisant le logiciel Swiss- PdbViewer.

(Kanyuka *et al.*, 2005, Stein *et al.*, 2005) sont regroupées au niveau de régions voisines, à la surface de la protéine, en bordure de la poche de fixation à la coiffe (**Figure 21**). Ces données obtenues dans le cas d'espèces végétales variées (piment, tomate, laitue, pois et orge) montrent que la résistance est liée à un petit nombre de substitutions d'acides aminés probablement situés à la surface d'interaction entre les facteurs d'initiation de la traduction avec des facteurs viraux (Andrew J *et al.*, 2007). Cependant, dans le cas de la résistance au MNSV (*Melon necrotic spot virus*, genre *Carmovirus*), l'unique mutation (substitution d'une Histidine position 228 en une Leucine ou « His228Leu ») se trouve à l'extrémité C-terminale de la protéine eIF4E (**Figure 21**) et non dans les régions I et II en surface de la protéine décrites précédemment, suggérant un mécanisme de résistance différent (Nieto *et al.*, 2006).

III.2.3. Diversité des phénotypes de résistance conférée par eIF4E selon les pathosystèmes

De façon surprenante, les phénotypes de la résistance récessive conférée par les facteurs eIF4E dépendent des pathosystèmes plantes-virus considérés (Robaglia & Caranta, 2006).

Chez la plupart des espèces cultivées, la résistance se manifeste à des étapes précoces du cycle viral et se traduit par l'absence d'accumulation virale dans les feuilles inoculées. C'est le cas des résistances dirigées contre le TuMV, le PPV et le LMV chez *A. thaliana* (*lsp1*), le BaYMV (*Barley yellow mosaic virus*) et le BaMMV (*Barley mild mosaic virus*) (*rym4-6*) chez l'orge, le PVY (*pvr1*, *pot1*), le TEV (*pvr2²/1*, *pot1*), le PVMV (*Pepper veinal mottle virus*) (*pvr2* et *pvr6*) chez le piment, le PSbMV et le BYMV (*Bean yellow mosaic virus*) (*sbm1*) chez le pois (Bruun-Rasmussen *et al.*, 2007, Decroocq *et al.*, 2006, Duprat *et al.*, 2002, Gao *et al.*, 2004b, Kang *et al.*, 2005a, Kanyuka *et al.*, 2004, Kuehne *et al.*, 2003, Ruffel *et al.*, 2005, Ruffel *et al.*, 2006).

Ce phénotype de résistance peut être lié à un défaut dans la multiplication virale au niveau cellulaire, comme par exemple la résistance *pvr2²* chez le piment au TEV (Deom *et al.*, 1997), ou à un défaut dans le mouvement de cellule à cellule, comme dans le cas de la résistance *pvr2¹* chez le piment au PVY (Arroyo *et al.*, 1996, Kang *et al.*, 2005a). Le gène de résistance *sbm1* chez le pois affecte la multiplication du PSbMV au niveau cellulaire. Ainsi, l'expression ectopique de l'allèle de sensibilité chez les pois résistants permet de compléter la multiplication du virus dans les cellules, mais aussi permet au virus de se déplacer d'une cellule à une autre (Gao *et al.*, 2004b).

Dans le cas de la résistance au RYMV (*Rice yellow mottle virus*, genre *Sobemovirus*) chez le riz, les substitutions d'acides aminés responsables de la résistance ont été localisées sur la surface d'eIF(iso)4G (Albar *et al.*, 2006). Cette résistance semble interférer avec le mouvement de cellule à cellule du virus, l'accumulation du virus dans les protoplastes issus de variété de riz résistante n'étant pas affectée par rapport aux variétés sensibles (Albar *et al.*, 2003).

D'autres gènes eIF4E confèrent une résistance quantitative et/ou peuvent être des composantes d'une résistance polygénique. Par exemple, chez le piment, l'allèle *pvr2* confère une résistance partielle à certains pathotypes du PVY (Ruffel *et al.*, 2002). Le gène *pvr6* ne confère la résistance au PVMV que lorsqu'il est combiné avec des allèles de résistance du gène *pvr2* (Ruffel *et al.*, 2006). De même, chez le piment, ce sont des mutations à la fois dans les gènes codant pour eIF4E et eIF(iso)4E qui confèrent la résistance au ChiVMV (*Chilli Veinal Mottle Virus*) (Hwang *et al.*, 2009).

De plus, de façon intéressante, un même allèle mutant du gène codant pour eIF4E chez une espèce végétale peut contrôler la résistance à différentes espèces de potyvirus. Ainsi chez le pois, des mutations dans eIF4E contrôlent la résistance à trois espèces différentes de potyvirus : le PSbMV, le CIYVV et le WLMV (*White lupin mosaic virus*) (Andrade *et al.*, 2009, Bruun-Rasmussen *et al.*, 2007, Gao *et al.*, 2004b). De même, chez le piment, les allèles de résistance au locus *pvr2* contrôlent la résistance au PVY, TEV et PepMoV (*Pepper mottle virus*) (Charron *et al.*, 2008).

Récemment, les travaux menés par Walsh *et al.* (2010) sur le pathosystème *Brassica rapa* / TuMV ont montré que ce potyvirus est capable d'utiliser à la fois les allèles d'eIF4E et d'eIF(iso)4E de *Brassica rapa* pour établir le cycle viral (Walsh *et al.*, 2010).

III.2.4. Facteur viral de contournement de la résistance conférée par eIF4E ?

Chez la plupart des membres de la famille des *Potyviridae*, la capacité à contourner les résistances récessives est souvent associée à des variations de séquences dans la protéine VPg (Ayme *et al.*, 2006, Borgstrom & Johansen, 2001, Charron *et al.*, 2008, Kang *et al.*, 2005a, Keller *et al.*, 1998, Kuehne *et al.*, 2003, Masuta *et al.*, 1999, Moury *et al.*, 2004, Nicolas *et al.*, 1997, Perez *et al.*, 2007) (**Tableau 2**).

D'ailleurs, l'implication d'eIF4E dans le cycle des potyvirus a été révélée pour la première fois grâce à la mise en évidence d'une interaction physique entre la protéine eIF(iso)4E d'*A. thaliana* et la VPg du TuMV, qui fut démontrée dans un système double hybride chez la levure (Wittmann et al., 1997). Cette interaction a depuis été confirmée *in planta* (Beauchemin et al., 2007) et dans de nombreux autres couples plant-potyvirus, en utilisant différentes approches de biochimie, système double hybride, tests ELISA, GST-Pull down, fluorimétrie (Charron et al., 2008, Grzela *et al.*, 2006, Kang et al., 2005a, Khan *et al.*, 2006, Michon et al., 2006, Miyoshi *et al.*, 2006, Okade *et al.*, 2009, Yeam *et al.*, 2007). De plus, des mutations dans la VPg du TuMV empêchant son interaction avec eIF(iso)4E rendent le virus non-infectieux, suggérant ainsi que cette interaction est essentielle pour cycle viral (Leonard et al., 2000). L'ensemble de ces données suggère que la perte de sensibilité au virus (résistance) serait la conséquence d'interaction protéine-protéine interrompue ou diminuée entre eIF4E et la VPg.

L'incidence de l'interaction VPg-eIF4E dans la sensibilité des plantes aux potyvirus est illustrée par les travaux de Charron *et al.* (2008) réalisés sur le pathosystème Piment-PVY. Les auteurs ont montré que la VPg des isolats avirulents de PVY n'interagit pas avec les différentes formes d'eIF4E codées par les variants alléliques de *pvr2* conférant la résistance, tandis que les VPg d'isolats virulents sont capables d'interagir avec ces formes d'eIF4E. Cette étude suggère que la clé du contournement de la résistance contrôlée par eIF4E chez le piment vis-à-vis du PVY est la restauration de l'interaction entre la VPg et eIF4E, et que ceci passe par des substitutions d'acides aminés au sein des séquences respectives de chacune des protéines (Charron et al., 2008). De plus, la substitution d'acide aminé, Gly107Arg dans l'allèle de résistance *pvr1* codant pour eIF4E est suffisante pour abolir l'interaction avec la VPg du TEV (Yeam et al., 2007).

De plus, il a été montré que les isolats de PVY avirulents peuvent évoluer de manière à contourner la résistance conférée par eIF4E (*pvr2*) en acquérant des mutations compensatoires dans la VPg et que ces acides aminés sont sous sélection positive (Moury et al., 2004). Ces mutations permettent de restaurer l'interaction entre la VPg et les formes mutées d'eIF4E codées par les allèles de résistance au locus *pvr2* (Charron et al., 2008). L'ensemble de ces données mettent en avant l'existence d'une coévolution chez le piment entre eIF4E et la VPg des potyvirus (Charron et al., 2008).

Etant donné que différents acides aminés ont été substitués chez les formes résistantes d'eIF4E dans différentes (ou au sein d'une même) espèces végétales, il est probable que le « point de contact » précis entre la VPg et eIF4E soit optimisé pour chaque potyvirus

(Charron et al., 2008). De plus, les mutations dans la VPg de tous les isolats contournant la résistance sont localisées dans la région centrale, probablement impliquée dans le recrutement d'eIF4E (Charron et al., 2008, Roudet-Tavert et al., 2007).

Dans le cas du pathosystème *A. thaliana* / TuMV, il a été montré qu'une simple mutation dans la VPg du TuMV suffit pour contourner la résistance d'un mutant d' *A. thaliana* KO dans le gène codant pour eIF(iso)4E (Gallois *et al.*, 2010). Ni l'ARN messager ni la protéine codant pour eIF(iso)4E ne sont détectables dans ce mutant, suggérant que la mutation de la VPg confère au TuMV la capacité d'utiliser une autre isoforme d'eIF4E ou un autre facteur de l'hôte indispensable au cycle du virus.

En commun avec la résistance aux potyvirus contrôlée par eIF4E, le contournement de la résistance conférée par *rymv1* (eIF(iso)4G) chez le riz est corrélée à des variations d'acides aminés dans la VPg du RYMV (Hebrard *et al.*, 2006). La VPg du RYMV et celle des potyvirus ne présentent pas de similitude au niveau structurel mais partagent un niveau élevé de désordre intrinsèque (Hebrard *et al.*, 2009). Une interaction directe entre eIF(iso)4G et VPg a été proposée et démontrée en système double hybride (Hebrard *et al.*, 2008).

D'autres protéines que la VPg peuvent cependant être impliquées dans le contournement des résistances contrôlées par les facteurs d'initiation de la traduction : le déterminant d'avirulence correspondant au gène de résistance récessive *sbm2* chez le pois, qui a été montré d'être étroitement lié au gène *eIF(iso)4E*, est la P3 du PSbMV (Gao *et al.*, 2004a, Hjulsgager *et al.*, 2006).

Dans le cas de la résistance conférée par eIF4E chez le melon, Diaz et al (2004) ont montré que c'est une courte séquence nucléotidique nommée 3'CITE (pour 3'-cap-independent translational enhancer), située dans la région 3'NTR qui est impliquée dans le contournement du gène récessif *nsv-eIF4E* (Diaz *et al.*, 2004). Les récents travaux de Truniger et al (2008) ainsi que ceux de Nicholson et al (2010) permettent de proposer un modèle selon lequel la spécificité d'hôte est conférée par une interaction directe entre la 3'-CITE du MNSV et eIF4E qui contribue à la formation du complexe d'initiation de traduction à l'extrémité 3' du génome viral. Ensuite, une interaction ARN-ARN entre les deux extrémités 5' et 3' permettrait de circulariser l'ARN viral, permettant ainsi l'initiation de la traduction (Nicholson *et al.*, 2010, Truniger *et al.*, 2008).

Très récemment, Nakahara et al. 2010 ont montré que le déterminant d'avirulence correspondant au gène de résistance récessive *cyv2* chez pois est la P1 du CIYVV. Une seule substitution d'acide aminé à la position 24 de la P1 (isoleucine en valine) confère au CIYVV la capacité à contourner la résistance *cyv2* (Nakahara *et al.*, 2010).

L'ensemble de tous ces résultats suggère que les virus ont développé des stratégies variées pour interagir avec la machinerie de traduction de l'hôte et contrecarrer les résistances conférées par eIF4E.

III.2.5. Rôle de l'interaction VPg-eIF4E dans le cycle des potyvirus ?

Comme décrit plus haut, dans le paragraphe (II.4.2.1), la principale fonction d'eIF4E est de fixer la coiffe en 5' des ARNm cellulaires pour promouvoir la circularisation de l'ARNm et l'initiation de la traduction (**Figure 9**). Puisque les potyvirus ne possèdent pas de coiffe mais la protéine VPg liée de façon covalente à l'extrémité 5', l'hypothèse la plus simple serait que l'interaction VPg-eIF4E « mimerait » l'interaction eIF4E-Coiffe permettant ainsi la circularisation et la traduction de l'ARN viral. En plus, des complexes ternaires incluant la VPg, eIF4E, et eIF4G ont été identifiés *in planta* dans le cas de l'infection du TuMV, du LMV, et du PVY (Grzela et al., 2006, Michon et al., 2006, Miyoshi et al., 2006). Cette hypothèse serait confirmée par les résultats de Gallie (2001) et Zeenko et al (2005) qui montrent que la traduction *in vitro* du TEV dans un système acellulaire est coiffe-indépendant mais repose sur la présence d'eIF4G (voir § II.4.2.1.) (Gallie, 2001, Zeenko & Gallie, 2005).

Plusieurs études récentes ont suggéré un rôle de la VPg dans l'inhibition de traduction cap-dépendante *in vitro* (Cotton *et al.*, 2006, Grzela et al., 2006, Khan *et al.*, 2008, Miyoshi *et al.*, 2008). Cet inhibition serait due à l'activité RNasique intrinsèque de la VPg (Cotton et al., 2006), mais cela n'a pas été confirmé dans une autre étude (Miyoshi et al., 2008). Il semble plutôt que la VPg ait deux effets distincts sur la traduction *in vitro*: le blocage de la traduction cap-dépendante des ARNm et la stimulation de la traduction cap-indépendante (Khan et al., 2008). Ceci suggère que le complexe VPg-eIF4E régule l'affinité de la machinerie de traduction en faveur de l'ARN des potyvirus. Mais la forme de la VPg (libre ou liée à l'extrémité 5' de l'ARN viral) impliquée dans cette régulation n'est actuellement pas connue (Caranta et al, non publié).

Un autre rôle potentiel de l'interaction VPg-eIF4E dans le cycle de réplication virale a aussi été suggéré (Beauchemin et al., 2007, Lellis et al., 2002). L'analyse par BiFC (complémentation par fluorescence bimoléculaire) a permis de localiser l'interaction d'eIF(iso)4E avec différents précurseurs polyprotéiques de la VPg du TuMV dans des compartiments sub-cellulaires distincts, ce qui renforce l'hypothèse que l'interaction joue de multiples rôles dans le cycle de réplication viral (Beauchemin et al., 2007).

III.2.6. D'autres facteurs de l'hôte potentiellement impliqués dans les mécanismes de résistance conférée par eIF4E ?

D'autres facteurs de l'hôte impliqués dans les mécanismes de résistance conférée par eIF4E ont été identifiés grâce à leur capacité à interagir avec la VPg ou avec eIF4E. Ces facteurs définiraient l'interactome du complexe VPg-eIF4E, dont la caractérisation serait utile pour la compréhension de l'ensemble du processus.

Comme décrit précédemment (§ III.2.4), eIF4E a été identifié dans un système double hybride chez la levure en utilisant comme appât un précurseur protéolytique de la VPg, la VPg-Pro (Wittmann et al., 1997). Trois autres protéines interagissant avec la VPg ont été identifiées mais elles n'avaient aucune homologie significative avec les protéines connues à l'exception d'une d'entre elles, la HC4, qui correspond à la protéine à doigts de zinc At3g25910 d'*A. thaliana* (Caranta et al., non publié). En utilisant le même système de criblage par double hybride chez la levure, trois protéines d'hôte capables d'interagir avec la VPg de potyvirus ont récemment été identifiées: la PVIP (voir § II.4.4.2) (Dunoyer et al., 2004), la AtRH8 et la PpDDXL (voir § II.4.2.2) (Huang et al., 2010). Dans les trois cas, la suppression du gène correspondant a entraîné une réduction (PVIP) ou une abolition (AtRH8 et PpDDXL) de la sensibilité aux potyvirus, et PPV respectivement, suggérant que ces deux protéines sont nécessaires pour l'accumulation virale dans les plantes. En se basant sur l'observation que ces facteurs de l'hôte (PVIP, AtRH8 et PpDDXL) ainsi qu'eIF4E interagissent avec la même protéine virale, la VPg, on peut imaginer qu'elles sont aussi impliquées dans le même processus du cycle d'infection virale.

D'autres facteurs de l'hôte interagissant avec le précurseur VPg-Pro de la VPg, et donc éventuellement avec la VPg elle-même, ont été identifiés: PABP (Leonard et al., 2004) et le facteur d'élongation eucaryote 1A, eEF1A (Thivierge et al., 2008). A noter ici que ces deux facteurs sont des composants de la machinerie de traduction, comme eIF4E et eIF4G.

L'observation au microscope couplée à l'analyse biochimique a suggéré que la PABP a deux destins différents dans les cellules infectées par des potyvirus (Beauchemin & Laliberte, 2007): soit elle se dirige vers le noyau, éventuellement avec la VPg parce que des quantités importantes de cette protéine est emmenée vers le noyau durant le cycle viral, ou elle se dirige vers le lumen des structures membranaires induites par le virus qui contient également la VPg-Pro et la RdRp virale. Ces structures membranaires sont les lieux éventuels où la réplication du virus à ARN se produit. Ainsi, cette observation suggère que la PABP établirait un lien entre la traduction et la réplication de potyvirus.

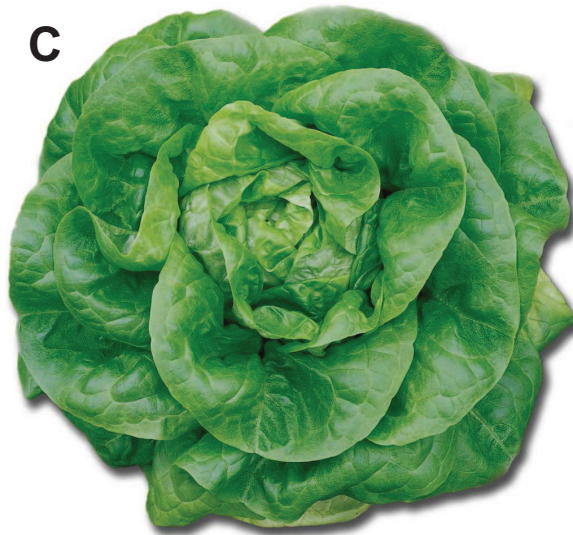
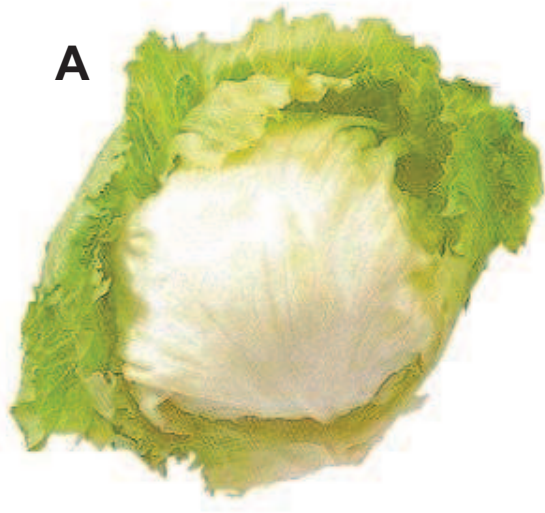


Figure 22. Différentes variétés de laitues. A. Laitue iceberg, B. Laitue romaine, C. Laitue « butterhead », D. Laitue feuille de chêne, E. la laitue batavia.

Enfin, un criblage à haut débit utilisant comme appât eIF4E permettrait d'identifier de facteurs candidats supplémentaires qui pourraient être impliqués dans le cycle des potyvirus.

Deux protéines d'*A. thaliana* capables d'interagir avec eIF4E ont été identifiées grâce à un tel criblage : la lipoxygénase 2 (LOX2) et BTF3, une sous-unité du complexe associé au polypeptide naissant (Freire, 2005, Freire *et al.*, 2000). Les fonctions de ces protéines et leur importance lors d'infection virale restent à déterminer.

Récemment, une nouvelle protéine impliquée dans l'infection d'*A. thaliana* par deux potyvirus, le PPV et le TuMV, a été identifiée. Il s'agit d'une protéine phosphatase se liant à l'ADN, AtDBP1 ou « *A. Thaliana DNA-binding protein phosphatase* » qui s'avère capable d'interagir directement avec le facteur eIF(iso)4E. En outre, l'analyse de mutants KO *atdbp1* montre que la perte d'expression du gène codant pour AtDBP1 entraîne la résistance au PPV et au TuMV, et un taux accru de dégradation de la protéine eIF(iso)4E au travers du protéasome 20S. Les auteurs suggèrent que l'interaction d'eIF(iso)4E avec AtDBP1 pourrait stabiliser eIF(iso)4E et empêcher sa dégradation (Castello *et al.*, 2010).

IV. Le pathosystème Laitue-LMV : un modèle d'étude des interactions plante-potyvirus

IV.1. La laitue et ses ressources génétiques

La laitue (*Lactuca sativa.*) est une plante annuelle appartenant au genre *Lactuca*, famille *Astéracées*, sous-famille *Cichorioideae* et tribu *Lactuceae*. Elle est largement cultivée pour ses feuilles tendres consommées comme légume, généralement crues en salade.

D'après les données de la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), sa production mondiale a atteint 23 millions de tonnes en 2007. Avec une production de plus de 450 000 tonnes par an, la France est le 3^{ème} pays européen producteur de laitue après l'Espagne et l'Italie et se situe au 7^{ème} rang mondial.

La famille *Asteraceae* contient également d'autres plantes cultivées telles que l'endive, la chicorée, l'artichaut, le tournesol, la carthame mais aussi de nombreuses plantes ornementales telles que le chrysanthème, gazania, l'*osteospermum*, *etc.* La laitue se caractérise par une grande diversité phénotypique des variétés (Ryder, 1999; Maisonneuve, 2003) (**Figure 22**).



Figure 23. Les quatre « ressources génétiques » de la laitue. **A.** *L. sativa*, **B.** *L. virosa*, **C.** *L. serriola*, **D.** *L. saligna*.

Bien qu'environ 100 espèces de *Lactuca* soient connues, quatre seulement peuvent subir des croisements interspécifiques (*L. sativa.*, *L. serriola.*, *L. saligna* et *L. virosa*) (**Figure 23**) qui ont parfois été utilisées dans les programmes de sélection, en particulier en tant que ressources génétiques pour la résistance aux agents pathogènes et insectes.

IV.2. Les virus de la laitue

La laitue est un hôte naturel pour plus de 30 espèces de virus de plantes (Blancard *et al.*, 2003). Cependant, beaucoup de ces virus n'ont pas d'impact significatif sur la récolte et des efforts de sélection pour la résistance ont été réalisés pour la moitié seulement de ces agents pathogènes (**Tableau 3**) (Blancard *et al.*, 2003, Davies *et al.*, 1997, Robinson & Provvidenti, 1993).

Décrit pour la première fois en Floride par Jagger en 1921, le virus de la mosaïque de la laitue (LMV) est le virus le plus dévastateur dans les cultures de laitue (German-Retana *et al.*, 2008a, Le Gall, 2003). En l'absence de mesures de contrôle, ce virus peut occasionner la perte totale des récoltes de printemps en champ (Dinant & Lot, 1992). Sa gamme d'hôte est étendue puisqu'il est capable d'envahir 121 hôtes appartenant à 16 familles et à 60 genres différents, comprenant principalement des *Astéracées* telle que la laitue, l'endive, le pissenlit, les laitrons mais aussi des hôtes appartenant à d'autres familles (*Fabacées* (pois), *Chenopodiacées* (épinard)...) ainsi que de nombreuses plantes ornementales (*Osteospermum*, *Gazania*, *Bupleurum falcatum*,...).

Le LMV est transmis par plusieurs espèces de pucerons selon un mode non persistant (Shukla *et al.*, 1994). Certains isolats sont également transmis par les semences, atteignant parfois plus de 8% des graines provenant de plantes infectées (Matthews, 1991). Ainsi, l'emploi de graines certifiées sans virus constitue la première étape dans la lutte contre le LMV. La limite de contamination tolérée dans les lots de semences est d'une graine infectée sur 30 000 aux Etats-Unis ainsi qu'en Europe (Lepoivre, 2003). Cependant, le contrôle du LMV en champ se fait essentiellement à travers l'utilisation de variétés porteuses de gènes de résistance.

Virus	Abréviation	Genre	Famille
<i>Lettuce mosaic virus</i>	LMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
<i>Turnip mosaic virus</i>	TuMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
<i>Bidens mottle virus</i>	BiMoV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
<i>Endive necrotic mosaic virus</i>	ENMV	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
<i>Mirafiori lettuce virus</i>	MiLV	<i>Ophiovirus</i>	<i>Ophioviridae</i>
<i>Lettuce big vein virus</i>	LBVV	<i>Varicosavirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>
<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>
<i>lettuce infectious yellows virus</i>	LIYV	<i>Crinivirus</i>	<i>Closteroviridae</i>
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV	<i>Tospovirus</i>	<i>Bunyaviridae</i>
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>
<i>Broad bean wilt virus</i>	BBWV	<i>Fabavirus</i>	<i>Secoviridae</i>
<i>Dandelion yellow mosaic virus</i>	DaYMV	<i>Sequivirus</i>	<i>Sequiviridae</i>
<i>Tomato bushy stunt virus</i>	TBSV	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tombusviridae</i>

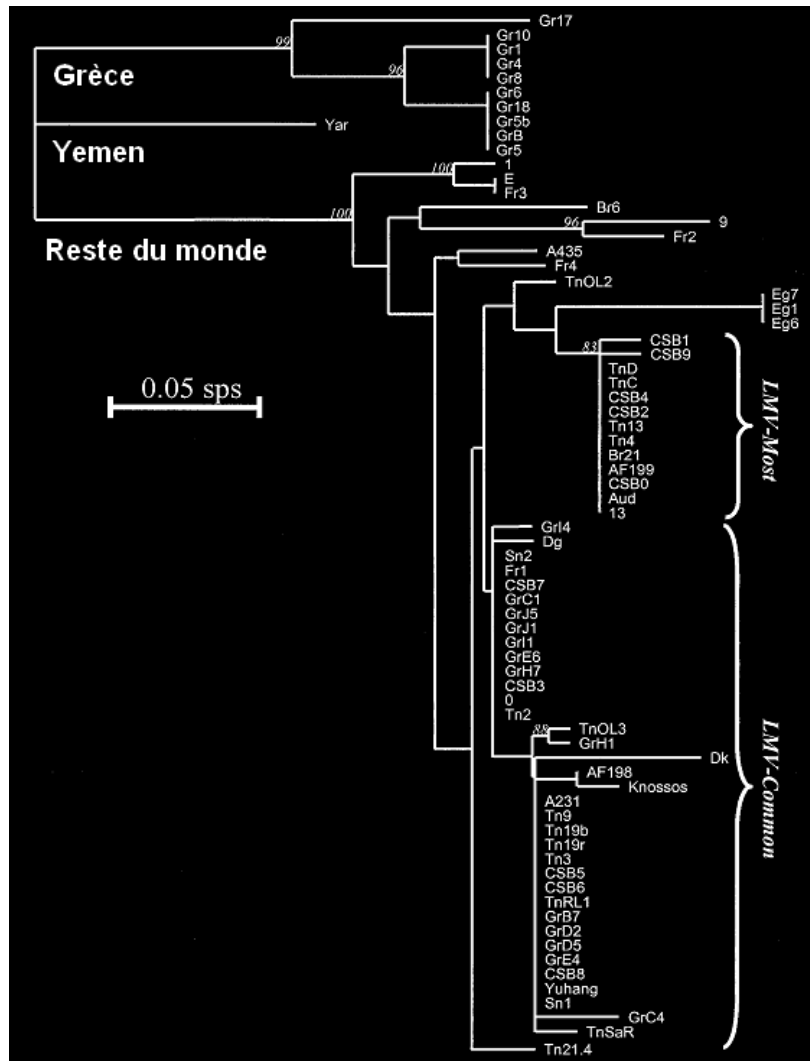
Tableau 3. Tableau récapitulatif des virus infectant la laitue et pour lesquels des efforts de sélection pour la résistance ont été réalisés.

IV.3. Les gènes de résistance au LMV chez la laitue

Les deux types de gènes de résistance au LMV, récessive et dominante, ont été identifiés chez la laitue (Dinant & Lot, 1992, Pink *et al.*, 1992b). Les trois gènes dominants ont été nommés *Mo2*, *Mo3* et *Mo4*. Le gène *Mo2* a été identifié dans le germplasma de *L. sativa* (Pink *et al.*, 1992a), alors que les deux autres, *Mo3* et *Mo4*, ont été identifiés dans l'espèce *L. virosa* (Le Gall *et al.*, 1999, Maisonneuve *et al.*, 1999). L'utilisation du *Mo2* dans des programmes de sélection variétale est limitée parce qu'il est facilement contourné par de nombreux isolats de LMV (Bos *et al.*, 1994, Dinant & Lot, 1992, Revers *et al.*, 1997a). En revanche, *Mo3* a un large spectre d'activité (Maisonneuve *et al.*, 1999) et est associé à un très fort niveau de résistance ou même d'immunité (Le Gall *et al.*, 1999). Cependant, les difficultés rencontrées lors de tentatives d'introgession dans *L. sativa* (Maisonneuve, 2003) ont jusqu'à présent restreint son utilisation dans la protection des cultures de laitue. Le gène *Mo4*, quant à lui, induit une réaction d'hypersensibilité bloquant la propagation du LMV dans la plante inoculée. Cependant, il a été montré qu'il pouvait facilement être contourné par le LMV (Le Gall *et al.*, 1999).

Les deux allèles du gène de résistance récessive au LMV, nommés *mo1*¹ et *mo1*², ont été très largement utilisés avec succès par les sélectionneurs (Candresse *et al.*, 2002, German-Retana *et al.*, 2008a, Le Gall, 2003). La forme allélique *mo1*¹, initialement nommée gène *g*, a été identifiée chez la variété «Gallega de Invierno» (van der Pahlen & Crnko, 1965). Il est principalement utilisé par les sélectionneurs européens et introduit dans de nombreuses variétés de laitue telles que la Butterhead, la Batavia, la Looseleaf, la Crisphead ainsi que la Laitue romaine (Pink *et al.*, 1992b). Le gène *mo1*² (originellement nommé *mo*) a été identifié pour la première fois dans l'accession PI251245 et quelques autres accessions de *L. sativa* cultivées en Egypte (German-Retana *et al.*, 2008a). Ce gène a ensuite été introgressé dans la laitue cultivée et a été surtout déployé par les sélectionneurs d'Amérique du nord dans la Crisphead et la Laitue romaine. Bien que les gènes alléliques *mo1* soient déployés de façon extensive par les sélectionneurs dans la plupart des régions du monde, ces gènes possèdent toujours un niveau élevé d'efficacité et se sont avérés jusqu'à présent très durables (Blancard *et al.*, 2003, Dinant & Lot, 1992).

Une étude de la diversité génétique, basée sur la comparaison de la séquence de la région variable comprise entre la N1b et la CP du LMV a permis de dresser un arbre phylogénétique



D'après (Krause-Sakate et al., 2002)

Figure 24. Dendrogramme des séquences nucléotidiques des isolats de LMV montrant les distances génétiques entre les isolats de LMV connus. L'analyse a été réalisée sur une région correspondant à la séquence comprise entre la jonction « fin de la séquence codante pour la N1b et début de la CP ». L'échelle correspond à 0,05 substitution par site.

des isolats de LMV. Parmi ces isolats, on peut distinguer deux branches phylogénétiques particulières: celle regroupant les isolats de type «Commun» et celle regroupant les isolats de type «Most» (pour *mol*-breaking, seed transmitted) (**Figure 24**). Les isolats communs constituent la majorité des isolats retrouvés dans les champs de laitue et partagent la capacité à être transmis par la graine mais ne contournent pas la résistance contrôlée par *mol*¹ et *mol*².

Les isolats Most sont apparus quant à eux durant ces dernières années et possèdent, comme leur nom l'indique, la capacité de contourner les résistances *mol*¹ et *mol*² tout en conservant la capacité à être transmis par la graine (Krause-Sakate *et al.*, 2002). Autant les isolats communs peuvent être contrôlés par l'utilisation en champ de laitues résistantes, autant ces variétés ne sont d'aucun secours vis-à-vis des isolats Most. Le seul moyen de lutte contre des isolats de ce type est de les détecter suffisamment tôt, dans les graines de laitue notamment, afin d'en limiter la propagation.

IV.4. Le gène de résistance récessive *mol* code pour eIF4E chez la laitue

Au laboratoire, Valérie Nicaise et Sylvie German-Retana ont montré que les gènes *mol*¹ et *mol*² codent pour des formes mutées du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Nicaise *et al.*, 2003). L'allèle *mol*¹ code pour une protéine mutante (eIF4E¹) caractérisée par une délétion de trois acides aminés (Glutamine-Glycine-Alanine) aux positions 108-110 qui sont remplacés par un seul résidu histidine et par une substitution de l'Alanine à la position 186 par une Serine. L'allèle *mol*² codant pour la protéine mutante eIF4E² est caractérisé par une substitution de l'Alanine à la position 70 par une Proline.

Comme décrit précédemment (§ III.2.2.) les mutations associées aux allèles de résistance du gène *mol* se situent à la surface de la protéine, dans la région proche de la fixation de la coiffe et à l'opposé de la zone de fixation du facteur eIF4G (Nicaise *et al.*, 2003) (**Figure 25**).

Des mutations ponctuelles ont été introduites dans eIF4E⁰ (isolé à partir d'une laitue sensible) afin d'en altérer les fonctions biologiques et d'identifier celles qui sont importantes pour l'infection par le LMV. Sur la base de la connaissance de la structure 3D d'eIF4E de mammifères, certaines de ces mutations étaient supposées abolir ou altérer l'interaction avec la coiffe, avec eIF4G ou modifier d'autres régions à la surface de la protéine. Ceci a été

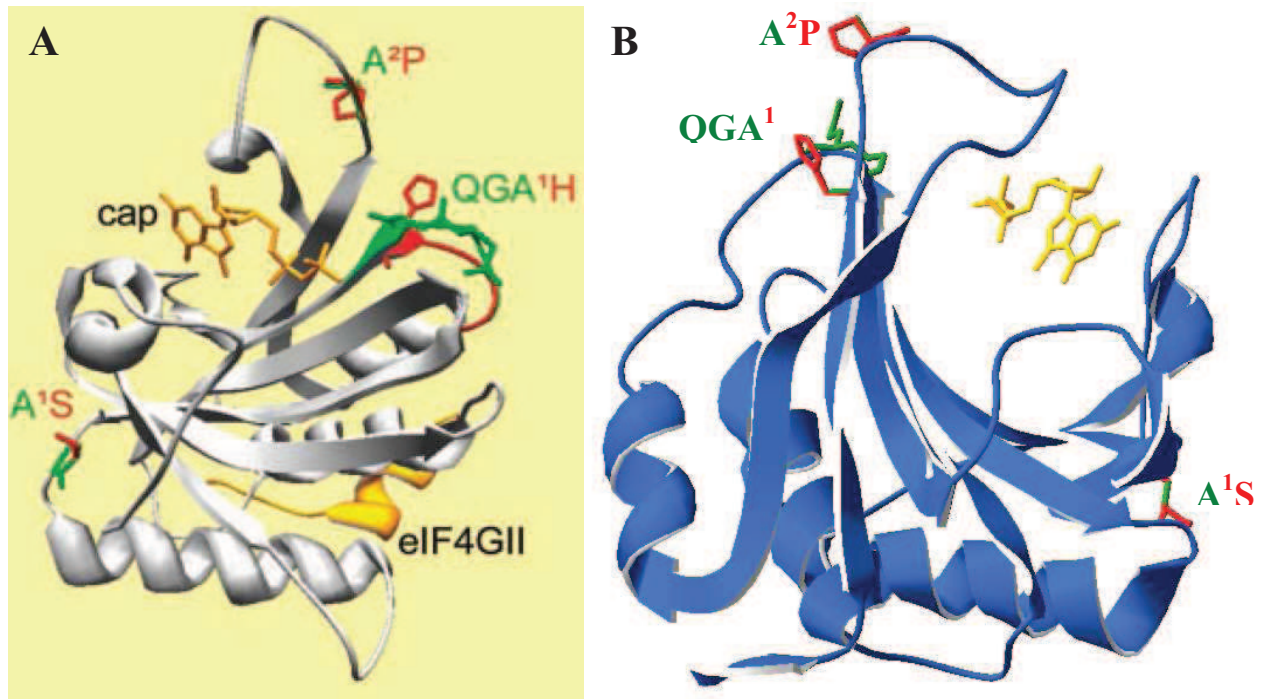


Figure 25. Localisation sur les structures prédites d'eIF4E de laitue, des mutations codées par les allèles mol^1 (en vert) et mol^2 (en rouge). (A) Prédiction basée sur l'homologie de Ls-eIF4E⁰ avec eIF4E de souris (Nicaise et al., 2003). (B) Prédiction basée sur l'homologie de Ls-eIF4E⁰ avec eIF4E de blé (Monzingo *et al.*, 2007). L'analogue de la coiffe et un peptide dérivé d'eIF4G (représentés en jaune) sont positionnés en fonction des données de leur co-cristallisation avec le Mm-eIF4E de souris et l'eIF4E de blé.

vérifié par des tests biochimiques (spectrométrie de fluorescence, chromatographie d'affinité, ELISA), fournissant au passage la première carte « structure/fonction » d'un eIF4E de plante (German-Retana *et al.*, 2008b). La capacité des eIF4E mutants à restaurer l'infection par le LMV chez des plantes résistantes a été évaluée en parallèle. La confrontation de ces résultats a permis de conclure que la capacité pour eIF4E de fixer un analogue de coiffe n'est pas requise pour la fonctionnalité de ce facteur dans le cycle viral. De plus, l'interaction d'eIF4E avec un oligopeptide mimant eIF4G ou avec un eIF4G hétérologue peut être fortement altérée sans que cela n'affecte leur capacité à restaurer l'infection du LMV en conditions non permissives.

Afin de déterminer si les substitutions en acides aminés identifiées dans les protéines eIF4E¹ et eIF4E² de résistance naturelle de la laitue ainsi que les 14 mutations artificielles introduites dans eIF4E⁰ ont un impact sur la fonction de traduction des ARNm de la levure, des tests d'aptitude à compléter une souche de levure présentant une expression conditionnelle d'eIF4E ont été réalisés. Il n'y a pas de corrélation entre le rôle *in planta* d'eIF4E vis-à-vis de l'interaction avec le LMV et la capacité de compléter la traduction dans la levure et aucun des deux allèles/protéines de résistance au locus *mo1* (eIF4E¹ et eIF4E²) n'apparaît affecté dans sa capacité à compléter la traduction (German-Retana *et al.*, 2008b). En outre, ce travail a permis d'obtenir des mutations dans eIF4E qui étaient inconnues dans la variabilité naturelle de la plante, mais qui sont incompatibles l'infection virale: ce sont autant de nouveaux allèles de résistance potentiels (German-Retana *et al.*, 2008b).

IV.5. Originalité de la résistance conférée par eIF4E chez la laitue par rapport aux autres résistances médiée par eIF4E

IV.5.1. Diversité des phénotypes de résistance

Chez la laitue, Le LMV provoque des symptômes variés en fonction de l'isolat viral, du génotype de la plante hôte ainsi que des conditions environnementales (Bos *et al.*, 1994, Dinant & Lot, 1992, Irwin *et al.*, 1999, Pink *et al.*, 1992a, Revers *et al.*, 1997a). Ainsi, pour la plupart des souches de LMV, telles que les souches communes (Krause-Sakate *et al.*, 2002), *mo1*² entraîne généralement une tolérance (multiplication virale sans expression de symptômes) (Dinant & Lot, 1992, Irwin *et al.*, 1999) tandis que *mo1*¹ entraîne une résistance

au niveau de l'accumulation dans les feuilles inoculées. De plus, l'utilisation de LMV marqués génétiquement (GFP ou GUS) a montré que l'allèle de résistance *mol*² bloque le chargement et le déchargement du LMV dans et depuis le phloème, altérant le mouvement à longue distance du LMV vers l'apex caulinaire (German-Retana *et al.*, 2000, German-Retana *et al.*, 2003, German-Retana *et al.*, 2008a).

IV.5.2. Le facteur viral de contournement de la résistance *mol-eIF4E* n'est pas seulement la VPg

Les analyses par génétique inverse des déterminants viraux de contournement de la résistance *mol* par le LMV via l'utilisation des clones complets d'ADNc infectieux du LMV (Yang *et al.*, 1998) ont montré que le(s) déterminant(s) de contournement de la résistance conférée par eIF4E chez la laitue sont localisés dans la partie centrale de la polyprotéine virale comprenant la région C-terminale de la CI (CI-C-ter), la 6K2 et la VPg (Redondo *et al.*, 2001). Les résultats obtenus dans le cadre de la thèse de Thomas GUIRAUD ont permis d'affiner cette région et ont montré l'implication à la fois de la VPg et de la région CI-C-ter dans le contournement de la résistance *mol* (Guiraud, 2004).

V. Contexte et objectifs de l'étude

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude des interactions entre les potyvirus et leur plante hôte, en utilisant le pathosystème LMV/laitue comme modèle d'étude.

Le clonage des gènes *mol*¹ et *mol*² de résistance récessive au LMV chez la laitue a montré qu'un tout petit nombre de mutations dans le facteur d'initiation eIF4E permet de contrôler l'infection par le LMV. Contrairement aux autres pathosystèmes impliquant eIF4E, l'implication à la fois de la VPg et de la CI du LMV dans le contournement de ce type de résistance récessive est une donnée très originale. Dans la littérature, la VPg est en effet le principal facteur de contournement viral de la résistance, alors que pour la première fois, l'implication de la CI a été montrée dans le cas du LMV (Guiraud, 2004).

Ainsi, mon travail de thèse a débuté par la confirmation des résultats montrant l'implication de la CI dans le contournement des allèles *mol*¹ et *mol*² en complétant les travaux sur les déterminant du contournement initiés au laboratoire (**Chapitre 1**). Nous nous

sommes ensuite focalisés sur la région CI-C-ter, longue de 52 aa, et sur l'identification des acides aminés impliqués dans le contournement de la résistance ; par une approche de mutagenèse dirigée ciblant des positions candidates identifiées en exploitant la variabilité naturelle du LMV, ou par une approche de mutagenèse aléatoire en mettant au point un crible haut débit des mutants obtenus (**Chapitre 2**). L'implication de la CI dans le contournement de la résistance *mo1* laisse supposer que cette protéine est capable d'interagir, directement ou non, avec eIF4E. Nous avons testé cette hypothèse *in vitro* et *in vivo* et estimé l'impact des mutations dans la région CI-C-ter sur ces interactions (**Chapitre 3**). Une discussion générale portant sur l'ensemble de mes résultats et les perspectives de ce travail constituent le **Chapitre 4**. Enfin, afin de quantifier l'accumulation virale dans les plantes de façon quantitative nous avons mis en place d'un test de détection du LMV par RT-PCR quantitative (**Annexe 1**).

Chapitre 1

Etude du déterminisme moléculaire de la virulence du LMV vis-à-vis du gène de résistance récessive mo1 chez la laitue

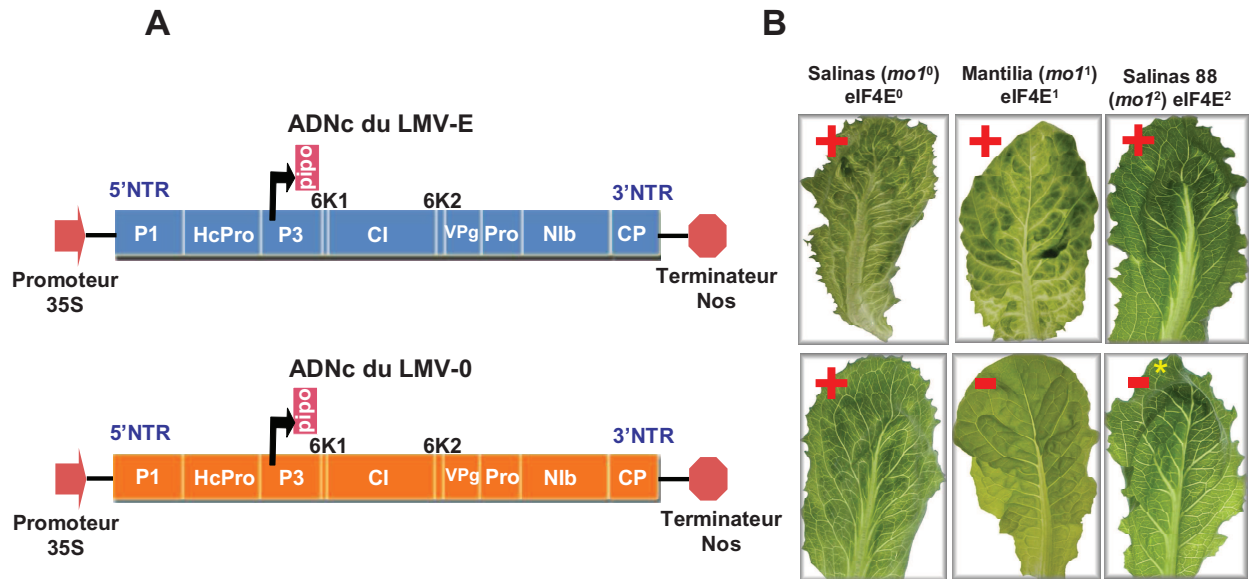


Figure 26. A. Représentation schématique des clones d'ADNC complets infectieux dérivés du LMV-0 (isolat non-contournant $mo1$) et LMV-E (isolat contournant $mo1$). Les ADNc ont été clonés dans le vecteur pBS70T en aval du promoteur 35S du CaMV et en amont du terminateur de transcription du gène codant pour la nopaline synthase d'*Agrobacterium* (NOS).

B. Caractéristiques biologiques des isolats de LMV-0 et LMV-E. + : Sensibilité : le virus se multiplie et des symptômes apparaissent ; - : Résistance : le virus ne se multiplie pas ; -* : Tolérance : le virus se multiplie de façon sporadique mais aucun symptôme n'apparaît.

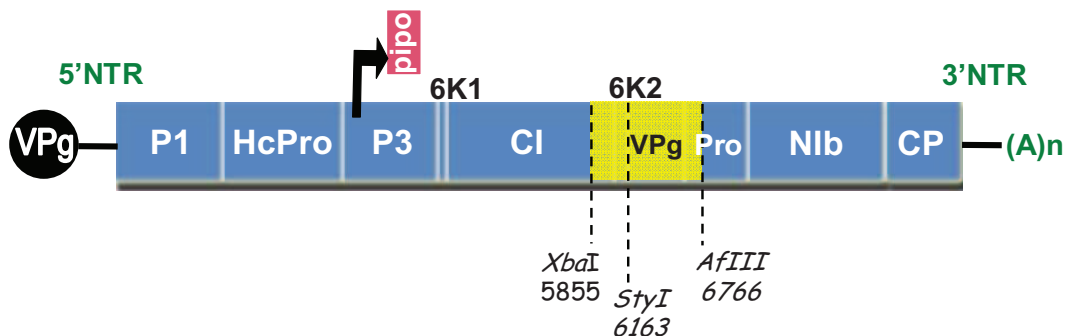


Figure 27. Localisation des déterminants de la virulence du LMV. Le rectangle jaune correspond à la région identifiée comme étant impliquée dans le contournement de la résistance $mo1$. Les noms des enzymes de restriction, et la position sur le génome du LMV de leurs sites de coupure sont indiqués au-dessous de la séquence du LMV (Redondo *et al.*, 2001a, Redondo *et al.*, 2001b).

I. Introduction

Afin d'identifier les déterminants moléculaires du LMV impliqués dans le contournement de la résistance *mo1* chez la laitue, une approche de génétique inverse a été suivie, en utilisant les clones d'ADNc complet infectieux (Redondo et al., 2001a, Yang *et al.*, 1998) obtenus au laboratoire pour deux isolats de LMV aux propriétés biologiques différentes (**Figure 26**). Sur variétés sensibles (Trocadéro, Salinas), le LMV-0 induit des symptômes légers, éclaircissements de nervures et mosaïques, tandis que le LMV-E provoque des symptômes sévères, rabougrissement et nécroses foliaires. Sur variétés résistantes (Salinas 88 et Mantilia), le LMV-E est capable de se multiplier et d'induire des symptômes sévères tandis que le LMV-0 n'est en général pas capable de se multiplier ni d'induire de symptômes chez ces variétés résistantes. Parfois, une accumulation faible du LMV-0 est détectée de façon sporadique dans la variété Salinas 88 (*mo1*²). Il s'agit dans ce cas là de tolérance (Revers *et al.*, 1997).

Au laboratoire, Redondo et al. (2001) ont montré que le(s) déterminant(s) viraux de contournement de la résistance étaient localisés dans la partie centrale de la polyprotéine virale contenant la région CI-C-ter, la 6K2 et la VPg du LMV (**Figure 27**) (Redondo et al., 2001a). Dans le but d'affiner cette cartographie, T. Guiraud a poursuivi ces travaux en échangeant des portions génomiques plus réduites au niveau de la région centrale du génome de LMV. Le comportement biologique des quatre clones recombinants qu'il a obtenus est résumé dans la **Figure 28**. Ces résultats préliminaires (car pas plus de deux répétitions biologiques avaient été faites) ont montré que l'échange de la VPg de l'isolat avirulent (LMV-0) par celle de l'isolat virulent (LMV-E) dans le virus LMV-0staf1E, semblait suffisant pour restaurer la compatibilité complète du LMV-0 avec les variétés de laitue portant l'allèle *mo1*¹ codant pour la forme « défectueuse » Ls-eIF4E¹, mais pas avec la variété portant l'allèle *mo1*². Le comportement des virus LMV-Estaf10 et LMV-0xbastyE capables d'infecter les variétés résistantes *mo1*¹ et *mo1*² indiquait que la région codant pour la portion CI-C-ter et la 6K2 suffisait pour le contournement des deux allèles de *mo1* (**Figure 28B**).

De plus, dans le but d'identifier les acides aminés dans la région CI-C-ter et la 6K2 potentiellement impliqués dans le contournement, un alignement des séquences protéiques du LMV-0, du LMV-E et de 10 isolats de LMV répartis dans les différentes branches de l'arbre phylogénétique et se comportant différemment vis-à-vis des résistances *mo1*¹ et *mo1*² avait été réalisé (**Figure 29**).

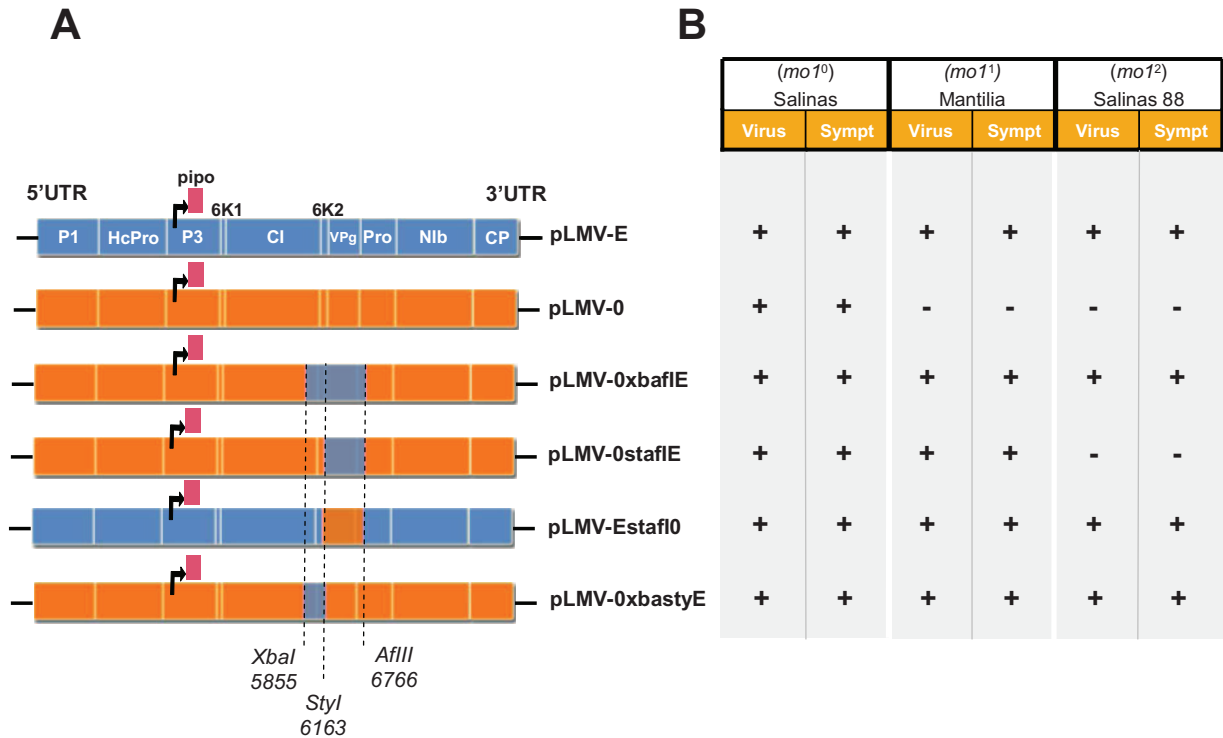


Figure 28. A. Représentation schématique du génome des virus recombinants construits à partir du LMV-0 et du LMV-E. Les sites de restriction utilisés pour construire ces virus recombinants ainsi que leur position sur le génome sont indiqués en dessous. **LMV-0xbafIE**, dérivé du LMV-0, comprenant la portion génomique codant pour la région CI-C-ter, la 6K2 et la VPg du LMV-E. **LMV-0stafIE**, dérivé du LMV-0, comprenant la séquence codant pour la VPg du LMV-E. **LMV-EstafI0**, dérivé du LMV-E et clone recombinant réciproque du LMV-0stafIE, comprenant la séquence codante de la VPg du LMV-0. **LMV-0xbastyE**, dérivé du LMV-0, comprenant la séquence codant pour la région CI-C-ter et pour la 6K2.

B. Caractéristiques biologiques des virus recombinants. (Résultats préliminaires obtenus lors de la thèse de T. Guiraud). La présence ou l'absence d'accumulation virale et de symptômes sur la variété sensible Salinas (*mo1⁰*) ainsi que sur les variétés résistantes Mantilia (*mo1¹*) et Salinas 88 (*mo1²*) est symbolisée respectivement par un (+) ou un (-). Virus = accumulation virale, Sympt = Symptômes.

Bien que 7 différences puissent être dénombrées entre les séquences protéiques du LMV-0 et du LMV-E dans cet intervalle, et en prenant en compte 10 isolats supplémentaires, deux positions dans la CI pourraient expliquer les différences de propriétés biologiques : les positions 602 et 621 (aa dans la séquence de la CI, aa 1927 et 1946 respectivement dans la séquence de la polyprotéine du LMV). Les 5 autres différences entre LMV-0 et LMV-E, dont 4 se trouvent dans la région 6K2, semblent a priori ne pas être corrélées avec le contournement des résistances *moI*¹ et/ou *moI*². Le rôle de la région 6K2 dans le contournement a donc été exclu. Tous les isolats incapables de contourner *moI* ont une alanine à la position 602 alors que 4 des 5 isolats contournant *moI*¹ et *moI*² ont une valine (ainsi qu'1 des 3 isolats ne contournant que *moI*¹) et le LMV-E une thréonine. A la position 621, la sérine des isolats non-contournants est substituée soit par une thréonine (LMV-E et LMV-Cordoue), soit par une isoleucine (LMV-CI2, LMV-AF199, LMV-13 et LMV-Tn4). Deux mutants dérivés du LMV-0 ont donc été obtenus par mutagenèse dirigée par T. Guiraud (**Figure 30A**): le mutant LMV-0-A602V, où l'alanine 602 est substituée par une valine, et le mutant LMV-0-S621T, où la sérine 621 est mutée en thréonine. Les analyses préliminaires menées sur ces mutants ont montré que le LMV-0-A602V n'est pas capable de contourner la résistance *moI* (**Figure 30B**). La substitution d'une alanine en valine à cette position ne semble donc pas suffisante pour entraîner une modification de la virulence du LMV-0. Par contre, le mutant LMV-0-S621T est capable de contourner la résistance conférée par *moI*¹ et *moI*² (**Figure 30B**). Il semble donc que la substitution de la sérine en une thréonine en position 621 confère au LMV-0 la capacité à contourner la résistance conférée par le gène *moI*. Pour confirmer cette hypothèse, il convenait de construire le mutant réciproque, le LMV-E porteur de la substitution de la thréonine 621 en une sérine.

J'ai donc entrepris la construction du LMV-ET621S ainsi que celle des virus recombinants LMVExbasty0 et LMVExbafI0, afin non seulement de reproduire mais aussi de compléter les résultats obtenus précédemment par T. Guiraud.

Malgré des efforts répétés, le clone LMV-Exbasty0 n'a jamais pu être obtenu, au contraire des clones LMV-ET621S et LMVExbafI0.

Trois expériences indépendantes d'inoculation des variétés Trocadéro, Salinas, Salinas 88 et Mantilia ont été réalisées au minimum, afin d'évaluer le comportement biologique des ces virus, en réalisant des test-ELISA semi-quantitatifs à 15 et 30 jpi (jours post-inoculation).

La descendance des virus inoculés a été contrôlée par RT-PCR en utilisant les amorces W et X (Matériel et méthodes, Tableau 18). L'ensemble des résultats obtenus a fait l'objet de l'article qui suit, publié dans *Molecular Plant Pathology*.



Figure 29. Alignement des séquences protéiques correspondant à la région CI-C-ter-6K2, de divers isolats de LMV. La première ligne est la séquence nucléotidique du LMV-0, les autres lignes correspondent aux séquences protéiques prédites. Seuls les acides aminés qui diffèrent avec la séquence du LMV-0 sont indiqués. Les isolats écrits en vert ne se multiplient pas sur les variétés *mol*¹ ni *mol*², les isolats en bleu ne se multiplient que sur les variétés *mol*¹, les isolats en rouge se multiplient à la fois sur les variétés *mol*¹ et *mol*². La ligne du haut indique la position des nucléotides sur le génome du LMV alors que la ligne du bas celle des acides aminés sur la polyprotéine du LMV, ainsi que la protéine à laquelle ces acides aminés appartiennent. La positions des acides aminés sur la protéine CI est aussi indiqué. Les deux positions candidates pour la mutagenèse dirigée sont surlignées en jaune.

II. Implication de la protéine d'inclusion cylindrique (CI) dans le contournement de la résistance récessive conférée par eIF4E chez la laitue vis-à-vis du LMV

Publication 1

Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against *Lettuce mosaic potyvirus*

Anas ABDUL-RAZZAK*, Thomas GUIRAUD*, Martine PEYPELUT, Jocelyne WALTER, Marie-Christine HOUVENAGHEL, Thierry CANDRESSE, Olivier LE GALL and Sylvie GERMAN-RETANA.

Interactions Plante-Virus, UMR GDPP 1090, INRA Université de Bordeaux 2, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon, France

*Both of these authors contributed equally to this project.

Molecular Plant Pathology (2009) **10** (1),109–113

Résumé en français

La capacité du virus de la mosaïque de la laitue à contourner la résistance de laitue conférée par les allèles mol^1 et mol^2 du gène codant pour le facteur d'initiation de la traduction 4E (eIF4E) a été analysée en suivant une stratégie de génétique inverse. Des mutations dans la protéine liée à l'ARN viral (VPg) permettent uniquement le contournement de l'allèle mol^1 , alors des mutations dans la partie C-terminale de la protéine d'inclusion cylindrique (CI) permettent de contourner les deux allèles de résistance. Le mutant ponctuel dans la CI (LMV-0-S621T) obtenu par mutagenèse dirigée est capable de contourner la résistance conférée par mol^2 et partiellement celle conférée par mol^1 tandis que le mutant réciproque (LMV-E-T621S) perd sa capacité à contourner les deux allèles de résistance. La région CI-C-ter semble donc directement impliquée dans le contournement de la résistance contrôlée par eIF4E chez la laitue

Il s'agit donc du premier exemple d'un gène de CI de potyvirus agissant comme un déterminant de contournement de la résistance récessive contrôlée par eIF4E.

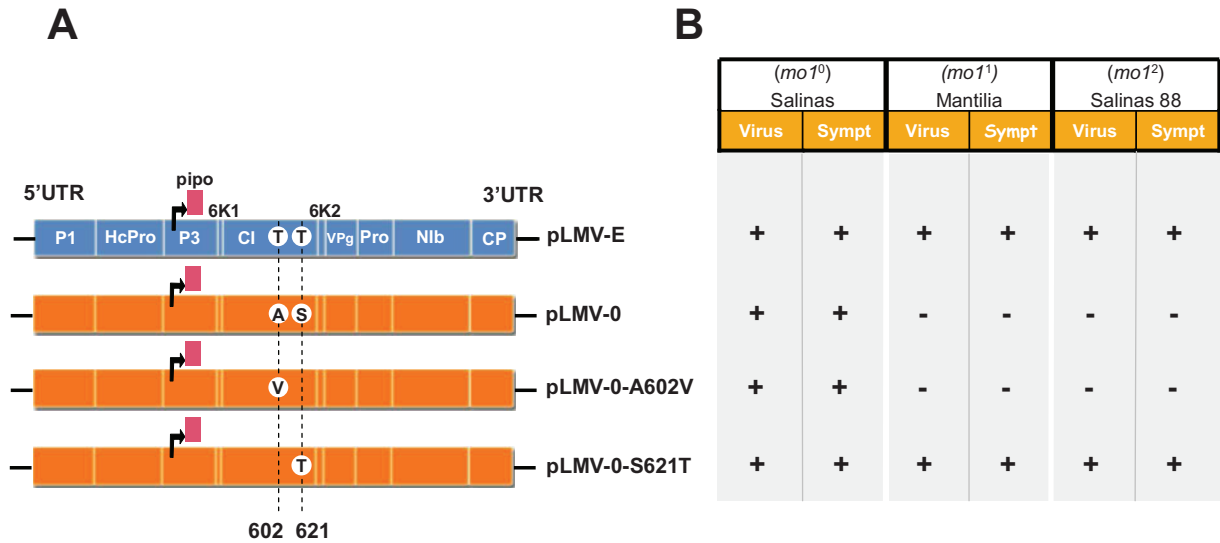


Figure 30. A. Représentation schématique du génome des virus mutants dérivés du LMV-0. LMV-0-A602V : alanine en position 602 est mutée en valine ; LMV-0-S621T : sérine en position 621 est mutée en Thréonine.

B. Caractéristiques biologiques des virus mutants. La présence ou l'absence d'accumulation virale et de symptômes sur la variété sensible Salinas (*mo1⁰*) ainsi que sur les variétés résistantes Mantilia (*mo1¹*) et Salinas 88 (*mo1²*) est symbolisée respectivement par un (+) ou un (-). Virus = accumulation virale, Sympt = Symptômes.

Short communication

Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against *Lettuce mosaic potyvirus*

ANAS ABDUL-RAZZAK†, THOMAS GUIRAUD†, MARTINE PEYPELUT, JOCELYNE WALTER, MARIE-CHRISTINE HOUVENAGHEL, THIERRY CANDRESSE, OLIVIER LE GALL AND SYLVIE GERMAN-RETANA*

Interactions Plante-Virus, UMR GDPP 1090, INRA Université de Bordeaux 2, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon, France

SUMMARY

The capacity of *Lettuce mosaic virus* to overcome the lettuce resistance conferred by the *mo1¹* and *mo1²* alleles of the gene for eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) was analysed using reverse genetics. Mutations in the virus genome-linked protein (VPg) allowed *mo1¹* only to be overcome, but mutations in the C-terminal portion of the cylindrical inclusion (CI) protein allowed both alleles to be overcome. Site-directed mutagenesis pinpointed a key role of the amino acid at position 621 in the virulence. This is the first example of the involvement of a potyviral CI protein in the breaking of an eIF4E-mediated resistance.

INTRODUCTION

Of the plant viruses infecting lettuce (*Lactuca sativa*), the potyvirus *Lettuce mosaic virus* (LMV) is one of the most destructive (Le Gall, 2003). As for the other potyviruses, the viral genome consists of a single-stranded, positive-sense RNA molecule, about 10 kb in length, with a genome-linked protein (VPg) covalently attached to its 5' end and a poly-A tail at its 3' end. The viral RNA encodes a large polyprotein, processed by three virus-encoded proteases (Revers *et al.*, 1997). The only resistance genes currently used to protect lettuce crops worldwide are the recessive allelic genes *mo1¹* and *mo1²*, corresponding to mutant alleles of the gene coding for eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) (German-Retana *et al.*, 2008a; Nicaise *et al.*, 2003).

LMV-E is a resistance-breaking isolate that induces symptoms in *mo1¹* and *mo1²* cultivars, whereas LMV-0 is unable to induce

symptoms in cultivars carrying the *mo1²* allele (tolerance) and does not systemically invade cultivars carrying the *mo1¹* allele (resistance) (German-Retana *et al.*, 2008b; Revers *et al.*, 1997). A reverse genetics analysis using full-length infectious clones of LMV-0 and LMV-E has shown that the resistance-breaking determinant(s) map to the 3' half of the LMV-E genome (Redondo *et al.*, 2001), including the region encoding VPg. So far, VPg has been identified as the single potyvirus virulence determinant for the overcoming of eIF4E-mediated recessive resistances (Ayme *et al.*, 2006; Charron *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2005; Kuhne *et al.*, 2003). In the present report, the LMV virulence region was narrowed down, and the use of site-directed mutagenesis allowed the identification of a key amino acid for the ability of LMV isolates to overcome the *mo1* eIF4E-mediated resistance of lettuce.

RESULTS

Recombinants were constructed by exchanging unique restriction fragments between infectious cDNA clones of LMV-0 (GENBANK X97704) and LMV-E (GENBANK X97705) (Redondo *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1998). Following biolistics inoculation (German-Retana *et al.*, 2000) to susceptible lettuce cultivar Trocadéro, all isolates were transferred by mechanical inoculation to other cultivars carrying the *mo1¹* or *mo1²* allele (Mantilia and Salinas 88, respectively) or to susceptible cultivars (Trocadéro and Salinas) (Redondo *et al.*, 2001). Salinas and Salinas 88 are nearly isogenic lettuce varieties differing at the *mo1* locus (Irwin *et al.*, 1999; Ryder, 1991).

Symptoms were monitored daily and leaves were harvested for the evaluation of viral accumulation 21 days post-inoculation (dpi). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of the viral progenies was performed as described previously (Krause-Sakate *et al.*, 2002), and the identity and stability of each recombinant or mutant were assessed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and/or sequence

* Correspondence. Tel.: +33 (0) 5 57 12 23 78; Fax: +33 (0) 5 57 12 23 84; E-mail: german@bordeaux.inra.fr

†Both of these authors contributed equally to this project.

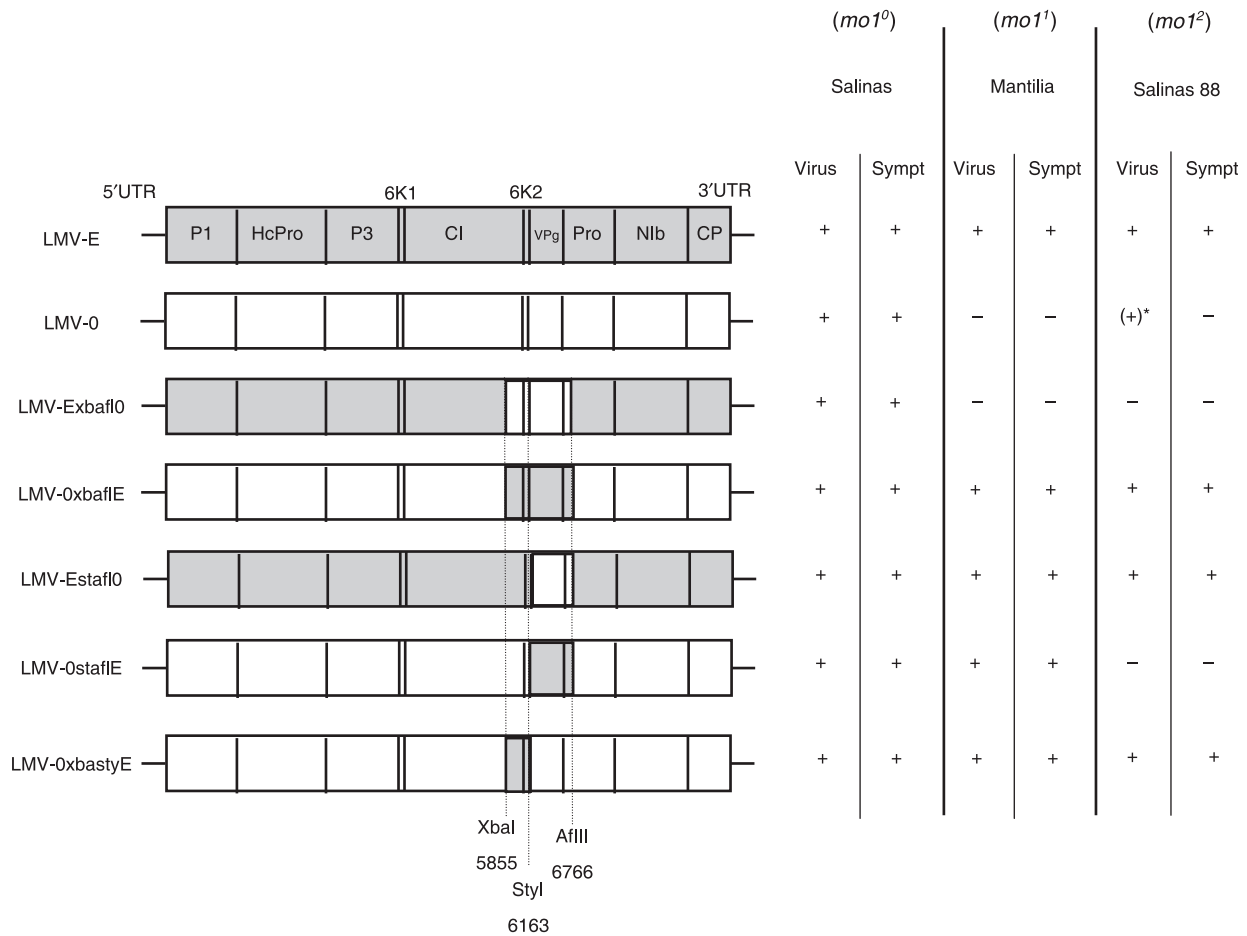


Fig. 1 Structure and biological properties of susceptible and resistant lettuce plants of the *Lettuce mosaic virus* (LMV) recombinants used in this study. Left: schematic representations of the genomes of the recombinants constructed between LMV-0 and LMV-E. Coding sequences of LMV-0 and LMV-E are represented by white and grey boxes, respectively. Restriction sites used to construct the recombinants and their position along the LMV genome are indicated. Right: behaviour of the parental LMV isolates and of the recombinants in susceptible (*mo1⁰*, cultivar Salinas) or resistant (*mo1¹*, cultivar Mantilia; *mo1²*, cultivar Salinas 88) lettuce plants. Virus, viral accumulation in systemically infected leaves; Sympt, symptoms; -, no viral accumulation or no symptoms; +, viral accumulation or symptoms. *(+) denotes sporadic detection of low-level (80% less than in susceptible plants), symptomless, systemic LMV-0 accumulation in some Salinas 88 plants.

analysis. In all cases, genetic stability of the recombinants or mutants on inoculation of the resistant hosts was observed. The relative viral concentrations were estimated by semi-quantitative double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described previously (German-Retana *et al.*, 2000, 2003, 2008a), after tenfold dilution of the plant extracts, so that the relationship between A_{405} and the antigen concentration was linear.

Figure 1 summarizes the behaviour of each recombinant with regard to viral accumulation and symptom induction at 21 dpi in three lettuce genotypes. All recombinants were infectious in susceptible cultivars Trocadéro and Salinas, and accumulated to levels comparable with those of the parental isolates (data not shown), indicating that their replication was not affected.

Recombinant LMV-OxbafIE, containing a fragment from LMV-E encoding the C-terminus of the CI protein, 6K2, VPg and a small

N-terminal portion of the NIa proteinase, accumulated and induced symptoms in both *mo1¹* and *mo1²* plants. The reciprocal recombinant (LMV-ExbafI0) failed to overcome the *mo1¹* and *mo1²* alleles (Fig. 1). Given that only two silent nucleotide changes separate the NIa proteinase coding region of the parental isolates, these results suggest that the region encoding the CI protein C-terminus, 6K2 and VPg contains the *mo1* resistance-breaking determinant(s).

To refine this analysis, a second set of recombinants was constructed by exchanging only VPg and the NIa N-terminal region (LMV-OstafIE and EstafI0). LMV-OstafIE multiplied and induced symptoms in Mantilia (*mo1¹*), showing that LMV-E VPg is sufficient in the LMV-0 background to enable the invasion of *mo1¹* lettuce. However, this was not the case in Salinas 88 (*mo1²*). Although it contains LMV-0 VPg, the LMV-EstafI0 reciprocal

Table 1 Oligonucleotides used for polymerase chain reaction (PCR)-fusion-based mutagenesis experiments.

Mutant	Name	Position*	Polarity	Sequence†	
LMV-E-T621S	A	5493	Sense	5'-GCGCTCGAGAGTACAACCTTAGGAGCC-3'	LMV-E
	B	5927	Antisense	5'-CTCCATGTCGAAGG A ACCCCATCACT-3'	
	C	5927	Sense	5'-AGTGATGGGG T TCCTTCGACATGGAG-3'	
	D	6014	Antisense	5'-TTTGAGACCGAGTCGTTTCTAAGAGCTCC-3'	
LMV-0-S621T	A	5444	Sense	5'-AAACTAAGCACGCTGGCAATAC-3'	LMV-0
	B	5927	Antisense	5'-GAAG G TACCCCGTCACC-3' (KpnI)	
	C	5930	Sense	5'-GACGGG G TACCTTCGACAT-3' (KpnI)	
	D	6146	Antisense	5'-TTGGTGCGAAGTGCATCAGC-3'	
LMV-0-A602V	A	5444	Sense	5'-AAACTAAGCACGCTGGCAATAC-3'	LMV-0
	B	5869	Antisense	5'-CTGACT A CTGCAGTTTTTGC-3' (PstI)	
	C	5871	Sense	5'-AAAA C TGCAGGTAGTCAGAGACAC-5' (PstI)	
	D	6146	Antisense	5'-TTGGTGCGAAGTGCATCAGC-3'	

*The position of the first nucleotide of the primer is indicated.

†The mutated bases are indicated in bold in the nucleotide sequence of the primers. In some cases, oligonucleotides were designed to introduce recognition sites for restriction endonucleases used for screening purposes (recognition sites in italic, restriction endonucleases indicated in parentheses).

recombinant induced symptoms and accumulated in both resistant lettuce cultivars (Fig. 1), indicating that LMV-E VPg is not necessary in the LMV-E background to overcome *mo1* resistance. Together, these results show that LMV-E VPg is sufficient to enable LMV multiplication in *mo1*¹ plants, but does not confer *mo1*²-breaking properties, suggesting that another resistance-breaking determinant must be present in the CI protein C-terminus plus 6K2 region.

This hypothesis was evaluated using recombinant LMV-0xbastyE, which contains the corresponding LMV-E region in the LMV-0 background. LMV-0xbastyE invaded *mo1*¹ and *mo1*² plants, confirming that a virulence determinant conferring *mo1*¹- and *mo1*²-breaking ability is present in the C-terminal region of the CI protein or 6K2. Despite extensive efforts, it has unfortunately not been possible to obtain the reciprocal recombinant (LMV-Exbasty0) to further strengthen these results.

Sequence comparisons of the CI protein C-terminus and 6K2 region from a collection of 16 LMV isolates representative of the biological and molecular diversity of LMV (seven isolates unable to multiply on *mo1*¹- or *mo1*²-carrying cultivars and nine *mo1*-breaking isolates) showed that, of the five amino acids differing between LMV-0 and LMV-E in the part of the CI protein under study, only two (positions 602 and 621) differed between LMV-0 and all *mo1*-breaking isolates. These two positions were therefore selected for PCR-based site-directed mutagenesis to generate point mutants derived from LMV-0 and LMV-E: LMV-0-A602V, in which alanine 602 (codon GCA) is substituted by a valine (GTA); LMV-0-S621T, in which serine 621 (TCC) is substituted by a threonine (ACC); and the reciprocal mutant LMV-E-T621S, in which threonine 621 (ACC) is substituted by a serine (TCC). For each mutagenesis experiment, two fragments were amplified with primers A and B, and C and D, respectively (Table 1) (primers B and C include the mutated nucleotide indicated in bold). The

fusion-PCR step was further performed with primers A and D, by mixing the previous amplified fragments.

LMV-0-A602V, in which alanine 602 is substituted with valine as in *mo1*-breaking isolates, accumulated and induced symptoms on the susceptible cultivar Salinas, but did not induce symptoms or accumulate in *mo1*¹ or *mo1*² cultivars (data not shown). The substitution at position 602 was therefore not sufficient to confer virulence.

LMV-0-S621T, in which serine 621 is substituted with threonine as in LMV-E, induced symptoms similar to those caused by the wild-type LMV-0 on susceptible Salinas, and accumulated to a similar level (Fig. 2). However, unlike its parent LMV-0, this mutant induced symptoms in both *mo1*¹ and *mo1*² cultivars (Mantilia and Salinas 88, respectively), and accumulated in both cultivars at 21 dpi. Variability in the virus accumulation levels was observed within and between our biological experiments. However, all *mo1* plants inoculated with LMV-0-S621T became infected and displayed symptoms (gain of virulence), contrary to the parental LMV-0 (Fig. 2). Nevertheless, the LMV-0-S621T efficiency of infection in Mantilia did not reach that of LMV-E, LMV-0xbastyE or LMV-0xbafE (symptoms less severe on Mantilia). The reciprocal mutant in the LMV-E background, LMV-E-T621S, accumulated and induced symptoms in the susceptible cultivar Salinas, but not in the *mo1*¹ and *mo1*² cultivars (Fig. 2). The stability of both point mutants was verified by sequencing following their propagation in the various hosts. No additional compensatory mutations were observed in the CI protein/6K2 and VPg coding regions (data not shown). The substitution of serine by threonine at position 621 is therefore sufficient to confer to LMV-0 the ability to overcome the resistance afforded by the two *mo1* alleles, whereas the reciprocal substitution results in a loss of virulence of LMV-E, suggesting that amino acid 621 of the CI protein plays a critical role in LMV virulence in lettuce plants carrying mutations in eIF4E.

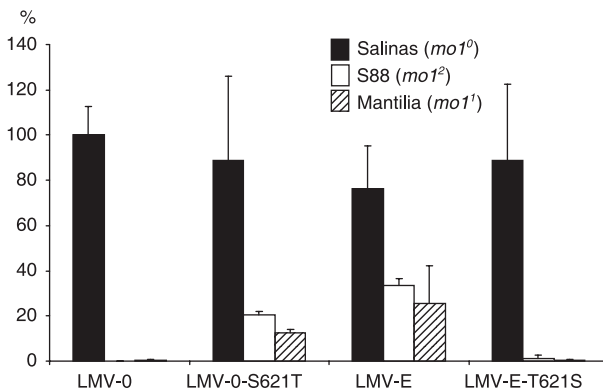


Fig. 2 Effects of mutations of amino acid 621 on the accumulation of the various viruses in susceptible and resistant lettuce. Plants from the varieties Salinas (*mo1*⁰, susceptible), Salinas 88 (*mo1*²) and Mantilia (*mo1*¹) were assayed. The accumulation of each virus was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and expressed as a percentage of the average value measured for LMV-0 on the susceptible lettuce cultivar Salinas. The samples (at least three plants for each virus) were collected from non-inoculated leaves (level 3 from the top of the plant) at 21 days post-inoculation (dpi) in at least four independent experiments. Average values are shown, together with standard deviations.

Overall, the results presented here show that the introduction of VPg from a virulent isolate into an avirulent one is sufficient to restore a full compatibility with lettuce varieties carrying the *mo1*¹ allele, but not the *mo1*² allele. Simultaneously, the region coding for the C-terminal portion of the CI protein and 6K2 allows both *eIF4E* alleles to be overcome. Site-directed mutagenesis of the CI protein at position 621 was sufficient to affect, in a reciprocal manner, the infection phenotype of the parental viruses, in plants carrying both resistance alleles, further demonstrating that the C-terminus of the CI protein is directly involved in the breaking of *eIF4E*-mediated resistance in lettuce.

DISCUSSION

The interactions involved in the lettuce–LMV pathosystem appear to be more complex than those reported in other plant–potyvirus pathosystems, where VPg has been shown to be solely responsible for overcoming *eIF4E*-mediated resistances (Ayme *et al.*, 2006; Bruun-Rasmussen *et al.*, 2007; Charron *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2005), although the avirulence determinant corresponding to the *sbm2* resistance gene in pea, shown to be tightly linked to the *eIF(iso)4E* gene, is the viral P3 of *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) (Gao *et al.*, 2004; Hjulsgaer *et al.*, 2006).

It is possible that the LMV infection process in lettuce differs in essence from other host–potyvirus interactions, but the most parsimonious hypothesis is that the genetic diversity in LMV happens to reveal a CI protein role that has remained unnoticed so far in other pathosystems.

The potyvirus CI protein has RNA-binding domains (Fernandez *et al.*, 1995) and carries RNA helicase and ATPase activities in its N-terminal two-thirds, both essential for viral replication (Fernandez *et al.*, 1997; Gomez de Cedron *et al.*, 2006).

So far, no function has been assigned to the C-terminal region of the CI protein, although it is a prominent feature of the potyviral CI protein, extending beyond the conserved domains. The identified activities located in the N-terminal half of the protein (ATPase, RNA binding and RNA helicase) are not affected *in vitro* by removal of the last 103 amino acids of the CI protein (Fernandez *et al.*, 1995). However, extensive mutagenesis experiments performed on *Tobacco etch virus* (TEV) and *Potato virus A* (PVA) identified mutations in the C-terminal region able to abolish viral replication or systemic movement (Carrington *et al.*, 1998; Kekarainen *et al.*, 2002), suggesting that the CI protein C-terminal region plays an important role(s) during viral infection. Furthermore, Choi *et al.* (2000) showed that the C-terminus of the CI protein, helper component proteinase (HcPro), P1 and P3 of *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), a Tritimovirus (family *Potyviridae*), interact with one another in yeast cells and *in vitro*. Recently, interactions between VPg and HcPro of LMV and between LMV VPg and lettuce *eIF4E* have been demonstrated *in vitro* (Roudet-Tavert *et al.*, 2007). The C-terminus of the CI protein could therefore be involved in a network of viral and cellular protein interactions, involving VPg, the CI protein, *eIF4E* and, possibly, HcPro and the translation initiation factor *eIF4G*, shown to be required for LMV infection in *Arabidopsis thaliana* (Nicaise *et al.*, 2007). Furthermore, as P3 is involved in the overcoming of *sbm-2* resistance (Hjulsgaer *et al.*, 2006), the possibility exists that P3 could also participate in the proposed interaction of the CI protein and VPg with host translation initiation factors. Furthermore, as it has been shown that partially processed viral products of potyvirus can be accumulated in infected plants (Merits *et al.*, 2002), including P3, the CI protein and VPg, it cannot be excluded that partially processed products could be the viral factor interacting with *eIF4E*. Mutations in *eIF4E* in resistant plants could destabilize this interaction network, resulting in resistance, whereas mutations in the CI protein could stabilize it, even in the presence of the mutated *eIF4E*, resulting in resistance breakdown. Further structural and biochemical studies should shed light on the role of the CI protein C-terminal domain in the success of virus infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by EPR Aquitaine (ref. 20000307004) and by the French National Agency for Research (Poty4E, ref. ANR-05-BLAN-0302-01). AAR was supported by a fellowship from the Syrian Ministry of Higher Education, and TG by a joint fellowship between the Aquitaine region and the 'Plant Health and the Environment' division of Institut National de la Recherche Agronomique.

We thank Thierry Mauduit and Marylin Roncoroni for taking care of the plants, and all members of the Interactions Plantes Virus group for useful discussions.

REFERENCES

- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A. and Moury, B. (2006) Different mutations in the genome-linked protein VPg of potato virus Y confer virulence on the pvr2(3) resistance in pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 557–563.
- Bruun-Rasmussen, M., Moller, I.S., Tulinius, G., Hansen, J.K., Lund, O.S. and Johansen, I.E. (2007) The same allele of translation initiation factor 4E mediates resistance against two Potyvirus spp. in *Pisum sativum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 1075–1082.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E. and Schaad, M.C. (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J.* **14**, 393–400.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J.L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A. and Caranta, C. (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J.* **54**, 56–68.
- Choi, I.R., Stenger, D.C. and French, R. (2000) Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritrovirus. *Virology*, **267**, 185–198.
- Fernandez, A., Lain, S. and Garcia, J.A. (1995) RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1327–1332.
- Fernandez, A., Guo, H.S., Saenz, P., Simon-Buela, L., Gomez de Cedron, M. and Garcia, J.A. (1997) The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4474–4480.
- Gao, Z., Evers, S., Thomas, C., Ellis, N. and Maule, A. (2004) Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to Pea seed-borne mosaic virus. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 488–494.
- German-Retana, S., Candresse, T., Alias, E., Delbos, R. and Le Gall, O. (2000) Effects of GFP or GUS tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance breaking LMV isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 316–324.
- German-Retana, S., Redondo, E., Tavert-Roudet, G., Le Gall, O. and Candresse, T. (2003) Introduction of a Nla proteinase cleavage site between the reporter gene and HC-Pro only partially restores the biological properties of GUS- or GFP-tagged LMV. *Virus Res.* **98**, 151–162.
- German-Retana, S., Walter, J., Doublet, B., Roudet-Tavert, G., Nicaise, V., Lecampion, C., Houvenaghel, M.C., Robaglia, C., Michon, T. and Le Gall, O. (2008a) Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *J. Virol.* **82**, 7601–7612.
- German-Retana, S., Walter, J. and Le Gall, O. (2008b) Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 127–136.
- Gomez de Cedron, M., Osaba, L., Lopez, L. and Garcia, J.A. (2006) Genetic analysis of the function of the plum pox virus CI RNA helicase in virus movement. *Virus Res.* **116**, 136–145.
- Hjulsager, C.K., Olsen, B.S., Jensen, D.M., Cordea, M.I., Krath, B.N., Johansen, I.E. and Lund, O.S. (2006) Multiple determinants in the coding region of Pea seed-borne mosaic virus P3 are involved in virulence against sbm-2 resistance. *Virology*, **355**, 52–61.
- Irwin, S.V., Kesseli, R.V., Waycott, W., Ryder, E.J., Cho, J.J. and Michelmore, R.W. (1999) Identification of PCR-based markers flanking the recessive LMV resistance gene mo1 in an intraspecific cross in lettuce. *Genome*, **42**, 982–986.
- Kang, B.C., Yeam, I., Frantz, J.D., Murphy, J.F. and Jahn, M.M. (2005) The pvr1 locus in Capsicum encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant J.* **42**, 392–405.
- Kekarainen, T., Savilahti, H. and Valkonen, J.P. (2002) Functional genomics on potato virus A: virus genome-wide map of sites essential for virus propagation. *Genome Res.* **12**, 584–594.
- Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., Pavan, M.A., Souche, S., Lot, H., Zerbini, F.M. and Candresse, T. (2002) Molecular characterization of Lettuce mosaic virus field isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology*, **92**, 563–572.
- Kuhne, T., Shi, N., Proeseler, G., Adams, M.J. and Kanyuka, K. (2003) The ability of a bymovirus to overcome the rym4-mediated resistance in barley correlates with a codon change in the VPg coding region on RNA1. *J. Gen. Virol.* **84**, 2853–2859.
- Le Gall, O. (2003) Lettuce mosaic virus. In: *CMI/AAB Description of Plant Viruses* (Jones, A.T., Robinson, D.J., Boonham, N. and Mumford, R., eds), p. 399. Wellesbourne: Association of Applied Biologists. URL <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=399> [accessed on 8 October 2008].
- Merits, A., Rajamaki, M.L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Makelainen, K., Valkonen, J.P. and Saarma, M. (2002) Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J. Gen. Virol.* **83**, 1211–1221.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. and LeGall, O. (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol.* **132**, 1272–1282.
- Nicaise, V., Gallois, J.L., Chafiai, F., Allen, L.M., Schurdi-Levraud, V., Browning, K.S., Candresse, T., Caranta, C., Le Gall, O. and German-Retana, S. (2007) Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **581**, 1041–1046.
- Redondo, E., Krause-Sakate, R., Yang, S.J., Lot, H., Le Gall, O. and Candresse, T. (2001) Lettuce mosaic virus (LMV) pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce varieties map to different regions of the viral genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 804–810.
- Revers, F., Yang, S.J., Walter, J., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T. and Dunez, J. (1997) Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of *Lettuce mosaic virus* differing in their biological properties. *Virus Res.* **47**, 167–177.
- Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E. and Le Gall, O. (2007) Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *J. Gen. Virol.* **88**, 1029–1033.
- Ryder, E.J. (1991) Salinas 88 lettuce. *Hortscience*, **26**, 439–440.
- Yang, S.J., Revers, F., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T. and Dunez, J. (1998) Construction of full-length cDNA clones of *Lettuce mosaic virus* (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants. *Arch. Virol.* **143**, 2443–2451.

	Trocadéro (mo1 ⁰)	Salinas (mo1 ⁰)	Mantilia (mo1 ¹)	Floribibb (mo1 ¹)	Salinas88 (mo1 ²)
LMV-0	<7	<7	-	-	-
LMV-E	<7	<7	7	9	15
LMV-0stafIE	<7	<7	12-14	-	-
LMV-0xbafIE	<7	<7	12-14	-	20
LMV-0xbastyE	<7	<7	12-14	-	14-15
LMV-EstafI0	<7	<7	12	15	12-14
LMV-ExbafI0	<7	<7	-	-	-
LMV-0-A602V	<7	<7	-	-	-
LMV-0-S621T	<7	<7	18-19	-	14-15
LMV-0-A602V/S621T	<7	<7	18-19	nt	14-15

Tableau 4. Délai d'apparition des symptômes induits par les virus parentaux LMV-0 et LMV-E, et les virus dérivés sur les différentes variétés de laitue.

Le nombre de jours après inoculation nécessaires pour voir apparaître les premiers symptômes sur les feuilles non inoculées sont indiqués en jours post inoculation (jpi).

(-) : aucun symptôme visible 30 jpi. (nt): non testé.

I. Résultats complémentaires

I.1. Le mutant LMV-0-S621T contourne partiellement la résistance moI^1 .

Bien que le mutant LMV-0-S621T soit capable de contourner les deux allèles de résistance moI^1 et moI^2 , son comportement est différent sur les variétés moI^1 et moI^2 . Sur Salinas 88 (moI^2), ce mutant induit en systémie des symptômes de mosaïque (**Figure 31**) dans 100% des plantes inoculées, et le niveau d'accumulation virale estimé par ELISA semi-quantitatif est comparable à celui observé sur la variété sensible (moI^0) dans 3 répétitions biologiques sur 3 (**Figure 32 et 33**). La substitution de la sérine en une thréonine en position 621 confère donc au LMV-0 la capacité de contourner « totalement » la résistance conférée par la forme Ls-eIF4E² chez Salinas 88.

Le fait que le mutant réciproque LMV-E-T621S ne provoque pas des symptômes et soit incapable de se multiplier sur Salinas 88 confirme que la position 621 est le déterminant moléculaire majeur impliqué dans l'incompatibilité conférée par Ls-eIF4E².

Sur Mantilia (moI^1), les symptômes induits par le LMV-0-S621T sont faibles (**Figure 31**) et détectés plus tardivement que ceux induits par le LMV-0xbastyE qui comporte la région CI-C-ter dérivée de LMV-E (**Tableau 4**). De plus, le niveau d'accumulation virale du mutant LMV-0-S621T sur Mantilia à 30 jpi est toujours plus faible que sur la variété sensible (moI^0) dans 3 expériences indépendantes sur 3 (**Figures 32 et 33**). L'ensemble de ces données montre que le mutant LMV-0-S621T contourne partiellement la résistance conférée par l'allèle moI^1 .

Même si la position 621 est impliquée dans le contournement de l'allèle moI^1 , la mutation S621T ne confère pas au LMV-0 le même niveau de virulence que pour le LMV-0xbastyE qui comporte l'intégralité de la région CI-C-ter et la portion 6K2 dérivées du LMV-E (région nt-5855-nt 6766). Au vu de l'alignement des séquences protéiques dans cette région (**Figure 29**), on ne peut pas identifier d'autre acide aminé candidat en plus des acides aminés 602 et 621 spécifique des isolats de LMV contournant moI^1 . Dans la région codant pour la 6K2, on peut dénombrer 4 acides aminés différents entre la séquence de LMV-0 et de LMV-E mais ces différences ne semblent pas à priori être corrélées strictement avec le contournement des résistances moI^1 et moI^2 .

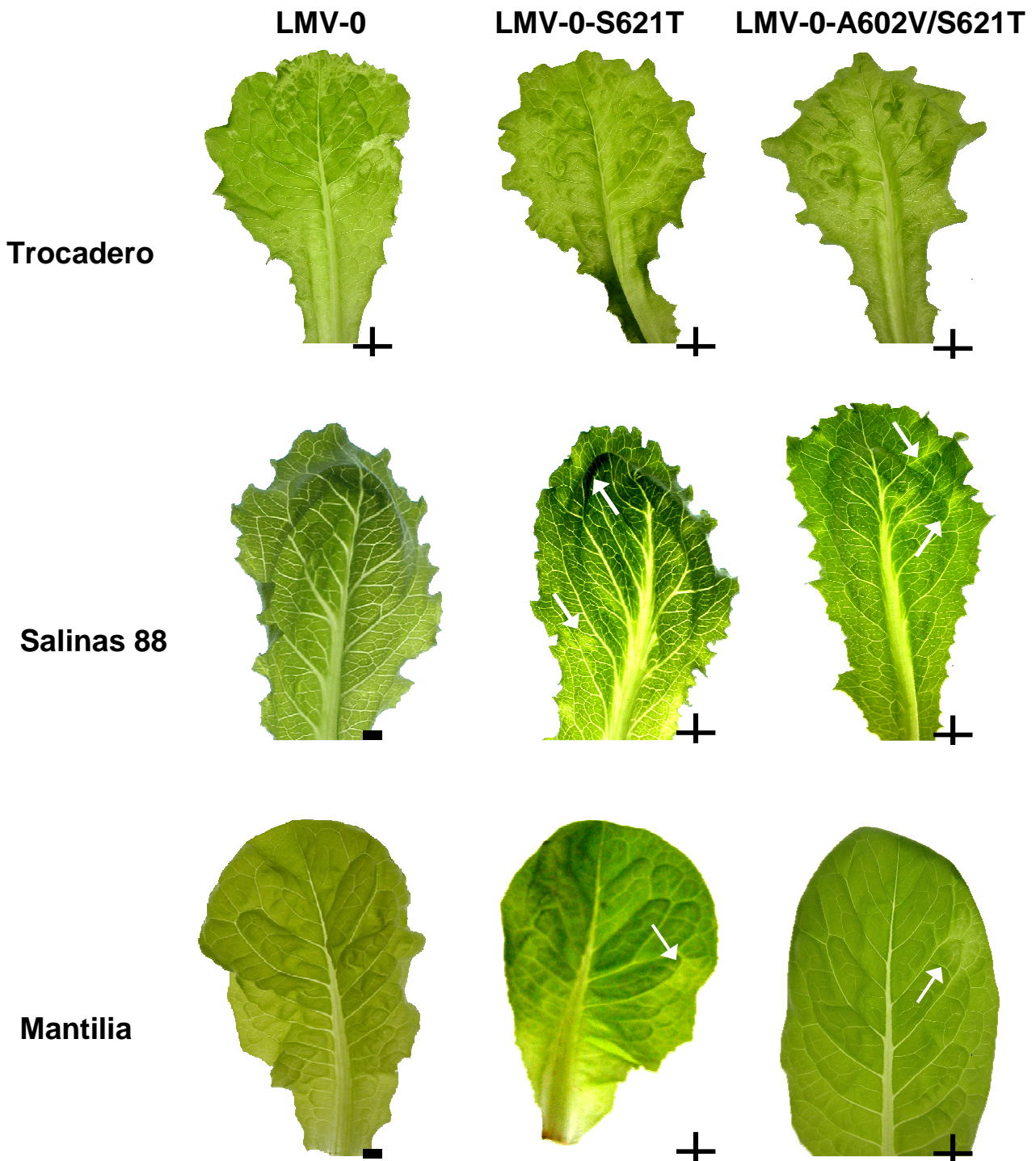


Figure 31. Symptômes induits par les virus mutants dérivés de LMV-0 sur les variétés de laitue Trocadero, Salinas 88 et Mantilia.

Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur Trocadero (variété exprimant *Ls-eIF4E⁰*), Salinas 88 (variété exprimant *Ls-eIF4E²*) et Mantilia (variété exprimant *Ls-eIF4E¹*). Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus. Les flèches blanches indiquent les symptômes quand ceux-ci ne sont pas évidents sur la photographie.

1.2. La Valine 602 et la Thréonine 621 n'ont pas un effet synergique sur le contournement de moI^1 .

Même si la substitution d'une alanine en valine à la position 602 dans la CI du LMV-0 n'a pas d'effet direct sur la virulence de LMV-0, on peut émettre l'hypothèse que cette position très conservée parmi tous les isolats contournant la résistance moI , agisse en synergie avec l'acide aminé à la position 621. Pour tester cette hypothèse, nous avons construit le double mutant LMV-0-A602V/S621T. Pour cela, nous avons réalisé une mutagenèse dirigée par PCR fusion (Matériel et Méthodes, § III.7.2) à partir du simple mutant LMV-0-S621T en substituant l'Alanine 602 par une Valine.

Les propriétés biologiques de ce double mutant ont été étudiées en parallèle de celles du simple mutant LMV-0-S621T lors de 3 expériences indépendantes.

Nos résultats montrent que ces deux mutants ont le même comportement sur les variétés résistantes moI^1 et moI^2 . Sur Salinas 88 (moI^2), le double mutant LMV-0-A602V/S621T provoque une mosaïque systémique (**Figure 31**) et s'accumule à un niveau comparable sur Salinas 88 et sur la variété sensible (moI^0) (**Figure 33**).

Sur Mantilia (moI^1), le double mutant provoque le même type de symptômes que le simple mutant et avec le même délai d'apparition des symptômes (**Figure 31 et Tableau 4**). De plus le double mutant s'accumule au même niveau que le simple mutant sur la variété moI^1 (**Figure 33**). Ainsi, la substitution de l'Alanine 602 en une Valine ne semble pas avoir un effet additif sur la capacité du simple mutant LMV-0-S621T à contourner l'allèle moI^1 .

1.3. La variété Floribibb porteuse de l'allèle moI^1 comporte des facteurs modulant le phénotype de l'infection .

Lors de l'analyse du comportement des virus recombinants LMV-0xbafIE, LMV-0stafIE et LMV-0xbastyE ainsi que du mutant ponctuel LMV-0-S621T, qui tous trois contournent la résistance moI^1 chez Mantilia, nous avons noté une différence au niveau des symptômes induits et de l'accumulation virale, entre les deux variétés de laitue résistantes porteuses du même allèle moI^1 , Floribibb et Mantilia.

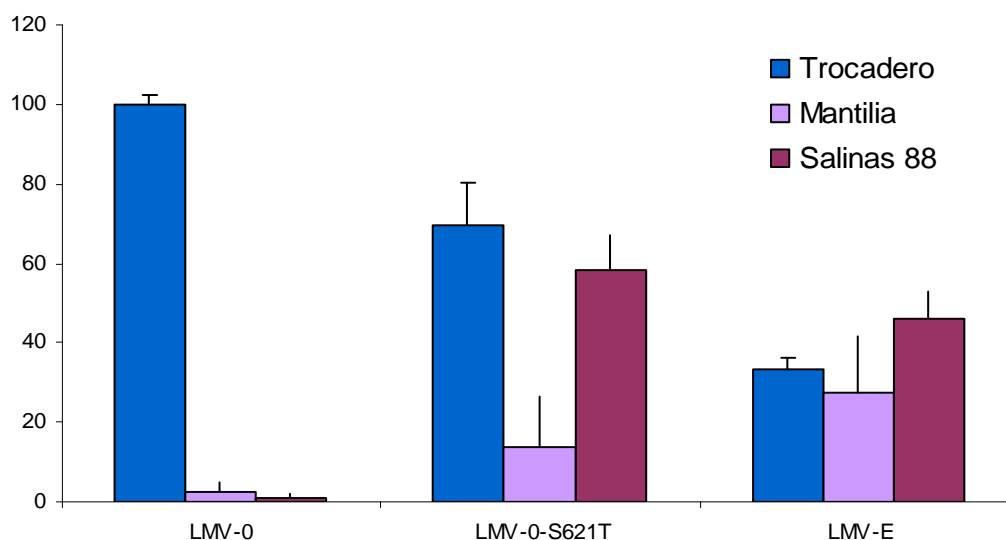


Figure 32. Estimation par ELISA semi quantitatif de l'accumulation du virus mutant LMV-0-S621T à 30 jpi.

Accumulation virale à 30 jpi dans les feuilles non inoculées , des virus parentaux LMV-0 et LMV-E et du virus mutant LMV-0-S621T sur les variétés Trocadero (*Ls-eIF4E⁰*), Mantilia (*Ls-eIF4E¹*) et Salinas 88 (*Ls-eIF4E²*). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur moyenne mesurée pour LMV-0 sur Salinas. Chaque valeur représente la moyenne obtenue pour 2 mesures par plante et 3 plantes par construction soit 6 mesures au total. Il s'agit d'une expérience parmi 3 expériences indépendantes réalisées.

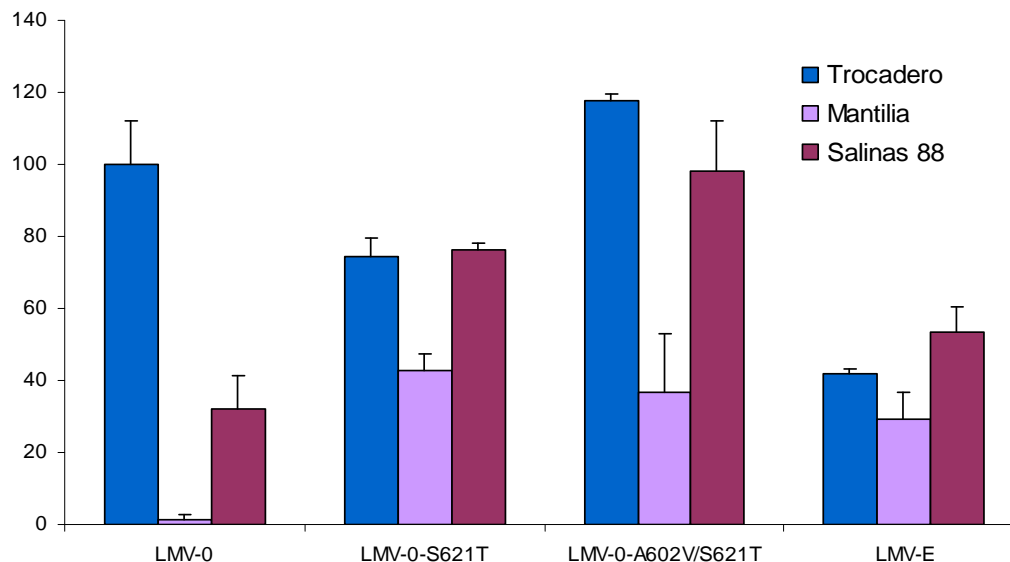


Figure 33. Estimation par ELISA semi quantitatif de l'accumulation du simple et double mutant dérivés de LMV-0 à 30 jpi.

Accumulation virale à 30 jpi dans les feuilles non inoculées , des virus parentaux LMV-0 et LMV-E et des virus mutants LMV-0-S621T et LMV-0-A602V/S621T sur les variétés Trocadero (*Ls-eIF4E⁰*), Mantilia (*Ls-eIF4E¹*) et Salinas 88 (*Ls-eIF4E²*). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur moyenne mesurée pour LMV-0 sur Salinas. Chaque valeur représente la moyenne obtenue pour 2 mesures par plante et 3 plantes par construction soit 6 mesures au total. Il s'agit d'une expérience parmi 3 expériences indépendantes réalisées.

Si les quatre virus cités sont capables d'induire des symptômes en systémie sur Mantilia entre 12 et 18 jpi, aucun d'entre eux n'est capable d'en produire sur la variété Floribibb contrairement au LMV-E (**Figure 34**). De même, les virus LMV-0xbastyE et LMV-0stafIE s'accumulent moins bien sur Floribibb que sur Mantilia à 30 dpi (**Figure 35A**) Un test de Student montre que les valeurs d'accumulation pour ces deux virus sur Mantilia et Floribibb sont très significativement différentes ($p > 0,01$). Ce différentiel d'accumulation de ces recombinants entre la variété Mantilia et Floribibb a été retrouvé lors de 3 répétitions biologiques indépendantes de cette expérience. Cette observation suggère que la variété Floribibb possède un ou des facteurs capables de moduler la résistance récessive conférée par *mol¹*.

Afin de vérifier s'il s'agit d'une spécificité de la variété Floribibb, nous avons étudié le comportement des quatre virus LMV-0xbafIE, LMV-0stafIE, LMV-0xbastyE et LMV-0S621T, sur dix variétés de laitue porteuses de l'allèle de résistance *mol¹* listées dans le **Tableau 5**.

Toutes ces variétés ont développé des symptômes en systémie lors de l'infection par les recombinants LMV-0xbafIE et LMV-0stafIE. Lors de l'infection par le LMV-0xbastyE, toutes les variétés ont développé des symptômes à l'exception des variétés Alizé et Locness (**Tableau 5 et annexe 2 figures 67, 68, 69**). En revanche, le mutant LMV-0S621T n'a été capable d'induire des symptômes que sur trois des dix variétés testées : Alizé, Remco et Krizet (**Tableau 5 et annexe 2 figure 70**). Il faut noter que nous n'avons pas reproduit cette expérience et que l'accumulation virale de chacun des virus sur les variétés *mol¹* n'a pas été quantifiée.

Cependant, l'ensemble de ces résultats suggère que la variété Floribibb, ainsi que les variétés Alizé et Locness possèdent probablement un ou plusieurs facteurs pouvant moduler la résistance récessive *mol¹*. Une approche de génétique classique faisant intervenir un croisement entre ces différentes variétés et Mantilia par exemple, permettrait d'identifier ces facteurs.

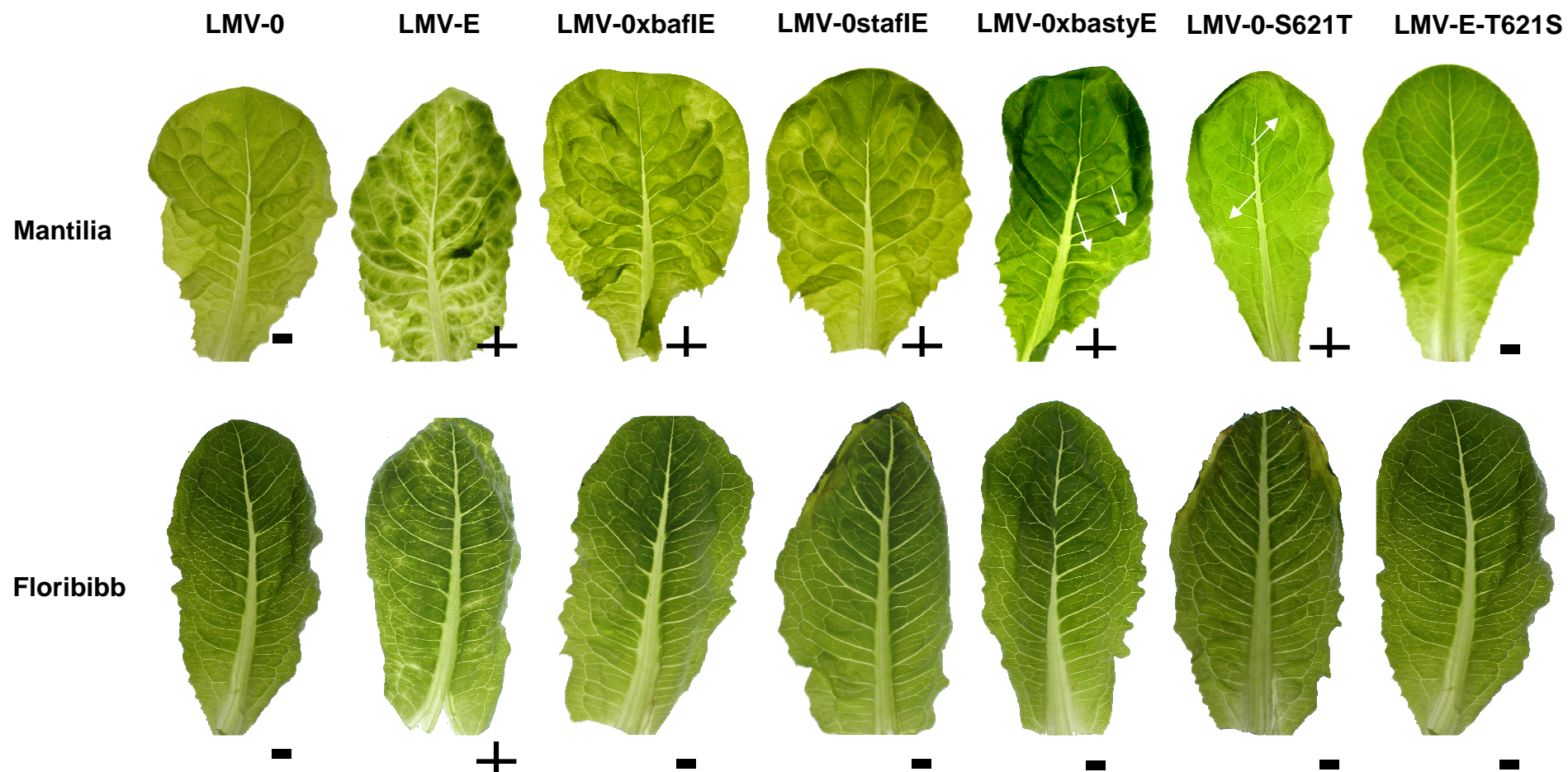


Figure 34. Symptômes induits par les virus recombinants dérivés des parents LMV-0 et LMV-E sur les variétés résistantes Mantilia et Floribibb (*mo1^l*).

Symptômes observés en systémie à 20 jpi. Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus. Les flèches blanches indiquent les symptômes du LMV quand ils ne sont pas évidents sur la photographie.

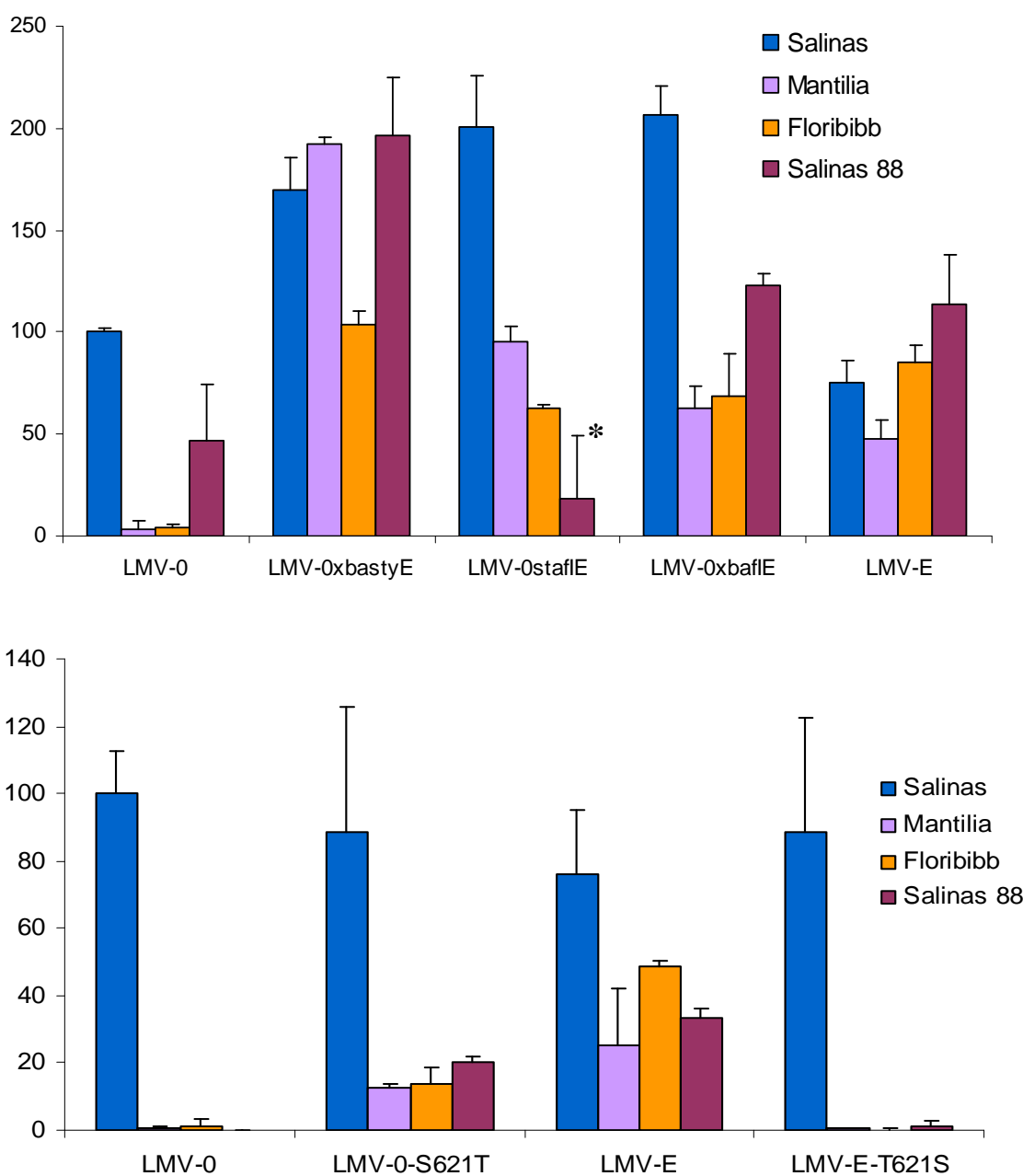


Figure 35. Estimation par ELISA semi quantitatif de l'accumulation des virus recombinants dérivés de LMV-0 et LMV-E à 30 jpi dans les quatre variétés de laitues sensibles et résistantes.

Accumulation virale à 30 jpi, des virus parentaux LMV-0 et LMV-E et des virus recombinants LMV-0xbafIE, LMV-0staffE, LMV-0xbastyE (A) ou des virus mutants LMV-0-S621T et LMV-E-T621S (B) sur les variétés Salinas (*Ls-eIF4E⁰*), Mantilia et Floribibb (*Ls-eIF4E¹*) et Salinas 88 (*Ls-eIF4E²*). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur moyenne mesurée pour LMV-0 sur Salinas. Chaque valeur représente la moyenne obtenue pour 2 mesures par plante et 3 plantes par construction soit 6 mesures au total. Il s'agit d'une expérience parmi 3 expériences indépendantes réalisées. (*) Il s'agissait d'une seule plante sur trois, En plus ce comportement n'a pas été reproduit dans les 2 autres expériences dans lesquelles ce virus ne s'accumule pas sur Salinas 88.

	LMV-0	LMV-E	LMV-0xbafIE	LMV-0stafIE	LMV-0xbastyE	LMV-0-S621T	LMV-E-T621S
Mantilia	-	+	+	+	+	+	+
Floribibb	-	+	-	-	-	-	-
Alizé	-	+	+	+	-	+	-
Locness	-	+	+	+	-	-	-
Mirian	-	+	+	+	+	-	-
Novir	-	+	+	+	+	-	-
Prestine	-	+	+	+	+	-	-
Remco	-	+	+	+	+	+	-
Krizet	-	+	+	+	+	+	-
Gallega	-	+	+	+	+	-	-
Dorémi	-	+	+	+	+	-	-
Rossia	-	+	+	+	+	-	-

Tableau 5. Comportement des virus dérivés de LMV-0 et LMV-E sur 10 variétés de laitues porteuses de l'allèle de résistance *mol¹*, ainsi que sur Floribibb et Mantilia .

Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur les feuilles non inoculées. Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus.

Chapitre 2

*Vers l'identification d'autres acides aminés dans
la région CI-C-ter du LMV impliqués dans le
contournement de la résistance conférée par
eIF4E*

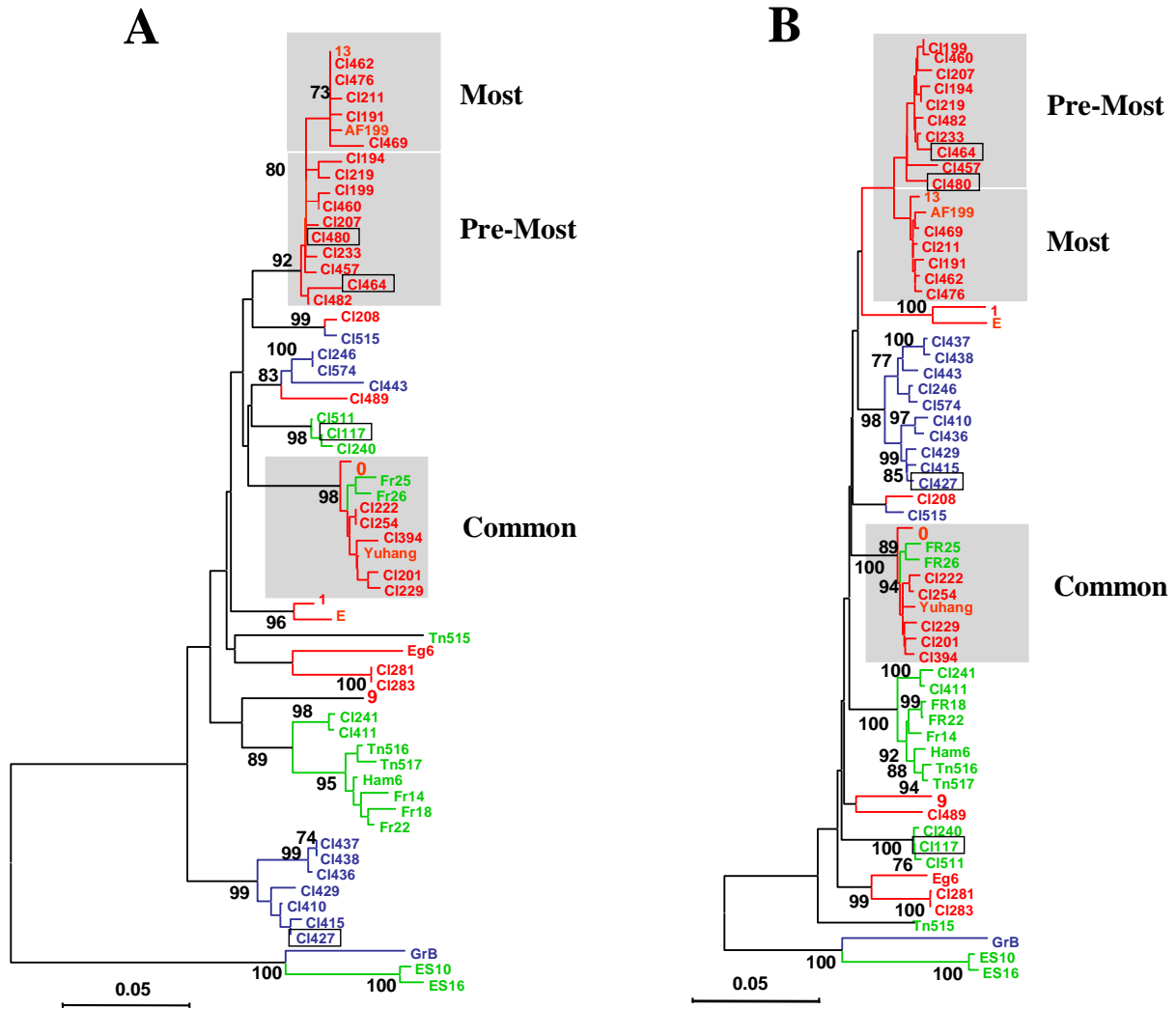


Figure 36. Comparaison des analyses phylogénétiques des isolats de LMV basées sur la séquence codant pour la jonction Nib-CP (A), et la région CI-C-ter-6K2-VPg (B). Les 60 isolats de LMV utilisés dans l'analyse sont colorés selon leur hôte d'origine : en rouge, laitue cultivée (*Lactuca sativa*), en bleu foncé, laitues non cultivées (espèces sauvages de *Lactuca* ou autres adventices) et en vert clair, plantes ornementales (*osteospermum*). Les rectangles gris représentent les différents groupes d'isolats de LMV. En complément des groupes d'isolats précédemment identifiés (figure 24 de l'introduction), le groupe « Pré-most » rassemble les isolats de LMV capables de contourner à la fois les allèles de résistance moI^1 et moI^2 mais qui ne sont pas transmis par la graine. L'échelle correspond à 0,05 substitution par site (L. Svanella et col.).

La région Nib-CP (216 pb) comprend l'extrémité N-terminale hypervariable de la capsid et la région CI-C-ter-6K2-VPg (1141 pb) est impliquée dans le contournement de la résistance moI .

Quatre des cinq isolats chiliens dont les propriétés biologiques sont étudiées ont été utilisés dans cet analyse phylogénétique (isolats encadrés), l'isolat CI248 a été utilisé dans une autre analyse (données non présentées) (L. Svanella et col.).

I. Exploitation de la variabilité naturelle du LMV

Comme décrit dans le paragraphe (IV.3) de l'introduction, plus de 200 isolats naturels de LMV provenant d'espèces variées (laitues cultivées, sauvages et plantes ornementales notamment) et de diverses origines géographiques (Krause-Sakate *et al.*, 2002), ont été collectés. En particulier, cette collection d'isolats de LMV (considérée comme l'une des plus complètes au niveau mondial) a été enrichie lors de cette thèse, par des isolats provenant d'un des centres de diversification du LMV, le Chili. Pour certains de ces isolats, la capacité à infecter des laitues porteuses de mutations dans eIF4E a été analysée, ainsi que la séquence codant pour la portion CI-C-ter-6K2-VPg, afin d'établir une éventuelle corrélation entre variabilité naturelle et valeur adaptative.

Ces analyses phylogénétiques, menées par L. Svanella, O. Le Gall et T. Candresse, au laboratoire, portant sur 60 isolats de LMV, ont été basées sur les deux régions du génome suivantes : la jonction NIB-CP (216 pb), une région très variable du LMV et notre « standard » pour décrire la variabilité moléculaire du LMV, et la région CI-C-ter-6K2-VPg (1141 pb) impliquée dans le contournement des gènes *mo1*.

Ces travaux ont permis d'établir deux arbres phylogénétiques globalement congruents (**Figure 36**), ce qui indique une co-évolution de ces deux régions du génome. Quelques isolats font exception et représentent probablement des recombinants. Les deux dendrogrammes présentent une structuration en fonction de l'espèce hôte (laitue, ornementale,..etc) (**Figure 36**) plus importante que celle en fonction de l'origine géographique des isolats. Ces analyses ont permis de distinguer, en plus des groupes de type «Commun» et de type «Most» (cf figure 24 de l'introduction) un groupe « Pré-Most » (constitué exclusivement d'isolats chiliens provenant de laitues cultivées) proche du groupe Most dans les deux arbres phylogénétiques, un groupe constitué uniquement d'isolats chiliens provenant d'espèces sauvages de *Lactuca* ou d'autres adventices et plusieurs clusters regroupant des isolats d'une espèce ornementale, *Osteospermum*.

Cinq isolats représentatifs de ces trois groupes ont été sélectionnés et leurs propriétés biologiques étudiées, dont la capacité à infecter des laitues porteuses des allèles *mo1*¹ et *mo1*² : deux isolats du groupe « Pré-Most » (CI464 et CI480), un isolat du groupe « espèces sauvages de *Lactuca* ou adventices » (CI427 issu de *Lactuca virosa*) et deux isolats du groupe « ornementales » (CI248 et CI117) ont été propagés sur *Lactuca sativa*, puis rétro-inoculés sur les variétés de laitue résistantes.

	Salinas (<i>moI⁰</i>)		Mantilia (<i>moI¹</i>)		Floribibb (<i>moI¹</i>)		Salinas 88 (<i>moI²</i>)	
	Virus	Sympt	Virus	Sympt	Virus	Sympt	Virus	Sympt
LMV-0	+	+	-	-	-	-	-	-
CI464	+	+	+	+	+	+	+	+
CI480	+	+	+	+	+	+	+	+
CI427	+	+	-	-	-	-	-	-
CI248	+	+	-	-	-	-	-	-
CI117	+	+	-	-	-	-	-	-

Tableau 6. Caractéristiques biologiques des cinq isolats chiliens. La présence ou l'absence d'accumulation virale à 30 jpi et de symptômes sur la variété sensible Salinas (*moI⁰*) ainsi que sur les variétés résistantes Mantilia, Floribibb (*moI¹*) et Salinas 88 (*moI²*) est symbolisée respectivement par un (+) ou un (-). Virus = accumulation virale, Sympt = Symptômes.

Le comportement biologique de ces isolats sur les variétés Mantilia, Floribib (moI^1) et Salinas 88 (moI^2) a montré que seuls les deux isolats « Pré-Most » CI464 et CI480 sont capables de contourner la résistance moI : ils induisent des symptômes de mosaïque et s'accumulent dans les feuilles infectées en systémie des trois variétés testées (**Tableau 6**).

Afin de savoir si la capacité des isolats « Pré-Most » (CI464 et CI480) à contourner les allèles moI^1 et moI^2 est corrélée à la présence d'acides aminés clefs dans la région CI-C-ter, nous avons complété l'alignement des séquences protéiques de cette région présenté sur la figure 29 (chapitre 1) avec ces nouvelles données (**Figure 37**). Bien que l'alignement ne révèle pas de nouvelles positions candidates, il confirme le rôle clé de l'acide aminé à la position 621 dans le contournement de la résistance moI . En effet, les deux isolats « Pré-Most » (CI464 et CI480) capables de contourner la résistance moI présentent à la position 621 une Isoleucine, alors que les 3 autres isolats non contournant (CI427, CI248 et CI117) ont une Serine (comme pour LMV-0). Ces données sont donc en adéquation avec les analyses précédentes (Figure 29, chapitre 1), montrant que tous les isolats incapables de contourner moI^1 et moI^2 , ont une Serine à la position 621 alors que les isolats contournant ont une Isoleucine ou une Thréonine (LMV-E). Par ailleurs, Le fait que l'isolat CI117 qui est incapable de contourner la résistance ait une Valine à la position 602 semblerait confirmer que cette position n'a pas un effet direct sur le contournement de la résistance moI .

II. Approche par mutagenèse aléatoire

Bien que l'approche par génétique inverse décrite dans le chapitre 1 ait permis de découvrir le rôle clé de l'acide aminé 621 de la protéine CI du LMV dans la restauration de la compatibilité entre le LMV et les variétés de laitues exprimant un eIF4E non permissif, elle ne permet pas de mettre en évidence toutes les positions dans la région CI-C-ter du LMV potentiellement impliquées dans ce processus, car elle est limitée par les données de séquence disponibles concernant la diversité naturelle du LMV. C'est pourquoi, en parallèle de l'approche menée pour enrichir la collection des isolats naturels du LMV, nous avons entamé une approche visant à générer une diversité artificielle par mutagenèse aléatoire dans la région CI-C-ter du LMV dans le but d'identifier de nouveaux acides aminés impliqués dans le processus du contournement de moI dans cette région.

Le principe de cette stratégie est indiqué sur la **figure 38**. Il s'agit d'exploiter le manque de fidélité de la Taq ADN polymérase utilisée en PCR classique. En présence de cations

Mn²⁺, l'enzyme génère alors un grand nombre d'erreurs au cours de la réaction de PCR réalisée sur la région nucléotidique 5416-6117 codant pour la CI-Cter de LMV-0 (Fromant *et al.*, 1995, LinGoerke *et al.*, 1997). Les produits de PCR obtenus sont ensuite clonés dans un clone d'ADNc complet infectieux du LMV, délété de la région nucléotidique 5512 à 6017 de la région CI, conduisant à l'obtention d'une banque de clones de LMV-0 mutés dans la région mutée par PCR (**Figure 38**). Le criblage positif de cette banque consiste à identifier des mutants dérivés du LMV-0 présentant un gain de pathogénicité sur laitue résistante (en particulier, capables de s'accumuler et/ou d'induire des symptômes selon la variété testée). Pour cela, des mélanges de clones mutants du LMV-0 sont inoculés « en groupe » par biolistique directement sur les variétés résistantes Salinas 88 et Mantilia. Chacun des mutants appartenant à l'un des « pools » qui induisent des symptômes ou une accumulation accrue sont ensuite inoculés séparément, puis séquencés.

II.1. Mise au point des conditions de mutagenèse aléatoire par PCR

Le but est de déterminer les conditions de PCR mutagène afin d'obtenir un taux moyen de mutagenèse d'environ une mutation non-synonyme par fragment de 701 pb. Ce taux de mutagenèse est optimal car il permet de cribler autant de positions que de mutants à cribler. Un taux de mutation plus élevé (plusieurs mutation dans le fragment) entraîne de cibler plus de positions pour un plus petit nombre de mutants à cribler au risque d'entraîner plus de mutations délétères pour le LMV ou plus de réversions d'une mutation intéressante.

La mise au point des conditions de mutagenèse aléatoire a été faite en réalisant deux réactions PCR avec deux concentrations finales de MnCl₂ (0,1 mM et 0,5 mM). Les amplicons ainsi obtenus ont été ensuite clonés dans le plasmide pJET1/blunt (matériel et méthodes, § II.1.2). Après séquençage de 10 clones pour chacune des deux conditions de PCR, les taux moyens de mutagenèse ont été calculés. Le taux moyen de mutagenèse obtenu est d'environ 0,5 mutation non-synonyme par fragment avec la concentration 0,1 mM de MnCl₂ et d'environ 1 mutation non-synonyme par fragment avec la concentration 0,5 mM.

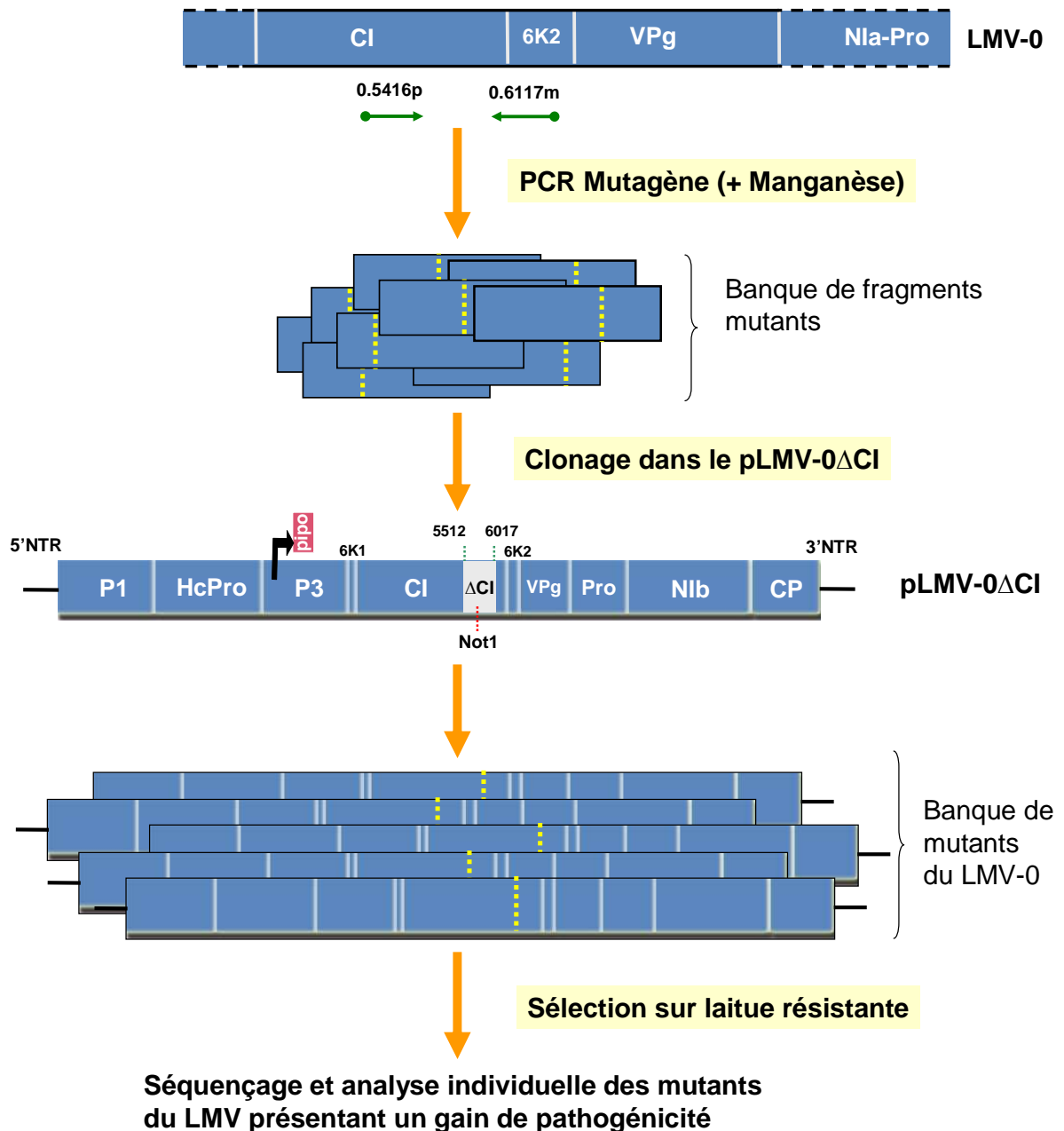


Figure 38. Stratégie de mutagenèse aléatoire par PCR sur la région CI-C-ter et 6K2 du LMV-0 .

Les deux flèches vertes horizontales représentent les amorces utilisées pour la PCR mutagène, ainsi que leur position sur le génome. Les noms des amorces sont indiqués au dessus des flèches.

Les pointillés jaunes représentent les mutations générées par l'infidélité de la Taq DNA polymérase.

II.2. Obtention du clone LMV-0ΔCI : un outil moléculaire crucial pour le clonage de la banque de fragments PCR mutés.

Pour faciliter le clonage de la banque de fragments PCR mutés dans le clone complet dérivé du LMV-0, nous avons suivi une stratégie du mutagenèse par PCR-Fusion consistant à déléter 505 nucléotides de la région CI-C-ter, et y introduire un site de restriction unique NotI (**Figure 39**). Le clonage de la banque de fragments mutés dans le clone LMV-0ΔCI a été fait par recombinaison homologue chez la levure (matériel et méthodes, § II.3.1) (**Figure 40**). Cette stratégie de clonage, plus efficace que celle dite « classique » par digestion-ligation, nécessite la modification du clone d'ADNc complet LMV-0ΔCI en un « vecteur navette » (*E. coli*-levure) par insertion d'une séquence contenant l'origine de répllication chez la levure (2μ) et le marqueur autotrophie pour le tryptophane (*Trp1*) (**Figure 40**). La séquence a été amplifiée à partir d'un clone de PVY (fourni par B. moury INRA Avignon) par PCR en utilisant un couple d'amporces permettant d'insérer le site de restriction DraIII à chaque extrémité de l'amplicon. L'amplicon ainsi obtenu a été cloné dans le plasmide pLMV-0 à l'aide du site de restriction unique DraIII présent dans le vecteur pBS70T (**Figure 41**).

Disposant de cet outil, une banque d'environ 5000 colonies de levure a été obtenue en suivant la stratégie présentée sur la figure 40. L'ADN plasmidique extrait en masse depuis les levures transformées a servi à la transformation d'*E. coli*. A ce jour, Nous avons utilisé seulement 5μl des 40 μL de cette préparation d'ADN plasmidique pour transformer d'*E. coli*. Environ 1600 clones indépendants ont ainsi été obtenus.

II.3. Validation de la méthode de criblage de la banque de mutants dérivés de LMV-0

Afin de disposer d'un test de criblage phénotypique de la banque de mutants (dont certains ont acquis la capacité de contourner *moI*), des essais d'inoculation en mélange de clones d'ADNc infectieux dérivés de LMV-0 qui sont capables de contourner *moI*, en présence d'un clone d'ADNc infectieux de LMV-0, ont été réalisés. Il s'agissait de déterminer le rapport molaire optimal « clone contournant/clone LMV-0 non contournant » qui conduit à l'apparition de symptômes sur les variétés résistantes Mantilia (*moI*¹) et Salinas 88 (*moI*²) dans le cas d'une co-inoculation.

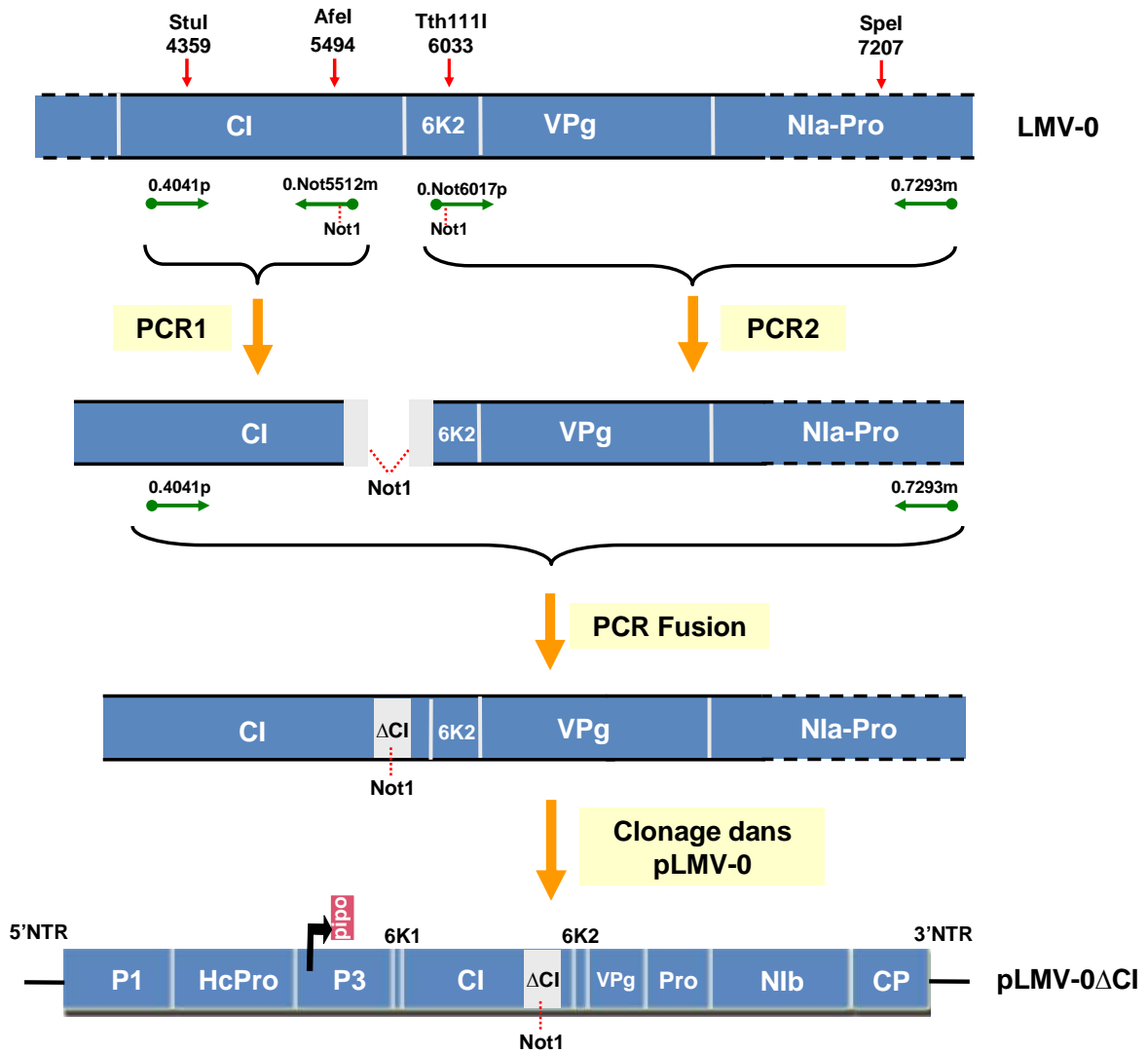


Figure 39. Stratégie de construction par PCR-Fusion d'un clone de LMV-0 délété au niveau de la région CI-C-ter (LMV-0 Δ CI).

Les flèches vertes représentent les amorces utilisées pour les trois étapes de la PCR-Fusion, ainsi que leur position sur le génome. Les noms des amorces sont indiqués au dessus des flèches. La portion grise (Δ CI) représente une séquence non virale contenant le site unique de digestion introduit permettant de linéariser le plasmide. La portion délétée représente 505 pb.

Les clones d'ADNc de LMV-0xbastyE et LMV-0xbafIE qui induisent des symptômes sur les variétés résistantes de laitue, ont été mélangés individuellement avec le clone d'ADNc du LMV-0 (non-contournant), selon quatre rapports molaires : clone contournant/ LMV-0 de 1/5, 1/10, 1/15 et 1/20. Les différents mélanges ont été inoculés par biolistique sur les variétés de laitue sensible, Mantilia et Salinas 88.

Dans les trois expériences indépendantes réalisées, des symptômes sont apparus sur les variétés résistantes uniquement en présence des rapports 1/5 et 1/10 (**Tableau 7**). Ceci montre que le nombre maximum de mutants inoculables en mélange par la méthode de biolistique est de 10. Il s'agit là d'un point faible de cette méthode de criblage, car ce nombre est trop restreint par rapport à la taille de la banque de mutants obtenue et représente un coût élevé. Une solution serait d'inoculer les mutants par agroinfection. Cette technique d'inoculation consiste à cloner une cassette d'expression de l'ADNc du LMV (comprenant un promoteur et un terminateur de transcription fonctionnant dans la cellule végétale) dans un vecteur binaire d'*Agrobacterium tumefaciens* qui, une fois infiltrée dans les tissus végétaux, entraîne l'expression ectopique de l'ARN viral puis de la polyprotéine virale d'une manière plus efficace. Malheureusement, de tels outils ne sont pas disponibles pour le moment dans le laboratoire de virologie.

II.4. Criblage de la banque de mutants dérivés de LMV-0

En nous basant sur la mise au point du test de criblage, nous avons réalisé des expériences préliminaires de criblage de la banque de mutants du LMV-0, en inoculant par biolistique les variétés résistantes Mantilia et Salinas 88 par des mélanges d'ADN plasmidique extrait d'*E.coli*.

Les mélanges d'ADN plasmidique ont été préparés de façon à respecter le rapport molaire 1/10 (un mélange doit contenir une quantité égale d'ADN plasmidique extrait de 10 colonies différentes). Pour ce faire et en supposant que toutes les colonies d'*E.coli* ont la même capacité de replication, l'ADN plasmidique de dix colonies a été extrait « en masse » et utilisé pour préparer les cartouches pour l'inoculation par biolistique.

L'idéal serait d'extraire les ADN plasmidiques des 10 colonies d' *E.coli* séparément, de les doser et de préparer le mélange de façon à ce qu'il contienne 1/10^{ème} de chaque ADN plasmidique. Mais cette méthode représentant un coût élevé, nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser la méthode d'extraction en masse d'ADN plasmidique.

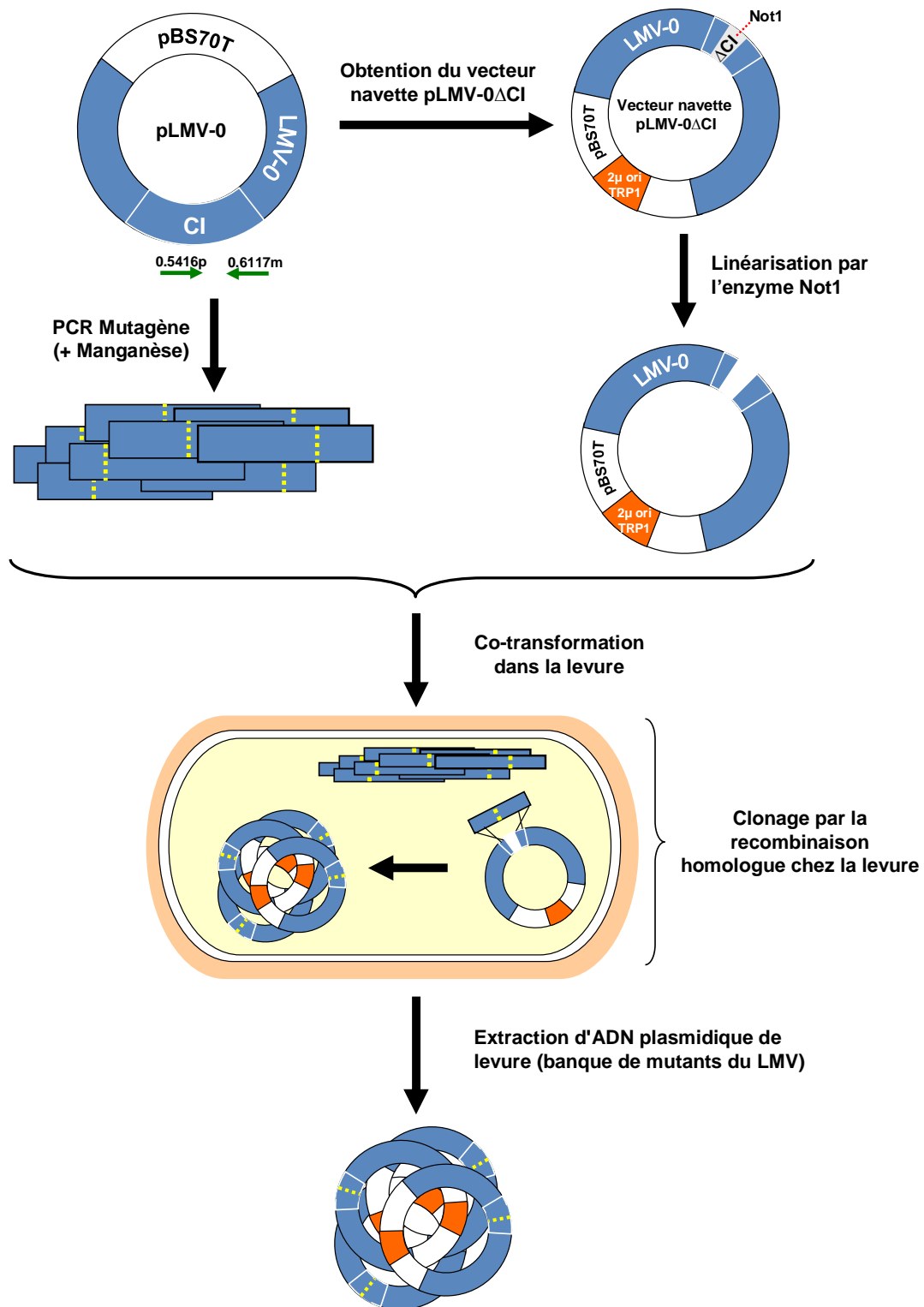


Figure 40. Stratégie clonage de la banque de fragments mutés obtenus par PCR mutagène dans le clone LMV-0ΔCI par recombinaison homologue chez la levure. Les deux flèches vertes horizontales représentent les amorces utilisées pour la PCR mutagène. les noms des amorces sont indiqués au dessus des flèches.

A ce jour, 124 pools d'ADN plasmidique (soit l'équivalent de 1124 plasmides) ont été inoculés par biolistique. Deux mélanges seulement ont entraîné l'apparition de symptômes faibles et tardifs (40 jpi) sur la variété Salinas 88 mais pas sur la variété Mantilia.

Les ARNs totaux des plantes Salinas 88 extériorisant des symptômes ont été extraits selon la méthode de Bertheau (matériel et méthodes, § III.1.1) puis la région CI-C-ter-6K2-VPg a été amplifiée par RT-PCR en utilisant les amorces W et X (Matériel et méthodes, Tableau 18). Les amplicons obtenus ont été ensuite séquencés. L'alignement des séquences protéiques de la région CI-Cter-6K2-VPg avec celle de LMV-0 a révélé la présence d'une seule mutation correspondant à l'acide aminé en position 621 : les virus capables de se multiplier sur Salinas 88 ont une thréonine à la position 621 au lieu d'une sérine. Ces résultats confirment le rôle clé de l'acide aminé à la position 621 dans le contournement de la résistance *moI* chez la laitue.

Cependant, le séquençage de la descendance des pools de clones mutés du LMV-0 ne permet de mettre en évidence que les mutations majoritairement représentées. L'identification de toutes les mutations véritablement impliquées dans le contournement nécessiterait de tester le comportement de chacun des clones d'ADNc mutés présents dans chacun des deux pools, individuellement, sur les variétés résistantes de laitue.

Les symptômes induits par les deux pools de mutants de LMV-0 sur les plantes Salinas 88 sont plus faibles et plus tardifs que ceux induit par le virus mutant LMV-0S621T. De plus, ces mélanges d'inoculum n'induisent pas des symptômes sur Mantilia au contraire du mutant LMV-0S621T qui provoque des symptômes faibles sur cette variété. Ceci est sans doute lié à la faible « charge virale initiale » du mutant contournant dans le mélange, et/ou aux effets compétitifs d'autres virus dans le pool.

Les résultats présentés ci-dessus ne sont que préliminaires et nécessitent évidemment d'être reproduits et complétés. En particulier, il faudra poursuivre le travail de criblage de la banque de mutants de LMV-0. Pour le moment, il semble que ce crible ne permette de mettre en évidence que les acides aminés ayant des effets majeurs dans le contournement.

La mise en évidence d'autres mutations impliquées dans le contournement nécessite sans doute de quantifier l'accumulation virale non seulement dans les plantes présentant des symptômes, mais encore dans toutes les plantes inoculées et d'analyser les mutants induisant une accumulation virale accrue.

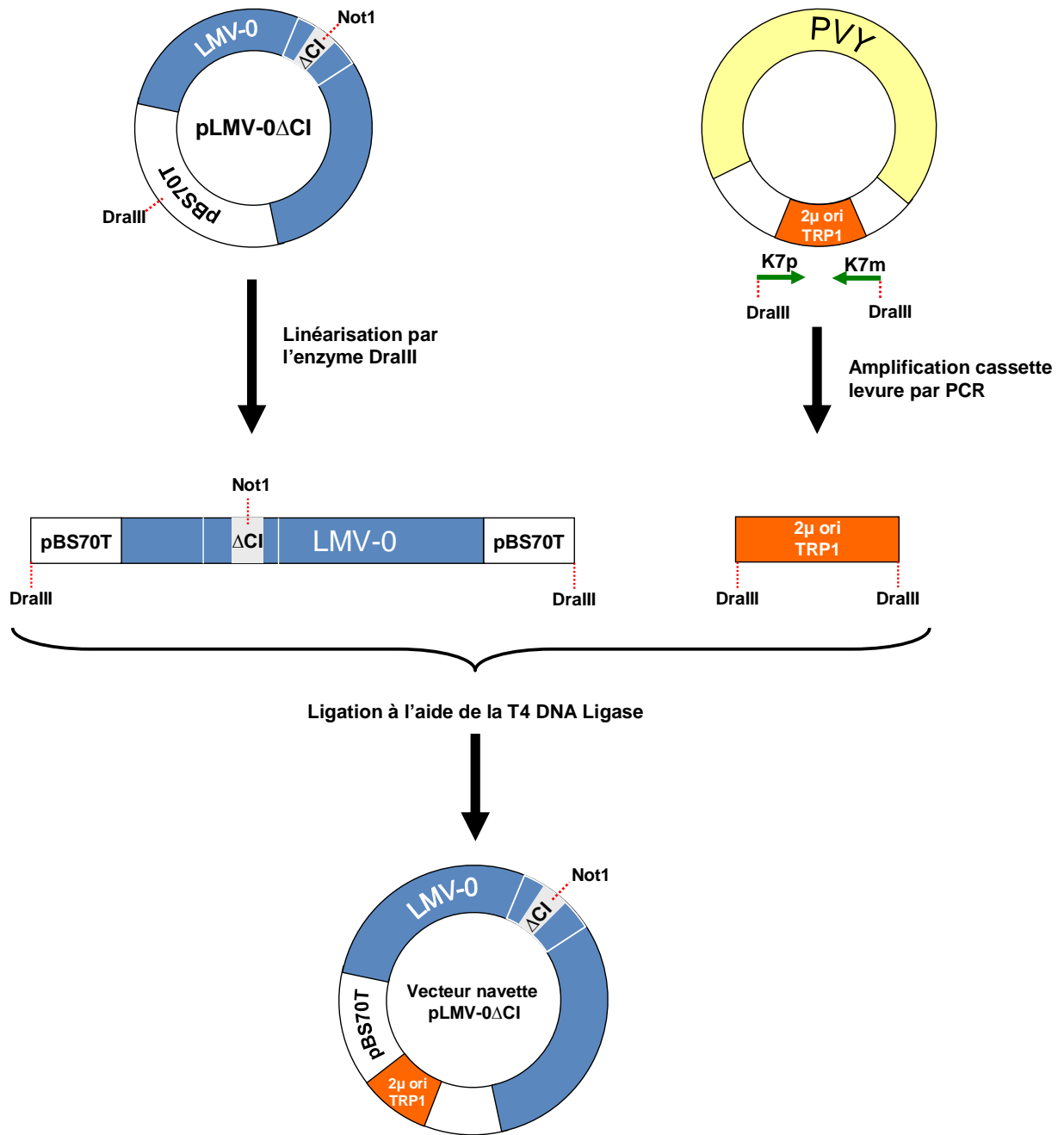


Figure 41. Stratégie de construction du vecteur navette pLMV-0ΔCI.

La séquence contenant l'origine de réplication chez la levure (2μ) et le marqueur autotrophe pour le tryptophane (*Trp1*) a été amplifiée à partir d'un clone de PVY (fourni par B. moury INRA Avignon). Les flèches vertes représentent les amorces utilisées dans la PCR, les noms des amorces sont indiqués au dessus des flèches. La portion grise (ΔCI) représente une séquence non virale contenant le site unique de digestion introduit « digestion-suicide ».

III. *Les acides aminés 617 et 627 dans la CI-C-ter du LMV jouent-ils un rôle dans la virulence du LMV vis à vis de mo1 ?*

Des travaux menés au sein du laboratoire par Laurence Svanella sur la capacité de certains isolats naturels du LMV à infecter des laitues porteuses de mutations dans eIF4E ont permis de caractériser des isolats capables d'évoluer vers la virulence en contexte de pression de sélection imposée par l'allèle *mo1*¹. Ces isolats comprennent des isolats d'origine sauvage (*Lactuca virosa*) (CI427 et CI574) ou ornementale (*Osteospermum*) (Tn 515, Tn 516 et Tn 517) (**Figure 36**) (Svanella *et al.*, communication personnelle). Ces isolats ont été propagés sur la variété sensible Trocadéro (*Lactuca sativa*) où ils induisent des symptômes de mosaïque systémique. Après rétro-inoculation sur mantilia (*mo1*¹), certaines plantes ont développé des symptômes faibles et tardifs (**Figure 42**). Lors du deuxième passage (depuis les mantilia extériorisant des symptômes) sur la même variété *mo1*¹, 100 % des plantes ont extériorisé des symptômes sévères avec un délai d'apparition beaucoup plus court que lors du premier passage (**Figure 42**). De plus, les virus qui ont ainsi « évolué » vers la virulence sur *mo1*¹ acquièrent simultanément la virulence vis-à-vis de *mo1*².

L'analyse des séquences protéiques de la région CI-C-ter-6K2-VPg des descendances virales de ces isolats dans les variétés *mo1*⁰ et *mo1*¹ a montré que les séquences restent stables dans la variété sensible alors que dans la variété résistante, de façon reproductible, une ou deux mutations sont apparues dans la région CI-C-ter (et aucune dans la région codant pour la VPg) et ce, dans au moins deux expériences indépendantes. Les isolats CI427 et CI574 capables de contourner *mo1*¹ comportent une seule mutation à la position 602 (alanine remplacée par une valine), alors que les isolats Tn 516 et Tn 517 présentent une mutation à la position 627 (alanine remplacée par une thréonine). L'isolat Tn 515 présente les deux mutations à la fois aux positions 602 et 627. En plus de ces deux mutations, tous les isolats présentent une Sérine en position 617 (alors que le LMV-0 présente une Glycine à cette position) (**Tableau 8**). Le séquençage du génome complet de l'isolat CI574 ayant évolué a montré qu'aucune autre mutation n'était apparue dans la descendance virale (L. Svanella, communication personnelle).

Ces données suggèrent que ces mutations pourraient être impliquées, de façon individuelle ou en combinaison, dans le contournement de la résistance *mo1*. Afin de tester cette hypothèse, des mutations ponctuelles dans la CI ciblant les acides aminés identifiés ont été introduites seules ou en combinaison, dans le clone d'ADNc complet du LMV-0 (incapable

	Rapport molaire	Salinas (<i>mo1⁰</i>)	Mantilia (<i>mo1¹</i>)	Salinass 88 (<i>mo1²</i>)
LMV-0		3/3	0/3	0/3
LMV-0xbastyE		3/3	2/3	3/3
	1/5	3/3	2/3	2/3
LMV-0xbastyE / LMV-0	1/10	3/3	3/3	2/3
	1/15	3/3	0/3	0/3
	1/20	3/3	0/3	0/3
LMV-0xbafIE		3/3	3/3	3/3
	1/5	3/3	2/3	2/3
LMV-0xbafIE / LMV-0	1/10	3/3	3/3	2/3
	1/15	3/3	0/3	0/3
	1/20	3/3	0/3	0/3

Tableau 7. Nombre de plantes infectées / nombre de plantes inoculées avec les différents rapports molaires (virus contournant *mo1* dérivé de LMV-0 / LMV-0) à 30 jpi.

Deux virus recombinants dérivés de LMV-0, LMV-0xbastyE, LMV-0xbafIE contournant la résistance *mo1* et induisant des symptômes sur les variétés résistantes Mantilia (*mo1¹*) et Salinas 88 (*mo1²*) ont été mélangés individuellement avec le LMV-0 (non-contournant) selon les quatre rapports molaires en mélange (clone contournant/ LMV-0) : 1/5, 1/10, 1/15 et 1/20. Les différents mélanges ont été inoculés par biolistique sur les variétés Salinas (*mo1⁰*), Mantilia et Salinas 88. Il s'agit d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes réalisées.

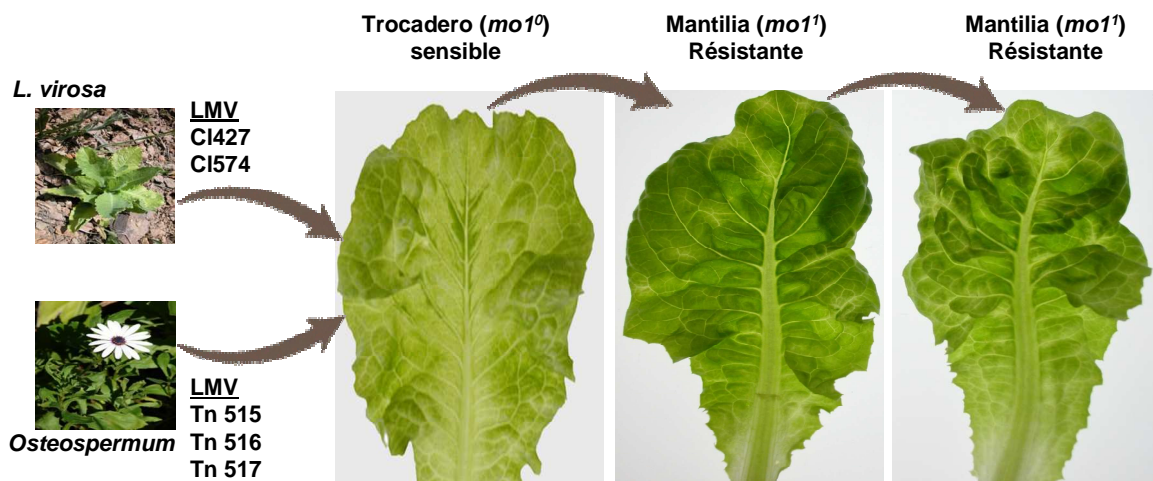


Figure 42. Des isolats de LMV d'origine sauvage (*Lactuca virosa*) ou ornementale (*Osteospermum*) sont capables d'évoluer vers le contournement de la résistance *mo1¹* chez la laitue *Lactuca sativa*. D'après L. Svanella

de contourner la résistance conférée par *moI*). L'introduction des mutations a été réalisée en suivant la stratégie de mutagenèse dirigée par fusion-PCR (matériel et méthodes, § III.7.2). Les fragments PCR mutés ont ensuite été clonés dans le clone LMV-0 Δ CI par recombinaison homologue chez la levure. La liste des mutants de LMV-0 obtenus et infectieux est donnée dans le **Tableau 9** et leur séquence présentée sur la **figure 43**.

Cette étude a été réalisée dans le cadre du stage de master II Biologie et Biotechnologie des Plantes (Université de Bordeaux) effectué par Guillaume ACELIN que j'ai partiellement encadré.

Les **Tableaux 9 et 10** résument les résultats préliminaires concernant le comportement de chacun des mutants dérivés de LMV-0, après inoculation mécanique des variétés de laitue sensibles Trocadéro et Salinas (*moI*⁰) et résistants Mantilia (*moI*¹) et Salinas 88 (*moI*²).

La durée d'apparition des symptômes sur laitues sensibles varie selon les mutants (entre 13 et 20 jours) tandis que sur les variétés résistantes, le temps d'apparition des symptômes est beaucoup plus long et plus variable (entre 1 et 2 mois) (**Tableau 9**).

Pour toutes les mutants inoculés, le contrôle de la séquence de la région CI-C-ter présente dans la descendance virale, en absence ou en présence de la pression de sélection exercée par les allèles de résistance, a été réalisé par le séquençage du produit d'amplification par PCR correspondant à la région nucléotidique 5789-6279 du génome viral (codant pour les acides aminés 571 à 735 de la CI du LMV).

Dans tous les cas, la séquence de cette région chez les mutants propagés sur plante sensible Trocadéro ou Salinas, était identique à celle du clone de départ, inoculé par biolistique.

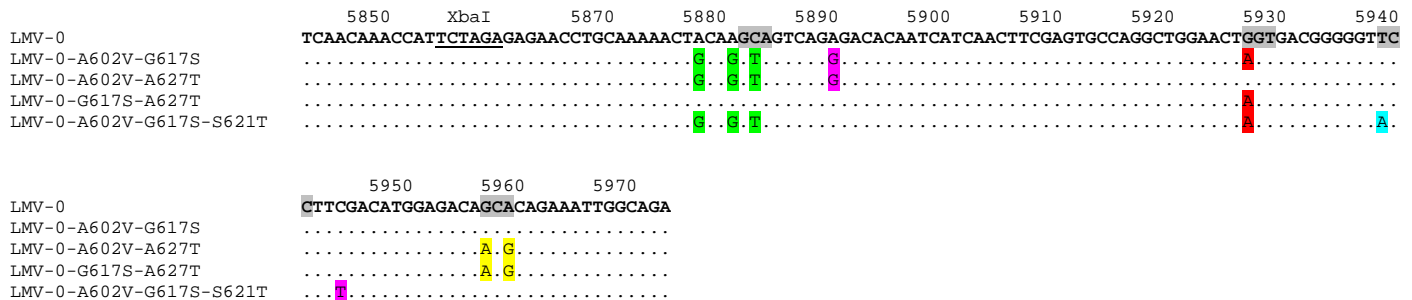
Dans le cas du simple mutant LMV-0-G617S, une seule laitue Mantilia (*moI*¹) (parmi les trois inoculées), a extériorisé des symptômes plus d'un mois après l'inoculation (**Tableau 9**). De façon très intéressante, deux mutations supplémentaires aux positions 602 et 621 (positions candidates ciblées dans le chapitre 1) sont présentes dans la descendance virale dans cette plante : l'alanine 602 est remplacée par une valine et la serine 621 par une thréonine. De plus, il s'agit bien d'une mutation A602V qui est apparue lors de la propagation du virus, et non la mutation introduite par mutagenèse dirigée car site PstI est absent (cf chapitre 1). Ceci suggère donc que le génotype de l'inoculum de départ (LMV-0-G617S) ne permettrait pas le contournement de la résistance, mais faciliterait l'apparition de mutations à des positions clés du contournement (en particulier la position 621).

LMV-0	A (602)	G (617)	A (627)
CI427	V	S	
CI574	V	S	
Tn516		S	T
Tn517		S	T
Tn515	V	S	T

Tableau 8. Position et nature des acides aminés dans la région CI-C-ter de la CI des isolats de LMV ayant évolué vers la virulence sur la variété Mantilia (*mol*¹).

Les acides aminés correspondant de la séquence de la CI du LMV-0 sont indiqués en haut du tableau. En rouge : les mutations qui apparaissent : A602V et A627T. En noir, la sérine en position 617 qui est présente dans la séquence de la CI (avant évolution vers la virulence).

A



B

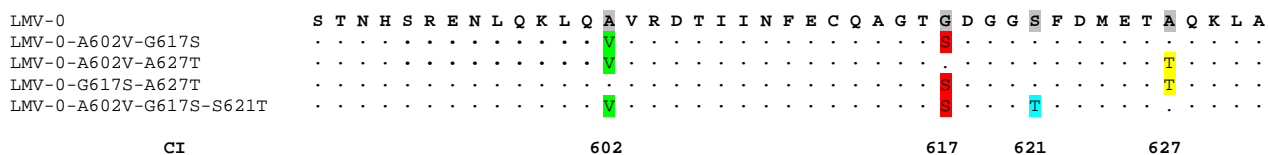


Figure 43. Alignement des séquences nucléotidique (A) et protéique (B) de la région CI-C-ter des clones d'ADNc complets mutés dérivés de LMV-0.

La séquence d'ADNc correspondant aux nucléotides 5847 à 5973 de l'ARN génomique (aa 589 à 631 de la CI) est représentée. Les codons mutés et les acides aminés correspondant sont indiqués en gris dans la séquence de LMV-0. Les nucléotides surlignés en couleur correspondent aux différentes mutations introduites. En vert, le codon GCA (**Alanine en position 602**) a été muté en GTA (**Valine**). Les autres mutations introduites en vert ne sont pas codantes. En rouge le codon GGT (**Glycine en position 617**) a été muté en AGT (**Sérine**). En bleu clair, le codon TCC (**Sérine en position 621**) a été muté en ACC (**Thréonine**). En jaune, le codon GCA (**Alanine en position 627**) a été muté en ACG (**Thréonine**). Les acides nucléiques en violet représentent des mutations silencieuses qui n'ont pas été introduites par mutagenèse dirigée. Les alignements de séquences ont été réalisés à l'aide du logiciel Méga 4 en utilisant ClustalX.

Dans le cas du simple mutant LMV-0-A627T, des symptômes sont apparus dans une plante sur huit pour chacune des variétés Mantilia et Salinas 88 (**Tableau 9**), sans que des mutations supplémentaires ne soient apparues dans le génome de la descendance. Cela suggère qu'une seule mutation à cette position 627 suffirait au contournement de la résistance, tout comme le simple mutant LMV-0-S621T. Cependant, ces résultats très préliminaires, montrent qu'une très faible proportion de plantes extériorise des symptômes. Il se peut que cette position soit importante pour le contournement mais qu'elle ne soit pas suffisante.

Les virus LMV-0-G617S-S621T et LMV-0-A602V-G617S-S621T sont capables de contourner les deux allèles de résistance du gène *mol*, de façon plus efficace (pourcentage d'infection plus élevé) pour le triple mutant LMV-0-A602V-G617S-S621T que le double mutant LMV-0-G617S-S621T (**Tableau 9**). Il semble donc que la mutation en position 617 facilite le contournement de la résistance en présence de la mutation 602. Pour la plupart des échantillons séquencés, la région CI-C-ter de la descendance virale est identique à celle du virus muté inoculé. Cependant le séquençage de la descendance du LMV-0-G617S-S621T infectant les variétés de laitues résistantes Salinas 88 et Mantilia a révélé l'apparition d'une mutation supplémentaire en position 627 (codon ACA codant pour une Thréonine), différente de celle apportée par PCR mutagène dirigée (codon ACG), alors que la descendance virale de ce virus mutant chez les variétés de laitue sensibles ne comprend pas cette mutation supplémentaire. Il semble donc que la présence de la mutation 617 ait facilité l'apparition de la mutation 627 en contexte de résistance. L'effet de la mutation 627 apparue sur la virulence des virus descendants vis-à-vis *mol*¹ et *mol*² est en cours de test, en réinoculant des variétés résistantes par l'inoculum viral prélevé de Mantilia et Salinas88 infectées par le LMV-0-G617S-S621T.

Il faut souligner que tous ces résultats ne sont que préliminaires, car pour certains virus, une seule expérience d'inoculation a été réalisée. De plus, le contrôle par RT-PCR de la descendance virale réalisé par séquençage n'a porté que sur une portion réduite du gène codant pour la CI-Cter, n'incluant que la zone d'introduction des mutations. Afin de vérifier qu'aucune autre mutation n'est apparue en dehors de cette zone, Il faut amplifier par RT-PCR et séquencer la région comportant non seulement la CI-C-ter mais encore la VPg.

Pour tous les mutants testés, le délai d'apparition des symptômes sur laitues sensibles est beaucoup plus court que sur les laitues résistantes. Cependant, les virus créés ont été inoculés au fur et à mesure de ce travail dans des conditions environnementales pouvant varier (ensoleillement, température de la serre..). En vue de comparer de façon plus rigoureuse le délai d'apparition des symptômes induits par les mutants sur laitues sensibles et résistantes,

	Trocadéro (<i>moI</i> ⁰)	Salinas (<i>moI</i> ⁰)	Mantilia (<i>moI</i> ¹)	Salinas88 (<i>moI</i> ²)
LMV-0	6/6	6/6	0/6	0/6
LMV-E	3/3	3/3	3/3	3/3
LMV-0-G617S	3/4	3/4	1/3 ^a	0/3
LMV-0-A627T	8/8	6/6	1/8	1/8
LMV-0-G617S-S621T	8/8	7/9	3/9 ^b	2/9 ^c
LMV-0-A602V-G617S-S621T	3/3	2/2	3/4	3/4
LMV-0-G617S-A627T	2/2	2/2	nt	nt
LMV-0-A602V-A627T	nt	nt	nt	nt

Tableau 9. Propriétés biologiques des virus parentaux LMV-0 et LMV-E, et des virus mutés dérivés de LMV-0 sur les différentes variétés de laitue. Les fractions indiquent le nombre de plantes extériorisant des symptômes sur le nombre total de plantes inoculées. Les lettres a, b et c font référence à l'apparition de nouvelles mutations et sont expliquées dans le texte. « nt » : non déterminé.

	Trocadéro (<i>moI</i> ⁰)	Salinas (<i>moI</i> ⁰)	Mantilia (<i>moI</i> ¹)	Salinas88 (<i>moI</i> ²)
LMV-0	7-10	7-10	-	-
LMV-E	7-10	7-10	21	30
LMV-0-G617S	13	13	56 max	-
LMV-0-A627T	20	20	32	32
LMV-0-G617S-S621T	16	16	25 à 38	25 à 38
LMV-0-A602V-G617S-S621T	16	16	32	32
LMV-0-G617S-A627T	16	16	nt	nt
LMV-0-A602V-A627T	nt	nt	nt	nt

Tableau 10. Délai d'apparition des symptômes induits par les virus parentaux LMV-0 et LMV-E, et les virus mutés dérivés de LMV-0 sur différentes variétés de laitue. Le nombre de jours après inoculation nécessaires pour voir apparaître les premiers symptômes dans les feuilles non inoculées sont indiqués en jours post inoculation (jpi). (-) : aucun symptôme visible 30 jpi. (nt): non testé.

ainsi que leur niveau d'accumulation (estimé par ELISA semi-quantitatif par rapport au LMV-0 ou par RT-PCR quantitative), chacun des mutants obtenus (simple, double et triple) sera inoculé en parallèle lors de la même expérience d'infection, sur laitues sensibles et résistantes.

En résumé, en plus du rôle clef joué par la Thréonine en position 621, les résultats préliminaires obtenus lors de ce travail confirmeraient que la Sérine en position 617 faciliterait l'apparition de mutations supplémentaires (en positions 602 et 621) permettant le contournement de la résistance conférée par *moI*¹ et que la position 627 jouerait à elle seule un rôle clef dans le contournement non seulement de *moI*¹ mais aussi de *moI*².

Chapitre 3

*Caractérisation fonctionnelle des interactions
entre la protéine eIF4E de laitue et ses
interacteurs viraux: CI et VPg*

I. Introduction

L'implication de région CI-C-ter du LMV dans le processus de contournement de la résistance conférée par eIF4E chez la laitue, suggère que cette protéine pourrait interagir, directement ou non, avec le facteur eIF4E de laitue. En particulier, le rôle clé de l'acide aminé 621 dans le contournement, pourrait être lié à sa capacité à rétablir ou modifier l'interaction de la CI avec les formes défectives d'eIF4E codées par les allèles de résistance *mo1*¹ et *mo1*².

L'interaction entre la protéine CI des potyvirus et eIF4E n'a jamais été décrite à ce jour. C'est pourquoi, nous avons testé *in vitro* par ELISA et *in vivo* par BiFC, les interactions CI/eIF4E et testé en particulier l'impact de la mutation de l'acide aminé 621 sur les interactions protéiques impliquant les différentes formes d'eIF4E.

II. Mise au point d'un protocole de purification des protéines CI-C-ter chez E.coli

L'étape préliminaire à ce travail a été d'exprimer chez *E.coli* et de purifier les quatre protéines recombinantes suivantes : CI-C-ter du LMV-0 et du LMV-E, ainsi que les formes mutées correspondantes CI-C-ter du LMV-0-S621T et du LMV-E-T621S. Pour ce faire, les séquences nucléotidiques codant pour ces protéines ont été clonées dans le vecteur d'expression procaryote pDEST-17 (Matériel et Méthodes, § V.1.1) permettant d'ajouter une étiquette de 6 histidines à l'extrémité amino-terminale de la protéine produite chez *E. coli*. De plus, la séquence nucléotidique codant pour la protéine GFP a été clonée dans le même vecteur d'expression, servant de contrôle négatif, sorte de protéine « naïve » pour l'interaction avec eIF4E.

L'utilisation d'*Escherichia coli* pour l'expression de protéines hétérologues est une technique efficace, pour laquelle de nombreux systèmes sont proposés. Néanmoins, chaque protéine demeure un cas à part, nécessitant une optimisation des techniques de production et de purification. La mise au point du protocole de purification, effectuée sur la protéine CI-C-ter a été longue et laborieuse.

Tampon de lyse (pH 8)		Tampon de lavage (pH 8)		Tampon d'éluion (pH 8)	
NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
		imidazole	20 mM	imidazole	250 mM

Tableau 11. Tampons utilisés pour l'extraction et la purification en conditions non dénaturantes des différentes protéines recombinantes exprimées chez *E. coli*.

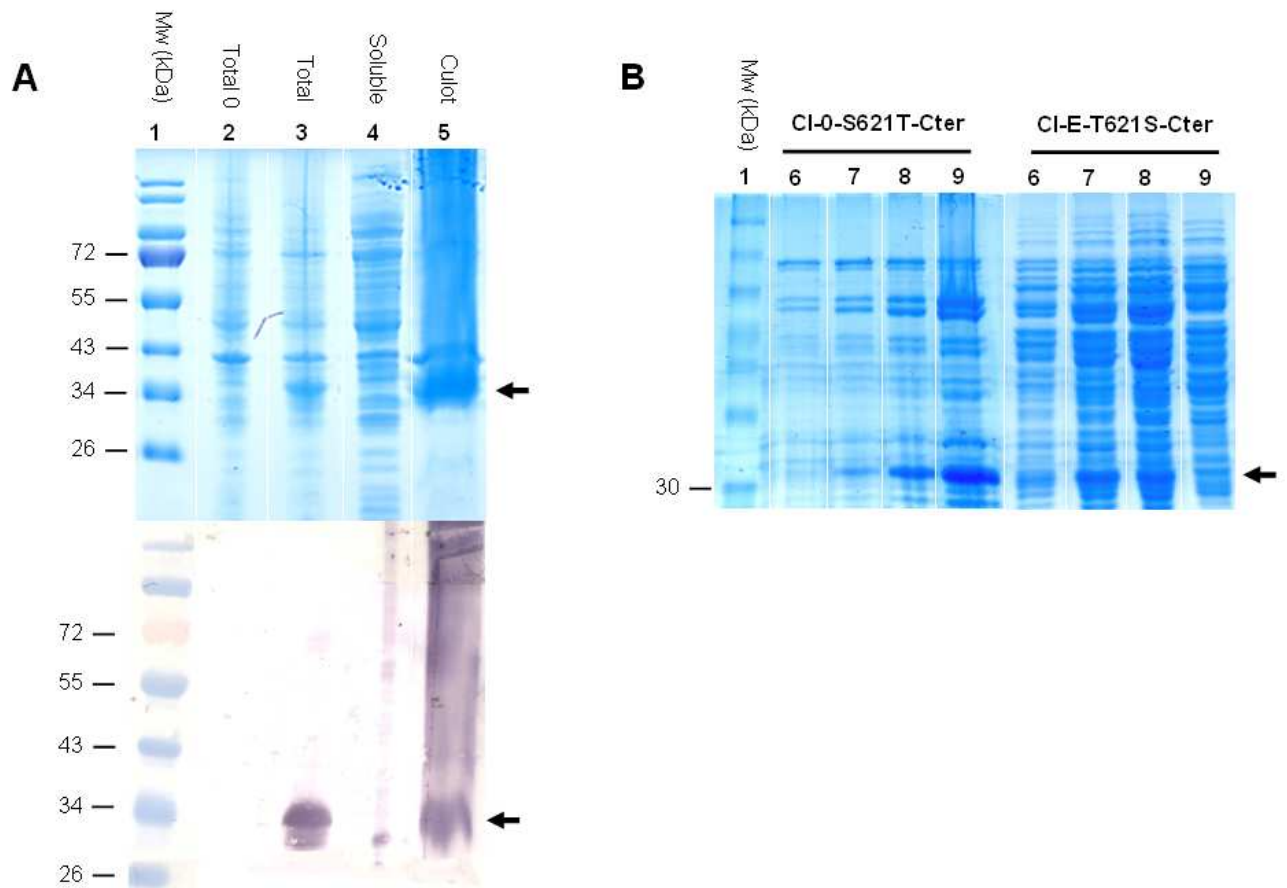


Figure 44. Essais de purification des protéines recombinantes CI-C-ter en conditions non dénaturantes.

(A) Analyse du profil électrophorétique des fractions soluble et insoluble de la protéine CI-0-C-ter. Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire (kDa). Piste 2 : Extrait protéique total avant l'induction à l'arabinose. Piste 3 : Extrait protéique total après 4 heures d'induction à l'arabinose (0.2 % final). Piste 4 : Extrait protéique soluble après centrifugation. Piste 5: Extrait protéique insoluble (culot) après centrifugation. Le western blot a été révélé à l'aide d'anticorps anti-His.

(B) : Analyse du profil électrophorétique des fractions d'éluion pour CI-0-S621T-C-ter et CI-E-T621S- C-ter. Pistes 6-7-8-9 : fractions d'éluion successives.

Les flèches indiquent la position des protéines recombinantes CI-C-ter (taille attendue : 32,6 kDa).

II.1. Purification en conditions non dénaturantes

Le premier protocole utilisé est dit en conditions « non dénaturantes », permettant d'obtenir des protéines solubles dans le cytoplasme de la bactérie et dans une conformation s'apparentant à l'état natif *in planta*. La purification a été réalisée sur la fraction soluble de l'extrait protéique. Pour ce faire, après production (à 28°C durant 3 heures après induction par ajout d'arabinose 0.2 % final), les culots bactériens correspondant à 500 mL de culture ont été suspendus dans 10 mL de tampon de lyse (**Tableau 11**) additionné de 0.5 mg/mL de lysozyme et 1/2 pastille de cocktail d'antiprotéase (Roche), puis incubés durant 30 min à 4°C et ont subi une sonication de 5 min. Le lysat ainsi obtenu est ultracentrifugé 45 min à 33000 rpm et le surnageant a été soumis à une chromatographie d'affinité sur une colonne de résine Ni NTA (QIAGEN) préalablement équilibrée avec du tampon de lyse. Après 2 lavages successifs de la résine avec 4 mL de tampon de lavage, la protéine recombinante liée à la colonne a été éluée à quatre reprises en présence de 0.5 mL de tampon d'éluion (**Tableau 11**).

La **Figure 44A** montre que la majeure partie de la CI est récupérée sous forme insoluble. Cela confirme les résultats de Fernandez et al (1995) montrant que la CI entière du PPV est extrêmement insoluble lors de la purification chez *E. coli*. De plus, les protéines éluées ont été chargées sur un gel d'acrylamide et visualisées par coloration du gel au Bleu de coomassie. La **Figure 44B** montre que les fractions protéiques obtenues ne présentent pas un degré de pureté satisfaisant.

II.2. Purification en conditions dénaturantes

L'application du protocole d'extraction/purification de protéines en conditions non dénaturantes n'ayant pas permis d'obtenir des fractions protéiques suffisamment pures, nous avons donc solubilisé les protéines en utilisant des tampons dénaturants additionnés d'urée 8 M (**Tableau 12**). Les culots bactériens correspondant à 500 mL de culture ont été extraits en utilisant 10 mL de tampon de lyse (**Tableau 12**) additionné de 1/2 pastille de cocktail d'antiprotéase (Roche). Après sonication et centrifugation, les culots bactériens, qui contiennent la majorité de la protéine produite, sont extraits dans un volume de 10 mL de tampon de solubilisation (**Tableau 12**). Les extraits sont incubés toute la nuit à 4°C. Puis le

Tampon de lyse (pH 8)		Tampon de solubilisation (pH 7.2)	
Tris HCl	50 mM	MOPS	20 mM
EDTA	2 mM	DTT	0.5 mM
DTT	1 mM	urée	8 M
Triton X100	10X		
PMSF	1 mM		
lysozyme	1 mg/mL		

Tampons de purification par variation de pH

Tampon de lavage (pH 6.3)		Tampon d'élution 1 (pH 5.9)		Tampon d'élution 2 (pH 4.5)	
NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris HCl	10 mM	Tris HCl	10 mM	Tris HCl	10 mM
urée	8 M	urée	8 M	urée	8 M

Tampons de purification par ajout d'imidazole (pH 7.2)

Tampon de lavage		Tampon d'élution	
MOPS	20 mM	MOPS	20 mM
DTT	0.5 mM	DTT	1 mM
urée	8 M	Imidazole	0.5 M
Imidazole	10 mM		

Tableau 12. Tampons utilisés pour l'extraction et la purification des différentes protéines recombinantes exprimées chez *E. coli* en conditions dénaturantes.

surnageant est récupéré et centrifugé à 10000 rpm pendant 30 min. Le surnageant ainsi obtenu est ensuite soumis à une chromatographie d'affinité utilisant la résine Ni NTA (QIAGEN).

Les protéines d'intérêt peuvent être purifiées en maintenant des conditions dénaturantes tout au long du protocole ou peuvent subir une renaturation progressive sur la colonne d'affinité en remplaçant au cours du lavage et/ou de l'élution le tampon contenant de l'urée par un tampon n'en contenant plus.

Dans le premier cas, l'élution des protéines d'intérêt peut être effectuée par diminution du pH (« élution acide »), entraînant une protonation des histidines et donc une perte d'affinité pour le métal (répulsion électrostatique). Après 2 lavages avec 4 mL de tampon de lavage (pH 6.3) (**Tableau 12**), les protéines monomères (formées d'un seul brin) sont éliminés par quatre lavages avec 0.5 mL du tampon d'élution 1 (pH 5.9). L'élution de la protéine d'intérêt a été effectuée en trois fois en présence de 0.5 mL du tampon d'élution 2 (pH 4.5) (**Tableau 12**).

Dans le deuxième cas, l'élution des protéines d'intérêt peut être effectuée par compétition, en déplaçant les protéines fixées au métal grâce à l'ajout d'un excès d'imidazole, analogue de l'histidine. Les lavages ont été réalisés avec un tampon contenant de l'urée (**Tableau 12**) et l'élution effectuée par un tampon n'en contenant plus (**Tableau 12**) permettant ainsi la renaturation des protéines lors de l'élution. L'excès d'imidazole (analogue de l'histidine) dans le tampon d'élution a permis de décrocher les protéines de la résine.

Les quatre protéines CI-C-ter ainsi que la protéine GFP ont été purifiées en suivant les deux méthodes de purification décrites ci-dessus (**Figure 45 et 46**). Dans les deux cas, les fractions protéiques obtenues se sont avérées assez pures et en quantités suffisantes (0,2-0,5 mg/ml) pour être utilisées dans les tests d'interaction avec les protéines eIF4E purifiées chez *E. coli*. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de la GFP.

III. Mise en évidence des interactions CI-eIF4E in vitro

Les quatre protéines CI-C-ter purifiées chez *E. coli* ont été utilisées dans les tests d'interaction en ELISA avec chacune des formes d'eIF4E de laitue (eIF4E⁰, eIF4E¹ et eIF4E²), purifiées chez *E. coli* par B. Doublet au laboratoire, selon le protocole décrit dans German-Retana et al. (2008). Le protocole suivi pour tester ces interactions par ELISA est décrit dans le paragraphe V.5 de Matériel et Méthodes.

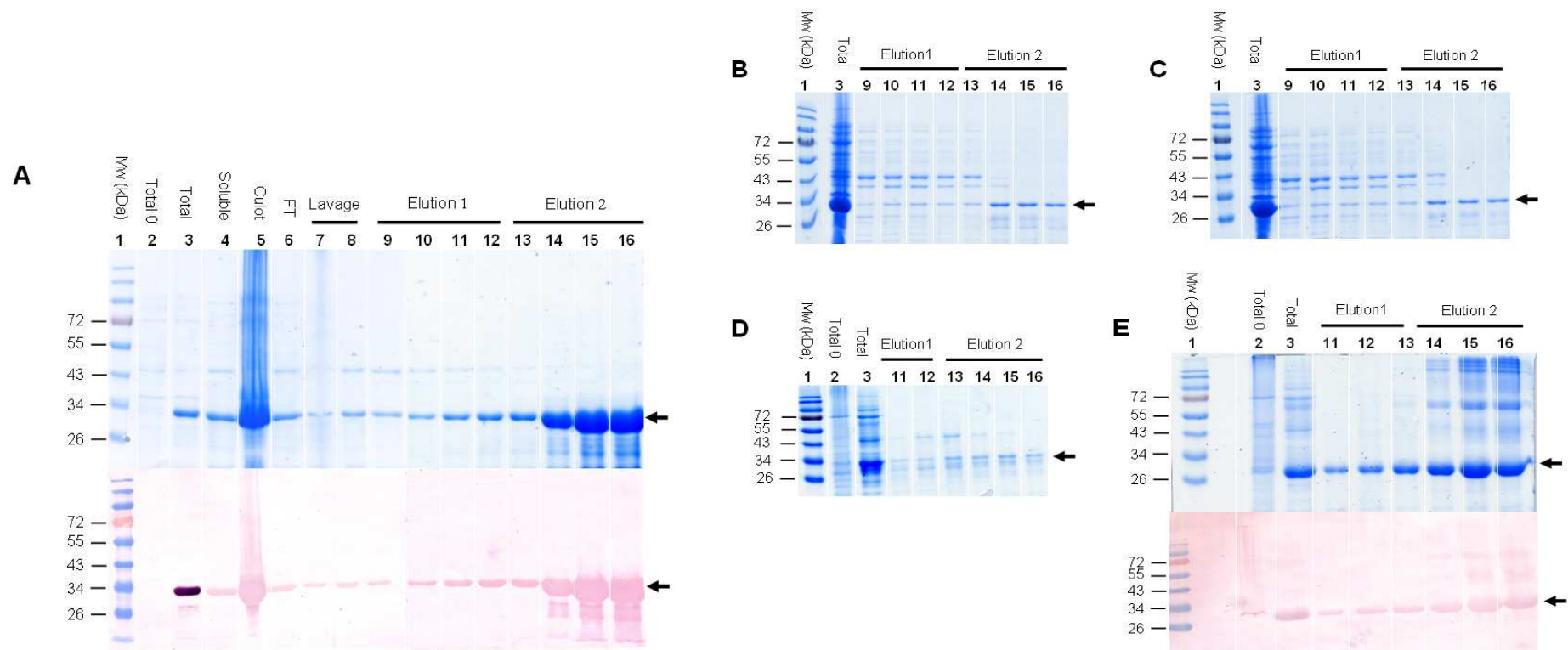


Figure 45. Purification des protéines CI-C-ter en conditions dénaturantes, puis élution par « variation de pH ». Analyse des protéines présentes lors des différentes étapes du protocole de purification : CI-0-C-ter (A), CI-0-S621T-C-ter (B), CI-E-C-ter (C), CI-E-T621S-C-ter (D) et GFP (E). Pour A et E, les western blot ont été révélés à l'aide d'anticorps anti-His.

Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire (kDa). Piste 2 : Extrait protéique total avant l'induction à l'arabinose. Piste 3 : Extrait protéique total après 4 heures d'induction à l'arabinose (0.2 % final). Piste 4 : Extrait protéique soluble après centrifugation. Piste 5: Extrait protéique insoluble (culot) après centrifugation. Piste 6 : « Flow through » de la colonne. Pistes 7-8 : Lavages de la colonne avec le tampon de lavage (pH 6.3). Piste 9-10-11-12 : élution avec le tampon d'élution 1 (pH 5.9). Pistes 13-14-15-16 : élution de la protéine d'intérêt à l'aide du tampon d'élution 2 (pH 4.5). Les flèches indiquent la position des protéines recombinantes. Taille attendue : 32,6 kDa pour les protéines CI-C-ter et 30,8 kDa pour la GFP.

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont présentés dans l'article ci-dessous (version non définitive). Ces résultats montrent que la fixation d'eIF4E⁰ à la CI-C-ter de LMV-0 est spécifique et dose dépendante (**Figure 47**). En effet, les contrôles négatifs montrent qu'aucun signal positif n'est observé en absence de l'un des deux partenaires (eIF4E⁰ et CI-C-ter) ou en présence de la GFP (**Tableau 13**).

De plus, chacune des quatre formes de CI-C-ter testées, qu'elles soient dérivées de virus capables de contourner la résistance (LMV-E, LMV-0-S621T) ou incapables de contourner la résistance (LMV-0, LMV-E-T621S) interagit avec chacune des trois formes d'eIF4E, porteuses ou pas des mutations conférant la résistance (**Figure 48**).

Cependant, il a été montré de façon reproductible que la CI-C-ter du LMV-0 interagit moins fortement avec les 3 formes d'eIF4E que la CI-C-ter du LMV-E (**Figure 48A**).

Les protéines mutées CI-C-ter de LMV-0-S621T et de LMV-E-T621S, ont un comportement similaire à celui des protéines sauvages : elles interagissent de façon comparable avec les différentes formes d'eIF4E (**Figure 48B**).

Ces résultats montrent que dans les conditions de nos tests, la mutation en position 621 n'entraîne pas de modification de l'interaction entre CI-C-ter et eIF4E *in vitro*.

Il serait intéressant de réaliser ces tests d'interaction avec les formes entières des protéines CI du LMV. Cependant, compte tenu de la très grande insolubilité de la protéine CI exprimée en système hétérologue (Fernandez *et al.*, 1995), il nous est apparu judicieux de purifier la protéine CI entière pourvue d'une Maltose Binding Protein (MBP) fusionnée en N-ter, sachant que cette étiquette augmente la solubilité des protéines (Kapust & Waugh, 1999). Nous avons donc cloné la séquence codant pour la CI entière du LMV-0 dans le vecteur pDonrTM 221 (Matériel et Methodes, § II.2.1) et transféré cette séquence dans le vecteur pDEST-HisMBP (Addgene) Gateway. Les premiers essais de purification de la protéine de fusion (~ 113 KDa) sont en cours au laboratoire.

IV. Mise en évidence des interactions CI-eIF4E in planta

Afin de vérifier si les interactions observées *in vitro* par ELISA ont également lieu dans les cellules végétales, nous avons utilisé la technique de Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) (voir Matériel et Methodes, § VII.1 pour le principe du BiFC).

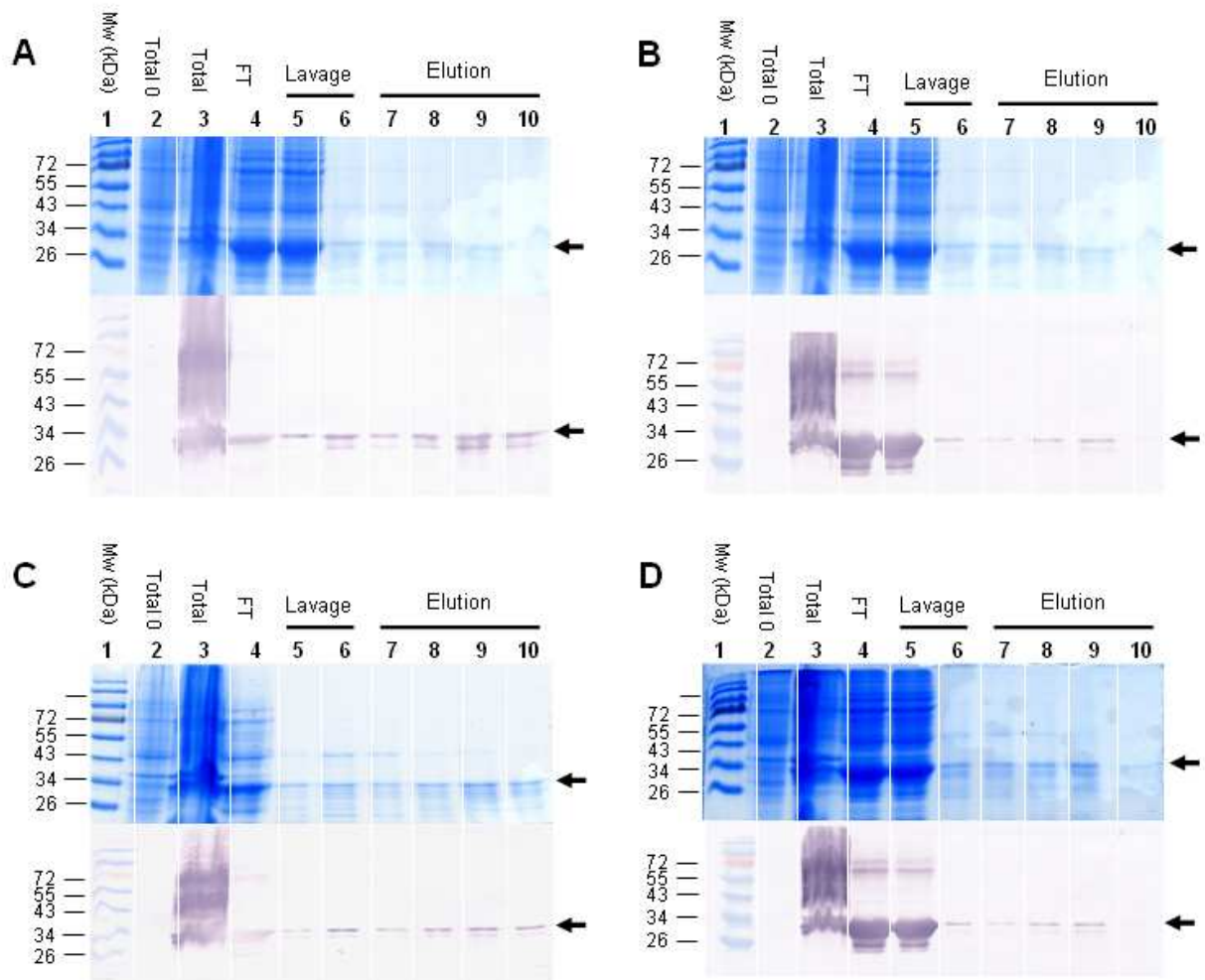


Figure 46. Purification des protéines CI-C-ter par dénaturation/renaturation progressive sur colonne. Analyse en gel de polyacrylamide des protéines présentes lors des différentes étapes réalisées lors de la purification de la protéine recombinante CI-C-ter du LMV-0 (A), CI-C-ter dérivée du LMV-0-S621T (B), CI-C-ter du LMV-E (C) et CI-C-ter du LMV-E-T621S (D). Les gels de polyacrylamide, colorés au bleu de Coomassie ainsi que les western blot correspondants révélés à l'aide d'anticorps anti-His sont montrés. Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire (kDa). Piste 2 : Extrait protéique total avant l'induction à l'arabinose. Piste 3 : Extrait protéique total après 4 heures d'induction à l'arabinose (0.2 % final). Piste 4 : « Flow through » de la colonne. Pistes 5-6: Lavages de la colonne avec le tampon de lavage. Pistes 7-8-9-10 : élution et renaturation de la protéine d'intérêt à l'aide du tampon d'élution.

IV.1. Expression transitoire en cellules d'oignon : inoculation par biolistique

Les séquences nucléotidiques codant respectivement pour la CI-C-ter et la CI entière du LMV-0, ainsi que la protéine eIF4E⁰ ont été fusionnées en C-ter ou en N-ter à chacune des deux parties de la protéine YFP (région N-terminale nEYFP ou C-terminale cEYFP) dans les plasmides nEYFP/pUGW (**Tableau 14**).

Les épidermes d'oignon ont été co-bombardés avec les différentes combinaisons possibles listées dans le (**Tableau 15**). L'interaction entre le facteur HcPro du LMV et la sous-unité alpha-5 d'*A. thaliana* a été utilisée comme contrôle positif d'interaction (combinaison PAE1-YC/YN-HcPro) (Dielen *et al.*, 2010b).

Les résultats obtenus lors de l'une de nos observations (Matériel et Methodes, § VII.2.2) sont représentés sur la **figure 49** et dans le **tableau 15**. Nous avons observé un signal fluorescent dans le cytoplasme des cellules bombardées avec les combinaisons suivantes : YN-CI-C-ter/YC-4E, YC-CI/YN-4E, YC-CI/4E-YN, CI-YC/4E-YN (**Figure 49**). Cependant, le nombre de cellules positives en fluorescence est beaucoup plus faible (au maximum 5 cellules par lame) que le nombre observé avec le contrôle HcPro/ PAE1 (une vingtaine de cellules positives par lame).

Aucun signal YFP n'est en revanche observable dans les cellules d'épiderme bombardées avec les contrôles négatifs. Cependant, ces résultats n'ont pas été reproductibles (signaux YFP observés dans 1 seule expérience sur 3) et le nombre de cellules YFP positives était bien inférieur (1-4 cellules par échantillon) au nombre observé dans le cas du contrôle positif (environ 30 cellules YFP positive).

Ces résultats n'ayant pu être reproduits, nous ne pouvons exclure que les signaux observés représentent des faux positifs plutôt que des signaux spécifiques d'interaction. La technique d'expression transitoire après transformation par biolistique s'est avérée très efficace au laboratoire pour mesurer des interactions entre d'autres protéines de plante et virales mais peut avoir une efficacité réduite car le nombre de cellules transformées dans les épidermes d'oignon est aléatoire d'un bombardement à l'autre.

C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser la méthode de BiFC par agroinfiltration d'*A. tumefaciens*, qui est en général plus efficace que la méthode de transformation par biolistique.

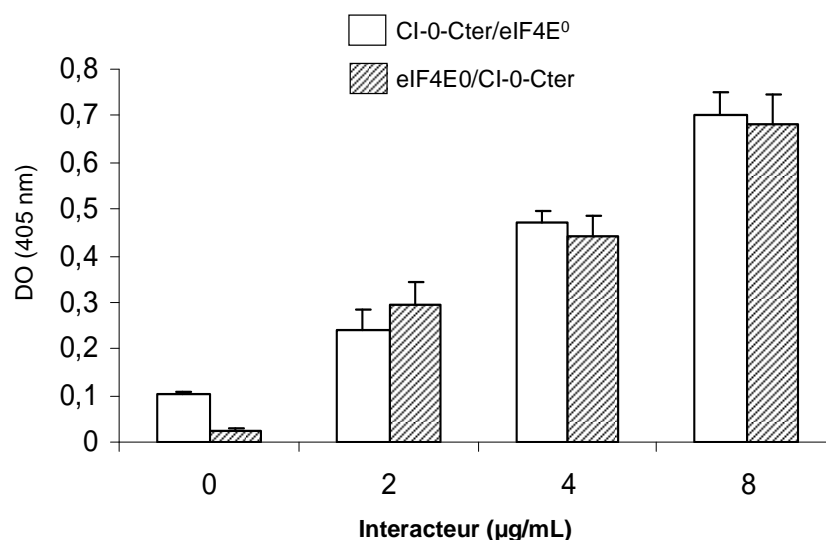


Figure 47. L'interaction CI-0-C-ter / eIF4E⁰ est dose dépendante.

Le coating a été réalisé soit avec la protéine CI-0-C-ter (barres vides) ou la protéine eIF4E⁰ (barres pleines) à une concentration de 4 µg/mL. Les concentrations croissantes de la protéine « interacteur » ont été testées (0 à 8 µg/mL). La révélation a été faite à l'aide des anticorps dirigés contre l'interacteur (anti-CI-C-ter ou anti-eIF4E). Les valeurs DO à 405 nm représentent les moyennes de trois répliquats obtenus dans une expérience représentative.

Coating	–	eIF4E ⁰	eIF4E ⁰	GFP
Interaction	CI-0-C-ter	CI-0-C-ter	–	CI-0-C-ter
Révélation	anti-CI-C-ter	anti-CI-C-ter	anti-CI-C-ter	anti-CI-C-ter
DO405	0,004 +/- 0,000	0,304 +/- 0,011	-0,002 +/- 0,003	-0,007 +/- 0,004
Coating	CI-0-C-ter	CI-0-C-ter	GFP	–
Interaction	eIF4E ⁰	–	eIF4E ⁰	eIF4E ⁰
Révélation	anti-eIF4E	anti-eIF4E	anti-eIF4E	anti-eIF4E
DO405	0,733 +/- 0,051	0,159 +/- 0,02	0,12 +/- 0,001	0,045 +/- 0,007

Tableau 13. Tableau récapitulatif des interactions testées *in vitro* par ELISA entre la protéine CI-C-ter du LMV-0 et la protéine eIF4E⁰ de laitue.

Coating réalisé avec 4 µg/mL de chaque protéine recombinante purifiée chez *E.coli* et la protéine « interacteur » est rajoutée à une concentration de 8 µg/ml. Contrôles négatifs réalisés : - (absence de protéine de coating, mais serum de veau fœtal 10 %) ou GFP produite dans les mêmes conditions. La révélation a été faite à l'aide d'anticorps dirigés contre l'interacteur (anticorps monoclonaux anti-CI-C-ter ou anticorps polyclonaux anti-eIF4E). Les valeurs de DO à 405 nm (DO405) représentent les moyennes (+/- la deviation standard) de trois répliquats obtenus dans une expérience représentative.

IV.2. Expression transitoire chez *N. Benthamiana* : transformation par agroinfiltration d'*A. tumefaciens*

Les tests d'interaction (CI-0-C-ter/eIF4E⁰ et CI-0/eIF4E⁰) ont été réalisés en co-transformant transitoirement des cellules de l'épiderme de feuilles de *Nicotiana benthamiana* avec les différentes combinaisons (**Tableau 15**). Comme contrôle positif, nous avons utilisé la protéine codée par le gène *tonneau1* d'*Arabidopsis thaliana* (TON1) (Azimzadeh *et al.*, 2008) qui capable d'auto-interagir formant d'homodimères *in vivo* (Samantha Vernhettes, INRA Versailles, communication personnelle).

Comme attendu, la co-expression de YN-TON1 et TON1-YC conduit à l'apparition d'un signal YFP dans le cytoplasme des cellules de *N. benthamiana* agroinfiltrées. Deux des huit combinaisons CI-0-C-ter/eIF4E⁰ (4E-YN/YC-C-ter et 4E-YC/YN-C-ter) ont donné un signal positif (fluorescence YFP dans le cytoplasme) (**Figure 50 et tableau 15**) lors de 3 expériences indépendantes. Toutefois, aucun signal n'a été détecté lors d'expression d'un seul des deux partenaires des combinaisons positives (4E-YN, 4E-YC, YC-C-ter ou YN-C-ter seul) (**Figure 50**).

Aucune combinaison impliquant la CI entière n'a conduit à un signal YFP positif dans les 3 expériences indépendantes réalisées (**Tableau 15**).

Dans leur ensemble, nos résultats montrent que eIF4E de laitue est capable d'interagir physiquement avec la région CI-C-ter du LMV-0 dans le cytoplasme des cellules de tabac.

Dans les conditions de nos tests, la technique BiFC par Agroinfiltration d'*A. tumefaciens* s'est avérée plus efficace que celle par inoculation par biolistique. C'est pourquoi, nous comptons l'utiliser pour confirmer l'interaction entre CI-C-ter et VPg du LMV *in planta*, qui a été récemment détectée *in vitro* par Roudet-Tavert Geneviève (cf. l'article ci-dessous).

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre couplé à des résultats obtenus dans notre laboratoire concernant l'étude de rôle fonctionnel des protéines CI et Vpg du LMV dans le contournement des allèles de résistance *mo1*¹ et *mo1*² chez la laitue ont fait l'objet de l'article suivant qui sera soumis dans *Journal of Virology*.

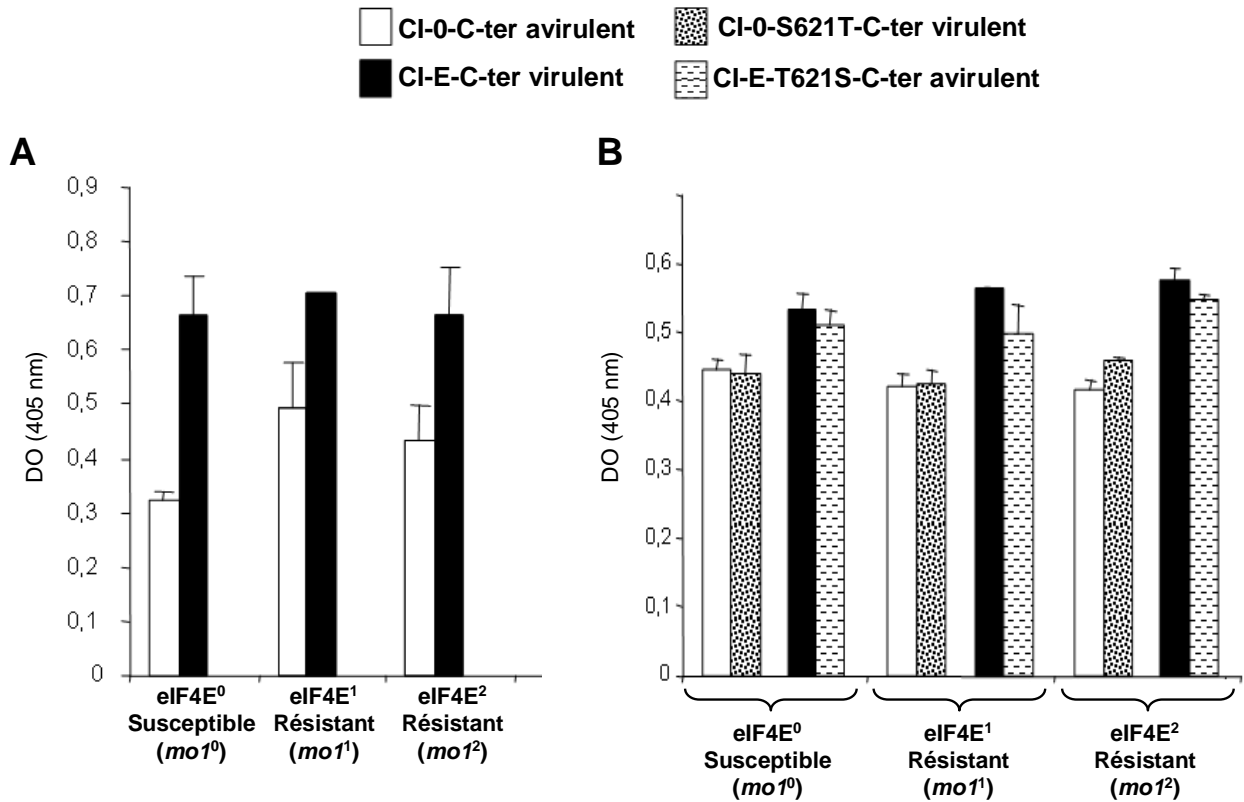


Figure 48. Mise en évidence des interactions entre les différentes formes de CI-C-ter et les trois formes d'eIF4E. (A) La CI-C-ter du LMV-E interagit plus fortement que la CI-C-ter du LMV-0 avec les 3 formes d'eIF4E. (B) La mutation 621 dans la CI-C-ter du LMV-0 et du LMV-E n'affecte pas de façon significative la fixation à chacune des trois formes d'eIF4E. Coating : CI-C-ter (4 µg/mL), interacteur : eIF4E (4 µg/mL), révélation : anti-corps dirigés contre eIF4E. Les valeurs DO à 405 nm représentent les moyennes de trois répliquats obtenus dans lors d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

Construction	Vecteur BIFC	Vecteur binaire BIFC
CI-C-ter-YN	nEYFP/pUGW2	pBiFP-1
CI-C-ter-YC	cEYFP/pUGW2	pBiFP-4
YN- CI-C-ter	nEYFP/pUGW0	pBiFP-2
YC-CI-C-ter	cEYFP/pUGW0	pBiFP-3
CI-YN	nEYFP/pUGW2	pBiFP-1
CI-YC	cEYFP/pUGW2	pBiFP-4
YN-CI	nEYFP/pUGW0	pBiFP-2
YC-CI	cEYFP/pUGW0	pBiFP-3
4E-YN	nEYFP/pUGW2	pBiFP-1
4E-YC	cEYFP/pUGW2	pBiFP-4
YN-4E	nEYFP/pUGW0	pBiFP-2
YC-4E	cEYFP/pUGW0	pBiFP-3

Tableau 14. Tableau récapitulatif des différentes constructions réalisées pour les tests d'interaction par BIFC. CI-C-ter : région CI-C-ter dérivée du LMV-0 ; 4E : séquence complète d'eIF4E⁰ isolée de laitue sensible (*mol*⁰).

Interaction CI-0-C-ter/eIF4E⁰			Interaction CI-0/eIF4E⁰		
Combinaisons	BiFC par biolistique	BiFC par Agroinfiltration	Combinaisons	BiFC par biolistique	BiFC par Agroinfiltration
CI-C-ter-YN/4E-YC	-	-	CI-YN/4E-YC	-	
CI-C-ter-YN/YC-4E	-	-	CI-YN/YC-4E	-	
CI-C-ter-YC/4E-YN	-	-	CI-YC/4E-YN	+	-
CI-C-ter-YC/YN-4E	-	-	CI-YC/YN-4E	+?	-
YN-CI-C-ter/4E-YC	-	+	YN-CI/4E-YC	-	-
YN-CI-C-ter/YC-4E	+	-	YN-CI/YC-4E	+?	-
YC-CI-C-ter/4E-YN	-	+	YC-CI/4E-YN	+	-
YC-CI-C-ter/YN-4E	-	-	YC-CI/YN-4E	+	-
Contrôles positifs			Contrôles positifs		
PAE1-YC/YN-HcPro	+	nt	PAE1-YC/YN HcPro	+	nt
YN-TON1/ TON1-YC		+	YN-TON1/TON1-YC	nt	+
Contrôles négatifs			Contrôles négatifs		
4E-YN	nt	-	4E-YN	nt	-
4E-YC	nt	-	4E-YC	nt	-
YC-CI-C-ter	nt	-	YC-CI-C-ter	nt	-
YN-CI-C-ter	nt	-	YN-CI-C-ter	nt	-
YN-CI	nt	-	YN-CI	nt	-

Tableau 15. Tableau récapitulatif des différentes combinaisons de plasmides testées par BIFC. « + » signal YFP positif ; «-» pas de signal YFP; « +? » Signal YFP « douteux »; nt : non testé

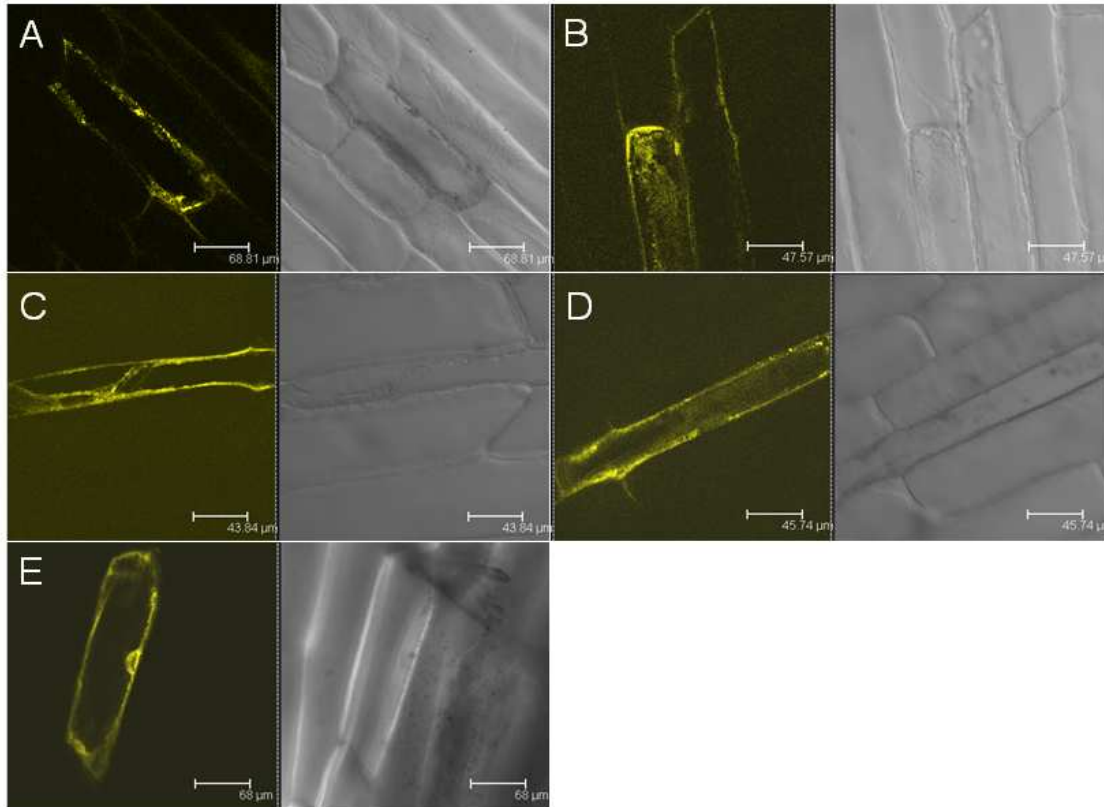


Figure 49. Interactions CI-eIF4E testées par BiFC dans des cellules d'épiderme d'oignon inoculées par biolistique.

Les combinaisons ont été inoculées dans les épidermes d'oignon par biolistique : YN-CI-C-ter/YC-4E (A), YC-CI/YN-4E (B), YC-CI/4E-YN (C), CI-YC/4E-YN (D) et YN-HCPro/PAE1-YC (E) (Contrôle positif).

A gauche : signal de fluorescence ; à droite : lumière transmise. Les signaux de fluorescence ont été observés en microscopie confocale 12 heures après transformation des épidermes d'oignon par biolistique. Les valeurs de barres d'échelle sont : 68,81 μm (A) ; 47,75 μm (B) ; 43,83 μm (C) ; 45,74 μm (D) ; 68 μm (E).

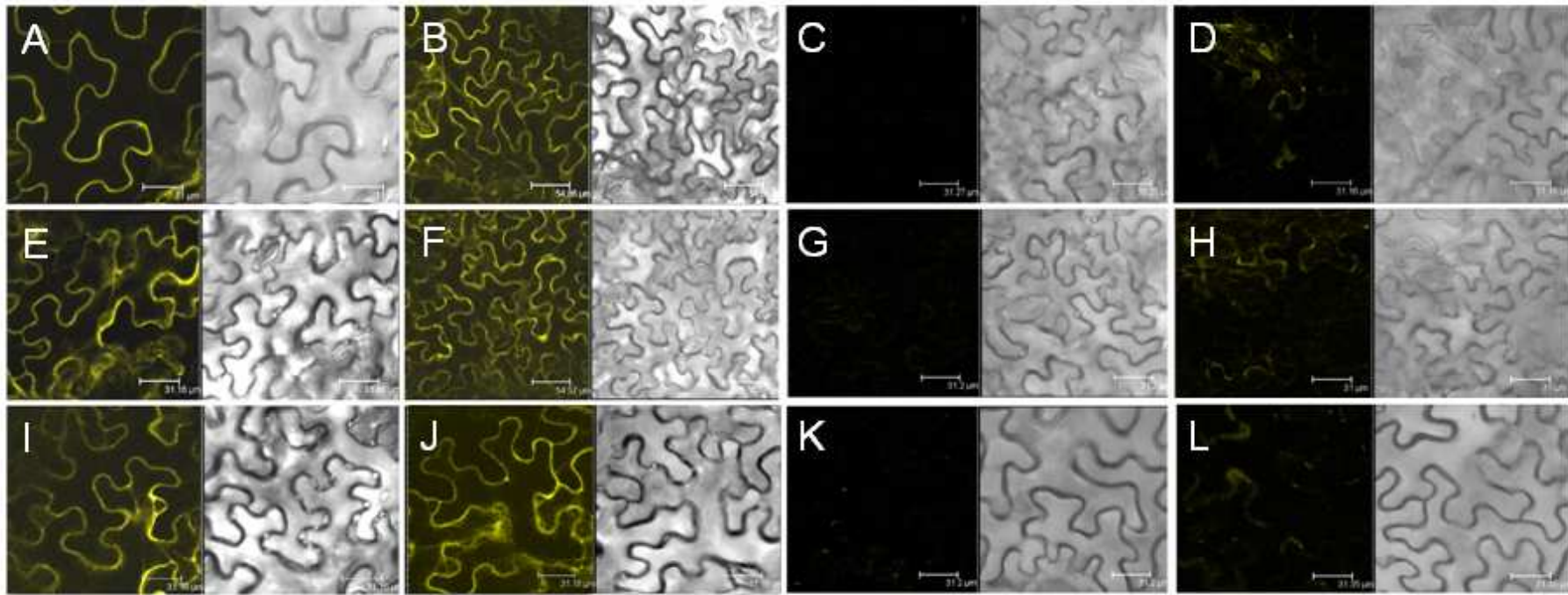


Figure 50. Visualisation des interactions CI-eIF4E par BiFC dans des cellules de *N. benthamiana* par agroinfiltration.

Les combinaisons des deux constructions ont été agroinfiltrées en présence du supresseur de silencing P0 dans de feuilles de *N. benthamiana* 4E-YN/YC-CI-C-ter (A et B), 4E-YC/YN-CI-C-ter (E et F) et YN-TON1/TON1-YC (I et J) (Contrôle positif fourni par S. Vernhette, INRA Versailles).

Contrôles négatifs : YC-CI-C-ter (C et D), 4E-YC (G et H) et P0 (K et L). A gauche : signal de fluorescence ; à droite : lumière transmise.

Les observations ont été faites en microscopie confocale, 2 jours après infiltration. Les photos D, H et L sont représentatives du bruit de fond que l'on peut observer dans certaines zones des feuilles agroinfiltrées, ces bruits de fond étant probablement dus à une réaction nécrotique. Valeurs de barres d'échelle : 31 μ m (A) ; 54,86 μ m (B) ; 31,27 μ m (C) ; 31,16 μ m (D,E) ; 54,57 μ m (F) ; 31,2 μ m (G) ; 31 μ m (H) ; 31,16 μ m (I, J) ; 31,2 μ m (K) ; 31,35 (L).

Publication 2

The C-terminus of Lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion (CI) interacts with the viral VPg and lettuce eIF4E.

(version non définitive)

Roudet-Tavert, G., Abdul-Razzak, A., Walter, J., Doublet, B., Delaunay, T., Michon, T., Le Gall, O.
German-Retana, S. and Candresse, T*.

à soumettre à Journal of Virology

The C-terminus of *Lettuce mosaic potyvirus* cylindrical inclusion (CI) interacts with the viral VPg and lettuce eIF4E.

Roudet-Tavert, G., Abdul-Razzak, A., Walter, J., Doublet, B., Delaunay, T., Michon, T., Le Gall, O. German-Retana, S. and Candresse, T*.

Equipe de Virologie, UMR GDPP 1090, INRA, Université Bordeaux, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France.

Running Title: LMV CI interactions

Key words: Potyvirus, CI helicase, interaction, resistance, eIF4E

Text [intro+M&M+Results+Discussion+Figure legends] : 5876 words

Summary : 157 words

2 Tables and 5 Figures

*: corresponding author.

Phone +33 (0) 557 12 23 89

Fax +33 (0) 557 12 23 89

e-mail: candresse@[bordeaux.inra.fr](mailto:candresse@bordeaux.inra.fr)

ABSTRACT

We previously showed that recessive resistance to *Lettuce mosaic virus* is conferred by the *mol* gene encoding the eukaryotic translation initiation factor (eIF4E) in lettuce and that the C-terminus of the viral cytoplasmic inclusion (CI-C-ter), together with the VPg, is directly involved in the overcoming of *mol* resistance. In this study, recombinant VPg and CI-C-ter proteins encoded by virulent or avirulent LMV isolates, and the three allelic forms of eIF4E, from susceptible or resistant lettuce cultivars, were expressed and purified from *Escherichia coli*. Using ELISA derived assays, we explored possible *in vitro* interactions between the CI-C-ter(s), eIF4E(s), and VPg (s) proteins. Furthermore, we demonstrated for the first time using a bimolecular fluorescence complement assay, that the C-terminus part of LMV CI can interact *in vivo* with the recombinant eIF4E. From our *in vitro* results, we conclude that there is no strict correlation between the CI-C-ter, VPg and eIF4E binding parameters and the biological outcome of the interactions.

INTRODUCTION

The outcome of viral infection is ultimately controlled by molecular interactions between host and viral proteins. Consequently, the understanding of the complex interaction network linking these partners in infected plants cells is crucial to elucidate the coordinated roles of the viral and cellular proteins involved in the infection process. Recent efforts allowed to gain a first vision of this interaction network in the case of members of the *Potyvirus* genus, the largest and most economically important genus of positive, single-stranded RNA plant viruses (Adams *et al.*, 2005, Shukla *et al.*, 1994). As an example, the cellular proteins Hsc70-3 and PABP2 and the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) N1b protein have been proposed to participate to the *Turnip mosaic potyvirus* (TuMV) replication complex (Dufresne *et al.*, 2008). Similarly, although their precise contribution to the viral infection process remains to be established, several chloroplastic proteins (RubisCO, 37kDa, PSI-K, Rieske Fe/S, NtMind, Fd V) have recently been shown to interact with various potyviral proteins including the capsid protein (CP), the CI helicase, the P1 and Helper component proteinase (HCPro) proteins (Feki *et al.*, 2005, McClintock *et al.*, 1998, Jimenez *et al.*, 2006, Shi *et al.*, 2007, Jin *et al.*, 2007, Cheng *et al.*, 2008). In several cases, reduction or abolition of the expression of these cellular proteins affect virus accumulation, thus functionally validating a contribution of these cellular partners to viral invasion of the host (Leonard *et al.*, 2000, Duprat *et al.*, 2002, Lellis *et al.*, 2002). A cell protein, potentially

involved in cellular transcriptional control (“PVIP” for Potyvirus VPg-interacting protein), and two host RNA Helicase-like proteins (“AtRH18”, “PpDDXL”) (Dunoyer *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 2010), were shown to interact with the potyviral Viral genome linked VPg. However, one of the most described plant-potyvirus proteins interaction involves the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) or its isoform eIF(iso)4E, and the potyviral VPg. For several potyviruses, this interaction has been shown to be absolutely required for viral infection, and allelic forms of eIF4E that are unable to interact with the potyviral VPg are recessive resistance gene products (Kang *et al.*, 2005a, Yeam *et al.*, 2007). In many crops species, including pepper, tomato, pea, lettuce, barley and melon, eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), and its isoform eIF(iso)4E are the only recessive resistance genes identified so far (Robaglia & Caranta, 2006, Truniger & Aranda, 2009). Moreover, eIF4G, another component of the eIF4F translation complex, or eIF4F itself, have been shown to interact directly or indirectly with the potyviral VPg (Khan *et al.*, 2006, Michon *et al.*, 2006) and both eIF4E and eIF4G are recruited in a coordinated and selective manner by potyviruses in *Arabidopsis thaliana* (Nicaise *et al.*, 2007). This suggests that initiation factors are required for virus infection and resistance function, opening the route to the investigation and the creation of new durable resistances (Piron *et al.*, 2010).

Furthermore, it was shown that mutations in the VPg of eIF4E-resistance breaking potyviruses, restore the binding with eIF4E protein of the resistance allele, suggesting a coevolutionary arms race between eIF4E and VPg (Charron *et al.*, 2008). To date, the VPg is the main potyviral protein identified as a virulence determinant in eIF4E-mediated resistance overcoming (Ayme *et al.*, 2006). Even if the biological role of the eIF4E/VPg interaction still remains unclear, some *in vivo* and *in vitro* data allowed characterizing this interaction more precisely. Biological (BiFC), immunochemical (ELISA), and spectrophotometrical (fluorescence measurements) approaches led to describe subcellular localisation of the eIF4E/VPg interaction *in planta* (Beauchemin *et al.*, 2007), to map the central domain of VPg as the viral interacting domain (Roudet-Tavert *et al.*, 2007) or to define some biochemical quantitative parameters, of the eIF4E/VPg interaction (Khan *et al.*, 2006, Michon *et al.*, 2006).

A salient feature of members of the family *Potviridae* is the accumulation in infected host cells of laminate cytoplasmic inclusion bodies called “pinwheels” (Edwardson, 1992), formed by the so-called cylindrical inclusion (CI) protein. As most other potyviral proteins, the CI is a multifunctional protein. Structural and genetic evidence have unambiguously shown its involvement in viral cell-to-cell movement (Roberts *et al.*, 1998, Carrington *et al.*,

1998, Wei *et al.*, 2010b, Gomez de Cedron *et al.*, 2006) while its RNA-binding, RNA helicase, and ATPase activities established its role in viral replication (Fernandez *et al.*, 1995, Merits *et al.*, 1998, Fernandez *et al.*, 1997). Beside its self-interaction (Lopez *et al.*, 2001), the CI has been described as binding to other viral proteins in yeast two-hybrid (YTH) screens or overlay assays, including HCPro (Guo *et al.*, 2001) P1 and P3 proteins (Merits *et al.*, 1999), confirming previous microscopy observations in the last two cases (Arbatova *et al.*, 1998, Rodriguezcerezo *et al.*, 1993). The CP of several potyviruses has been shown to be associated with CI in both pinwheels and in plasmodesmata (RodriguezCerezo *et al.*, 1997), and CI of *Potato virus A* (PVA) copurified with isolated virus particles (Gabrenaite-Verkhovskaya *et al.*, 2008), further reinforcing the evidence for the existence of CI-CP interactions. A few cellular CI-interacting proteins have been identified (Bilgin *et al.*, 2003, Jimenez *et al.*, 2006), and the TuMV and *Soybean mosaic virus* (SMV) CIs have been shown to be the viral targets recognized by dominant resistance genes (Jenner *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2009). All these results suggest that the potyviral CI protein is very likely an important player in the plant-potyvirus interaction network.

Previous studies have shown that eIF4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus* (LMV) (Nicaise *et al.*, 2003). Indeed, the widely used *mol*¹ and *mol*² natural resistance alleles of the *mol* gene, correspond to mutant allelic forms of eIF4E and, depending on the particular LMV isolate, confer either a true resistance phenotype (absence of detectable virus accumulation in inoculated plants) or a tolerance phenotype (lack of symptoms and sporadic accumulation). As for other potyviruses, the VPg of LMV interacts with the lettuce eIF4E *in vitro* and *in vivo* (Michon *et al.*, 2006, Roudet-Tavert *et al.*, 2007) (S. German-Retana, personal communication). However, using *in vitro* fluorescence spectroscopy assays, the VPg of non-resistance breaking isolate was shown to bind with similar affinity to susceptible eIF4E allelic form (eIF4E⁰) and resistance forms (eIF4E¹ or eIF4E²) (Michon *et al.*, manuscript in preparation). Furthermore, reverse genetic studies have shown that LMV eIF4E-resistance-breaking in lettuce is more complex than for other plant-potyvirus pathosystems: two virulent determinant (VPg and CI-C-ter regions) are able to confer independently the ability to overcome the eIF4E-mediated resistance (Abdul-Razzak *et al.*, 2009). Mutations in the VPg allow only the overcoming of *mol*¹ but mutations in the C-terminal part of the CI helicase confer the ability to overcome both resistance alleles, demonstrating for the first time a role of the CI in the eIF4E-mediated resistance system. In

particular, a point mutation at position 621 of the CI, changing a serine to a threonine, was shown to be sufficient to allow both *mol*¹ and *mol*²-overcoming (Abdul-Razzak et al., 2009).

In the present study, the potential interactions between the CI helicase and the viral VPg and cellular eIF4E partners were investigated. For each partner protein, various allelic forms (resistance-breaking or non resistance-breaking for viral proteins, susceptibility- or resistance-conferring for cellular proteins) were expressed and purified from *E. coli* as recombinant histidine-tagged fusion proteins and their interactions analysed *in vitro* in ELISA-derived assays. Furthermore, in by using a BiFC approach, the binding of the CI helicase with eIF4E factor was checked *in vivo*. Our results demonstrate that the C-terminal end of the CI helicase involved in resistance-breaking is able to interact with both VPg and lettuce eIF4E, *in vitro* and *in vivo*.

MATERIAL AND METHODS

Expression and purification of lettuce eIF4E and LMV-VPg in *Escherichia coli*

Each of the three allelic forms of eIF4E isolated from *mol*¹ and *mol*² resistant lettuce (eIF4E¹ and eIF4E²) and from *mol*⁰ susceptible lettuce (eIF4E⁰) were expressed and purified from *E. coli*, as poly(his)fusion, via Gateway technology (Invitrogen) as described previously (German-Retana *et al.*, 2008b). The coding sequence of the VPg derived from LMV-0 (VPg-0) and LMV-E (VPg-E) were cloned into the pTrcHis-C expression vector (Invitrogen) in-frame with an N-terminal histidine tag, according to the manufacturer's instructions. Both VPg recombinant proteins were purified as previously described in (Michon *et al.*, 2006). When required, an extra polishing step was performed: VPgs samples eluted from the Nickel affinity resin were loaded onto a superose 12 size exclusion column (GE Healthcare) to remove any contaminant protein species. Recombinant proteins were further analyzed by 15% SDS-PAGE, and fractions containing pure VPg were pooled and concentrated before use.

Expression and purification of LMV CI-C-ter proteins in *Escherichia coli*

The cDNAs encoding the C-terminus of the CI protein (nt 5192 to nt 6007 in the LMV genome) derived from LMV-0, from LMV-E, and from the mutants LMV-0S621T and LMV-E-T621S (Abdul-Razzak *et al.*, 2009) were PCR amplified using the primers 0.5192p (5' CAC CAT GGG GAC GGA AGA AAT ACC 3') and 0.6007m (5' TCA TTG GTG ATA

AAT GAC ATC GAT GC 3') and cloned into pENTR/D-TOPO® vector (Invitrogen). Using the Gateway® Technology (Invitrogen), the coding regions of each protein were transferred from pENTR/D-TOPO® into the pDEST™17 destination vector (Invitrogen), to allow production of N-terminal fusions harbouring a 6xHis tag. The recombinant vectors were introduced into *Escherichia coli* (strain BL21-AI) for protein expression. Bacteria were grown at 37°C in 1 L LB medium containing 100 µg/mL ampicilin. When the exponential phase was reached, the protein expression was induced by addition of 0.2% arabinose during 4 hours at 37°C. All subsequent steps were performed at 4°C. Cells were pelleted and suspended in 50 mL of extraction buffer TEX (50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X100, pH 8). One tablet of cocktail inhibitors (Roch) and 1 mg/mL Lysozyme were added to the cell suspension. After 30 min incubation under gentle shaking the sample was sonicated on ice for 5 minutes (0.4 s/pulsations). Inclusion bodies were spun down at 10 000 g for 30 min. The supernatant was discarded and 10 mL of solubilization buffer SB (8 M Urea, 20 mM MOPS, 1 mM DTT, pH 7.2) was added to the pellet. The pellet was solubilized by gently shaking overnight. The insoluble material was removed at 10000 g for 30 min. 2 mL of Ni NTA beads (Qiagen) were equilibrated in washing buffer WB (SB, 10 mM imidazol) and gently mixed with the protein extract during 5 minutes. The beads suspension was packed in a chromatography column and washed with 25 mL of WB. The proteins were eluted by 3 successive additions of 1 mL of EB (20 mM MOPS, 1 mM DTT, 500 mM imidazol, pH 7.2). In the eluted fractions, the presence of His-tagged CI proteins was checked by SDS-PAGE and western blot using monoclonal anti-CI antibodies (see production below).

Production of specific monoclonal antibodies directed against the CI-C-ter protein

Balb/c mice were immunized with 50µg of recombinant CI (C-ter domain of the CI of LMV-0, purified as below, and previously controlled by mass spectrophotometry). The mAbs were obtained by cell fusion, the screening of the hybridom cells was performed by direct ELISA experiments: purified antigenic protein CI-C-ter domain (4µg/ml) or CI-C-ter-induced bacterial lysate extract was coated into the wells (25µl diluted ½ in ELISA carbonate buffer, overnight 4°C), following by a saturation step (Fetal Bovine Serum : FBS 10% PBS, 30 minutes at room temperature). The tissue culture supernatants (25µl diluted ½ in PBS Tween 0.2% FBS 0.2%, 1 h 37°C) were added. Specific antigenic complexes were detected by using alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (Sigma). The 2A7-8 hybridom cell was finally selected, the 2A7 mAbs purified and tested further by

Western blot and ELISA assays, for their specificity and polyvalence, and then used in the ELISA binding assays.

ELISA-derived binding assays

An ELISA-derived interaction assay was used as previously described (Clark & Adams, 1977, Roudet-Tavert et al., 2007), and performed as following. A 96-well microtiter plate was coated with eIF4E or CI-C-ter fusion protein (4 µg/ml or dilutions starting from 1µg/ml) at 4°C overnight. After washing 3 times with PBS Tween and blocking with Fetal Bovine Serum (FBS) (10% in PBS) at room temperature for 30 minutes, 100 µl of recombinant purified eIF4E, CI-C-ter, or VPg proteins was allowed to bind to immobilized proteins at 4°C for 1 hour (8µg/ml or serial dilutions starting from 0.25 µg/ml). The protein complexes were detected by using specific polyclonal antibodies directed against lettuce eIF4E (pAb38) (1/1000) (Roudet-Tavert et al., 2007), specific monoclonal antibodies directed against LMV-VPg (mAb 1H5) (5µg/ml) (Roudet-Tavert et al., 2007) or against LMV-CI-C-ter (mAb 2A7) (5µg/ml) (this work), following by anti-mouse and anti-rabbit alkaline phosphatase conjugates (SIGMA 1/3000). For several sets of measurements, it was possible to fit an estimated dissociation constants to the experimental data as described (Michon et al., 2006).

All the proteins (except coated proteins that were diluted in standard ELISA Carbonate buffer) and the antibodies (primary and secondary) were diluted in PBS containing 0.2% Tween 20 and 0.2% FBS. In experiments using CI-C-ter as a prey, at the interaction step level, PBS buffer containing 100mM (instead of standard 150mM) NaCl was used. In some experiments, the mGFP (modified Green Fluorescent Protein) protein was used as a control. Such a mGFP was expressed as poly(his) fusion protein and purified from *E.coli* as described (Dielen et al., 2010b).

BiFC assay

Lettuce eIF4E⁰ and LMV-0 CI C-terminal coding sequences cloned in pENTR/D-TOPO® (Invitrogen), were individually recombined using the Gateway® system into each of the four pBiFP vectors, pBiFP1, pBiFP2, pBiFP3 and pBiFP4 (Azimzadeh et al., 2008). In the final expression vectors, the coding sequences are cloned in fusion with the N- and C-terminal parts of YFP, either as N-terminal or C-terminal fusions, under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. All BiFC constructs were confirmed by sequencing. For

fluorescence complementation tests, all eight compatible combinations between protein pairs (i.e., providing both parts of the YFP) were assayed in transient expression by agroinfiltration. Agroinfiltration into *N. benthamiana* was performed as described previously (Nicaise et al., 2007). Briefly, *Agrobacterium* strain C58C1 (pMP90) was transformed with each of the constructed clones by electroporation. *Agrobacteria* harbouring each clone were grown at 28 °C overnight. The cultures were harvested by centrifugation, resuspended in infiltration medium [10 mM MgCl₂, 150 mM Acetosyringone, 10 mM 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid (MES)] at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) = 0.5. *Agrobacterium* cultures were mixed in pairwise combinations together with *agrobacteria* harbouring a plasmid expressing the P0 silencing suppressor of *Beet western yellows polerovirus* (Pfeffer et al., 2002) and infiltrated onto the abaxial surface of leaves. P0 was used to enhance the ectopic expression of heterologous genes. YFP fluorescence was detected 2 days after infiltration using a Leica TCS SP2 confocal microscope with 10X and 20X dry objectives, and the LCS Lite Leica software. The YFP fluorescence was assessed with excitation at 514 nm using an argon laser, with an emission band of 525 to 600 nm.

RESULTS

The C-terminal portion of LMV CI binds *in vitro* to lettuce eIF4E

The *in vitro* binding of the C-terminal region of LMV-CI (amino acid 372 to 643 according to CI amino acid sequence) thereafter referred as CI-C-ter, to the lettuce eIF4E was first investigated. In order to evaluate a possible interaction in a plant-virus compatibility situation, the CI-C-ter protein was derived from the common, non resistance-breaking LMV-0 isolate (CI-0-Cter) while the eIF4E⁰ used was encoded by the lettuce susceptibility allele *moI*⁰. Both viral and cellular proteins were produced as recombinant fusion proteins in *E. coli* and purified to near homogeneity as described in Materials and Methods. The interaction between the two proteins was investigated using a two-site ELISA assay in which the bait protein is first immobilized into the wells of ELISA plates and the binding of the prey interacting protein revealed using specific antibodies as described in Materials and methods. After checking the specificity of the conjugates (see titration data of immobilized baits in Supplementary Fig 1a), both orientations of the assay (immobilization of either the CI-C-ter or eIF4E in the wells) were evaluated. Several control treatments were systematically performed, including either omitting the immobilized bait or replacing it by the purified *Aequorea victoria* green fluorescent protein (GFP) or omitting the interacting prey protein.

The results obtained are shown in Table 1. As indicated by the measurement of the OD values performed at 405 nm (A_{405}) a significant binding of the second partner (prey) was observed, irrespective of whether CI-0-Cter or eIF4E⁰ was used as the immobilized bait. All control assays (Supplemental Figure 1A and Table 1), in which one or the other of the partner proteins was omitted or replaced by GFP, gave no significant A_{405} values, indicating that the interaction signal detected is a specific one. The CI-C-ter/eIF4E interaction was then shown to be dose-dependent since the A_{405} values obtained for CI-C-ter or eIF4E binding increased as a function of increasing concentrations of the prey interactant, irrespective of which partner was used as the immobilized bait (Figure 1). Such an experiment was repeated and gave comparable results. These ELISA reliable binding assays were then used to assess whether the detected interaction was affected by the identity of the allelic forms of eIF4E and CI-C-ter proteins.

Impact of allelic variations on the binding of the C-terminal portion of LMV CI to lettuce eIF4E forms

The viral CI-C-ter proteins derived from either the non-resistance breaking LMV-0 or resistance-breaking LMV-E isolates were compared in their ability to bind to each of the three allelic forms of eIF4E, from susceptible (eIF4E⁰) or resistant lettuce (eIF4E¹ and eIF4E²). Titrations of the coated proteins were assessed using specific antibodies followed by anti-rabbit or anti-mouse antibodies conjugated to alkaline phosphatase. Supplementary Figure 1A shows that the amounts of coated protein were equivalent for all proteins.

Figure 2A shows the results of an ELISA assay representative of at least 3 independent experiments and indicates that a significant interaction was detected in all assayed combinations, irrespective of the allelic form of the CI-C-ter or eIF4E being evaluated, or of whether CI-C-ter or eIF4E was used as the immobilized bait. Indeed, the CI-C-ter from LMV-0 (CI-0) and the CI-C-ter from LMV-E (CI-E) proteins significantly bound to all three allelic eIF4E forms. However, despite the fact that similar amounts of CI-0 and CI-E were used, as indicated by titration assays, the A_{405} values measured with CI-0 (white bars) were systematically lower than those observed with CI-E (grey bars). In addition, the signal obtained with CI-0 / eIF4E⁰ interactions was lower than those obtained when either eIF4E¹ or eIF4E² were used. Both effects were reproducible and observed irrespective of whether CI-C-ter or eIF4E was used as the immobilized bait. Concerning the CI-E, no clear or reproducible differences were observed in binding between the different eIF4E allelic forms.

To further evaluate the differences in binding observed for CI-0 between the susceptibility form eIF4E⁰ and the resistance forms eIF4E¹ or eIF4E², the binding signal observed in the presence of varying concentrations of the various eIF4E forms was evaluated.

Figure 2B shows that the binding curve for eIF4E⁰ is significantly lower than those obtained with either eIF4E¹ or eIF4E². This result was reproducible and quantitative analysis from these ELISA data could be performed, allowing to estimate the dissociation constant of the CI/eIF4E⁰ binding to 0.2 μM. Concerning the binding to eIF4E¹ and eIF4E², the affinity was reproducibly found significantly higher (K_d = 0.01 to 0.1 μM). Thus, these data confirm the results obtained before, using fixed concentrations of the three proteins. Similar experiments performed in parallel using CI-E, did not show any significant differences in the binding between the various eIF4E forms, with essentially superposable curves (see Supplemental Figure 2A and 2B) with an evaluated K_d = 0.024 to 0.08 for the four curves. Again, these results are in accordance with the data shown in Figure 2A, obtained with fixed protein concentrations. It therefore appears that the CI from the non-resistance breaking LMV-0 isolate shows lower affinity for the eIF4E factor from susceptible lettuce cultivar and, more generally, that it binds less efficiently to all forms of eIF4E than the CI from the resistance-breaking LMV-E isolate.

Mutations at position 621 in the C-terminal portion of LMV-0 or LMV-E CI do not significantly affect their eIF4E binding *in vitro*

We previously showed that site-directed mutagenesis of the CI-C-ter protein at position 621 was sufficient to affect, in a reciprocal manner, the infection phenotype of the parental viruses LMV-0 and LMV-E, in plants carrying both resistance allele. The S621T point mutation in LMV-0 was sufficient to confer resistance-breaking properties to LMV-0 and conversely, the T621S mutation in LMV-E abolished LMV-E infectivity in resistant lettuce. We therefore investigated whether mutations at this position would affect the eIF4E-binding properties of the CI-C-ter from LMV-0 and LMV-E derived mutants.

Mutant forms of CI-C-ter from LMV-0-S621T and LMV-E-T621S were expressed in *E. coli* and purified using the same purification procedure as described for the wild type CI-0-Cter and CI-E-Cter. The ability of each mutant form CI-0-S621T and CI-E-T621S, to bind to eIF4E⁰ was then compared to that of their wild type counterparts. As shown in Figure 3, both mutated forms were able to interact with eIF4E⁰, and no significant difference was observed

compared to the wild-type proteins, indicating that the point mutations introduced at position 621 do not significantly affect the *in vitro* eIF4E-binding properties of the CI-C-ter forms studied. Similar binding experiments were conducted in parallel using the eIF4E¹ and eIF4E² forms (see Supplemental Figure 3). The results obtained indicate that similar to the binding to eIF4E⁰, the CI-C-ter binding to the two resistance allelic forms of eIF4E is not affected by mutations at position 621.

The C-terminal portion of LMV-0 CI binds *in planta* to lettuce eIF4E⁰

To test whether lettuce eIF4E⁰ and LMV CI-0-Cter are able to interact *in vivo*, we performed bimolecular fluorescence complementation (BiFC) (Bracha-Drori *et al.*, 2004, Walter *et al.*, 2004), as described in Materials and methods. In this system, the N-terminal and the C-terminal fragments of YFP were both fused to the N terminus and C terminus of the coding sequences of lettuce eIF4E, and LMV CI-C-ter. Bait and prey association brings YFP fragments together and drives reassembly of an active fluorescent protein, providing a direct readout of the interaction *in vivo*. Combinations of chimeric genes expressed from the cauliflower mosaic virus 35S promoter were transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves using *Agrobacterium* infiltration. A total of three independent BiFC experiments were performed to check eIF4E / CI-C-ter interactions *in vivo*. Two out of eight combinations eIF4E/CI-C-ter gave a positive signal (YFP fluorescence in the cytoplasm), as shown in Figure 4. A fluorescent signal was observed for 4E-YN / YC-CI-C-ter and 4E-YC / YN-CI-C-ter combination (Figure 4 A-D), while no signal (or in some cases a very light background signal distinguishable from the one observed in panels A-D) was detected by expression of either 4E-YN, 4E-YC, YC-CI-C-ter or YN-CI-C-ter alone (Figure 4 E and F, Supplemental Figure 4 C and F). In addition to those negative controls, a BiFC experiment was performed, where the following combinations were checked: 4E-YN / 4E-YC and YC-Cter / YN-Cter. No fluorescence signal was recovered in these experiments, except sometimes the background shown in Supplemental Figure 4, contrarily to the combination 4E-YN / YC-CI-C-ter in the same conditions. Taken together, these results show that eIF4E is able to physically interact with LMV CI-C-ter in the cytoplasm of tobacco cells.

The C-terminal portion of LMV CI binds to the viral VPg *in vitro*

The VPg from LMV-0 and LMV-E were expressed in *E. coli* and purified to near homogeneity as poly-Histidine fusions proteins. Potential interactions between LMV CI-C-ter and VPg were then evaluated in ELISA-based assays using the same experimental setup used above to investigate CI-C-ter/eIF4E interactions. Erratic and irreproducible results were obtained when the VPg was used as the immobilized bait and this test format was therefore discarded (Results not shown). However, when the CI-C-ter protein from LMV-0 was used as the bait, significant and reproducible binding signals were obtained, as illustrated in Table 2.

As for the CI-C-ter/eIF4E, the CI-C-ter/VPg interaction detected was specific as no signal was obtained when either of the protein partners was omitted or replaced by GFP used as a control protein (Table 2). In homologous assays, in which the binding of the VPg of a given virus isolate was assayed with the CI-C-ter derived from the same isolate, the interaction was observed irrespective of the isolate origin of the CI-C-ter used. However, in parallel assays using titrated amounts of the two proteins, (see supplemental Figure 1A), when the CI-E was used as the immobilized bait, a reproducibly higher A_{205} signal was obtained compared to the signals observed for CI-0 interactions, indicating that CI-E binds more efficiently to its homologous VPg-E in our assays (see Supplemental Figure 5).

Experiments were then performed to evaluate whether this difference in binding might be caused by differences in the CI-C-ter or in the VPg binding properties. The results obtained indicate that the VPg proteins from LMV-0 and LMV-E differed in their ability to bind to the CI-C-ter from both viruses. The CI-0 (Figure 5A) or CI-E (Figure 5 B) was immobilized as bait in the microplates and the binding of increasing concentrations of the two VPg proteins was measured. Essentially similar binding curves were obtained with the CI-0 and the CI-E, the LMV-0 VPg always showing a weaker signal than that of LMV-E (Figures 5A and 5B). We therefore conclude that the lower CI-0/VPg-0 interaction observed, as compared to the CI-E/VPg-E was due to the lower binding of the VPg-0 and not to differences in the binding properties of the two assayed CI-C-ter proteins.

DISCUSSION

In this study we focused our efforts on the functional analysis of potyvirus interactions with the translation initiation factor eIF4E, which we had previously identified as the product of the durable *mol* recessive LMV resistance gene in lettuce and as a general key player in plant-potyvirus interactions (Nicaise et al., 2007, German-Retana et al., 2008b, Truniger & Aranda, 2009). In particular, we focused on the analysis of the complex protein interaction

network involving eIF4E in LMV-Lettuce pathosystem. Besides the initially identified partners, eIF4E and the viral VPg (Roudet-Tavert et al., 2007, Michon et al., 2006), the two-sites ELISA-based assays conducted in this study, allowed us to demonstrate for the first time an additional physical interaction between the C-terminal portion of LMV CI (aa 372 to 643 in the CI sequence) and the lettuce eIF4E. This interaction was further confirmed *in vivo* in the cytoplasm of tobacco cells, using BiFC assays. This later result is in line with our previous biological assays demonstrating the involvement of the LMV CI-C-ter domain in *mol* resistance breaking (Abdul-Razzak et al., 2009).

We further showed that, whatever the eIF4E/CI combination considered (CI from virulent or avirulent virus and eIF4E from susceptible or resistant lettuce), a significant interaction was always observed between the two recombinant proteins. Interestingly, the CI protein from the non overcoming resistance strain (CI-0) was able to strongly interact not only with the eIF4E factor from susceptible lettuce (eIF4E⁰) but also from resistant cultivars (eIF4E^{1,2}). It seems that the natural QGA deletion at positions 108 to 110 in eIF4E¹, or the A-to-P substitution at position 70 in eIF4E² sequences which confer resistance to lettuce (Nicaise et al., 2003), did not impede the physical interaction with CI in our *in vitro* assays. Although the resistance phenotypes of lettuce cultivars bearing eIF4E¹ and eIF4E² are different, leading to resistance and tolerance respectively to LMV, in our experimental conditions, no significant difference between eIF4E¹ and eIF4E² / CI bindings was observed. Furthermore, although the point mutation S621T in CI-0 was crucial to restore the virulence of LMV-0 in resistant lettuce and the reciprocal substitution T621S sufficient to abolish LMV-E virulence, our *in vitro* ELISA binding assays clearly showed that the mutant forms behaved like the wild-type ones. Remarkably, these mutations do not seem to affect the interaction network or the interaction parameters we have been able to measure so far. Therefore, eIF4E-mediated resistance efficiency in lettuce does not strictly correlate with a physical interaction between the lettuce factor and the viral CI.

Importantly, we noticed a stronger interaction signal between CI-0 and the mutated alleles of eIF4E. Potyviral proteins are multifunctional and are likely to fulfil sequential functions within the viral cycle. In resistant hosts, reinforced interactions between eIF4E and CI might prevent its availability, and consequently, one could expect that mutations in CI allowing resistance breaking would induce a weakening of eIF4E⁰ binding. This hypothesis seems excluded since in our experiments, the eIF4E/binding-including eIF4E⁰ were reinforced with CI-E compared to CI-0 and the CI-E/eIF4E binding strength is similar for the three eIF4E isoforms.

We also previously demonstrated that lettuce eIF4E interacts with a short helical central domain of the VPg (Roudet-Tavert et al., 2007) and the VPg-eIF4E interaction was confirmed using BiFC *in vivo* (German-Retana personal communication). The experiments presented in this study, showed that the C-terminal portion of LMV CI is able to interact *in vitro* with VPg. The interactions between the LMV-0 CI and VPg proteins were weaker than the interactions observed between their LMV-E homologs. Cross tests (VPg-0/CI-E and CI-0/VPg-E) showed that these differences were linked to VPg properties. Globally the eIF4E-interacting network involving CI and VPg is strengthened in the case of LMV-E. This could suggest an interaction threshold necessary to insure the infection process in resistant lettuces. However a clear correlation between the interaction parameters linking eIF4E, VPg, and CI and the biological outcome of a particular LMV-lettuce interaction is missing. Each of the three proteins can bind to each other. A thermodynamic analysis is in progress to precise if the network processes through exclusive binary interactions, or if a ternary complex involving CI, VPg and eIF4E can be formed.

Interactions involved in the lettuce-LMV pathosystem are therefore more complex than those reported in other plant-potyvirus pathosystems, where the VPg has been shown to be mainly responsible for overcoming eIF4E-mediated resistances (Ayme et al., 2006, Charron et al., 2008, Kang et al., 2005a, Bruun-Rasmussen *et al.*, 2007) with the exception of the P1 of *Clover yellow vein virus* (CLYVV) very recently shown to be involved in the breaking of eIF4E-mediated resistance in pea (Nakahara *et al.*, 2010).

Through its interaction with VPg and CI, eIF4E might be involved in the control of the successive fates encountered by the viral RNA, such as replication, intracellular and cell-to-cell trafficking.

Increasing evidence that potyviruses utilize and modify the endomembrane system of the cell and plasmodesmata for their replication and cell-to-cell movement have been provided recently (Laliberte & Sanfacon, 2010, Wei & Wang, 2008, Cotton *et al.*, 2009). Indeed, in *N. Benthamiana* TuMV infected cells, the viral proteins VPg-Pro, RNA-dependent RNA polymerase, and CI helicase and host translation factors (including eIF4E) were found to be associated with 6K vesicles that associate with chloroplasts, suggesting that these chloroplast-bound 6K vesicles are the site for potyvirus translation and replication (Cotton et al., 2009, Wei *et al.*, 2010a). The VPg of *Potato virus A* potyvirus was found to be uridylylated by the viral RNA dependant RNA polymerase (RdRp) NIb (Puustinen & Makinen, 2004). By analogy to picornaviruses it has been proposed that the positioning of the VPg uridylylated form at the 3' polyadenylated end of viral positive RNA strand may serve as a

primer for genome replication (Puustinen & Makinen, 2004). To date, no function has been assigned to the C-terminal region of the CI, although it is a prominent feature of the potyviral CI, extending beyond the conserved domains including the RNA helicase activity reported in the N-terminal part of PPV-CI (aa 1-aa 473) (Fernandez et al., 1995). During replication this function is likely to unwind secondary structures ahead from RdRp. We demonstrated here that the CI C-terminal domain interacts specifically with VPg. An interaction with the “priming VPg” could position CI in front of the RdRp replication complex allowing the RNA linearization required for the negative strand synthesis.

Through its interaction with VPg and CI, eIF4E might be also involved in the control of the cell-to-cell trafficking. In pea and pepper, eIF4E assists potyvirus cell-to-cell movement (Gao *et al.*, 2004b, Arroyo *et al.*, 1996). In *mol²* lettuce, grafting experiments showed that while the systemic movement of LMV is severely impaired, neither phloem loading nor phloem unloading is completely inhibited, while cell to cell movement is delayed (German-Retana *et al.*, 2003, German-Retana *et al.*, 2008a).

Potyvirus cell-to-cell movement involves several viral proteins. Among them is the CI protein where a combination of ultra-structural analyses and genetic data strongly suggest that it interacts directly with plasmodesmata and ribonucleoprotein complexes to facilitate cell-to-cell movement (Gomez de Cedron et al., 2006, Carrington et al., 1998). Furthermore, the recently discovered potyviral P3N-PIPO protein was shown to interact *in vivo* with the CI and this complex would coordinate the formation of plasmodesmata-associated conical structures that would facilitate the intercellular movement of potyviruses in infected plants (Wei et al., 2010b, Wen & Hajimorad, 2010). Furthermore, Torrance et al (Torrance *et al.*, 2006) showed that some of the particles of PVY and PVA potyviruses contain a protruding tip at one end of the virus particles, which is presumably associated with the 5'-end of viral RNA and that contains the viral VPg and HcPro. One could hypothesize that VPg interacts with host factors, possibly eIF4E, PVIP and the CI to facilitate cell-to-cell movement; or with eIF4E and host factors such as PABP to initiate uncoating and translation of viral RNA.

Taking together, our *in vitro* binding results complete previous genetical, biochemical and ultrastructural studies, suggesting that the C-terminal domain of the LMV CI protein could be involved in a large interaction network of viral and cellular proteins, including plant translation initiation factors, viral VPg, HcPro, and possibly P1 and P3 (Guo et al., 2001, Gao et al., 2004b, Merits et al., 1998, Nakahara et al., 2010, Wei et al., 2010b).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by grants from the French National Agency for Research (Poty4E, reference ANR-05-BLAN-0302-01) and GENOPLANTE (Transvir GNP05003G). AAR was supported by a fellowship from the Syrian Ministry of Higher Education. We thank Thierry Mauduit and Marylin Roncoroni for taking care of the plants.

REFERENCES

1. **Abdul-Razzak, A., T. Guiraud, M. Peypelut, J. Walter, M. C. Houvenaghel, T. Candresse, O. Gall, and S. German-Retana.** 2009. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. *Molecular Plant Pathology* **10**:109-113.
2. **Adams, M. J., J. F. Antoniw, and F. Beaudoin.** 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology* **6**:471-487.
3. **Arbatova, J., K. Lehto, E. Pehu, and T. Pehu.** 1998. Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *Journal of General Virology* **79**:2319-2323.
4. **Arroyo, R., M. J. Soto, J. M. MartinezZapater, and F. Ponz.** 1996. Impaired cell-to-cell movement of potato virus Y in pepper plants carrying the y(a)(pr2(1)) resistance gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**:314-318.
5. **Ayme, V., S. Souche, C. Caranta, M. Jacquemond, J. Chadoeuf, A. Palloix, and B. Moury.** 2006. Different mutations in the genome-linked protein VPg of Potato virus Y confer virulence on the pvr2(3) resistance in pepper. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**:557-563.
6. **Azimzadeh, J., P. Nacry, A. Christodoulidou, S. Drevensek, C. Camilleri, N. Amiour, F. Parcy, M. Pastuglia, and D. Bouchez.** 2008. Arabidopsis TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* **20**:2146-2159.
7. **Beauchemin, C., N. Boutet, and J. F. Laliberte.** 2007. Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of Turnip mosaic virus, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta. *Journal of Virology* **81**:775-782.
8. **Bilgin, D. D., Y. Liu, M. Schiff, and S. P. Dinesh-Kumar.** 2003. P58(IPK), a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Developmental Cell* **4**:651-661.
9. **Bracha-Drori, K., K. Shichrur, A. Katz, M. Oliva, R. Angelovici, S. Yalovsky, and N. Ohad.** 2004. Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal* **40**:419-427.
10. **Bruun-Rasmussen, M., I. S. Moller, G. Tulinius, J. K. Hansen, O. S. Lund, and I. E. Johansen.** 2007. The same allele of translation initiation factor 4E mediates

- resistance against two Potyvirus spp. in *Pisum sativum*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**:1075-82.
11. **Carrington, J. C., P. E. Jensen, and M. C. Schaad.** 1998. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal* **14**:393-400.
 12. **Charron, C., M. Nicolai, J. L. Gallois, C. Robaglia, B. T. Moury, A. Palloix, and C. Caranta.** 2008. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant Journal* **54**:56-68.
 13. **Cheng, Y. Q., Z. M. Liu, J. Xu, T. Zhou, M. Wang, Y. T. Chen, H. F. Li, and Z. F. Fan.** 2008. HC-Pro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. *Journal of General Virology* **89**:2046-2054.
 14. **Clark, M. F., and A. N. Adams.** 1977. Characteristics of Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Plant-Viruses. *Journal of General Virology* **34**:475-483.
 15. **Cotton, S., R. Grangeon, K. Thivierge, I. Mathieu, C. Ide, T. Y. Wei, A. M. Wang, and J. F. Laliberte.** 2009. Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *Journal of Virology* **83**:10460-10471.
 16. **Dielen, A. S., F. T. Sasaki, J. Walter, T. Michon, G. MÉNard, G. Pagny, R. Krause-Sakate, I. D. G. Maia, S. Badaoui, O. Le Gall, T. Candresse, and S. German-Retana.** 2010. The 20S proteasome $\alpha 5$ subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the Lettuce mosaic potyvirus HcPro protein.
 17. **Dufresne, P. J., K. Thivierge, S. Cotton, C. Beauchemin, C. Ide, E. Ubalijoro, J. F. Laliberte, and M. G. Fortin.** 2008. Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology* **374**:217-227.
 18. **Dunoyer, P., C. Thomas, S. Harrison, F. Revers, and A. Maule.** 2004. A cysteine-rich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *Journal of Virology* **78**:2301-2309.
 19. **Duprat, A., C. Caranta, F. Revers, B. Menand, K. S. Browning, and C. Robaglia.** 2002. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant Journal* **32**:927-934.
 20. **Edwardson, J. R.** 1992. Inclusion-Bodies. *Archives of Virology*:25-30.
 21. **Feki, S., M. J. Loukili, R. Triki-Marrakchi, G. Karimova, I. Old, H. Ounouna, A. Nato, F. Nato, J. L. Guesdon, P. Lafaye, and A. B. Elgaaied.** 2005. Interaction between tobacco ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (RubisCO-LSU) and the PVY coat protein (PVY-CP). *European Journal of Plant Pathology* **112**:221-234.
 22. **Fernandez, A., H. S. Guo, P. Saenz, L. SimonBuela, M. G. deCedron, and J. A. Garcia.** 1997. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Research* **25**:4474-4480.
 23. **Fernandez, A., S. Lain, and J. A. Garcia.** 1995. Rna Helicase Activity of the Plum Pox Potyvirus CI Protein Expressed in *Escherichia-Coli* - Mapping of an Rna-Binding Domain. *Nucleic Acids Research* **23**:1327-1332.
 24. **Gabrenaite-Verkhovskaya, R., I. A. Andreev, N. O. Kalinina, L. Torrance, M. E. Taliansky, and K. Mäkinen.** 2008. Cylindrical inclusion protein of potato virus A is associated with a subpopulation of particles isolated from infected plants. *J Gen Virol* **89**:829-38.

25. **Gao, Z. H., E. Johansen, S. Eyers, C. L. Thomas, T. H. Noel Ellis, and A. J. Maule.** 2004. The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant Journal* **40**:376-385.
26. **German-Retana, S., E. Redondo, G. Tavert-Roudet, O. Le Gall, and T. Candresse.** 2003. Introduction of a NIa proteinase cleavage site between the reporter gene and HC-Pro only partially restores the biological properties of GUS- or GFP-tagged LMV. *Virus Research* **98**:151-162.
27. **German-Retana, S., J. Walter, B. Doublet, G. Roudet-Tavert, V. Nicaise, C. Lecampion, M. C. Houvenaghel, C. Robaglia, T. Michon, and O. Le Gall.** 2008. Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *Journal of Virology* **82**:7601-7612.
28. **German-Retana, S., J. Walter, and O. Le Gall.** 2008. Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. *Molecular Plant Pathology* **9**:127-136.
29. **Gomez de Cedron, M., L. Osaba, L. Lopez, and J. A. Garcia.** 2006. Genetic analysis of the function of the plum pox virus CI RNA helicase in virus movement. *Virus Res* **116**:136-45.
30. **Guo, D. Y., M. L. Rajamaki, M. Saarma, and J. P. T. Valkonen.** 2001. Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology* **82**:935-939.
31. **Huang, T.-S., T. Wei, J.-F. Laliberte, and A. Wang.** 2010. A Host RNA Helicase-Like Protein, AtRH8, Interacts with the Potyviral Genome-Linked Protein, VPg, Associates with the Virus Accumulation Complex, and Is Essential for Infection, p. 255-266, vol. 152.
32. **Jenner, C. E., F. Sanchez, S. B. Nettleship, G. D. Foster, F. Ponz, and J. A. Walsh.** 2000. The cylindrical inclusion gene of Turnip mosaic virus encodes a pathogenic determinant to the Brassica resistance gene TuRB01. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**:1102-1108.
33. **Jimenez, I., L. Lopez, J. M. Alamillo, A. Valli, and J. A. Garcia.** 2006. Identification of a Plum pox virus CI-Interacting Protein from Chloroplast That Has a Negative Effect in Virus Infection, p. 350-358, vol. 19.
34. **Jin, Y. S., D. Y. Ma, J. L. Dong, D. F. Li, C. W. Deng, J. C. Jin, and T. Wang.** 2007. The HC-Pro protein of Potato virus Y interacts with NtMinD of tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**:1505-1511.
35. **Kang, B. C., I. Yeam, J. D. Frantz, J. F. Murphy, and M. M. Jahn.** 2005. The *pvr1* locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant Journal* **42**:392-405.
36. **Khan, M. A., H. Miyoshi, S. Ray, T. Natsuaki, N. Suehiro, and D. J. Goss.** 2006. Interaction of genome-linked protein (VPg) of turnip mosaic virus with wheat germ translation initiation factors eIFiso4E and eIFiso4F. *Journal of Biological Chemistry* **281**:28002-28010.
37. **Laliberte, J.-F., and H. Sanfacon.** 2010. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu Rev Phytopathol* **48**:69-91.
38. **Lellis, A. D., K. D. Kasschau, S. A. Whitham, and J. C. Carrington.** 2002. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology* **12**:1046-1051.
39. **Leonard, S., D. Plante, S. Wittmann, N. Daigneault, M. G. Fortin, and J. F. Laliberte.** 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation

- eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology* **74**:7730-7737.
40. **Lopez, L., A. Urzainqui, E. Dominguez, and J. A. Garcia.** 2001. Identification of an N-terminal domain of the plum pox potyvirus CI RNA helicase involved in self-interaction in a yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology* **82**:677-686.
 41. **McClintock, K., A. Lamarre, V. Parsons, J. F. Laliberte, and M. G. Fortin.** 1998. Identification of a 37 kDa plant protein that interacts with the turnip mosaic potyvirus capsid protein using anti-idiotypic-antibodies. *Plant Molecular Biology* **37**:197-204.
 42. **Merits, A., D. Y. Guo, L. Jarvekulg, and M. Saarma.** 1999. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* **263**:15-22.
 43. **Merits, A., D. Y. Guo, and M. Saarma.** 1998. VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *Journal of General Virology* **79**:3123-3127.
 44. **Michon, T., Y. Estevez, J. Walter, S. German-Retana, and O. Le Gall.** 2006. The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *Febs Journal* **273**:1312-1322.
 45. **Nakahara, K. S., R. Shimada, S. H. Choi, H. Yamamoto, J. Shao, and I. Uyeda.** 2010. Involvement of the P1 cistron in overcoming eIF4E-mediated recessive resistance against Clover yellow vein virus in pea. *Mol Plant Microbe Interact.*
 46. **Nicaise, V., J. L. Gallois, F. Chafiai, L. M. Allen, V. Schurdi-Levraud, K. S. Browning, T. Candresse, C. Caranta, O. Le Gall, and S. German-Retana.** 2007. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **581**:1041-6.
 47. **Nicaise, V., S. German-Retana, R. Sanjuan, M. P. Dubrana, M. Mazier, B. Maisonneuve, T. Candresse, C. Caranta, and O. LeGall.** 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiology* **132**:1272-1282.
 48. **Pfeffer, S., P. Dunoyer, F. Heim, K. E. Richards, G. Jonard, and V. Ziegler-Graff.** 2002. P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* **76**:6815-6824.
 49. **Piron, F., M. Nicolai, S. Minoia, E. Piednoir, A. Moretti, A. Salgues, D. Zamir, C. Caranta, and A. Bendahmane.** 2010. An Induced Mutation in Tomato eIF4E Leads to Immunity to Two Potyviruses. *Plos One* **5**.
 50. **Puustinen, P., and K. Makinen.** 2004. Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *Journal of Biological Chemistry* **279**:38103-38110.
 51. **Robaglia, C., and C. Caranta.** 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science* **11**:40-45.
 52. **Roberts, I. M., D. Wang, K. Findlay, and A. J. Maule.** 1998. Ultrastructural and Temporal Observations of the Potyvirus Cylindrical Inclusions (CIs) Show That the CI Protein Acts Transiently in Aiding Virus Movement. *Virology* **245**:173-181.
 53. **Rodriguezcerezo, E., E. D. Ammar, T. P. Pirone, and J. G. Shaw.** 1993. Association of the Nonstructural P3 Viral Protein with Cylindrical Inclusions in Potyvirus-Infected Cells. *Journal of General Virology* **74**:1945-1949.
 54. **RodriguezCerezo, E., K. Findlay, J. G. Shaw, G. P. Lomonossoff, S. G. Qiu, P. Linstead, M. Shanks, and C. Risco.** 1997. The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* **236**:296-306.

55. **Roudet-Tavert, G., T. Michon, J. Walter, T. Delaunay, E. Redondo, and O. Le Gall.** 2007. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *Journal of General Virology* **88**:1029-1033.
56. **Shi, Y., J. Chen, X. Hong, J. Chen, and M. J. Adams.** 2007. A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Molecular Plant Pathology* **8**:785-790.
57. **Shukla, D. D., C. W. Ward, and A. A. Brunt.** 1994. The Potyviridae. The Potyviridae.:xii + 516 pp.
58. **Torrance, L., I. A. Andreev, R. Gabrenaite-Verhovskaya, G. Cowan, K. Makinen, and M. E. Taliany.** 2006. An unusual structure at one end of potato potyvirus particles. *J Mol Biol* **357**:1-8.
59. **Truniger, V., and M. A. Aranda.** 2009. Recessive Resistance to Plant Viruses. *Advances in Virus Research*, Vol 75 **75**:119-+.
60. **Walter, M., C. Chaban, K. Schutze, O. Batistic, K. Weckermann, C. Nake, D. Blazevic, C. Grefen, K. Schumacher, C. Oecking, K. Harter, and J. Kudla.** 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal* **40**:428-438.
61. **Wei, T., T.-S. Huang, J. McNeil, J.-F. Laliberte, J. Hong, R. S. Nelson, and A. Wang.** 2010. Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J Virol* **84**:799-809.
62. **Wei, T., and A. Wang.** 2008. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *Journal of Virology* **82**:12252-12264.
63. **Wei, T., C. Zhang, J. Hong, R. Xiong, K. D. Kasschau, X. Zhou, J. C. Carrington, and A. Wang.** 2010. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* **6**:e1000962.
64. **Wen, R. H., and M. R. Hajimorad.** 2010. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* **400**:1-7.
65. **Yeam, I., J. R. Cavatorta, D. R. Ripoll, B. C. Kang, and M. M. Jahn.** 2007. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* **19**:2913-2928.
66. **Zhang, C. Q., M. R. Hajimorad, A. L. Eggenberger, S. Tsang, S. A. Whitham, and J. H. Hill.** 2009. Cytoplasmic inclusion cistron of Soybean mosaic virus serves as a virulence determinant on Rsv3-genotype soybean and a symptom determinant. *Virology* **391**:240-248.

^a Immobilized bait	–	eIF4E ⁰	eIF4E ⁰	^e GFP
^b Interactant prey	CI-0	CI-0	–	CI-0
^c Antibodies	2A7	2A7	2A7	2A7
^d OD ₄₀₅	0,004 +/-0,000	0,304 +/- 0,011	-0,002 +/- 0,003	-0,007 +/- 0,004

^a Immobilized bait	CI-0	CI-0	^e GFP	–
^b Interactant prey	eIF4E ⁰	–	eIF4E ⁰	eIF4E ⁰
^c Antibodies	38	38	38	38
^d OD ₄₀₅	0,733 +/- 0,051	0,159 +/- 0,02	0,12 +/- 0,001	0,045 +/- 0,007

Table 1. The C-terminal portion of LMV-0 binds specifically to Lettuce eIF4E⁰ *in vitro*
^a 4 µg/ml of coated protein; ^b 8 µg/ml of binding protein; ^c mAb anti-CI-0 (2A7), pAb anti-eIF4E (38); ^d Means +/- SD of three replicates obtained in a typical experiment; ^e Green fluorescent protein negative control (GFP).

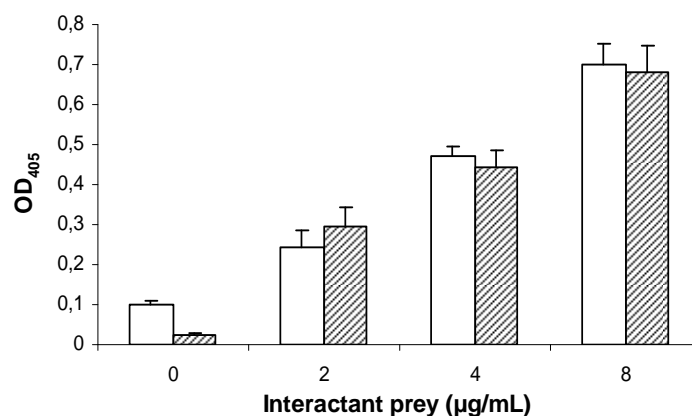


Figure 1. Biochemical assessment of the dose dependant binding of the C-terminal portion of LMV-0 CI to lettuce eIF4E⁰.

Wells are coated with 4µg/ml of CI-0 (open bars) or eIF4E⁰ (filled bars) and then incubated with increasing concentrations of the interacting prey (eIF4E⁰ or CI-0; from 0 to 8 µg/ml). Binary complexes are detected using specific eIF4E or CI antibodies. A₄₀₅ values are the means of three replicates from a typical experiment, after subtraction of the background value obtained when omitting the bait.

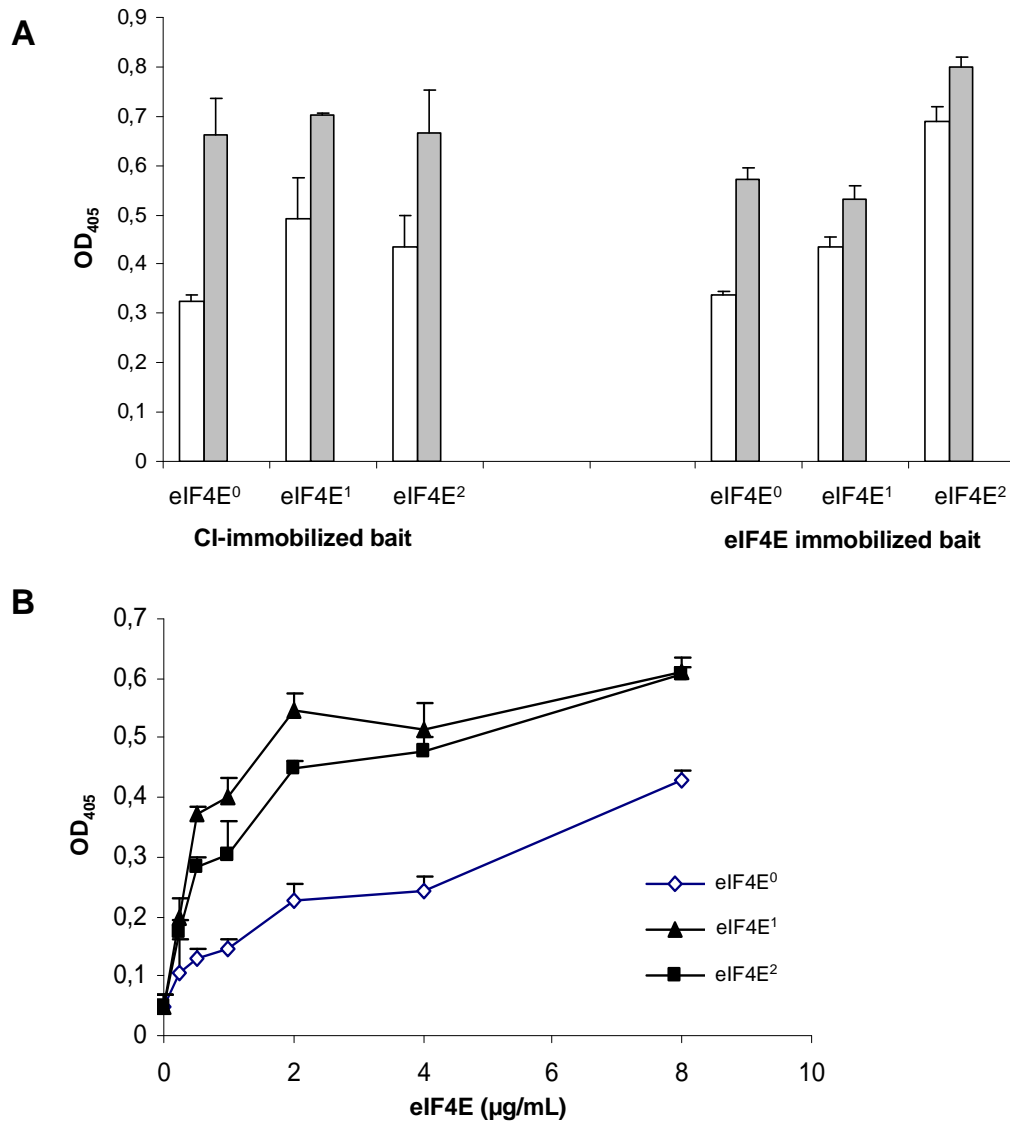


Figure 2. The C-terminal portion of LMV-0 and LMV-E CI bind *in vitro* to lettuce eIF4E allelic forms.

A. CI-0 (white bar) and CI-E (grey bar)/ ELISA binding assays: recombinant CI-Cter or eIF4E is used as the immobilized bait (4 µg/ml) and the binding with 8 µg/ml of eIF4E or CI-C-ter partner is assayed.

B. Binding curves obtained in CI-0-Cter / eIF4E interaction assays: in all cases, 4 µg/ml of CI-0 are coated on the plates and the binding of serial dilutions (0 to 8 µg/ml) of eIF4E⁰ (white squares), eIF4E¹ (black triangles), and eIF4E² (black squares) is measured. A₄₀₅ are the means of three replicates obtained in a typical experiment.

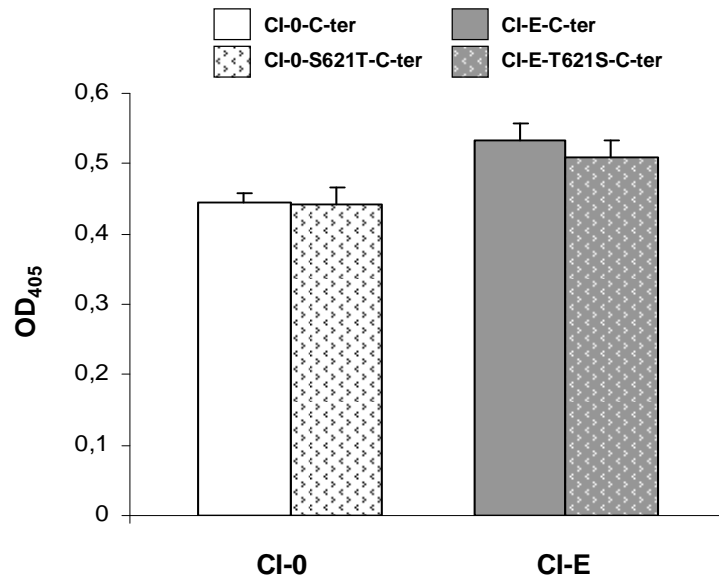


Figure 3. Biochemical assessment of the effects of the mutations introduced at position 621 in the CI-Cter of LMV-0 and LMV-E, on eIF4E⁰ binding.

Wild-type (open bars) and mutated forms (filled bars) of CI-0 (white bars) or CI-E (grey bars) are immobilized on the plates and the binding to eIF4E⁰ is evaluated in an ELISA binding assay. A_{405} values are the means of three replicates obtained in a typical experiment.

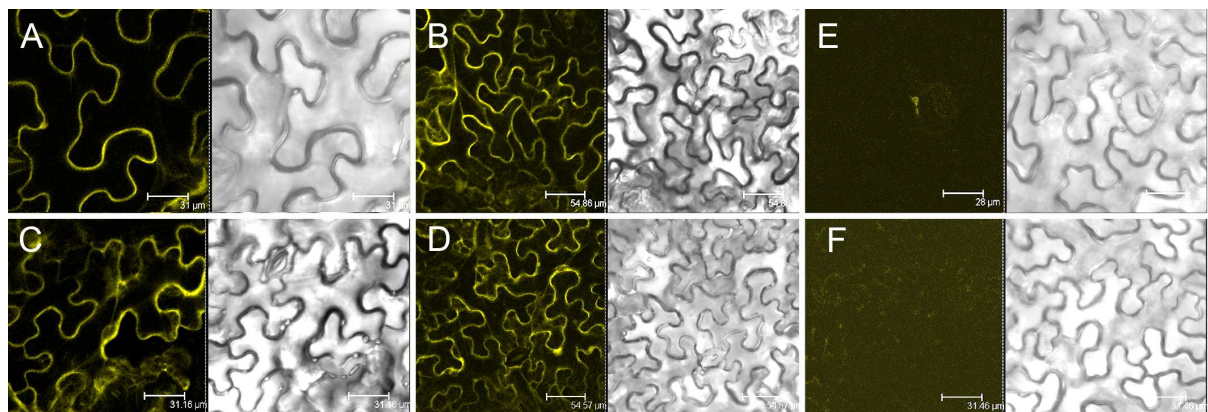


Figure 4. Detection of *in planta* interactions between the C-terminal portion of LMV-0 CI and eIF4E⁰ by Bimolecular Fluorescence Complementation.

The constructed clones were transferred into *Nicotiana benthamiana* leaves by agroinfiltration in pairwise combinations as follows: 4E-YN + YC-CI-Cter (A and B), 4E-YC + YN-CI-Cter (C and D) 4E-YN alone (E), YN-CI-Cter alone (F). The reconstructed yellow fluorescent protein (YFP) signals were observed in the epidermal cells using confocal microscopy at 2 days post-infiltration. Co-expression of (A), (B), (C), and (D) induced fluorescence signals. Images for fluorescence emitted by YFP (left) and for the transmitted light mode (right) are shown.

^a Immobilized bait	–	CI-0	CI-0	^e GFP	CI-0
^b Interactant prey	VPg-0	VPg-0	–	VPg-0	^e GFP
^c Antibodies	1H5	1H5	1H5	1H5	α GFP
^d OD ₄₀₅	0,021 +/- 0,004	0,613 +/-0,017	0,025 +/- 0,014	0,015 +/- 0,013	0,045 +/- 0,015

Table 2. The C-terminal portion of LMV-0 CI binds specifically to the viral VPg-0.

^a 4 μ g/ml of coated protein ; ^b 8 μ g/ml of binding protein; ^c mAb anti-VPg (1H5); mAb anti-GFP (α GFP); ^d Means +/- SD of three replicates obtained in a typical experiment; ^e Green fluorescent protein negative control.

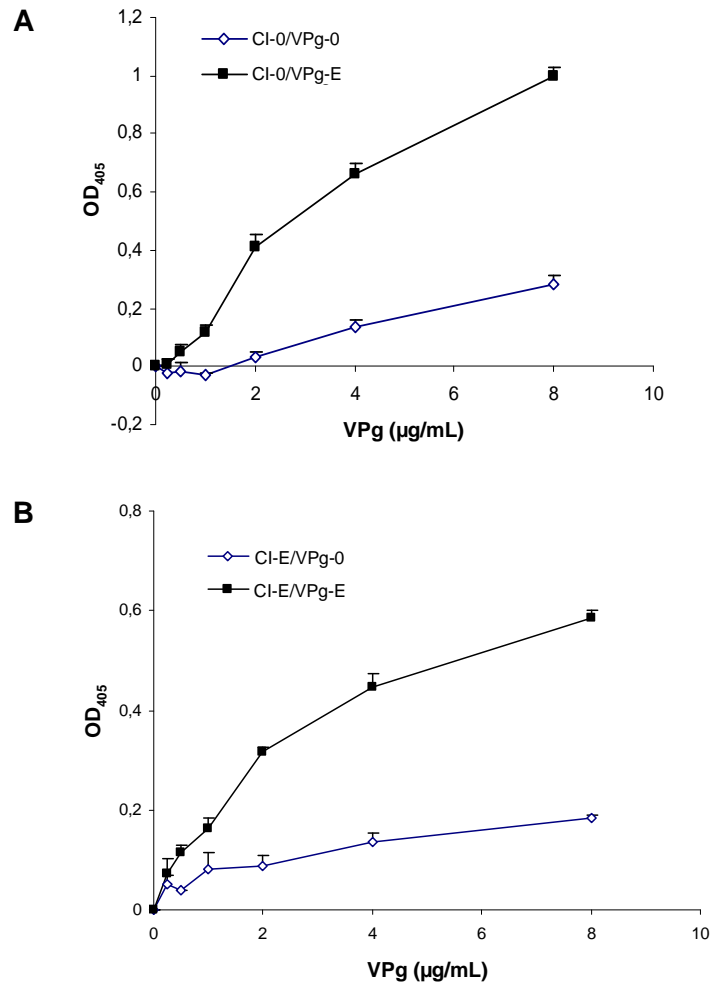
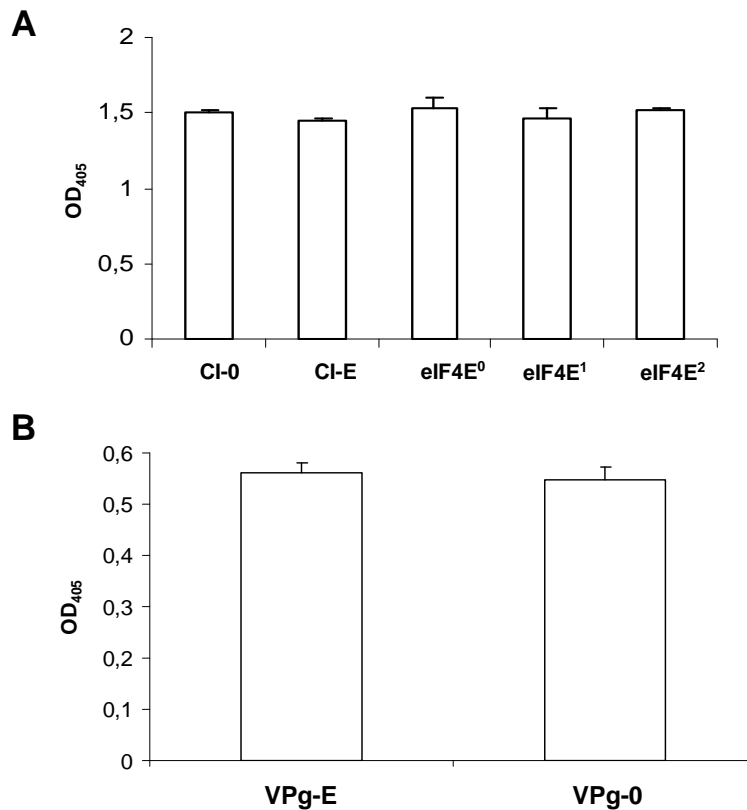


Figure 5. The LMV-0 VPg binds less efficiently *in vitro* to the viral CI-C-ter than LMV-E VPg.

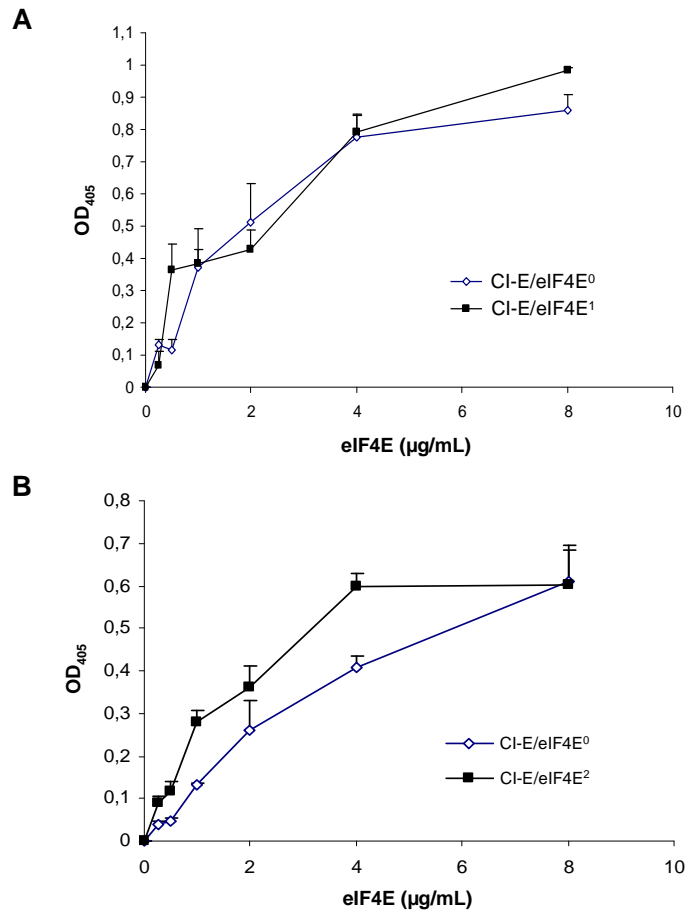
4 µg/ml of CI-0 (A) or CI-E (B) are immobilized on the wells. The binding to serial (0 to 8 µg/ml) dilutions of VPg-0 (white squares) and VPg-E (black squares) is compared in an ELISA-binding assay. A_{405} values are the means of three replicates obtained in a typical experiment.



Supplemental Figure 1. Titration of the recombinant proteins used in ELISA assays.

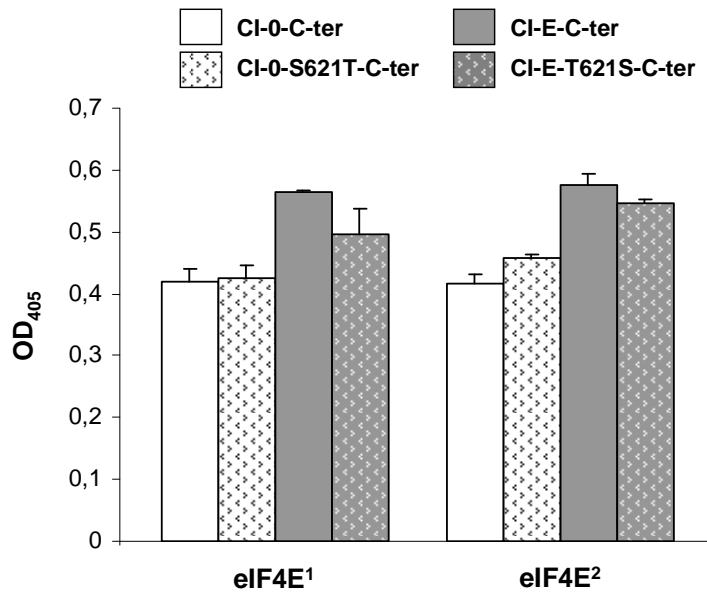
(A) Titration of LMV CI-C-ter (-0,-E) and lettuce eIF4E^(0,1,2) proteins. 4µg/ml of recombinant proteins are immobilized on the plates and the titration is achieved by using specific monoclonal 2A7 anti-CI and polyclonal 38 anti-eIF4E antibodies. A₄₀₅ values are the means of three replicates. No signal is obtained when the specific antibodies are omitted.

(B) Titration of LMV-VPg(s). Polyclonal anti-VPg antibodies are coated on the plates and 8 µg/ml of VPg-E and VPg-0 are incubated. VPg detection is performed by using monoclonal 1H5 anti-VPg antibodies. A₄₀₅ values are the means of three replicates obtained after correction by subtracting the background values (omitting VPg).



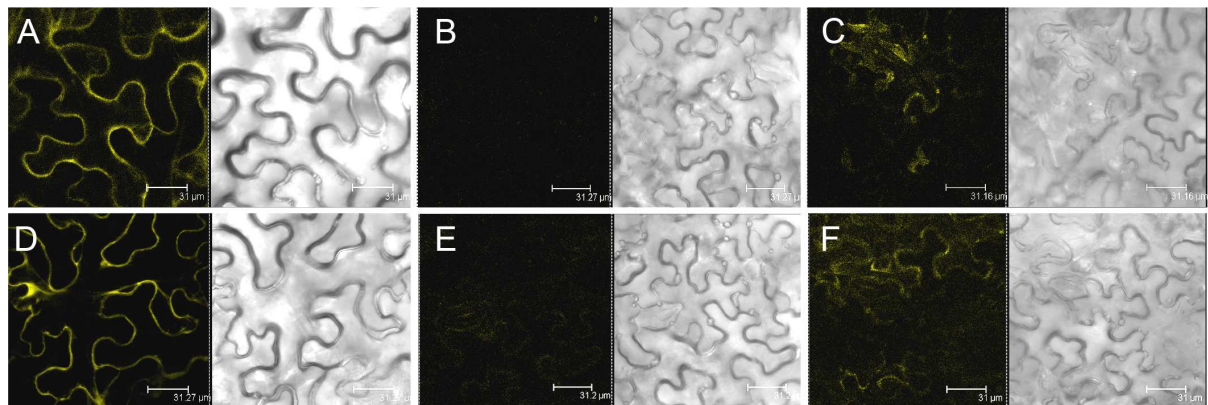
Supplemental Figure 2. Biochemical assessment of the binding of the C-terminal portion of LMV-E CI to the three eIF4E allelic forms.

The CI-E/eIF4E ELISA binding curves are shown. In each case, 4 µg/ml of CI-E are coated on the plates and the binding of serial dilutions (0 to 8 µg/ml) of (A) eIF4E⁰ (white squares) and eIF4E¹ (black squares) or (B) eIF4E⁰ (white squares) and eIF4E² (black squares) are measured. A_{405} values are the means of three replicates obtained in a typical experiment.



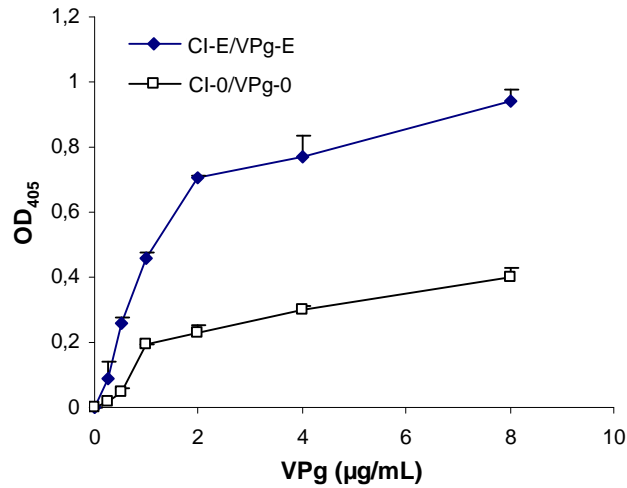
Supplemental Figure 3. Biochemical assessment of the effects of the mutations introduced in the C-terminal portion of LMV-0 and LMV-E CI on eIF4E binding .

The C-terminal portion of LMV-0 or LMV-E, mutated at position 621, binds *in vitro* to eIF4E¹ and eIF4E². Wild (open bar) and mutated (filled bar) forms of CI-0 (white bar) or CI-E (grey bar) are immobilized on the plates and the binding to eIF4E¹ and eIF4E² is evaluated in an ELISA binding assay. A_{405} values are the means of three replicates obtained in a typical experiment.



Supplemental Figure 4. Detection of *in planta* interactions between the C-terminal portion of LMV-0 CI and lettuce eIF4E⁰ by Bimolecular Fluorescence Complementation.

The constructed clones were transferred into *Nicotiana benthamiana* leaves by agroinfiltration in pairwise combinations as follows: 4E-YN + YC-CICter (A) 4E-YC + YN-CI-Cter (D). Negative controls: YC-CI-Cter alone (B and C), 4E-YC alone (E and F). Images for fluorescence emitted by YFP (left) and for the transmitted light mode (right) are shown. The reconstructed yellow fluorescent protein (YFP) signals were observed in the epidermal cells using confocal microscopy at 2 days post-infiltration in A and D (other samples than those shown in Figure 4). Panels C and F are representative of the YFP background signal that can be observed in some areas of the agro infiltrated leaves, probably due to necrosis reaction. Bar scale – 31 μ m (A), 31,16 μ m (D), 31,2 μ m (E) and 31 μ m (F).



Supplemental Figure 5. The CI-Cter/ VPg binding strength for LMV-0 proteins is weaker than the interactions measured for LMV-E proteins.

4 µg/ml of CI-0 (white squares) or CI-E (black squares) are immobilized on the wells and the binding of serial dilutions of its homologous VPg-0 (white squares) or VPg-E (black squares) (0 to 8 µg/ml) is measured. A_{405} values are the means of three replicates obtained in a typical assay

Chapitre 4

Discussion Générale et perspectives

L'élucidation de la nature moléculaire des gènes de résistance récessive vis-à-vis des potyvirus est assez récente : jusqu'à présent, seuls les facteurs d'initiation de la traduction eucaryote eIF4E ont été identifiés comme produits de ces gènes naturels de résistance récessive.

Dans le cas du pathosystème LMV/Laitue, l'approche par gène candidat a montré que le facteur Ls-eIF4E chez la laitue est le produit du gène *moI*, dont les allèles récessifs *moI*¹ et *moI*² codent pour les formes Ls-eIF4E¹ et Ls-eIF4E², conférant à l'état homozygote une absence de sensibilité (et donc pour l'agronome une résistance) au LMV (Nicaise *et al.*, 2003). Une approche de génétique inverse a permis de faire l'hypothèse que le LMV contourne la résistance conférée par des formes défectives de Ls-eIF4E par le biais de la région du génome codant pour la région CI-Cter-6K2-VPg.

Dans ce contexte, l'objectif du travail présenté était de confirmer l'implication de la région CI-C-ter dans le contournement, et d'identifier des acides aminés jouant un rôle clef dans ce processus. De plus, nous avons entrepris l'analyse fonctionnelle de la résistance conférée par eIF4E en caractérisant les interactions impliquant les différentes formes de Ls-eIF4E et les différentes formes de ses interacteurs viraux : la VPg et la CI-C-ter.

I. Le contournement de la résistance *moI* chez la laitue par le LMV n'est pas gouverné par la relation « gène pour gène ».

Nos résultats montrent que la VPg du LMV-E, isolat virulent capable de contourner la résistance conférée par *moI*¹ et *moI*², est suffisante pour restaurer une pleine compatibilité entre le LMV et la variété *moI*¹ mais pas *moI*². D'autre part, la région codant pour le domaine CI-C-ter et pour la 6K2, suffit à elle seule à conférer la capacité du LMV à se multiplier sur des variétés exprimant la forme Ls-eIF4E¹. Cette région est aussi nécessaire pour la multiplication sur des variétés de laitue exprimant la forme Ls-eIF4E². De plus, nous avons montré qu'un mutant ponctuel dans la CI (LMV-0-S621T) obtenu par mutagenèse dirigée est capable de contourner la résistance conférée par *moI*² et, partiellement, celle conférée par *moI*¹ tandis que le mutant réciproque (LMV-E-T621S) perd sa capacité à contourner les deux allèles de résistance.

Ces résultats impliquent pour la première fois la région C-terminale de l'hélicase CI dans le contournement d'une résistance aux potyvirus médiée par eIF4E (Abdul-Razzak *et al.*, 2009), et montrent que le LMV code pour deux facteurs de virulence vis-à-vis du gène *moI* :

non seulement la VPg mais aussi la région CI-C-ter. Nos résultats sont donc très originaux dans le contexte de la grande majorité des pathosystèmes plante-potyvirus, où le contournement des gènes de résistance récessive impliquant eIF4E est systématiquement corrélé à la présence de mutations dans la VPg (Truniger & Aranda, 2009). En effet, les études réalisées dans différents pathosystèmes impliquant les espèces cultivées pois, tomate, piment, ont révélé que la VPg est systématiquement impliquée dans le contournement des gènes de résistance codant pour les facteurs d'initiation de la traduction (Ayme *et al.*, 2007, Masuta *et al.*, 1999, Moury *et al.*, 2004, Sato *et al.*, 2003). De plus, les travaux de Charron *et al.* (2008) ont montré que la VPg des isolats avirulents du PVY n'interagit pas en double hybride avec les différentes formes d'eIF4E codées par les variants alléliques du gène de résistance récessive *pvr2* chez le piment, alors que les VPg d'isolats virulents sont au contraire capables d'interagir avec ces formes d'eIF4E. L'ensemble de ces résultats suggère que la clé du contournement de la résistance conférée par eIF4E aux potyvirus chez les espèces cultivées est la restauration de l'interaction entre la VPg et eIF4E, et que ceci passe par des substitutions d'acides aminés au sein des séquences respectives de chacune des protéines.

Cependant, il semble qu'une deuxième exception à la règle « VPg = facteur de contournement » existe: en effet, lors de la rédaction de cette thèse, Nakahara *et al.* (2010) ont montré qu'une mutation ponctuelle dans la P1 d'un autre potyvirus, le CIYVV, suffisait à contourner la résistance conférée par eIF4E chez le pois (Nakahara *et al.*, 2010). De plus, il est probable que des mutations dans la P3 du PSbMV soient associés au contournement d'une résistance potentiellement conférée par eIF(iso)4E chez le pois (Hjulsager *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats n'apporte donc pas d'éléments convergents permettant de proposer un modèle simple impliquant uniquement des substitutions dans la VPg pour le contournement de la résistance conférée par eIF4E, et il semble que le pathosystème Laitue/LMV reflète cette complexité.

II. Rôle d'autres mutations ponctuelles dans les deux régions de virulence du LMV, CI-C-ter et VPg, dans le contournement de la résistance $mo1$?

II.1. Dans la région CI-C-ter ?

Nous avons montré que le mutant LMV-0-S621T, se multiplie en systémie sur la variété $mo1^2$ à un niveau comparable à celui du virus recombinant LMV-0xbastyE (qui comprend l'ensemble de la région CI-Cter) mais à un taux beaucoup plus faible sur la variété Mantilia $mo1^1$. De plus, l'introduction de la mutation supplémentaire en position 602 (présente dans tous les isolats de LMV contournant les deux allèles $mo1^1$ et $mo1^2$ ainsi que dans un isolat ne contournant que $mo1^1$) ne modifie pas le comportement du double mutant LMV-0-A602V-S621T, chez les deux variétés $mo1^1$ et $mo1^2$.

Nos résultats montrent donc que la capacité du LMV à contourner totalement la résistance $mo1^1$ ne peut être imputée à une seule mutation dans la CI-Cter, et les travaux menés au laboratoire par L. Svanella et T. Candresse, portant sur l'analyse de la diversité génotypique et phénotypique du LMV, semblent le confirmer. En effet, ces travaux ont permis de caractériser au niveau moléculaire, une collection d'isolats de LMV de laitue, d'espèces sauvages ou ornementales. En particulier, les propriétés de contournement des allèles de résistance $mo1^1$ et $mo1^2$ ont été analysées pour certains de ces isolats, et ont permis de mettre en évidence des acides aminés potentiellement impliqués dans le contournement, dans la région correspondant à la partie CI-C-ter. Des isolats de LMV d'origine sauvage (*Lactuca virosa*) ou ornementale (*Osteospermum*) sont en effet capables d'évoluer vers le contournement de la résistance $mo1^1$ chez la laitue *Lactuca sativa* (Svanella *et al.*, communication personnelle). En réalisant un alignement de séquences de la région CI-C-ter-6K2-VPg des virus ayant évolué vers le contournement de la résistance, les acides aminés candidats aux positions 602, 617, 621 et 627 ont été mis en évidence comme pouvant être impliqués dans le contournement de la résistance $mo1$. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées : la thréonine 621 semble impliquée systématiquement dans le contournement de $mo1^2$, la sérine 617 faciliterait le contournement de $mo1^1$, la valine 602 ainsi que la thréonine 627 permettraient l'évolution vers la virulence vis-à-vis de $mo1^1$.

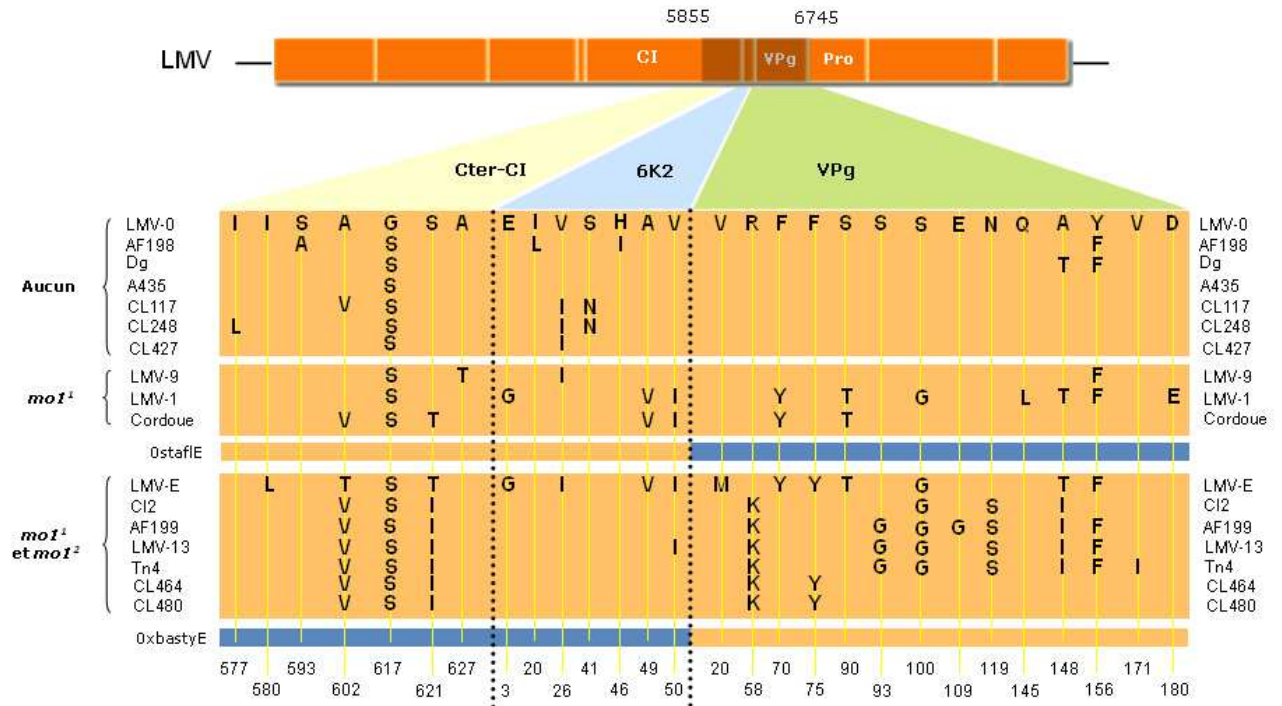


Figure 51. Diversité naturelle du LMV et contournement de la résistance *mol1*.

Cette figure représente de façon simplifiée, la position et l'identité des acides aminés de la région CI-C-ter, 6K2 et VPg qui présentent un polymorphisme de séquence entre les différents isolats de LMV (les séquences complètes de cet alignement sont représentées dans l'Annexe 3). La capacité de ces isolats à contourner la résistance conférée par les allèles *mol1*¹ et *mol1*² est indiquée à gauche. Les zones en orange représentent les séquences identiques à celle du LMV-0. Les carrés bleu foncé correspondent aux portions de séquence dérivées de LMV-E clonées dans les virus recombinants LMV-Ostafle et LMV-0xbastyE.

La ligne du bas indique la position des acides aminés sur la séquence de la protéine CI, 6K2 ou VPg.

Lors de ce travail de thèse, les différentes combinaisons de mutations aux positions 602, 617, 621 et 627 ont été réalisées, et les clones infectieux dérivés de LMV-0 mutés ont été produits. Nos résultats préliminaires confirmeraient le rôle clef de la Sérine en position 617 pour faciliter l'apparition de mutations supplémentaires (en positions 602 et 621) permettant le contournement de la résistance conférée par *mol¹* et la position 627 jouerait à elle seule un rôle clef dans le contournement non seulement de *mol¹* mais aussi de *mol²*.

L'analyse de l'alignement des séquences protéique de la région CI-C-ter, la 6K2 et la VPg des divers isolats du LMV appartenant aux différentes pathotypes (**Figure 51 et annexe 3**) confirmerait ces résultats : la serine 617, présente dans tous les isolats de LMV (excepté LMV-0), est accompagnée de deux mutations dans les positions 602 et 621 dans tous les isolats contournant les deux allèles *mol¹* et *mol²* et un des trois isolats contournant seulement *mol¹*, ce qui confirmerait le rôle de cet acide aminé pour faciliter l'apparition de mutations aux positions 602 et 621.

D'un autre côté, le fait que l'isolat LMV-9 qui ne contourne que *mol¹* ait une thréonine à la position 627 confirmerait le rôle de cette position dans le contournement de *mol¹*.

Il est donc étonnant qu'en contexte d'infection naturelle du LMV, la résistance *mol* utilisée par les producteurs de laitue soit durable et que peu de variants qui émergent ne soient capables de contourner cette résistance. Il est fort possible que le coût de fitness (Fitness = aptitude à s'accumuler dans les plantes et à se disséminer de plante à plante) associé à ces mutations dans la région CI-C-ter soit très élevé pour le virus.

En effet, à cause de leur taille réduite, les génomes viraux présentent peu d'emplacements « neutres » et la plupart des mutations sont létales ou délétères (Carrasco *et al.*, 2007b, Sanjuan *et al.*, 2004). Ainsi, l'acquisition de virulence par le TuMV vis-à-vis du gène dominant TuRB01 du chou, est associée à une baisse de fitness faible, mais mesurable (Jenner *et al.*, 2002). Ce coût de virulence expliquerait la faible prévalence des souches virulentes en condition de culture de variétés possédant le gène TuRB01. Dans le cas du ZYMV (Desbiez *et al.*, 2003), l'augmentation de la sévérité des symptômes dans un cultivar de courgette tolérant est lié à l'acquisition d'une mutation dans la protéine virale P3 et entraîne une perte de fitness relative chez des plantes sensibles.

Les mutations délétères réduisent généralement la fitness des virus (Carrasco *et al.*, 2007b, de la Iglesia & Elena, 2007, Duarte *et al.*, 1992) et sont éliminées par la sélection purificatrice. Un exemple représentatif a été montré par Carrasco *et al.* (2007a, b) qui ont étudié la répartition des effets de mutations sur la fitness du TEV. Ces auteurs ont créé une collection de 66 clones portant chacun une seule substitution nucléotidique différente. La

fitness de chaque clone a été mesurée par des expériences de compétition contre un virus sauvage. La plupart des mutations testées sont létales, les mutations délétères réduisent le fitness (Carrasco *et al.*, 2007a, Carrasco *et al.*, 2007b).

Afin de vérifier si les mutations identifiées dans la CI-C-ter de LMV ont un tel effet délétère réduisant la fitness du virus, des expériences de co-inoculation du LMV-0 et de chacun des mutants obtenus capables de contourner la résistance, seront réalisées chez la laitue sensible Trocadéro. En contexte de co-infection, l'accumulation de chacun des virus sera quantifiée par RT-PCR quantitative.

II.2. Dans la région 6K2 et la VPg ?

La figure 51 montre que les séquences des acides aminés de la région CI-C-ter, la 6K2 et la VPg des isolats de LMV appartenant au pathotype de LMV contournant uniquement la résistance conférée par l'allèle *moI*¹ ou à celui contournant les deux allèles *moI*¹ et *moI*² présentent des différences réparties non seulement dans la CI-C-ter mais aussi dans la VPg. Cependant, le virus chimérique LMV-0stafIE qui appartient au pathotype contournant uniquement l'allèle *moI*¹ ne code que pour une VPg virulente dérivée de LMV-E. Ces données permettent d'identifier plusieurs positions dans la VPg potentiellement impliquées dans la compatibilité du LMV avec les variétés *moI*¹ notamment les positions 90 et 100 de la VPg (positions 2111 et 2121 de la polyprotéine respectivement) (**Figure 51 et annexe 3**). Une approche par mutagenèse dirigée comparable à celle réalisée dans le cas de la région CI-C-ter nous permettrait de vérifier l'implication de ces positions dans le contournement de la résistance *moI*¹.

De plus, nous n'avons pas identifié d'isolats naturels du LMV capables de contourner les formes alléliques de *moI*, qui ne présentent des substitutions en aa à la fois dans la CI-C-ter et la VPg : des différences au niveau d'une de ces régions sont toujours accompagnées de différences au niveau de l'autre région. En outre, Les isolats naturels du LMV incapables de contourner *moI* portent des mutations plutôt positionnées dans la région CI-C-ter-6K2 (**Figure 51**). On peut imaginer que lorsque des mutations naturelles apparaissent au niveau de la région CI-6K2, des mutations compensatoires apparaissent rapidement dans la VPg.

Les approches de mutagenèse dirigée (et aléatoire) devront être poursuivies afin d'identifier les acides aminés de la VPg d'une part et ceux du domaine CI-C-ter et la 6K2 d'autre part qui sont impliqués dans la compatibilité avec Ls-eIF4E¹.

En complément de l'approche de génétique inverse menée lors de cette thèse, l'analyse de la contrainte évolutive qui s'exerce sur les deux facteurs de virulence du LMV (grâce à l'analyse de la diversité au niveau nucléotidique et acide aminé) de la VPg et de la CI sera réalisée.

Cette analyse sera réalisée via un logiciel qui calcule le ratio omega (ω) : nombre de mutations non synonymes / synonymes (Moury et al., 2004). Une valeur de $\omega > 1$ signifie que les mutations non synonymes offrent d'avantage de fitness à la protéine et ont des probabilités de fixation supérieures à celles de mutations synonymes (sélection positive). En revanche, une valeur ω proche de 0 signifie que la protéine est essentiellement conservée au niveau des acides aminés (sélection purificatrice ou négative) et une valeur $\omega=1$ correspond à une sélection neutre. Les gènes viraux évoluent globalement sous sélection négative (Garcia-Arenal *et al.*, 2001) et les différentes régions des génomes viraux codant pour les différentes protéines virales sont plus ou moins contraintes (Moury *et al.*, 2006).

Il serait donc intéressant de voir dans quelle mesure certains des acides aminés de la CI et de la VPg impliqués dans le contournement de *mol* sont sous pression de sélection positive.

III. Des mutations naturelles et artificielles affectent-elles les interactions entre eIF4E et ses partenaires viraux ?

Le fait que les substitutions au niveau des loci *pvr2*, *pot-1*, *mol* et *sbm1* qui confèrent la résistance respectivement au PVY, LMV et PSbMV aient toujours lieu au niveau de deux régions de la protéine eIF4E (Gao *et al.*, 2004b, Kang *et al.*, 2005a, Nicaise et al., 2003, Ruffel *et al.*, 2005), exposées à la surface de la protéine, suggère que le mécanisme de résistance sous-jacent soit conservé pour les différents couples potyvirus-plante. Une des hypothèses les plus simples est que ces mutations dans le facteur eIF4E modifient son interaction avec une(des) protéine(s) virale(s).

L'implication de la VPg du LMV dans le contournement de la résistance *mol*¹ et celle de la CI-C-ter dans le contournement de *mol*¹ et *mol*² laisse donc supposer que ces protéines virales puissent interagir, directement ou non, avec Ls-eIF4E.

Dans le cas du pathosystème LMV/laitue, les résultats obtenus au laboratoire ont montré en ELISA et en spectroscopie de fluorescence, une interaction *in vitro* entre la VPg du LMV et Ls-eIF4E (Michon *et al.*, 2006, Roudet-Tavert *et al.*, 2007). De plus, cette interaction a été confirmée *in vivo* par BiFC (S. German-Retana, communication personnelle).

Les constantes de dissociation des interactions Ls-eIF4E-VPg ont été mesurées en spectroscopie de fluorescence, montrant que la VPg du LMV a une affinité comparable pour Ls-eIF4E à celle de la coiffe des ARNm, son ligand « natif », et que ces deux ligands entraînent en compétition pour interagir avec Ls-eIF4E (Michon et al., 2006). Les interactions entre allèles naturels de eIF4E, capables ou non de supporter la multiplication virale, et de VPg provenant d'isolats capables ou non de se multiplier tout de même dans des plantes possédant des allèles de eIF4E déficients pour cette fonction (LMV-0 et LMV-E) ont été ensuite caractérisées. Les résultats obtenus montrent que les mutations naturellement observées dans eIF4E ou VPg n'affectent pas la qualité de l'interaction même quand elles sont associées à des phénotypes biologiquement différents (contrairement à ce qui est observé dans d'autres couples plante-potyvirus) (T. Michon, communication personnelle). Par ailleurs, la protéine VPg est bel et bien capable d'interactions directes avec eIF4E mais aussi avec la protéine virale HcPro et ces deux interactions s'inhibent entre elles, suggérant que HcPro pourrait jouer un rôle régulateur dans l'interaction eIF4E-VPg, ou l'inverse (Roudet-Tavert et al., 2007).

Lors de ce travail de thèse, nous avons démontré pour la première fois une interaction *in vivo* et *in vitro* entre Ls-eIF4E et la région CI-Cter du LMV. De même que pour la VPg, les interactions entre les allèles naturels d'eIF4E, et de CI-C-ter provenant d'isolats virulents ou pas, ont été ensuite caractérisées *in vitro* en ELISA. Les résultats obtenus montrent que la CI-C-ter du LMV-E (isolat virulent) interagit plus fortement que la CI-Cter du LMV-0 (isolat avirulent), à la fois avec la forme sensible et les formes résistantes de Ls-eIF4E. Ce résultat suggère que la capacité du contournement des eIF4E « non permissifs » pourrait être corrélée avec le niveau d'interaction entre la CI-C-ter et eIF4E. Cependant cette hypothèse n'est pas vérifiée dans les conditions de nos tests car la mutation S621T qui joue un rôle clé dans le contournement n'affecte pas le niveau d'interaction entre les formes sauvages de la CI-C-ter et les formes de Ls-eIF4E. En particulier, dans Ls-eIF4E¹, la délétion du triplet QGA (positions 108 to 110) ou la substitution A-to-P (position 70) dans Ls-eIF4E², qui confèrent la résistance au LMV-0 (Nicaise et al., 2003), n'empêchent pas l'interaction physique avec la CI-C-ter du LMV-0. La technique de double-hybride chez la levure a été utilisée en parallèle au laboratoire et a permis de confirmer les interactions eIF4E-CI-Cter mais le niveau d'interaction mesuré était trop faible pour pouvoir quantifier des différences d'interactions (J. Walter, communication personnelle). A ce jour, il est difficile de déterminer si ces résultats sont liés aux techniques d'étude des interactions employées ou à une réalité biologique.

De plus, les interactions binaires entre VPg et CI-C-ter ont été montrées en ELISA (Article en cours de rédaction).

L'ensemble de ces données suggère donc l'existence d'un complexe ternaire CI-VPg-eIF4E. Etant donné que les interactions binaires eIF4E-VPg, eIF4E-CI-Cter et VPg-CI-Cter ont été montrées, il convient désormais de mettre en évidence la formation du complexe CI-VPg-eIF4E et de vérifier si un différentiel quantitatif d'interactions existe lors de la confrontation des différentes formes de Ls-eIF4E avec les différentes formes de VPg et CI, codées par le LMV-0 ou le LMV-E. Une telle analyse quantitative peut être réalisée par calorimétrie isotherme à titration (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) (Bruylants & Bartik, 2005). Cette technique de microcalorimétrie peut se révéler utile pour mettre en évidence et quantifier une compétition entre deux ligands. Comme cette technique nécessite la compatibilité des tampons de resuspension des protéines exprimées en système hétérologue, l'optimisation de la purification de la CI en conditions non dénaturantes est actuellement en cours au laboratoire.

De plus, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'interaction entre ces protéines sur leurs fonctions connues : en particulier, en collaboration avec le Pr. Juan-Antonio Garcia (CSIC-UAM, Madrid), nous testerons si l'interaction CI/eIF4E est généralisable à des CI d'autres potyvirus et si cette interaction a un effet sur l'activité hélicase *in vitro* associée à la CI (Fernandez *et al.*, 1995, Lain *et al.*, 1990).

IV. Vers l'identification d'autres facteurs impliqués dans la compatibilité du LMV et les variétés de laitue résistantes.

La principale limitation aux méthodes de test d'interaction entre deux protéines utilisées dans cette thèse, réside dans le fait que ces interactions puissent être dépendantes de la formation d'un complexe protéique composé de protéines virales et de l'hôte. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent les interactions Laitue-LMV et de caractériser l'impact des interactions eIF4E / VPg / CI-Cter dans le cycle viral et dans les fonctions cellulaires, il s'avère nécessaire d'identifier l'ensemble des partenaires protéiques de eIF4E dans l'interaction avec les potyvirus et de caractériser la localisation subcellulaire des interactions protéines virales-protéines de l'hôte.

L'identification de ces facteurs peut se faire par le biais d'études d'interactions physiques entre protéines *in vitro* et/ou *in vivo*.

Comme décrit précédemment dans l'introduction (§ III.2.6), certains facteurs cellulaires interagissant avec les protéines virales « cibles », ont été identifiés en utilisant la technique double hybride chez la levure. Toutefois, Cette technique ne permet de mettre en évidence que les interactions les plus fortes et les interactions faisant intervenir deux protéines ou domaines protéiques.

Plusieurs tentatives ont donc été réalisées au laboratoire pour purifier, à partir de plantes saines ou infectées par le LMV, des complexes protéiques contenant eIF4E afin d'en caractériser les constituants. En particulier, une approche par « pull-down » utilisant la protéine recombinante VPg exprimée en système bactérien, a servi à piéger par affinité les composants capables d'interagir avec elle dans un extrait cellulaire brut de laitue. Bien que cette approche exclue l'identification de complexes préformés, elle donne tout de même accès au répertoire des interactions possibles. Des complexes eIF4E-eIF4G-VPg ont été ainsi identifiés dans des extraits de laitues saines (Michon et al., 2006). Bien que l'approche privilégiée s'affranchisse d'a priori, les localisations des principales protéines candidates (eIF4E, eIF(iso)4E, CP, VPg) dans les fractions subcellulaires ont été précisées ainsi que leur comportement en filtration sur gel (T. Michon, communication personnelle). Il a été montré par ailleurs, que la fixation de eIF4G à eIF4E augmente son affinité pour la VPg, ce qui favoriserait le recrutement d'eIF4E par le virus, aux dépens des ARNm cellulaires (Grzela *et al.*, 2006, Michon et al., 2006, Miyoshi *et al.*, 2006). De plus, il a été montré au laboratoire que les facteurs eIF4E et eIF4G sont recrutés par les potyvirus de façon coordonnée, suggérant que la réussite de l'infection requiert l'ensemble du complexe eIF4F (Nicaise *et al.*, 2007).

En parallèle, la protéine eIF(iso)4E étiquetée à son extrémité N-terminale (avec la GFP, ou une étiquette de type *Tandem Affinity Purification Tag* (Puig *et al.*, 2001)) a été exprimée par transgénèse dans un mutant *d'A. Thaliana* « Knocked Out » pour le facteur natif. Des plantes homozygotes pour ces transgènes ont pu être inoculées et des premiers essais de co-purification réalisés, afin d'identifier les composants des complexes par micro-séquençage ou par analyse en spectrométrie de masse. L'avantage de cette approche par co-purification est de donner accès à des complexes pré-formés *in vivo*, et donc particulièrement susceptibles de représenter une réalité biologique, surtout en condition d'infection virale. Néanmoins la co-purification s'est montrée très délicate à mettre en oeuvre, et n'a pour l'instant donné aucun résultat (J. Walter, communication personnelle).

Un criblage exhaustif des protéines de la plante hôte interagissant avec les protéines virales VPg et CI-C-ter est envisagé en suivant d'autres approches : parmi elles, l'approche *in*

in vitro (CIS-display), permettant d'identifier des complexes protéiques interagissant avec les protéines virales cibles (Miyamoto-Sato *et al.*, 2005).

V. Rôle du complexe formé entre le facteur eIF4E et les facteurs viraux identifiés CI-Cter et VPg dans le cycle viral ?

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant au rôle des interactions entre le facteur eIF4E, la région CI-C-ter-6K2 et la VPg dans le cycle viral. Ces hypothèses comprennent un rôle dans l'initiation de la traduction et/ou la réplication, un rôle dans la perturbation des fonctions nucléaires de l'hôte, et/ou un rôle dans le mouvement de cellule à cellule.

V.1. Rôle dans l'initiation de la traduction/réplication ?

Deux précurseurs de la VPg du TuMV se sont révélés capables d'interagir *in planta* avec eIF4E et eIF(iso)4E. En particulier, le complexe 6K-VPg-Pro-eIF(iso)4E est détecté dans les vésicules cytoplasmiques encastrées dans le réticulum endoplasmique (RE) (Beauchemin *et al.*, 2007, Leonard *et al.*, 2004). La formation de ces vésicules, nécessaires pour assembler le complexe de réplication (Schaad *et al.*, 1997b), est induite par le polypeptide 6K-VPg-Pro qui est aussi capable à rediriger la RdRp virale ainsi que les facteurs d'hôte PABP, HSC 70-3, eEF1A et eIF4E/eIF(iso)4E vers les vésicules (Beauchemin *et al.*, 2007, Beauchemin & Laliberte, 2007, Dufresne *et al.*, 2008, Thivierge *et al.*, 2008). Récemment, il a été montré que ces vésicules sont produites aux sites de sortie du RE sur la membrane du RE (Wei & Wang, 2008), et qu'elles transitent par l'appareil de Golgi pour atteindre les chloroplastes où elles s'agrègent et induisent des invaginations de l'enveloppe externe du chloroplaste (Wei *et al.*, 2010a). Les vésicules induites par la 6K2 associées au chloroplaste contiennent des composants viraux : la réplicase virale, l'hélicase CI et des formes répliquatives d'ARN double brin ainsi que de l'ARN viral. L'ensemble de ces données suggère que les potyvirus recruteraient successivement le réticulum endoplasmique et les chloroplastes pour répliquer leur génome (Wei *et al.*, 2010a).

La protéine CI présente trois activités enzymatiques identifiées dans sa région N-terminale: une hélicase (Lain *et al.*, 1990), un domaine de fixation à l'ARN (Fernandez *et al.*, 1995) et un domaine ATPase (Riechmann *et al.*, 1992). La région C-terminale, ne possède

aucune de ces activités enzymatiques, mais pourrait jouer un rôle dans la traduction et la réplication. Ainsi, des expériences de mutagenèse exhaustive effectuées sur la CI du TEV et du PVA ont permis d'identifier des mutations dans la région C-terminale de la CI capables d'abolir la réplication virale ou le mouvement systémique (Carrington *et al.*, 1998, Kekarainen *et al.*, 2002).

La protéine CI de par son activité hélicase, permettrait de dérouler les structures secondaires d'ARN double brin apparaissant lors de la réplication. La VPg pourrait jouer un rôle dans la circularisation du génome viral, qui peut-être accomplie grâce à une interaction entre le complexe VPg-eIF4E/eIF(iso)4E et eIF4G/eIF(iso)4G, qui lui-même interagit avec la PABP, ou par l'interaction directe entre VPg-Pro et PABP (Leonard *et al.*, 2004). Des complexes ternaires comprenant VPg, eIF4E et eIF4G (eIF4F) ont en effet été identifiées dans plusieurs cas d'infections par des potyvirus, comme le TuMV, le LMV, et le PVY (Grzela *et al.*, 2006, Michon *et al.*, 2006, Miyoshi *et al.*, 2006).

La circularisation de l'ARN viral est importante pour une traduction efficace (Kawaguchi & Bailey-Serres, 2002), mais elle peut aussi être importante pour la réplication, comme cela a été montré chez les picornavirus (Herold & Andino, 2001). Grâce à cette circularisation, la VPg peut être déplacée à l'extrémité 3', favorisant ainsi son rôle proposé comme amorce pour la synthèse du brin complémentaire (Puustinen & Makinen, 2004), tandis que l'interaction entre RdRp et PABP peut initier la réplication (Dufresne *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2000). La co-localisation des RdRp et eIF4E/eIF(iso)4E dans la membrane des vésicules induites par 6K-VPg-Pro suggère que eIF4E/eIF(iso)4E peut également jouer un rôle dans la réplication (Thivierge *et al.*, 2008).

Les facteurs d'initiation de la traduction et les facteurs d'élongation co-localisent avec les protéines de réplication virale suggérant ainsi que la traduction et la réplication de l'ARN des potyvirus sont couplées (Beauchemin *et al.*, 2007, Beauchemin & Laliberte, 2007, Dufresne *et al.*, 2008, Thivierge *et al.*, 2008). Les étapes de la traduction et la réplication se sont avérées couplés *en cis* chez plusieurs virus à ARN simple brin de polarité positive, tels que le BMV (*Brome mosaic virus*, genre *Bromovirus*) (Yi *et al.*, 2007), le RCNMV (*Red clover necrotic mosaic virus*, genre *Dianthovirus*) (Mizumoto *et al.*, 2006), le SINV (*Sindbis virus*, genre *Alphavirus*) (Sanz *et al.*, 2007), et les poliovirus (Egger & Bienz, 2005, Egger *et al.*, 2000).

Etant donné que le polypeptide 6K-VPg-Pro est liée à la membrane, il peut agir comme un point d'ancrage pour les autres protéines (Beauchemin & Laliberte, 2007). Par conséquent, il a été proposé que ce polypeptide pourrait avoir un rôle important dans la capture des machineries de réplication et de traduction de l'hôte, grâce à son interaction avec

eIF4E/eIF(iso)4E, et les séquestrer dans les vésicules cytoplasmiques où la multiplication virale se produit.

En se basant sur l'ensemble de ces données, on peut émettre comme hypothèse que dans le pathosystème LMV-laitue, les interactions entre Ls-eIF4E, CI-C-ter-6K2 et VPg participent à la circularisation de l'ARN viral pour permettre à la fois la traduction du génome viral et sa réplication.

V.2. Rôle dans le noyau ?

Le rôle potentiel du complexe CI-(6K2)-VPg-eIF4E dans la perturbation des fonctions nucléaires de l'hôte est basée sur l'observation que la VPg-Pro du TuMV interagit *in planta* avec eIF(iso)4E au niveau de structures subnucléaires (Beauchemin et al., 2007). Cela pourrait expliquer l'interruption de l'expression de gènes de l'hôte induite par des potyvirus (Aranda & Maule, 1998). On pourrait formuler comme hypothèse que ce complexe de protéines CI-(6K2)-VPg-eIF4E est importé dans le noyau, pour y jouer un rôle dans la traduction nucléaire ou dans la régulation de gènes cellulaires au profit de la multiplication virale (par l'inhibition de gènes de défense, ou l'induction de gènes nécessaires pour la multiplication). Cependant cette hypothèse est contredite par le fait qu'à ce jour ni l'ARN viral, ni la CI, ni la 6K2 des potyvirus n'aient été détectées dans le noyau de cellules infectées. Par contre, la VPg du PVA a une localisation nucléaire, où elle interagit avec la fibrillarine et cette interaction est très importante pour l'infection virale (Rajamaki & Valkonen, 2009).

V.3. Rôle dans le mouvement de cellule à cellule ?

Selon la dernière hypothèse, le complexe CI-(6K2)-VPg-eIF4E pourrait être impliqué dans le mouvement viral de cellule à cellule. Ainsi, Arroyo et al (1996) ont suggéré que la résistance *pvr2¹* chez le piment bloque le mouvement de cellule à cellule du PVY (Arroyo *et al.*, 1996). En outre, le gène de résistance *sbm1* chez le pois pourrait affecter à la fois le mouvement de cellule à cellule du PSbMV et la multiplication virale au niveau cellulaire (Gao et al., 2004b). Le rôle d'eIF4E dans le mouvement de cellule à cellule pourrait être dû à des interactions entre le cytosquelette et la machinerie de la traduction (Bokros *et al.*, 1995).

De plus, les protéines virales CI, CP et VPg sont aussi impliquées dans le contrôle du mouvement de cellule à cellule (voir § II.4.4.1 de l'introduction). La VPg-Pro du TuMV est localisée dans de structures subnucléaires *in planta* et peut interagir avec eIF(iso)4E (Beauchemin et al., 2007). Cette localisation subnucléaire pourrait jouer un rôle dans le mouvement de cellule à cellule, comme décrit pour *umbravirus*, où la localisation nucléaire de la protéine de mouvement du virus est nécessaire pour la formation ultérieure de particules ribonucléoprotéiques virales capables de se déplacer à longue distance et d'induire une infection systémique (Kim *et al.*, 2007). La CI semble impliquée dans la translocation à travers les plasmodesmes puisqu'elle a été détectée chez divers potyvirus à proximité de ces organes de communication intercellulaire (Carrington et al., 1998, Roberts *et al.*, 1998). De plus, l'interaction de la CI avec la protéine P3N-PIPO conduirait à l'accumulation de la CI sous forme de structures coniques au niveau des plasmodesmes, nécessaires au mouvement de cellule à cellule (Wei *et al.*, 2010b). Même si le rôle de la 6K2 dans le mouvement des potyvirus reste indéterminé, l'ensemble de ces données laissent nous supposer que le complexe formé entre Ls-eIF4E et les facteurs viraux CI-6K2 et VPg pourrait avoir un rôle dans le mouvement de cellule à cellule du LMV.

En conclusion...

Approfondir la connaissance des mécanismes qui gouvernent l'interaction entre le LMV et la laitue ainsi que la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et identifier en particulier des protéines cellulaires, distinctes des facteurs d'initiation de la traduction, recrutées par le pathogène lors des interactions plante virus, constitue l'un des principaux futurs challenges. Pour cela, les approches mécanistiques des interactions moléculaires entre les facteurs de plantes et du virus (CI en particulier) couplées à des approches de génétique ou/et « gènes candidats » (dont ceux impliqués dans la réplication et le mouvement de cellule à cellule du virus) menées en parallèle, permettront de dresser une liste exhaustive des facteurs de plante pouvant représenter de nouveaux candidats de résistance récessive.

Connaître ces protéines qui interviennent aux côtés d'eIF4E dans le cycle viral fournira aux généticiens de nouveaux gènes candidats qu'ils pourront introduire dans les schémas de sélection en vue d'optimiser la résistance anti-virale liée à eIF4E. En présence de formes mutées de ces facteurs aux côtés des allèles de résistance de eIF4E, on peut s'attendre

notamment à une meilleure efficacité et à une meilleure durabilité, le virus ayant plus de difficultés à s'accommoder d'un contexte de résistance polygénique.

Matériels et Méthodes

Nom	Provenance	Comportement		Transmissibilité par la graine	Type	Référence	N° Accession
		<i>mol</i> ¹	<i>mol</i> ²				
0	France	-	-	+	Commun	Revers <i>et al.</i> , 1997	X97704
1	France	+	-	-	?	Revers <i>et al.</i> , 1997	Z78225
13	France	+	+	+	MOST	Revers <i>et al.</i> , 1997	Z78223
9	France	+	-	-	?	Revers <i>et al.</i> , 1997	Z78226
A435	Australie	-	-	-	?	Krause-Sakate <i>et al.</i> , 2002	AF368954
AF198	Brésil	-	-	+	Commun	Krause-Sakate <i>et al.</i> , 2002	AJ278855
AF199	Brésil	+	+	+	MOST	Krause-Sakate <i>et al.</i> , 2002	AJ278854
Dg	Danemark	-	-	ε	Commun	Krause-Sakate <i>et al.</i> , 2002	AF368956
E	Espagne	+	+	-	?	Revers <i>et al.</i> , 1997	X97705
Tn4	Tunisie	+	+	?	MOST	Krause-Sakate <i>et al.</i> , 2002	AF368965
CI2	Chili	+	+	?	Pré-MOST	non publié	-
Cordoue	Espagne	+	-	?	?	non publié	-
CI117	Chili	-	-	?	?	non publié	-
CI248	Chili	-	-	?	?	non publié	-
CI427	Chili	-	-	?	?	non publié	-
CI464	Chili	+	+	?	Pré-MOST	non publié	-
CI480	Chili	+	+	?	Pré-MOST	non publié	-

Tableau 16. Propriétés biologiques et provenance des isolats de LMV analysés lors de ce travail. Capable de contourner la résistance conférée par *mol* ("+"), incapable de contourner la résistance ("-"). Transmissibilité par la graine : non transmissible ("-"), transmissible ("+"), faiblement transmissible ("ε"). Most (*mol*-breaking, Seed-Transmitted).

I. Matériel biologique et conditions de culture

I.1. Matériel végétal

Toutes les plantes utilisées lors de ce travail ont été cultivées en serre à une température d'environ 25°C et avec 16 heures d'éclairement par jour.

Tous les isolats de LMV ont d'abord été multipliés sur la variété de laitue sensible Trocadéro (aucun gène de résistance connu). Ces isolats ont été inoculés par la suite à des variétés de laitue sensible (Salinas) ou porteurs du gène de résistance moI^1 (Mantilia, Floribibb, Alizé, Locness, Mirian, Novir, Prestine, Remco, Krizet, Gallega, Dorémi et Rossia), et moI^2 (Salinas 88).

L'espèce *N. benthamiana* a constitué notre plante modèle pour les expériences de BiFC par agroinfiltration.

I.2. Isolats de LMV

Plusieurs isolats de *Lettuce mosaic virus* (LMV) différant par leur origine géographique et leurs caractéristiques biologiques, ont été analysés lors de ce travail (**Tableau 16**). Les isolats LMV-0, LMV-E, LMV-1, LMV-9 et LMV-13 avaient été fournis par H. Lot (INRA, Montfavet). L'isolat LMV-Dg, isolé sur la composée ornementale *Osteospermum*, avait été fourni par T. Wetzel (Revers *et al.*, 1997) et les isolats LMV-AF198, LMV-AF199 ont été isolés sur laitue (*Lactuca sativa*) au Brésil par M. A. Pavan (Krause-Sakate *et al.*, 2001). L'isolat A435 a été fourni par J. Thomas (Australie). Les isolats suivants ont été collectés par les chercheurs du laboratoire : Tn4 en Tunisie sur laitue, C12, C1464 et C1480 au Chili sur laitue, C1427 au Chili sur laitue sauvage (*L. virosa*), C1248 et C1117 sur *Osteospermum* au Chili et isolat Cordoue sur laitue en Espagne.

1.2.1. Inoculation mécanique des virus

L'inoculum est obtenu par broyage de feuilles infectées dans un mortier en présence de Na_2HPO_4 25 mM, DIECA 2 % (p/v 1/3), additionné de Carborundum (400 mg/g de feuille) et du charbon végétal. Les feuilles des jeunes plants sont alors frottées avec l'inoculum et aussitôt rincées avec de l'eau. Le matériel infecté, récolté 12 à 30 jours après inoculation, peut être conservé pendant plusieurs mois à 4°C après lyophilisation ou utilisé frais.

1.2.2. Inoculation biolistique d'acides nucléiques correspondant aux ADNc complets infectieux du LMV

Le principe de la biolistique consiste à projeter sur des tissus des microparticules d'or de 1 μm de diamètre enrobées d'ADN, à l'aide d'un canon à particules. La force de propulsion est obtenue par détente d'un gaz sous pression (l'hélium). Certaines des microparticules vont pénétrer dans les cellules, transportant avec elles l'ADN. Cet ADN atteindra ensuite le noyau où la transcription de l'ADNc complet infectieux viral aura lieu et permettra la reconstitution de l'ARN génomique viral.

Le protocole de préparation du matériel à bombarder a été fourni par Bio-Rad. Cent μL de spermidine (50 mM) sont ajoutés à 5 mg de billes d'or (diamètre = 1 μm). Après avoir mélangé pendant 30 s au vortex, le plasmide est ajouté à raison de 100 ng par cartouche en présence de 100 μL de CaCl_2 1 M. 10 min à température ambiante sont nécessaires à la précipitation de l'ADN sur les billes d'or. Le mélange est ensuite lavé trois fois dans 1 mL d'éthanol absolu puis repris dans 600 μL de PVP-éthanol 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Il est alors placé dans un tube en plastique « Tefzel Tubing »[®] (Bio-Rad) et séché sous un flux d'azote. L'inoculation biolistique est réalisée avec le pistolet à particules Bio-Rad "Helios Gene Gun", à une pression d'hélium de 180 psi.

1.3. Souches bactériennes

1.3.1. Bactéries utilisées pour le clonage

La bactérie Gram (-) *Escherichia coli* a été utilisée comme organisme de clonage lors de ce travail. Les souches employées, XL1-blue, Top10F', DH10B, BL21-AI et DH5 α présentent les génotypes et caractéristiques suivants :

XL1-blue (Stratagene): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ Δ M15 Tn10* (Tetr)].

Cette souche porte une délétion dans le gène *lac Z* (délétion de la séquence appelée peptide α), permettant l' α -complémentation avec les plasmides de type pUC. Ces plasmides contiennent en effet le domaine codant pour la partie α de la β -galactosidase dans lequel est situé le multisite de clonage (MSC). L'insertion d'un ADN au niveau de ce MCS entraîne l'inactivation de ce peptide. Ainsi en présence d'un substrat chromogène de la β -galactosidase, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal), les colonies bactériennes apparaissent bleues si leur β -galactosidase est active et blanches si cette enzyme n'est pas fonctionnelle. Ce système de sélection blanc/bleu permet une identification visuelle des bactéries contenant un plasmide recombinant.

Top10F' (Invitrogen): F- *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*.

Cette souche est utilisée pour les clonages avec le plasmide pZeroTM-2 et permet aussi l'utilisation de l' α -complémentation avec les plasmides adéquats.

DH10B: F-, *mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, λ -, rpsL, nupG* (GibcoBRL).

Une souche utilisée pour propager les plasmides de grande taille.

DH5 α (Invitrogen) : *supE44 Δ lacU169 (f80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*.

Antibiotique	Concentration finale
Ampicilline	100 µg/mL
Kanamycine	50 µg/mL
Spectinomycine	100 µg/mL
Rifampycine	50 µg/mL
Gentamycine	20 µg/mL

Tableau 17. Concentration finale des différents antibiotiques utilisés.

Cette souche à taux de transformation élevé est très utilisée pour les transformations ne nécessitant pas de spécificités particulières et les transformations effectuées en vue de purifier de l'ADN plasmidique.

BL21-AITM (Invitrogen): F⁻ *ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm araB::T7RNAP-tetA*.

Elle est utilisée pour la surexpression de protéines dont le gène a été inséré dans un vecteur d'expression sous le contrôle du promoteur T7. Cette souche possède une copie chromosomique de l'ARN polymérase T7 sous contrôle d'un promoteur araBAD dont la transcription est induite par l'arabinose. Les bactéries BL21-AI ont permis de surexprimer les protéines CI-C-ter et le facteur d'initiation de la traduction Ls-eIF4E.

1.3.2. Bactéries utilisées pour la transformation de plantes

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 utilisée est une souche désarmée, c'est-à-dire qu'elle contient un plasmide pMP90 Ti « désarmé » dépourvu des gènes tumoraux de l'ADN-T et portant le gène de résistance à la gentamycine. Ce plasmide apporte en *trans* les gènes de virulence (gènes *vir*) nécessaires au transfert dans les cellules de plante d'un brin d'ADN compris entre les séquences bordantes de l'ADN-T, présent sur le plasmide binaire. Une fois transformée avec un plasmide binaire contenant la séquence d'ADN d'intérêt, délimitée par les bordures gauche et droite (LB et RB), la souche bactérienne est capable de transférer cette séquence vers le génome végétal. Le chromosome bactérien possède le gène de résistance à la rifampicine.

1.3.3. Milieux de culture

Les bactéries sont cultivées en milieu riche LB (milieu de Luria-Bertani, BRL) à la température adaptée (37°C pour *E. coli* et 28°C pour *A. tumefaciens*). En milieu liquide, les bactéries sont agitées à 180 rpm dans un récipient d'un volume au minimum cinq fois plus grand que le volume de culture afin de conserver une oxygénation optimale du milieu. Pour les cultures sur milieux solides, du bacto-agar est rajouté au LB (15 g/L). Pour la sélection des bactéries transformées, le milieu de culture est supplémenté par un ou plusieurs antibiotiques selon le vecteur et la souche utilisés, aux concentrations usuelles décrites dans le **Tableau 17**. Les cultures bactériennes à saturation peuvent être conservées à -80°C dans du glycérol 15 % final.

1.4. Les levures

1.4.1. Souche de levure utilisée

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée dans cette étude est la souche diploïde YPH501 dont le génotype est : *ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*. La souche YPH501 possède une délétion de 0.6 kb dans le gène *TRP1* (Sikorski & Hieter, 1989), qui l'empêche de synthétiser le tryptophane. Les transformants sont ainsi sélectionnés en fonction de leur capacité à se développer sur un milieu minimum sans tryptophane.

1.4.2. Milieux de culture

Les cellules de levure ont été cultivées en milieu liquide ou sur milieu semi-solide (contenant 2 % de bactoagar) à 30°C. Le milieu non sélectif utilisé (YPD) contient 1 % « yeast extract » (Difco), 2 % bacto peptone (Difco), 2 % D-glucose. Le milieu de sélection utilisé (Minimal SD Base (Clontech) 2,67 %) est un milieu minimal supplémenté par tous les acides aminés, excepté le tryptophane (-Trp Do supplement (Clontech) 0,074 %). Pour la préparation des milieux de culture, de l'eau bidistillée MilliQ a été utilisée. Les milieux prêts ont été stérilisés en autoclave à 121°C pendant 1 h.

II. Techniques de clonage et de transformation utilisées lors de ce travail

II.1. Clonage « classique » par digestion-ligation

II.1.1. Principe et mode opératoire

L'insert et le vecteur sont digérés par une ou deux enzymes de restriction selon la stratégie du clonage. Dans le cas d'un vecteur linéarisé *via* une seule enzyme de restriction, le

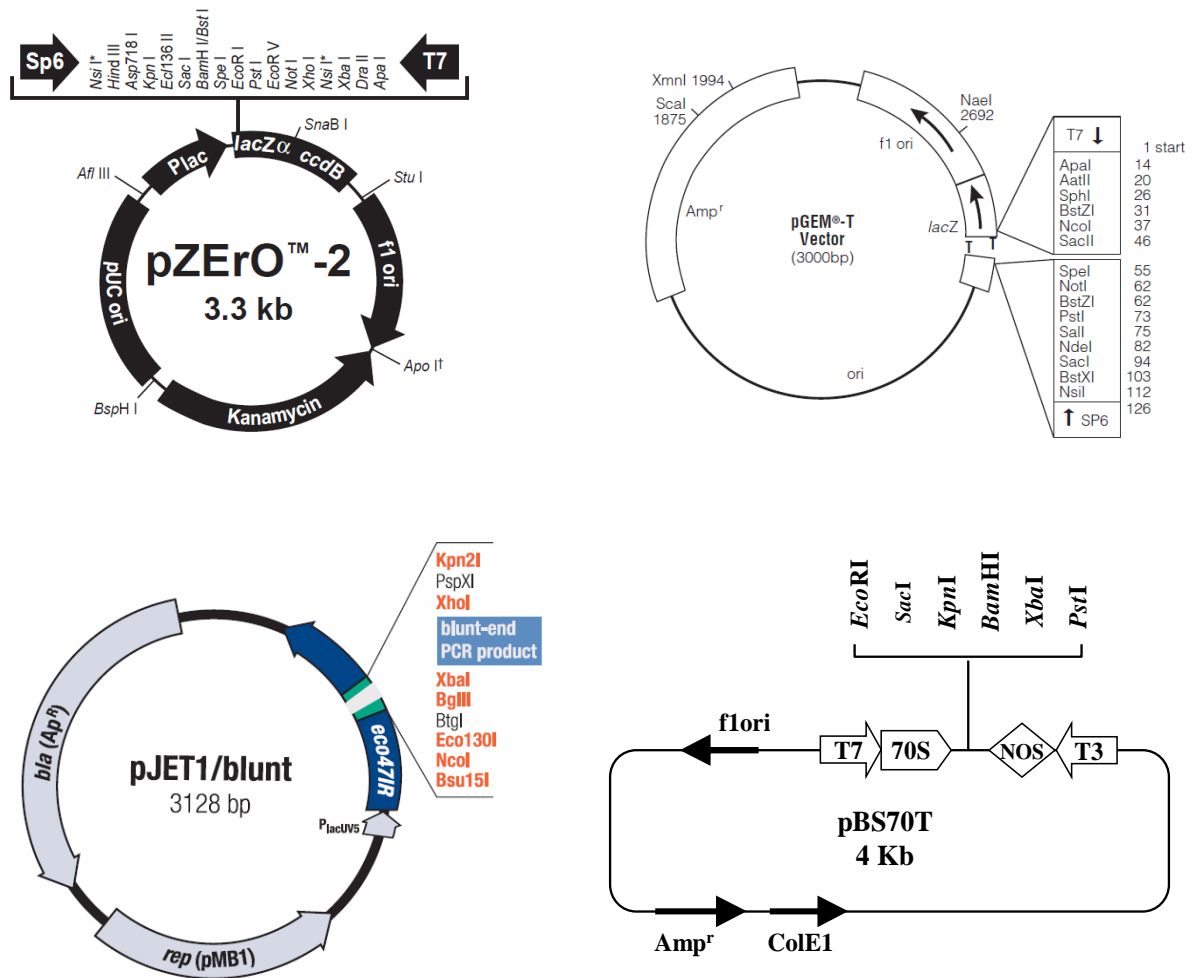


Figure 52. Représentation schématique des différents vecteurs de clonage classique utilisés lors de ce travail.

groupement phosphate de l'extrémité 5' est éliminé afin d'éviter toute re-circularisation du vecteur lors de l'étape de ligation. Cette déphosphorylation est effectuée avec une phosphatase alcaline (Matériel et Méthodes, § III.6.6). L'ADN à cloner (fragment produit par PCR ou par digestion enzymatique) est purifié par électrophorèse sur gel d'agarose (Matériel et Méthodes, § III.3.1). Une étape de sous-clonage dans un vecteur intermédiaire peut être indispensable pour faciliter le clonage dans le vecteur final. Dans ce cas, le fragment d'ADN d'intérêt flanqué de sites de restriction appropriés amplifié par PCR, est cloné dans l'un des vecteurs pZero[™]-2 (Invitrogen), pGEM[®]-T Easy (Promega) ou pJET1/blunt (Fermentas) (Matériel et Méthodes, § II.1.2). Il est ensuite extrait de ce vecteur par digestion enzymatique à l'aide des enzymes de restriction qui lui sont spécifiques.. La ligation dans le vecteur linéarisé au préalable est réalisée à l'aide de la T4 DNA Ligase (Matériel et Méthodes, § III.6.2).

II.1.2. Vecteurs de clonage « classiques »

Différents plasmides sont utilisés pour le clonage, le séquençage, et l'amplification des séquences ADNc du LMV (**Figure 52**).

Le plasmide pZero[™]-2 (Invitrogen) est inclus dans le kit de clonage Zero background[™]/Kan cloning (Invitrogen). Il a été utilisé pour le clonage de fragments d'ADN obtenus par PCR dans la souche d'*E. coli*, TOP10F'. Il contient le gène de résistance à la kanamycine et le gène *ccdB*, létal pour *E. coli*, fusionné avec la partie C-terminale du gène *LacZα*. L'expression de ce gène sous contrôle du promoteur lac est induite par l'IPTG et entraîne la mort des bactéries car il code pour une protéine qui interfère avec la gyrase de l'ADN d'*E. coli*, inhibant ainsi la croissance bactérienne. Le multisite de clonage étant situé dans le gène *LacZα*, la présence d'un insert ne permet plus l'expression du gène *ccdB*. Ce système sélectionne donc en présence de kanamycine et d'IPTG uniquement les bactéries contenant un plasmide recombinant.

Le plasmide pGEM[®]-T Easy (Promega) a été utilisé pour le clonage de produits de PCR issus d'une amplification par la Taq ADN polymérase ou la DyNAzyme[™] EXT DNA Polymérase (Finnzymes) (Matériel et Méthodes, § III.6.3). Ce plasmide permet le clonage de fragments portant une adénine 3' sortante à leurs extrémités. Il possède la partie α du gène de la β-galactosidase permettant la sélection blanc/bleu des plasmides recombinants.

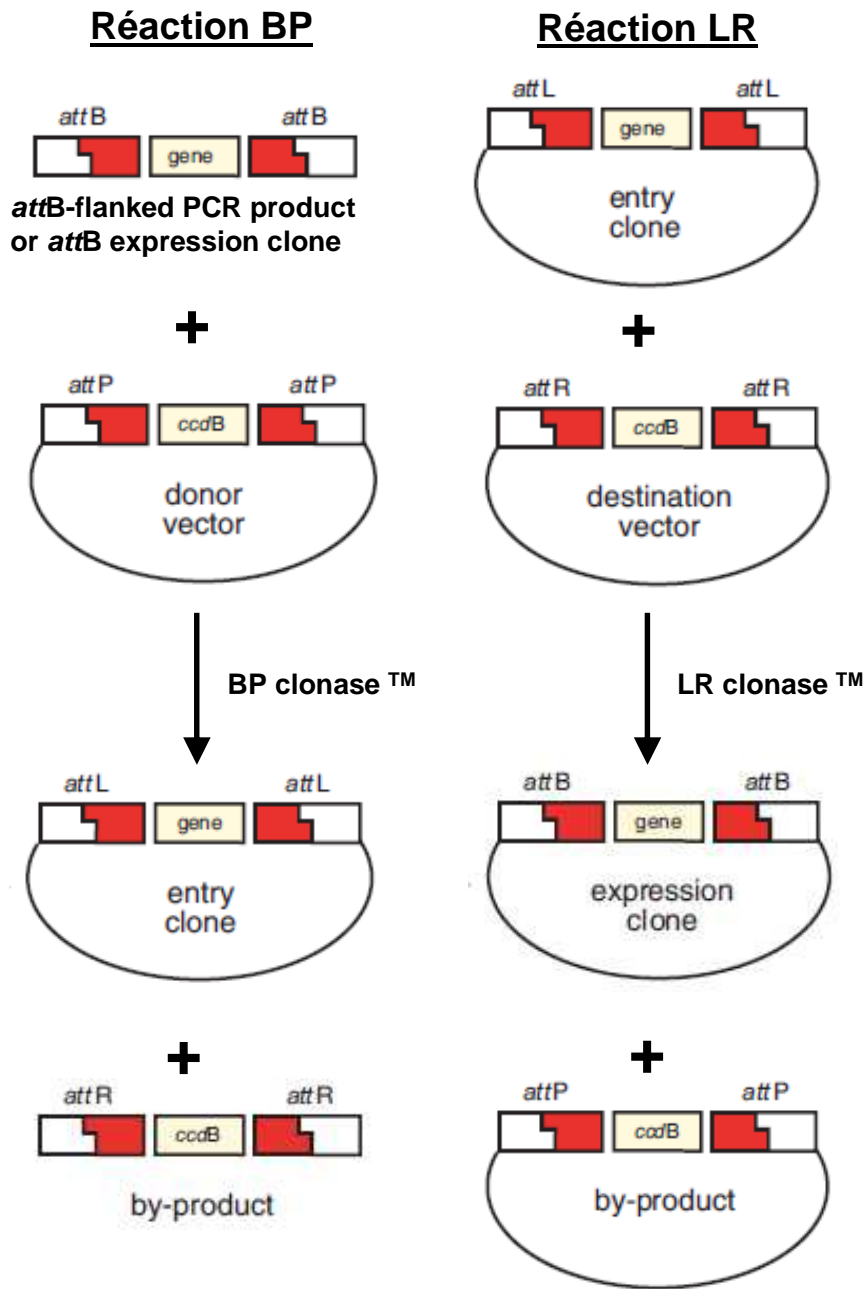


Figure 53. Principe de la technologie Gateway™ (d'après Invitrogen™).

Le plasmide pJET1/blunt (Fermentas) a été utilisé pour le clonage de produits de PCR issus d'une amplification par la Taq ADN polymérase et ne présentant pas d'extrémité adénine 3' sortante.

Le plasmide pBS70T, construit au laboratoire par O. Le Gall et T. Candresse, a été utilisé pour l'obtention du clone complet de LMV-0. Il possède le gène résistance à l'ampicilline, le promoteur 35S du CaMV dont les séquences « enhancer » ont été dupliquées, nommé P70S, et le terminateur du gène de la nopaline synthétase d'Agrobacterium, NOS. Le multisite de clonage, identique à la portion *EcoRI-PstI* de la cassette de clonage de pBS+ (Stratagene) est situé entre P70S et NOS.

II.2. Clonage « Gateway » (Invitrogen)

II.2.1.Principe et mode opératoire

Ce type de clonage a le double avantage d'être rapide et approprié lorsqu'un même fragment d'ADN est à cloner dans plusieurs vecteurs différents. En particulier, dans le cadre de cette thèse, cette technologie s'est montrée optimale pour le clonage de l'ADNc codant pour la région CI-C-ter et la CI entière du LMV, ainsi que le facteur eIF4E de laitue, dans le but d'exprimer ces protéines chez *E. coli* (Matériel et Méthodes, § V.1), ou encore d'étudier des interactions *in vivo* par BiFC (Matériel et Méthodes, § VII).

Cette technique de clonage est basée sur la capacité de recombinaison entre l'ADN du phage lambda et celui d'*E.coli* via les sites *att* lors du cycle lysogénique. L'intégration se fait par recombinaison entre les sites *attP* présents sur l'ADN du phage, et les sites *attB* localisés dans le génome de la bactérie. Cette étape nécessite deux enzymes : une enzyme codée par le phage « *phage protein integrase* » (Int) et un facteur de bactérie « *bacterial protein integration host factor* » (IHF). Ce mélange enzymatique est appelé BP clonase. Cette réaction BP est réversible par utilisation du mélange enzymatique « LR clonase » qui contient les enzymes Int, IHF et une enzyme additionnelle du phage : excisionase (Xis).

Le clonage de la séquence d'intérêt dans un vecteur de destination se fait en deux étapes (Figure 53).

Nom	Amorce	Séquence (5'-3')	Polarité	Cible
A	E5493p	GCGCTCGAGAGTACAACCTCCTTAGGAGCC	sens	CI-C-ter (LMV-E)
B	Emut5939m	CTCCATGTCTGAAGGAACCCCATCACT	antisens	CI-C-ter (LMV-E)
C	Emut5939p	AGTGATGGGGGTTCCTTCGACATGGAG	sens	CI-C-ter (LMV-E)
D	E6043m	TTGAGACCCGAGTCGTTTGCTAAGAGCTCC	antisens	CI-C-ter (LMV-E)
E	0.4041p	CATTAGTATCTACGTGCG	sens	CI-C-ter (LMV-0)
F	0.Not5512m	TGAATGCGGCCGCGACTAAGGAGTT	antisens	CI-C-ter (LMV-0)
G	0.Not6017p	CTCCTTAGTGCGGCCGATTTCAGCTCTCAGTA	sens	CI-C-ter (LMV-0)
H	0.7293m	GGCATCGCTGCATG	antisens	CI-C-ter (LMV-0)
I	0.5444p	AAACTAAGCACGCTGGCAATAC	sens	CI-C-ter (LMV-0A602V)
J	0.5944m	GAAGGTACCCCGTCACC	antisens	CI-C-ter (LMV-0A602V)
K	0.5930p	GACGGGGGTACCTTCGACAT	sens	CI-C-ter (LMV-0A602V)
L	0.6166m	TTGGTGTCTGAAGTGCATCAGC	antisens	CI-C-ter (LMV-0A602V)
M	0.5416P	ACAGTTCAAGTTGAAGGAATCAAG	sens	CI-C-ter (LMV-0)
N	0.6117m	CTTTGCCGTTTACCTTTCCTTGG	antisens	CI-C-ter (LMV-0)
O	0.5192p	CACCATGGGGACGGAAGAAATACC	sens	CI-C-ter (LMV-0, LMV-E)
P	0.6007m	TCATTGGTGATAAATGACATCGATGC	antisens	CI-C-ter (LMV-0, LMV-E)
Q	0.4080pDonr	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGAGCGTTGACGAGATCATTGACC	sens	CI (LMV-0)
R	0.5192pDonr	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGGGACGGAAGAAATACC	sens	CI-C-ter (LMV-0)
S	0.6007mDonr	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT CATTGGTGATAAATGACATCGATGC	antisens	CI (LMV-0)
T	CI-0fusmDonr	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT TGGTGATAAATGACATCGATGC	antisens	CI, CI-C-ter (LMV-0)
U	K7p	CCCCACTACGTGCTCGAGGGGGTGGAGC	sens	Cassette de levure
V	K7m	CCCCACGTAGTGCTCGAGTCGGTTCGAAAAA AG	antisens	Cassette de levure
W	0.5762p	TTCAAACAGTCACAGC	sens	CI-C-ter -6K2-VPg (LMV)
X	0.6939m	ACGTATTCACCATGTCTCG	antisens	CI-C-ter -6K2-VPg (LMV)

Tableau 18. Amorges utilisées lors de ce travail.

Lors de la première, l'ADN d'intérêt est amplifié par PCR en utilisant des amorces hybrides possédant des extensions *attB1* en 5' et *attB2* en 3'. Ce produit de PCR permet de réaliser (grâce à l'extension *attB*) une recombinaison *in vitro* (réaction BP) avec les sites *attP* du vecteur pDONR™221 (Invitrogen) (Matériel et Méthodes, § II.2.2) conduisant au clone « d'entrée ». Un système alternatif à la construction des clones d'entrée est l'utilisation du vecteur d'entrée pENTR/D TOPO® (Matériel et Méthodes, § II.2.2) permettant de cloner grâce à l'action de la topoisomérase du virus *Vaccinia* (réaction TOPO) des produits PCR comportant à l'extrémité 5' du brin sens la séquence CACC.

La deuxième étape du clonage consiste en une recombinaison entre les deux sites *attL* présents sur le vecteur d'entrée et les deux sites *attR* du vecteur de destination (réaction LR) (**Figure 53**).

Les fragments CI-C-terminaux (aa 372-643) dérivés de LMV-0, LMV-E et des mutants ponctuels LMV-0-S621T et LMV-E-T621S, ainsi que la CI entière (aa 1-643) du LMV-0, ont été amplifiés par PCR en utilisant les amorces répertoriées dans le **Tableau 18**.

Les réactions de PCR ont été réalisées avec la *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) DNA Polymérase (Stratagene) ou la Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) (Matériel et Méthodes, § III.6.3).

Les gènes d'intérêt ont été ensuite clonés dans les plasmides d'entrée pENTR TOPO® ou pDONR™221 (**Tableau 19**). La réaction de TOPO cloning s'effectue à température ambiante pendant 20 min, en présence de 5-10 ng de vecteur pENTR TOPO®, 1 µL de produit PCR, 1 µL de solution de sel (NaCl 1.2 M, MgCl₂ 0.06 M).

La réaction de BP cloning se fait à 25°C pendant 1 h, en présence de 150 ng de vecteur pDONR™221, 1-7 µL de produit PCR, 2 µL de BP clonase™. La BP clonase est inactivée par addition de 1 µL de protéinase K durant 10 min à 37°C. Les bactéries DH5α (Invitrogen®) et OmniMAX™2-T1R sont transformées avec les produits de la réaction de TOPO cloning et de BP cloning respectivement. Les clones positifs sélectionnés (résistants à la kanamycine), appelés clones d'entrée recombinants, (ou pEntry) sont ensuite séquencés.

Lorsque le clone a été contrôlé par séquençage, le gène d'intérêt est transféré dans le vecteur de destination choisi, lors de la réaction « LR », pendant une heure à 25°C, en présence de 1 µL de plasmide de destination, 2 µL de pEntry recombinant, 2 µL de tampon LR (5x) et 2 µL de LR clonase. La LR clonase est ensuite inactivée par addition de 1 µL de protéinase K pendant 10 min à 37°C. Des bactéries DH5α (Invitrogen) sont transformées avec le produit de la réaction LR et mises en culture dans des boîtes de Pétri contenant du LB-Agar supplémenté par un antibiotique selon le vecteur de destination utilisé.

Nom du clone obtenu	Vecteur de clonage	Matrice pour la PCR	Amorces utilisées pour amplifier l'insert ^a
Clonage classique			
pZero-E-T621S	pZero TM -2	pLMV-E	PCR1 : (A+B), PCR2 : (C+D), PCR3 : (A+D)
LMV-E-T621S	pLMV-E		
pZero-0ΔCI	pZero TM -2	pLMV-0	PCR1 : (E+F), PCR2 : (G+H), PCR3 : (E+H)
pLMV-0ΔCI	pLMV-0		
pZero-0-A602V/S621T	pZero TM -2	pLMV-0-A602V	PCR1 : (I+J), PCR2 : (K+L), PCR3 : (I+L)
Clonage dans la levure			
LMV-0-A602V/S621T	pLMV-0ΔCI	pZero -0-A602V/S621T	(M+N)
Clonage Gateway			
I. Vecteurs d'entrée			
pENTR-CI-Cter-0	pENTR/D TOPO [®]	pLMV-0	(O+P)
pENTR-CI-Cter-0S621T	pENTR/D TOPO [®]	pLMV-0-S621T	(O+P)
pENTR-CI-Cter-E	pENTR/D TOPO [®]	pLMV-E	(O+P)
pENTR-CI-Cter-ET621S	pENTR/D TOPO [®]	pLMV-E-T621S	(O+P)
pDONR-CI-Cter-0mut ^b	pDONR TM 221	pLMV-0	(R+T)
pDONR-CI-0	pDONR TM 221	pLMV-0	(Q+S)
pDONR-CI-0mut ^b	pDONR TM 221	pLMV-0	(Q+T)
II. Vecteurs de destination			
pDEST 17-CI-Cter-0	pDEST 17		
pDEST 17-CI-Cter-0-S621T	pDEST 17		
pDEST 17-CI-Cter-E	pDEST 17		
pDEST 17-CI-Cter-E-T621S	pDEST 17		
pDEST 17-GFP	pDEST 17		
CI-0-Cter-YN (pUGW)	nEYFP/pUGW2		
CI-0-Cter-YC (pUGW)	cEYFP/pUGW2		
YN-CI-0-Cter (pUGW)	nEYFP/pUGW0		
YC-CI-0-Cter (pUGW)	cEYFP/pUGW0		
CI-0-YN (pUGW)	nEYFP/pUGW2		
CI-0-YC (pUGW)	cEYFP/pUGW2		
YN-CI-0 (pUGW)	nEYFP/pUGW0		
YC-CI-0 (pUGW)	cEYFP/pUGW0		
eIF4E ⁰ -YN (pUGW)	nEYFP/pUGW2		
eIF4E ⁰ -YC (pUGW)	cEYFP/pUGW2		
YN- eIF4E ⁰ (pUGW)	nEYFP/pUGW0		
YC- eIF4E ⁰ (pUGW)	cEYFP/pUGW0		
CI-0-Cter-YN (pBiFP)	pBiFP-1		
CI-0-Cter-YC (pBiFP)	pBiFP-4		
YN-CI-0-Cter (pBiFP)	pBiFP-2		
YC-CI-0-Cter (pBiFP)	pBiFP-3		
CI-0-YN (pBiFP)	pBiFP-1		
CI-0-YC (pBiFP)	pBiFP-4		
YN-CI-0 (pBiFP)	pBiFP-2		
YC-CI-0 (pBiFP)	pBiFP-3		
eIF4E ⁰ -YN (pBiFP)	pBiFP-1		
eIF4E ⁰ -YC (pBiFP)	pBiFP-4		
YN- eIF4E ⁰ (pBiFP)	pBiFP-2		
YC- eIF4E ⁰ (pBiFP)	pBiFP-3		

Tableau 19. Clones obtenus lors de ce travail. ^a Amorces référencées dans le Tableau 18.

^b Clone contenant un implicon avec codon stop.

II.2.2. Vecteurs de clonage gateway

Le plasmide pENTR/D TOPO[®] (Invitrogen) (**Figure 54**) a été utilisé comme vecteur « d'entrée » dans le système Gateway. Ce vecteur peut intégrer rapidement (en 5 min) des produits PCR comportant à l'extrémité 5' du brin sens la séquence CACC grâce à l'action de la Topoisomérase I du virus *Vaccinia*. De plus, il permet d'obtenir une intégration spécifique et directionnelle (conservation du cadre de lecture). Ce vecteur est silencieux : il ne possède pas de promoteur, ni de séquence d'initiation de la traduction. Ces séquences devront donc être apportées par le plasmide de destination. Ce vecteur donneur contient également un gène de résistance à la kanamycine (Km^R).

Le plasmide pDONRTM221 (Invitrogen): Plasmide donneur compatible avec la technologie Gateway pour l'obtention du clone d'entrée. Ce vecteur possède des sites de recombinaison *attP1* et *attP2* permettant le clonage d' amplicons de PCR flanqués des sites *attB* par réaction de BP clonase. Ce vecteur porte un gène de résistance à la kanamycine (Km^R), ainsi qu'un second au chloramphénicol (Cm^R) inséré entre les 2 sites *attP* (**Figure 54**).

II.3. Clonage par recombinaison homologue chez la levure

II.3.1. Principe et mode opératoire

La stratégie de clonage chez la levure, repose sur le mécanisme de recombinaison homologue et permet d'intégrer un fragment d'ADN dans un vecteur sans passer par une étape de ligation. En effet, la co-transformation de la levure d'un produit d'amplification obtenu par PCR et d'un plasmide délété d'une partie de la région correspondant à l'amplicon PCR et linéarisé à cet endroit, conduit à la réparation de ce « gap » par recombinaison au niveau de la zone de chevauchement homologue (Kostrub *et al.*, 1998).

Le mélange des deux ADN (amplicon PCR et plasmide linéarisé) est transféré dans la souche de levure YPH501 par une méthode dite « LiAc ». Selon cette méthode, une culture de 25 mL de levure est lancée à partir d'une pré-culture de 5 mL dans le milieu non sélectif liquide YPD, à 30°C et sous agitation (250 rpm). Quand la DO₆₀₀ = 0.7 est atteinte, la culture est centrifugée à 5000 rpm pendant 8 min. Après deux lavages avec 10 mL d'eau distillée

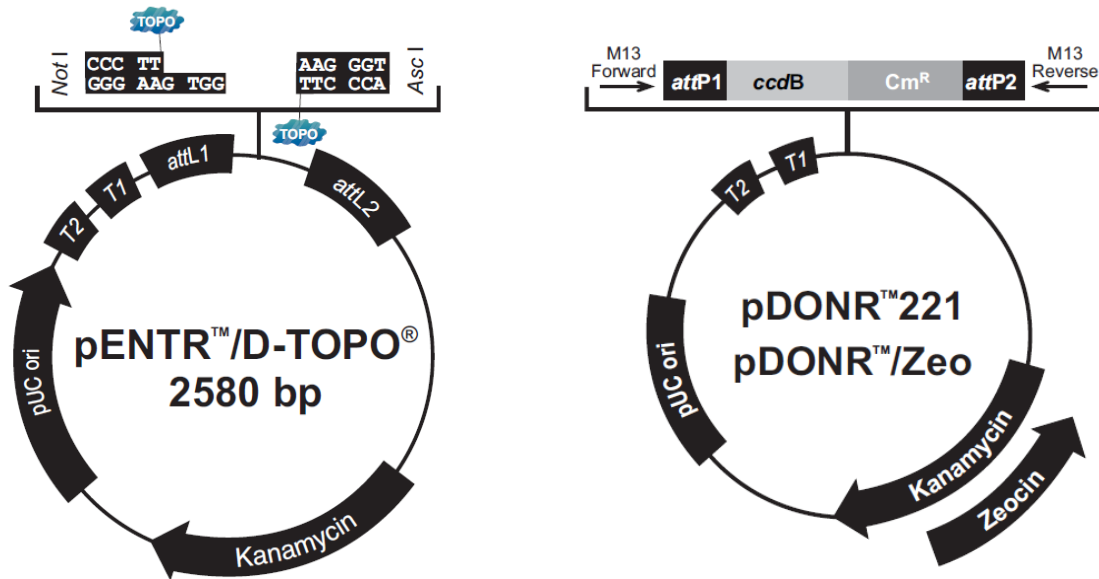


Figure 54. Représentation schématique des vecteurs d'entrée utilisés dans le système de clonage Gateway.

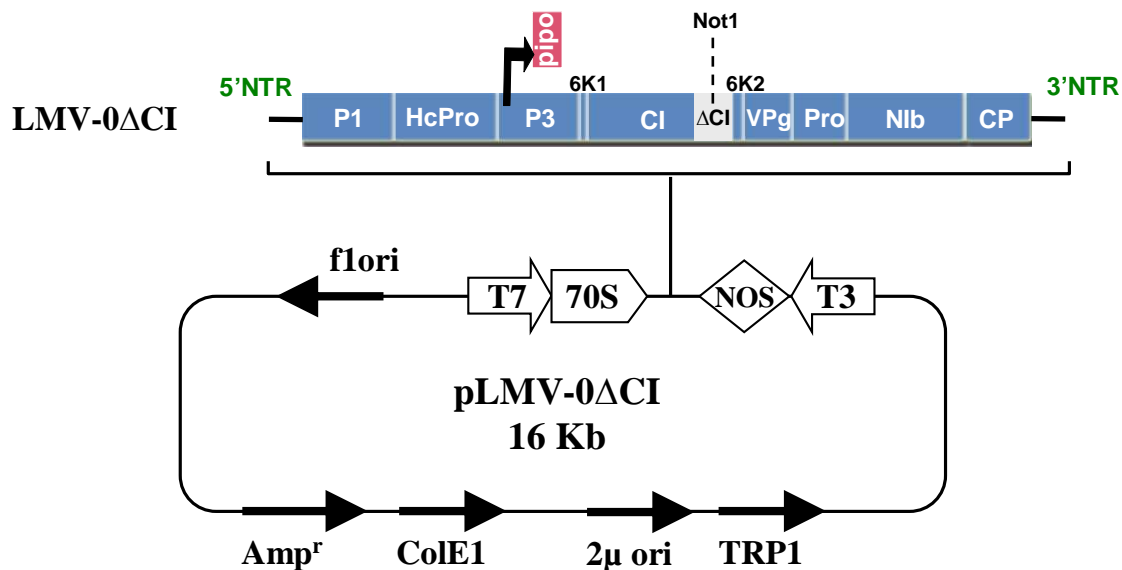


Figure 55. Représentation schématique du vecteur pLMV-0ΔCI.

stérile autoclavée, le culot est repris dans 500 µL de tampon « LiAc » (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM acétate de lithium). Après centrifugation à 5000 rpm pendant 5 min, le culot est à nouveau repris dans 500 µL de tampon « LiAc ».

Pour la transformation des levures, le mélange suivant est constitué : 70 µg d'ADN entraîneur (solution d'ADN de sperme de saumon « Stratagene » dénaturé au préalable par chauffage) 15 µL d'ADN correspondant au mélange insert /vecteur (ratio molaire de 3 /1), 100 µL de levures resuspendues dans le tampon « LiAc », et 700 µL de tampon « PEG/LiAc » [10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM acétate de lithium, 40 % (p/v) de polyéthylène glycol (PEG)]. L'ensemble est homogénéisé par pipetages successifs puis incubé pendant 2 h à 30°C sous agitation forte à 250 rpm. La transformation se fait alors par choc thermique pendant 15 min à 42°C. Les levures sont ensuite centrifugées 5 min à 5000 rpm, lavées avec 400 µL d'eau distillée stérile autoclavée puis centrifugées 5 min à 5000 rpm. Le culot est repris dans 400 µL d'eau distillée stérile autoclavée. Un volume de 250 µL de ces cellules est ensuite étalé avec des billes de verre (Ø 0.45 µm) sur une boîte de Pétri contenant du milieu sélectif. La boîte est ensuite incubée à 30°C pendant 48 h au minimum.

Les colonies de levures dans lesquelles la recombinaison homologe s'est produite, sont repérées par leur capacité à pousser sur le milieu de sélection, dépourvu de Tryptophane.

II.3.2. Vecteur de clonage dans la levure dérivé de pLMV-0

Le plasmide pLMV-0-ΔCI, est un «vecteur navette», capable de se répliquer à la fois chez *E.coli* et dans la levure, qui a été obtenu au cours de cette thèse à partir du clone d'ADNc complet de LMV-0 (**Tableau 19**). Il a été construit en délétant une partie (168 aa) de la région CI-C-ter de l'ADNc du LMV-0 et en y introduisant un site de restriction unique Not1. Une séquence d'environ 2 kb contenant l'origine de réplication 2µ de la levure ainsi que le gène de sélection *Trp1* (marqueur autotrophie pour le tryptophane) sous le contrôle de son promoteur levure (cassette de levure), a été insérée dans le plasmide pBS70T (**Figure 55**). Ce plasmide a été utilisé dans la technique de clonage par recombinaison homologue chez la levure décrite ci-dessus pour obtenir le double mutant pLMV-0-A602V/S621T (**Tableau 19**) (Chapitre 1, § III.2) ainsi qu'une banque de mutants ponctuels et aléatoires dérivés de LMV-0 (Chapitre 2, § II et III).

Les différents clones obtenus lors de cette thèse sont référencés dans le **Tableau 19**.

II.4. Transformation bactérienne

II.4.1. Transformation par électroporation

La méthode d'électroporation (Dower *et al.*, 1988, Neumann *et al.*, 1982) consiste à introduire des macromolécules dans des cellules compétentes en créant des pores membranaires transitoires à l'aide d'un champ électrique. Les bactéries compétentes sont obtenues par lavages successifs de cellules en fin de phase exponentielle de croissance ($DO_{600} = 0.6$) dans du glycérol 10 % froid et stérile (Zabarovsky & Winberg, 1990). Elles sont utilisées à une concentration de $5 \cdot 10^5$ cellules/mL. Un champ électrique de 1800V/cm est appliqué durant 9 millisecondes (résistance 200 Ω , capacité de 25 μ F) à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser[®] II (Bio-Rad). Après une incubation de 1 h à 37°C dans du milieu SOC (bacto-tryptone 2 % p/v, extrait de levure 0.5 % p/v, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, glucose 20 mM), les bactéries sont étalées sur du milieu LB solide contenant les antibiotiques de sélection, additionné de X-Gal (20 μ g/mL) et d' IPTG (0,5 mM) dans le cas de l' α - complémentation. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant une nuit pour *E. coli* et à 28°C pendant 2 jours pour *A. tumefaciens*.

II.4.2. Transformation par choc thermique

Dans le cas des bactéries Top10F', DH5 α et BL21-AI chimio-compétentes, l'introduction de plasmides se fait par choc thermique. Après avoir été maintenu sur glace 30 min, le mélange composé d'ADN plasmidique et de 50 μ L de bactéries est incubé pendant 45 s à 42°C puis aussitôt placé sur glace. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du milieu SOC, incubées 1 heure à 37°C sous agitation, puis étalées sur milieu solide sélectif. Les boîtes sont incubées pendant une nuit à 37°C.

III. Techniques de manipulation des acides nucléiques

Au cours de ce travail, la plupart des techniques classiques de biologie moléculaire ont été utilisées suivant les protocoles décrits dans (Sambrook, 1989) ou dans les fiches techniques des fournisseurs.

III.1. Extraction d'acides nucléiques

III.1.1. Extraction d'ARN totaux de plante (selon la méthode dite de Bertheau)

Les feuilles de plantes infectées sont broyées dans un mortier en présence de 5 volumes (P/V) de PBS-Tween [NaCl 136,9 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, K Tween 20 0,05 % (v/v)], additionné de PVP 25K 2 % (p/v), et de DIECA 20 mM. Ce broyat est centrifugé durant 10 min à 13000 rpm, puis 200 µL du broyat clarifié est additionné de 20 µL de SDS 10 % et incubé pendant 15 min à 55°C. Le mélange est placé ensuite pendant 5 min dans de la glace en présence de 100 µL d'acétate de potassium 3M/5M (acétate de potassium 3M / acide acétique 5 M), puis centrifugé pendant 5 min à 13000 rpm. Les ARN présents dans le surnageant sont fixés sur de la silice en présence de NaI [surnageant supplémenté de 700 µL de NaI 6 M et de 5 µL de silice (Sigma)] et laissés 10 min à température ambiante. Après 2 étapes de lavages avec une solution composée de 20 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50% éthanol, les ARN sont repris dans 300 µL d'eau distillée stérile autoclavée.

III.1.2. Extraction d'ADN plasmidique d'E. coli

Les plasmides sont extraits par la méthode de la lyse alcaline (Sambrook, 1989) à partir d'une culture bactérienne en phase stationnaire. En routine, le plasmide ainsi purifié est analysé par électrophorèse, après digestion par des enzymes de restriction.

Pour le séquençage, les plasmides sont extraits grâce à l'utilisation du kit WIZARD[®] Plus SV DNA Purification System (Promega). Cette méthode, plus rapide, est basée sur la chromatographie sur colonnes de silice et permet un meilleur rendement.

III.1.3. Extraction d'ADN plasmidique de levure

La préparation d'ADN plasmidique de levure ne permet pas son analyse directe car elle contient un mélange d'ADN plasmidiques en quantité beaucoup trop faibles. Cet ADN est donc essentiellement utilisé pour transformer des bactéries afin d'isoler et amplifier les ADN plasmidiques et les analyser.

Les plasmides sont extraits à partir d'une culture de levure en phase stationnaire (2-3 mL de milieu sélectif ensemencé à partir d'une colonie de levure) ayant poussé à 30°C sous agitation à 250 rpm pendant 24 à 30 h. Les cellules sont sédimentées par centrifugation pendant 5 min à 5000 rpm à température ambiante. Après l'addition de 200 µL de « tampon d'extraction d'ADN de levure » [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 2 % (v/v) Triton X-100, 1 % (p/v) SDS (sodium dodécyl sulfate)] ainsi que de 200 µL de mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v), les cellules sont broyées à l'aide de billes de verre (Ø 0.45 µm) par agitation vigoureuse pendant 5 min. Le surnageant est ensuite extrait par 200 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v). L'ADN est précipité par addition de 20 µL d'acétate de sodium 3,3 M et de 550 µL d'éthanol absolu froid pendant au moins 2 h à -20°C, puis centrifugé pendant 30 min à 14000 rpm à 4°C. Les sels sont éliminés par lavage avec 600 µL d'éthanol à 70 % froid. L'ADN est séché sous vide puis remis en suspension dans 50 µL de tampon TE (Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) contenant 200 µg/mL de RNase A, et la solution est incubée 20 min à 50°C. De la protéinase K (80 µg/mL final) et du SDS [0,5 % (p/v) final] sont ajoutés et l'incubation est poursuivie durant 20 min à 37°C. Un volume égal de mélange 0,8 M NaCl, 13 % (p/v) PEG₆₀₀₀ est ajouté afin de précipiter les acides nucléiques de grande taille (1 h à 0°C). Après centrifugation, rinçage du culot par l'éthanol 70 % et séchage sous vide, le culot d'ADN est repris dans 10 à 15 µL d'eau distillée stérile autoclavée. L'ADN ainsi préparé est utilisé pour la transformation de bactéries compétentes *E. coli* par électroporation (Matériel et Méthodes, § II.4.1).

III.2. Séparation des acides nucléiques par électrophorèse en gel d'agarose

Les acides nucléiques sont des polyanions. Dans un champ électrique, ils migrent donc vers l'anode. Ils peuvent être séparés selon leur taille grâce à une migration dans une structure réticulée telle que des gels d'agarose préparés dans un tampon conducteur. Les ADN non marqués sont visualisés grâce au bromure d'éthidium (BET; 0.5 µg/mL), molécule qui s'intercale dans les acides nucléiques et émet une lumière visible quand elle est exposée à des rayons UV (254 nm). Les gels d'agarose utilisés sont horizontaux et leur concentration est généralement comprise entre 0.7 et 2 % (p/v). La migration s'effectue dans du tampon TBE (Tris 89 mM, borate 89 mM, EDTA 2 mM), sous une tension de 50 à 120 V. Avant la charge, les échantillons sont additionnés de 1/5^{ème} de leur volume par du tampon de charge 6X

(EDTA 60 mM, SDS 0.6 % p/v, glycérol 30 % p/v, bleu de bromophénol 0.1 % p/v, xylène cyanol 0.1 % p/v).

III.3. Purification d'acides nucléiques

III.3.1. Purification de fragments d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose

Après électrophorèse, le fragment d'intérêt est excisé sous lumière UV avant d'être purifié à l'aide du kit GENE CLEAN[®] Turbo (Q-BIOgene). La bande de gel découpée est placée à 50°C dans une solution saline (GENE CLEAN[®] Turbo Salt Solution) pour entraîner la dissolution de l'agarose et favoriser l'adsorption de l'ADN sur la silice contenue dans les colonnes de purification fournies dans le kit. L'ADN fixé sur la silice est ensuite lavé avec la solution de lavage fournie (GENE CLEAN[®] Turbo Wash Concentrate) et élué avec un faible volume d'eau (10 à 30 µL selon l'intensité de la bande).

III.3.2. Purification de fragments PCR ou de produits de digestion

Afin de faciliter le clonage de certains fragments d'ADN, les dimères d'amorces issus de la PCR ou les enzymes de restriction présentes dans le mélange réactionnel sont éliminés grâce à l'utilisation de l'un des kits commerciaux MSB[®] Spin PCRapace Kit (INVITEK) ou GENE CLEAN Turbo (Q-BIOgene). Le principe repose sur l'emploi d'une matrice de silice qui retient les fragments de plus de 100 pb. Après lavages, l'ADN est repris dans de l'eau ou du tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.

III.4. Déprotéinisation des acides nucléiques

Les solutions d'acides nucléiques sont traitées par un volume égal d'un mélange de phénol saturé en Tris-HCl 50 mM pH 8, chloroforme et alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v). Après homogénéisation et centrifugation (13500 rpm pendant 5 min à 4°C), la phase aqueuse est traitée par un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24/1, v/v). Après une nouvelle homogénéisation et centrifugation, la phase aqueuse obtenue est dépourvue de protéines.

III.5. Précipitation des acides nucléiques

Les acides nucléiques en solution sont précipités par addition de 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 2,5 volumes d'éthanol à 95 % ou 0,6 volumes d'isopropanol. Le mélange est centrifugé durant 30 min à 13500 rpm à 4°C. Le culot d'acides nucléiques est rincé par de l'éthanol à 70 % et séché.

Lorsque les acides nucléiques sont en faible quantité (moins de 1 µg), des ARN de transfert (ARNt) (10 µg) peuvent être ajoutés comme entraîneurs de précipitation.

III.6. Modifications enzymatiques

Les acides nucléiques sont les substrats de nombreuses réactions enzymatiques permettant leur manipulation *in vitro*. En règle générale, les enzymes sont éliminées après leur action par déprotéinisation (Matériel et Méthodes, § III.4) ou par l'utilisation d'un kit de purification comme décrit dans le paragraphe III.3.2 et les acides nucléiques sont précipités par l'éthanol (Matériel et Méthodes, § III.5).

III.6.1. Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction reconnaissent spécifiquement une courte séquence d'ADN bicaténaire (le plus souvent un palindrome 6 nucléotides) et coupent la molécule à ce niveau. Elles sont utilisées pour caractériser une molécule d'ADN et lors des clonages pour préparer le plasmide et le fragment d'ADN à insérer. Le temps d'incubation et la quantité d'enzyme à utiliser dépendent de la quantité d'ADN à digérer. En général, 1 µg d'ADN plasmidique est coupé par 5 unités d'enzyme après 1 h d'incubation à la température préconisée.

III.6.2. L'ADN ligase du bactériophage T4

Cette enzyme catalyse la liaison covalente entre deux molécules d'ADN. Elle est capable de lier entre elles des extrémités franches ou cohésives. Elle utilise l'ATP comme cofacteur. La réaction est réalisée dans un volume de 20 µL en une nuit à 14°C en présence d'une unité

d'enzyme pour 50 à 200 ng de vecteur dans le tampon recommandé par le fournisseur qui contient de l'ATP et du PEG.

Pour les clonages dans le vecteur pZero-TM2, la ligation est réalisée dans un volume de 10 µL après incubation 30 min à 16°C en présence de 2 unités d'enzyme, suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Dans le vecteur pGEM®-T Easy, la ligation s'opère à température ambiante pendant une heure en présence de 3 unités de l'enzyme fournie dans le kit.

III.6.3. Les ADN polymérase ADN dépendantes

Les ADN polymérase ADN dépendantes synthétisent des molécules d'ADN à partir de matrices d'ADN. Pour l'amplification d'acides nucléiques par PCR, quatre polymérase thermostables ont été utilisées.

La *Taq* ADN polymérase (Q-BIOgene) isolée de *Thermus aquaticus* a permis l'amplification de l'ADNc issu de l'étape de reverse transcription lors des réactions de RT-PCR (Matériel et Méthodes, § III.7.4).

La PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) est dérivée de l'ADN polymérase de type *Pyrococcus* à laquelle un domaine de fixation à l'ADN a été rajouté pour augmenter son efficacité de synthèse.

La *Pfu* ADN polymérase (Stratagene) isolée de *Pyrococcus furiosus* possède une activité exonucléasique correctrice 3'→5' qui rend la polymérisation plus fiable.

La DyNAzymeTMEXT DNA Polymérase (Finnzymes) est un mélange enzymatique comprenant : la DyNAzyme II (qui possède une activité exonucléasique 5'→3') et une enzyme dite de « proof reading » portant une activité de relecture 3'→5'.

Ces trois dernières polymérase sont beaucoup plus « fiables » que les ADN Polymérase classiques et ont été utilisées pour amplifier des séquences destinées à être clonées puis séquencées.

III.6.4. Les reverse transcriptases

La transcription inverse (RT) permet la synthèse de molécules d'ADN complémentaires (ADNc) simple brin à partir d'une matrice d'ARN. Un mélange de Reverse Transcriptases a été utilisé préalablement aux réactions de PCR sur des extraits d'ARNs totaux de plantes infectées, le mélange Reverse-iT™ de ABgene. Il s'agit d'un mélange de reverse transcriptases extraites du virus de la myéloblastose aviaire (AMV Reverse Transcriptase) et du virus de la Leucémie Murine de Moloney (M-MLV Reverse Transcriptase) combinant les propriétés de chacune de ces enzymes et optimisé en terme de sensibilité et de stabilité.

III.6.5. Les nucléases

La RNase A (Sigma) est une ribonucléase isolée de pancréas bovin et a été utilisée pour dégrader les ARN d'origine bactérienne présents dans les préparations d'ADN plasmidique (Matériel et Méthodes, § III.1.2).

III.6.6. La phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline extraite de l'intestin de veau (CIAP) (Invitrogen) catalyse l'hydrolyse des groupements phosphate situés à l'extrémité 5' des acides nucléiques. Elle est essentiellement utilisée pour la préparation des vecteurs de clonage, la déphosphorylation empêchant la re-circularisation du vecteur sur lui-même lors de l'étape de ligation.

La déphosphorylation est réalisée après linéarisation du vecteur par une enzyme de restriction qui a été généralement inactivée par chauffage à 70°C pendant 10 min. Une unité de phosphatase est ensuite rajoutée directement au milieu réactionnel. Après incubation (10 min à 37°C pour des extrémités cohésives, 1 h à 37°C pour des extrémités franches) la phosphatase est inactivée par une étape de déprotéinisation (Matériel et Méthodes, § III.4), et l'ADN est précipité par l'éthanol (Matériel et Méthodes, § III.5).

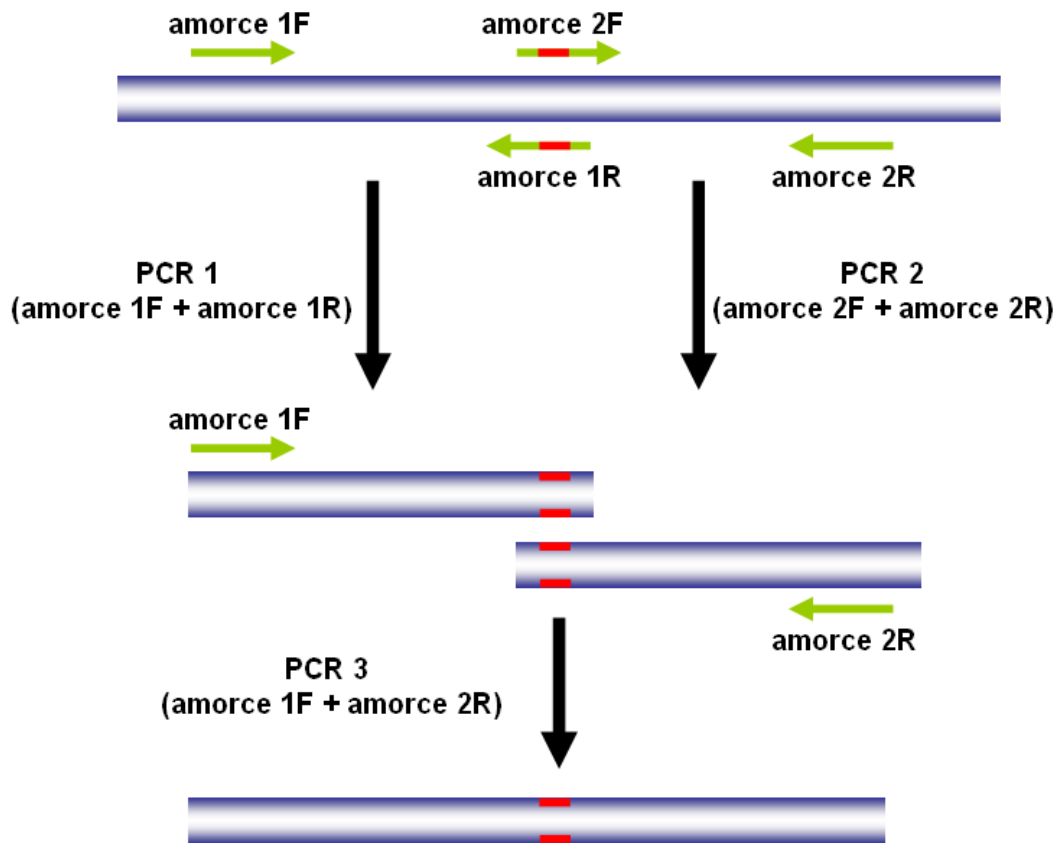


Figure 56. Principe de la mutagenèse dirigée par Fusion-PCR. Les amorces sont représentées par des flèches vertes. Les traits rouges schématisent la mutation introduite.

III.7. Techniques d'amplification de séquence par PCR

III.7.1. La PCR

Les réactions d'amplification sont réalisées en présence d'1 unité de polymérase, dans le tampon du fournisseur additionné de MgCl₂ (1,5 mM), de dNTP (250 µM chacun) et d'un couple d'amorces (1 µM chacune). Après 5 min de dénaturation à 95°C, l'amplification est effectuée pendant 40 cycles successifs comprenant à chaque fois les étapes de dénaturation (95°C pendant 20 s-1 min), d'hybridation (à une température dépendant des T_M des amorces pendant 20 s-1 min) et d'élongation (68°C ou 72°C pendant 40 s-3 min).

Dans le cas de la PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) la première étape de dénaturation se fait à 98°C pendant 30 s, suivie par 40 cycles successifs comprenant à chaque fois les étapes de dénaturation (98°C pendant 7 s), d'hybridation (à une température dépendant des T_M des amorces pendant 20 s) et d'élongation (72°C pendant 40 s-3 min).

III.7.2. Mutagenèse dirigée par fusion-PCR

Cette technique a été utilisée afin d'obtenir des mutants ponctuels dans la région CI-C-ter du LMV-0 et du LMV-E. Deux premières PCR parallèles réalisées avec les oligonucléotides portant la mutation à introduire (amorces 1R et 2F) permettent d'obtenir deux amplicons, qui possèdent une région de chevauchement de 20 nucléotides centrée autour de la mutation (**Figure 56**). Les amplicons sont purifiés en utilisant le kit MSB[®] Spin PCRapace Kit (INVITEK). La troisième PCR est réalisée en présence des deux amplicons obtenus précédemment, purifiés et dilués au 1/1000^{ème} et des deux amorces externes (amorces 1F et 2R). Les réactions de PCR sont réalisées en présence de 2.5 unités de Taq polymérase *Pfu* (Stratagene), dans du tampon 1X *Pfu* Buffer, additionné de dNTP (200 µM final) et d'un couple d'amorces (chacune 0,5 µM final). Après 5 min de dénaturation à 95°C, l'amplification est effectuée pendant 40 cycles successifs comprenant à chaque fois les étapes de dénaturation (92°C pendant 10 s), d'hybridation (58°C pendant 1 min) et d'élongation (72°C pendant 2 min). Pour finir, 10 minutes d'élongation sont réalisées. Il est parfois nécessaire de réaliser 10 cycles avec une température d'hybridation plus basse (40°C) avant de poursuivre avec 30 cycles avec une température d'hybridation de 58°C afin de favoriser l'appariement des deux fragments.

Tampon de coating	
Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	30 mM
Tampon PBS-Tween	
NaCl	136,9 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
KCl	2,68 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
K Tween 20	0,05 % v/v
Tampon substrat (pH 9,8)	
Diéthanamine pH ajusté avec HCl	9,7 % v/v

Tableau 20. Composition des tampons utilisés lors des expériences d'ELISA.

III.7.3. Mutagenèse aléatoire par PCR

La stratégie de mutagenèse aléatoire exploite le manque de fidélité de la Taq ADN polymérase utilisée en PCR classique. En présence de cations Mn^{2+} , l'enzyme génère alors un plus grand nombre d'erreurs au cours de la réaction de PCR (Fromant *et al.*, 1995, LinGoerke *et al.*, 1997). Les réactions de polymérisation se font dans le tampon réactionnel suivant : 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 0,5 mM $MnCl_2$, 0,2 mM dNTP, 1 μ M de chaque amorce, 0,1 unité de Taq DNA polymérase par μ L de milieu réactionnel et 1 ng/ μ L de milieu réactionnel de matrice ADN. Les amorces utilisées (M et N) sont référencées dans le **Tableau 18**.

III.7.4. La RT-PCR

La technique de PCR couplée à l'étape de RT a été utilisée pour la détection des ARNs viraux, à partir de 5 μ g d'ARN totaux purifiés selon la méthode de Bertheau (Matériel et Méthodes, § III.1.1). Elle consiste à réaliser l'étape de RT directement dans le tampon de la Taq ADN polymérase. Pour ce faire, 1 unité de RTase Reverse-iT™ (ABgene) est ajoutée au mélange de PCR. Les cycles PCR sont précédés d'une incubation à 42°C durant 15 min-1 h selon la taille du produit d'amplification attendu.

IV. Technique de quantification de l'accumulation virale dans les plantes

IV.1. Technique ELISA

La méthode d'Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Clark & Adams, 1977) a été utilisée pour détecter la présence de LMV dans les feuilles de plantes infectées par les différentes constructions de LMV recombinants et quantifier l'accumulation des particules virales dans les variétés résistantes et sensibles de façon semi-quantitative. La composition des tampons utilisés lors d'un test ELISA est donnée dans le **Tableau 20**.

Les plaques de microtitration sont « sensibilisées » par incubation pendant 3 h à 37°C : les puits contiennent 100 μ l de tampon de « coating » dans lequel les anticorps dirigés contre le

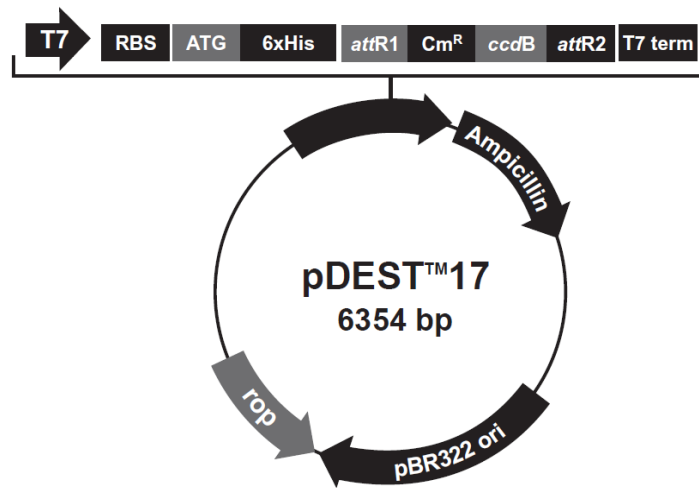


Figure 57. Représentation schématique du vecteur d'expression bactérienne pDEST 17 (Invitrogen).

LMV (Matériel et Méthodes, § VI) ont été dilués au 1/500^{ème}. La plaque est ensuite lavée trois fois avec une solution de PBS-Tween puis 100 µl de chaque échantillon de broyage sont déposés dans les puits et incubés une nuit à 4°C. Les échantillons sont constitués d'extraits de feuilles de laitues saines ou infectées, broyées dans trois fois leur volume de PBS-Tween-PVP (PVP 25K (2 % p/v) et clarifiés par 5 min de centrifugation à 10000 rpm. Après trois lavages au PBS-Tween, 100 µl de conjugué anticorps/phosphatase alcaline dilué au 1/500^{ème} dans du PBS-Tween supplémenté en ovalbumine (0.2 % p/v) sont déposés dans chaque puits. La plaque est à nouveau incubée pendant 3 h à 37°C. Enfin, après trois nouveaux lavages au PBS-Tween, le substrat de révélation (paranitrophénylphosphate, Sigma) est dilué dans le tampon substrat à une concentration de 1 mg/mL et déposé dans les puits. En présence de phosphatase alcaline, ce substrat donne un produit coloré jaune (paranitrophénol) dont l'apparition est mesurée à une longueur d'onde de 405 nm à l'aide d'un lecteur automatique (modèle PR 2100, Sanofi Diagnostics Pasteur).

IV.2. RT-PCR quantitative

La mise au point d'un test de RT-PCR quantitative pour mesure le niveau d'accumulation des isolats de LMV est décrit dans l'**annexe 1** de ce manuscrit.

V. Technique de manipulation des protéines

V.1. Expression et purification des protéines recombinantes chez E.coli

V.1.1. Vecteurs d'expression bactérienne

Le plasmide pDEST 17 (Invitrogen) est un vecteur dit de « destination » utilisé dans le système Gateway. Ce vecteur comporte, entre les sites *attR1* et *attR2*, un gène de résistance au chloramphénicol, ainsi que le gène de létalité *ccdB*, décrit précédemment (**Figure 57**). En amont du site *attR1*, ce vecteur contient un promoteur T7 suivi d'un site de fixation aux ribosomes (RBS), d'un codon initiateur ATG et enfin des 6 codons déterminant l'« étiquette » 6xHis. Ce vecteur permet d'exprimer la protéine d'intérêt en fusion à son extrémité

N-terminale à une étiquette « histidine ».

V.1.2. Induction de l'expression des protéines

Les ADNc codant pour les régions CI-C-ters (aa 372-643) du LMV-0, LMV-E, LMV-0-S621T et LMV-E-T621S, ainsi que l'ADNc codant pour la protéine GFP ont été clonées au préalable dans le vecteur pENTR/D TOPO, puis introduits dans le vecteur de destination pDEST-17 (**Tableau 19**) lors de la réaction LR suivant le protocole décrit au paragraphe II.2.1.

Les bactéries BL21AI transformées avec les différents vecteurs d'expression pDEST17 recombinants, sont mises en préculture une nuit à 37°C dans 20 mL de milieu LB additionné d'ampicilline (concentration finale 100 µg.mL⁻¹). Ces précultures permettent d'ensemencer des cultures de 1 L. L'expression des protéines recombinantes est induite par ajout de 0.2 % (v/v) d'arabinose lorsque la DO₆₀₀ de la culture bactérienne est comprise entre 0.4 et 0.5. Après induction, les cultures sont placées à 28°C pour 4 heures, sous agitation. Les cultures sont alors centrifugées 25 min à 5000 rpm à 4°C et les culots ainsi obtenus sont conservés à -20°C pour une lyse ultérieure.

V.1.3. Extraction et solubilisation des protéines insolubles

Le culot bactérien obtenu est resuspendu sur glace dans 50 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, Triton X100 0,1 %). Nous ajoutons alors à cette solution, la moitié d'une pastille d'inhibiteurs de protéases et du lysozyme (1 mg/mL). Le tout est incubé 30 min sous agitation à 4°C. L'échantillon est alors soniqué dans la glace 3 fois 5 min (des pulses de 0.4 seconde sont réalisés, espacés de 0.6 seconde). Le matériel est alors centrifugé à 10000 rpm pendant 15 min. Le surnageant (fraction soluble) est jeté et le précipité (fraction insoluble) est extrait dans un volume de 10 mL de tampon dénaturant (urée 8 M, MOPS 20 mM, DTT 1 mM, pH 7,2). Le tube est ensuite incubé sous agitation toute la nuit à 4°C. Puis le surnageant est récupéré et centrifugé à 10000 rpm pendant 30 min. Enfin, le surnageant est récupéré pour les étapes ultérieures de purification.

Tampon 5X	
Tris-HCl pH 6,8	60 mM
Glycérol 25%	25 %
SDS	2 %
β -Mercaptoéthanol	14,4 mM
Bleu de Bromophénol	0,25 %

Tableau 21. Composition du tampon de charge 5X de protéines.

Gel de séparation	
Acrylamide/BisAcrylamide (37,5/1)	15 %
SDS	0,1 %
TrisHCl pH 8,8	375 mM
APS	0,1 %
Temed	0,08 %
Gel de concentration	
Acrylamide/BisAcrylamide (37,5/1)	5 %
SDS	0,1 %
TrisHCl pH 6,8	125 mM
APS	0,1 %
Temed	0,08 %

Tableau 22. Composition des gels d'acrylamide.

V.1.4. Purification de protéines recombinantes sur colonne de nickel

Le surnageant est ensuite déposé sur une colonne contenant 2 mL de billes Ni NTA (QIAGEN) équilibrée avec tampon de lavage (urée 8 M, MOPS 20 mM, DTT 1 mM, imidazole 10 mM, pH 7,2). Les billes sont resuspendues dans le surnageant et incubées sous agitation pendant 5 min à 4°C. Après un lavage avec 10 mL de tampon de lavage, l'élution est réalisée 3 fois en présence de 2 mL de tampon d'élution (MOPS 20 mM, DTT 1 mM, imidazole 0,5 M, pH 7,2).

Le protocole suivi pour la purification de la GFP est en tout point comparable à celui suivi pour les régions CI-C-ter.

Les fractions d'élution sont dosées par la technique de Bradford (Bradford, 1976) et analysées par migration en gel SDS-PAGE 10 % et par Western blot, permettant ainsi de sélectionner les fractions d'élution les plus pures correspondant à la protéine d'intérêt.

V.2. Electrophorèse en gel d'acrylamide

Entre 10 et 20 µg de protéines totales mélangées à du tampon de charge 5X (**Tableau 21**) sont placés 5 min dans un bain-marie porté à ébullition. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel d'acrylamide à 10 % selon la méthode décrite par (Laemmli, 1970). La composition des gels de concentration et de séparation est résumée dans le **Tableau 22**. Après 10 min à 100 V, la migration s'effectue pendant 40 min à 200 V dans un tampon contenant du Tris base (3 g/L), de la glycine (14,4 g/L) et du SDS (0.1 %). Généralement, deux gels sont préparés en même temps, pour réaliser une coloration au bleu de Coomassie en parallèle du Western blot.

V.3. Coloration au bleu de Coomassie

Après l'électrophorèse, le gel d'acrylamide est lavé 3 fois à l'eau puis placé dans la solution de coloration Bio-Safe™ Coomassie (Bio-Rad). Une fois qu'une coloration satisfaisante est obtenue, la réaction est arrêtée en plaçant le gel dans l'eau.

Tampon de transfert	
Tris-base	3 g/L
Glycine	14,4 g/L
méthanol	200 mL/L

Tableau 23. Composition du tampon de transfert.

Tampon de blocage	
Tampon de lavage	100 mL
Lait en poudre	5 g
Tampon de lavage	
Tris pH 7,4	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 %
Tampon de révélation	
Tris pH 9,5	100 mM
NaCl	250 mM
MgCl ₂	1 mM

Tableau 24. Composition des tampons utilisés pour l'immunoblotting.

V.4. *Immunoblotting*

Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond™ ECL™, Amersham Biosciences) à l'aide du Trans-Blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad) en présence de solution de transfert (**Tableau 23**). Après un lavage dans du tampon de lavage, la membrane est laissée sous agitation à 37°C pendant 45 min dans le tampon de blocage (**Tableau 24**). La membrane est ensuite lavée une fois dans du tampon de lavage, puis incubée dans du tampon de lavage additionné d'anticorps primaire (anti His) (Matériel et Méthodes, § VI) à 37°C pendant 1 h. L'excès d'anticorps est éliminé en réalisant trois lavages successifs de 5 min sous agitation dans du tampon de lavage. Ensuite, la membrane est incubée avec du tampon de lavage additionné d'anticorps secondaire (anti souris) à température ambiante pendant 1 h (Matériel et Méthodes, § VI). Après trois lavages successifs de 5 min avec du tampon de lavage, la membrane est incubée dans du tampon de révélation, 20 min sous agitation. Le western blot est alors révélé, par ajout du substrat de la phosphatase alcaline, le NBT-BCIP, Roche, dilué au 1/100^{ème}. Lorsque le signal observé est satisfaisant, la réaction est stoppée en plaçant la membrane dans l'eau.

V.5. *Mise en évidence d'interactions protéine-protéine in vitro par ELISA*

L'interaction entre la région CI-C-ter et le facteur eIF4E a été mise en évidence *in vitro* suivant une technique ELISA adaptée dans notre laboratoire (**Figure 58**). Les plaques de microtitration sont sensibilisées pendant une nuit à 4°C en incubant 100 µL de solution de coating (**Tableau 20**) contenant 4 µg/mL de protéine eIF4E, CI-Cter ou GFP (contrôle négatif) par puits. Les plaques sont ensuite lavées trois fois avec du PBS-Tween. Après saturation à l'aide d'une solution du sérum de veau fœtal (SVF) 10 % dans du tampon PBS pendant 30 min à température ambiante, les plaques sont à nouveau lavées trois fois avec du PBS-Tween. Par la suite, 100 µL de chaque protéine « interacteur » eIF4E, CI-Cter ou GFP diluées dans du tampon (PBS-Tween 0,2 %, SVF 0,2 %) (une série de dilutions de 0.25 µg/mL à 8 µg/mL), sont déposés dans les puits et incubés une heure à 37°C. Après trois lavages au PBS-Tween, 100 µL d'anticorps primaire (anti- eIF4E, anti CI et anti GFP) (Matériel et Méthodes, § VI) dilués dans du tampon (PBS-Tween 0,2 %, SVF 0,2 %) sont déposés dans les puits. Les plaques sont à nouveau incubées pendant 90 min à 37°C.

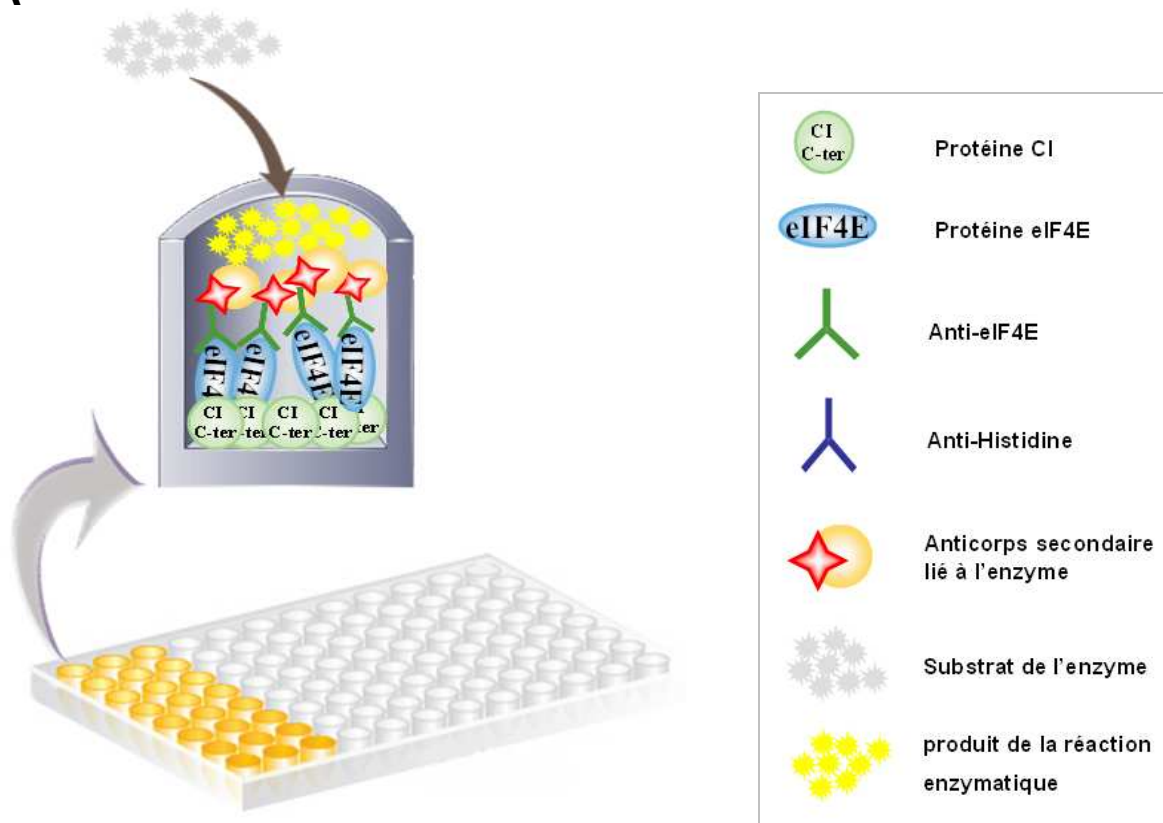
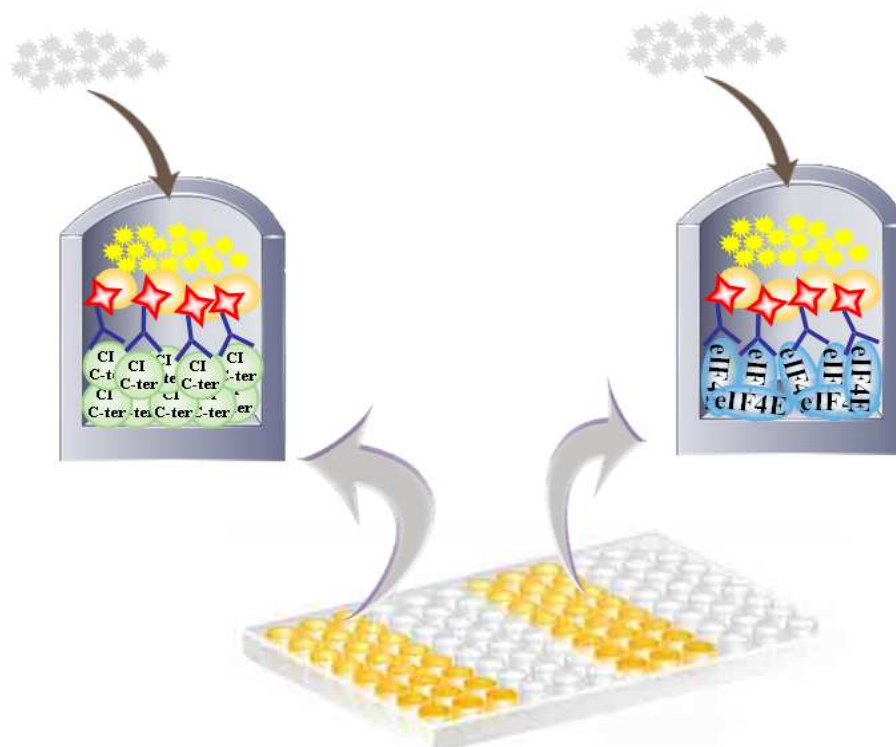
A**B**

Figure 58. Principe du test ELISA mis au point pour tester l'interaction entre la protéine virale CI et la protéine cellulaire eIF4E. A. Test d'interaction : coating : CI-Cter ; interacteur : eIF4E ; révélation : anti-eIF4E. B. Titration des protéines CI-C-ter et eIF4E.

Après trois lavages au PBS-Tween, 100 μ L d'anticorps secondaires (Matériel et Méthodes, § VI) dilués dans du tampon PBS-Tween sont déposés dans les puits. Les plaques sont à nouveau incubées pendant une heure à 37°C. Enfin, après trois lavages au PBS-Tween, le substrat de révélation (paranitrophénylphosphate, Sigma) est ajouté. En parallèle, toutes les protéines utilisées dans l'interaction ont été titrées dans une plaque. Pour cela, la plaque de microtitration a été sensibilisée par incubation des puits en présence de 100 μ L de solution de coating contenant 4 μ g/mL des protéines eIF4E, CI-C-ter et GFP. Les protéines sont ensuite révélées avec l'anticorps primaire (anti- eIF4E, anti CI, anti GFP ou anti His) puis l'anticorps secondaire correspondant (Matériel et Méthodes, § VI).

VI. *Caractéristiques des anticorps utilisés*

Anticorps anti LMV: Les anticorps polyclonaux anti-LMV "Anticorps de coating" et les anticorps conjugués à la phosphatase alcaline "Anticorps conjugués PA" (SEDIAG) sont utilisés au 1/500^{ème} pour détecter et quantifier l'accumulation du LMV par ELISA.

Anticorps anti eIF4E de laitue (pAb38): Ils sont dirigés contre la protéine eIF4E de laitue. Ces anticorps polyclonaux ont été utilisés au 1/1000^{ème} lors des expériences d'interaction protéine- protéine par ELISA.

Anticorps anti His Tag : Les anticorps monoclonaux anti-His (monoclonal antihistidine antibody produced in mouse, Sigma) ont été utilisés au 1/1000^{ème} lors des expériences d'interaction protéine- protéine par ELISA.

Anticorps anti CI du LMV: Les anticorps utilisés ont été préparés et purifiés dans notre laboratoire. Ces anticorps monoclonaux dirigés contre la région CI-C-ter du LMV sont utilisés en ELISA à une concentration de 5 μ g/mL.

Anticorps anti GFP: Les anticorps monoclonaux anti GFP (Monoclonal Anti-Green Fluorescent Protein (GFP) antibody produced in mouse, Sigma) ont été utilisés au 1/1000^{ème} lors des expériences d'interaction protéine- protéine par ELISA.

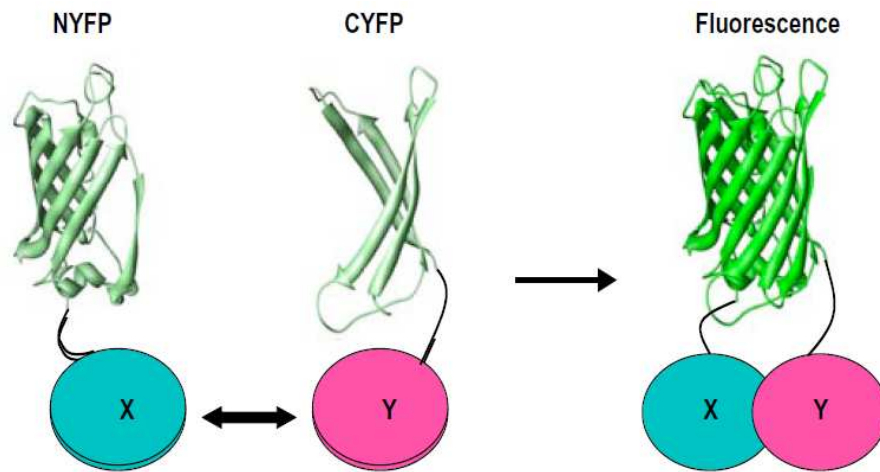


Figure 59. Principe de la technique de Bimolecular Fluorescence complementation (BiFC). La fluorescence est détectable lorsque les deux « hémi »-molécules non fluorescentes (N-YFP et C-YFP) sont amenées à proximité grâce à l'interaction des deux protéines (X et Y) auxquelles elles ont été fusionnées.

Anticorps secondaires marqués à la phosphatase alcaline : Les anticorps "Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Alkaline phosphatase antibody produced in goat" et "Anti-Mouse IgG (whole molecule)- Alkaline phosphatase antibody produced in rabbit" (Sigma) ont été utilisés au 1/3000^{ème} lors des expériences de Western blot et d'interaction protéine- protéine par ELISA.

VII. Mise en évidence d'interactions protéines-protéines in vivo par BiFC

VII.1. Principe du BiFC

La technique de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) a été mise en œuvre par (Hu *et al.*, 2002, Hu & Kerppola, 2003). C'est une technique très spécifique et sensible permettant la détection d'interactions protéine-protéine dans des cellules vivantes (Walter *et al.*, 2004). Cette méthode consiste à fusionner les parties N et C-terminales non fluorescentes de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) ou de ses variantes (CFP, YFP, RFP) à chacune des deux molécules dont on veut tester l'interaction. L'émission de fluorescence observable en microscopie photonique, dépend de l'interaction entre les molécules d'intérêt auxquelles chacune des « moitiés » de GFP ont été fusionnées (**Figure 59**).

VII.2. BiFC par inoculation biolistique de cellules d'oignon

VII.2.1. Vecteurs de clonage Gateway compatibles

Les vecteurs de clonage Gateway utilisés pour les expériences de BiFC sont les suivants: nEYFP/pUGW2, cEYFP/pUGW2, nEYFP/pUGW0 and cEYFP/pUGW0 (Nakagawa *et al.*, 2007) (**Figure 60**). Ils permettent de tester des interactions protéine-protéine *in vivo* de façon transitoire, après inoculation par biolistique des constructions sur cellules d'oignon. Les régions N-terminale N-YFP (aa 1-174) et C-terminale C-YFP (aa 175-239) de la protéine fluorescente YFP ont été clonées dans les vecteurs pUGW2 et pUGW0 permettant de

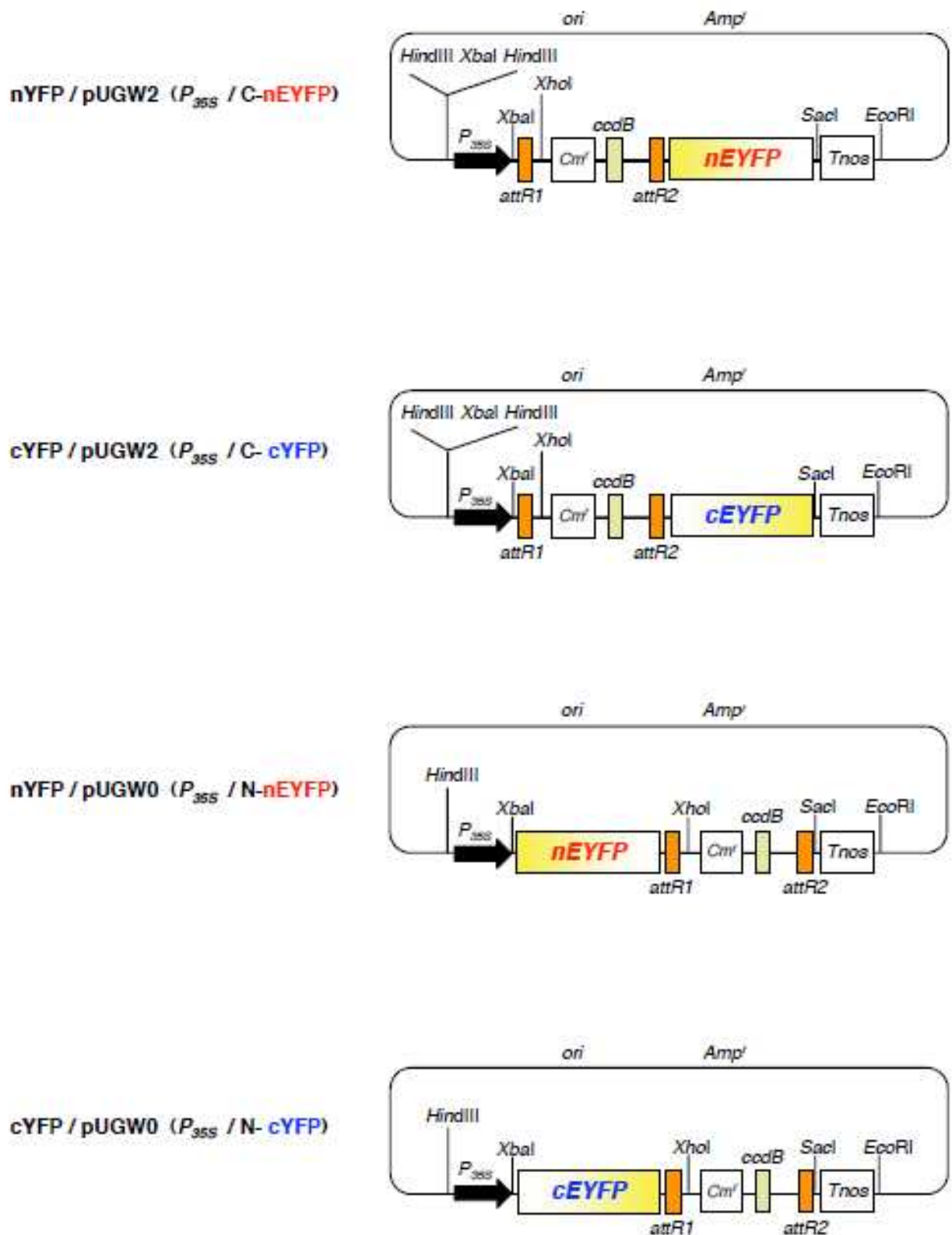


Figure 60. Représentation schématique des vecteurs Gateway utilisés pour les expériences de Bimolecular Fluorescence complementation (BiFC) sur épiderme d'oignon.

fusionner soit en C-ter soit en N-ter de la protéine d'intérêt, les « moitiés » de YFP (**Figure 60**).

VII.2.2. Mode opératoire

Les ADNc correspondant à la région CI-Cter et à la protéine CI entière codées par le LMV-0 ainsi celui correspondant à la protéine eIF4E⁰ ont été clonés dans les vecteurs BiFC pUGW2 et pUGW0 (**Tableau 19**) lors de la réaction LR suivant le protocole décrit au paragraphe II.2.1

Les expériences de transformation transitoire par biolistique sont réalisées sur des cellules d'épiderme d'oignon, selon un protocole fourni par M. Hernoult (UMR 619, INRA Bordeaux).

Les plasmides utilisés pour cette expérience sont purifiés à l'aide du kit WIZARD[®] Plus SV DNA Purification System (Promega). Des billes d'or de 1,6 µm de diamètre (Bio-Rad) sont suspendues dans de l'éthanol 50 % à raison de 40 mg/160 µL puis aliquotées par fractions de 25 µL. L'ADN plasmidique est ensuite fixé sur les billes : pour 25 µl de billes, 5 µg d'ADN plasmidique total [2.5 µL d'un plasmide pUGW contenant la C-ter CI-0 ou CI-0 entière (1 µg/µL) + 2.5 µL d'un plasmide pUGW contenant eIF4E⁰ (1 µg/µL)] et 10 µL de spermidine (0.1 M) sont ajoutés. Après avoir vortexé le mélange billes-ADN pendant 3 min, 25 µL de CaCl₂ à 2.5 M sont ensuite ajoutés puis les billes sont centrifugées brièvement. Le surnageant est éliminé, les billes sont rincées une fois par 200 µL de l'éthanol 70 %, puis une deuxième fois par 200 µL de l'éthanol 100 %. Elles sont ensuite reprises dans 30 µL d'éthanol 100 %. 8 µL de cette préparation sont déposés sur des membranes (« macroporteur », Biorad) qui sont gardées à température ambiante pour que l'éthanol s'évapore.

L'appareillage utilisé pour réaliser les tirs est un Gun Bio-Rad system PDS-1000/He (Bio-Rad) (**Figure 61**). Les membranes de macroporteurs recouvertes des billes d'or sont placées au-dessus d'une grille de projection, située en position moyenne par rapport au disque de rupture (**Figure 61**). Les épidermes d'oignon placés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Murashige et Skoog (MS) (Duchefa) sont placés dans la chambre à vide à 9 cm de la plaque porteuse du macroporteur. Lorsque le vide atteint 25 pouces équivalent de mercure, une pression d'hélium de 1100 psi est appliquée, rompant le disque de rupture et provoquant la pulvérisation des billes à la surface des échantillons. Les échantillons sont ensuite placés une nuit à l'obscurité dans une chambre climatisée à une température de 20 à 25°C. Les

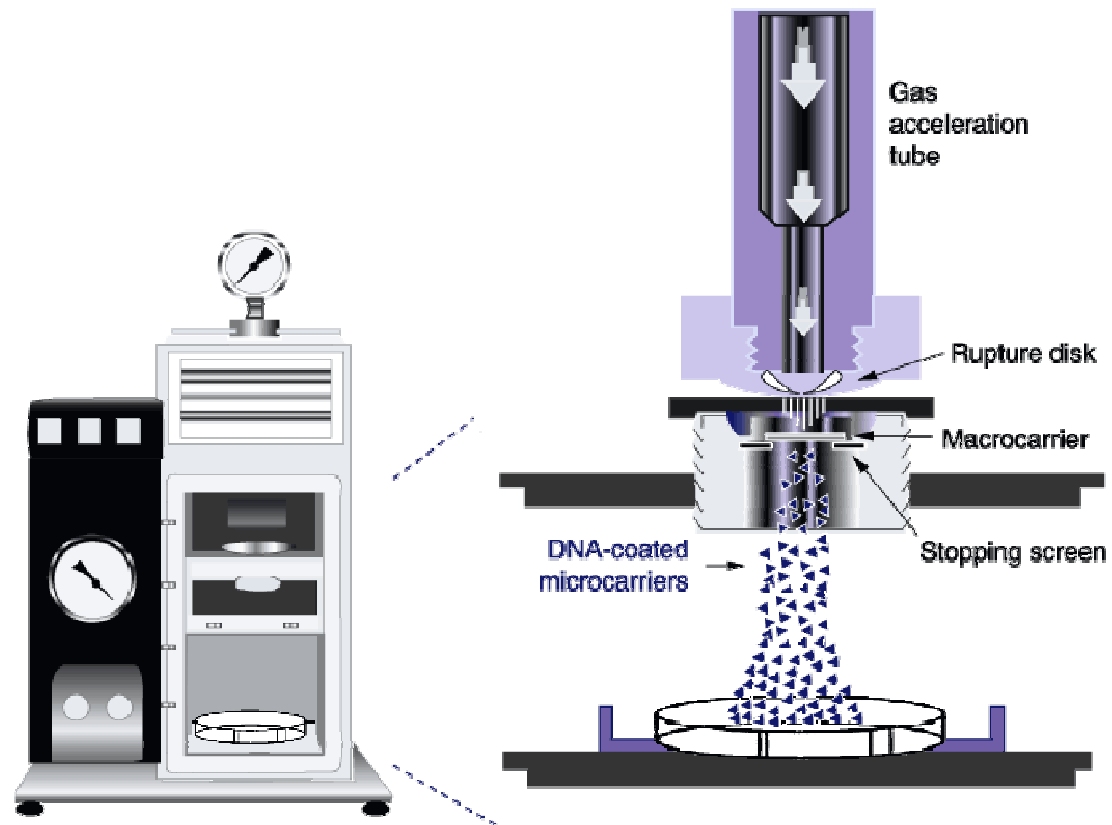


Figure 61. Appareil à bombardement de microparticules (gun Bio-Rad system PDS-1000/He) (Bio- Rad).

observations et les captures d'image sont faites le lendemain matin, à l'aide d'un microscope confocal Leica TCS SP2, avec un objectif à sec x20. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Leica LCS 2.61 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). L'excitation de la YFP se fait grâce au laser argon à une longueur d'onde de 514 nm et l'émission de fluorescence est mesurée entre 549-602 nm.

VII.3. BiFC par agroinfiltration d'*A. tumefaciens* chez *N. Benthamiana*

VII.3.1. Vecteurs binaires Gateway pour BiFC

Les vecteurs de destination Gateway pBiFP-1 à 4 (Azimzadeh *et al.*, 2008) (**Figure 62**) sont utilisés pour étudier les interactions protéine-protéine *in planta*, par expression transitoire par agroinfiltration. Les vecteurs pBiFP-1 et pBiFP-4 permettent de fusionner en C-ter de la protéine d'intérêt, la moitié N-terminale ou la moitié C-terminale de la YFP. Tandis que les vecteurs pBiFP-2 et pBiFP-3 permettent de réaliser ces fusions en N-ter de la protéine d'intérêt.

VII.3.2. Mode opératoire

Les ADNc codant pour la région CI-C-ter et la protéine CI entière du LMV-0 ainsi celui correspondant à la protéine eIF4E⁰ ont été clonés dans les vecteurs pBiFP (**Tableau 19**) par une réaction LR suivant le protocole décrit au paragraphe II.2.1

L'avantage de la transformation transitoire est qu'elle permet d'observer en quelques jours l'expression d'une construction. La technique par infiltration consiste à faire pénétrer dans les tissus foliaires une solution d'*Agrobacterium* afin d'infecter les cellules de l'épiderme avec la construction d'intérêt. L'infiltration des feuilles de *Nicotiana benthamiana* est réalisée suivant le protocole dérivé de (English *et al.*, 1997). Une pré-culture de 5 ml (LB + antibiotiques) d'*Agrobacterium* portant le plasmide d'intérêt est réalisée sur la nuit à 28°C. Le lendemain, cette pré-culture sert à ensemercer une culture de 25 mL (LB + antibiotiques additionnés de 20 µM acétylsyringone et 10 mM MES), incubée une nuit à 28°C sous agitation. Après centrifugation du milieu de culture, le culot bactérien est rincé puis resuspendu dans la solution d'agroinfiltration (10 mM MES pH6,3, 10 mM MgCl₂ et 150 mM Acétylsyringone). La DO₆₀₀ de la solution bactérienne est ajustée à 0,5. Après incubation

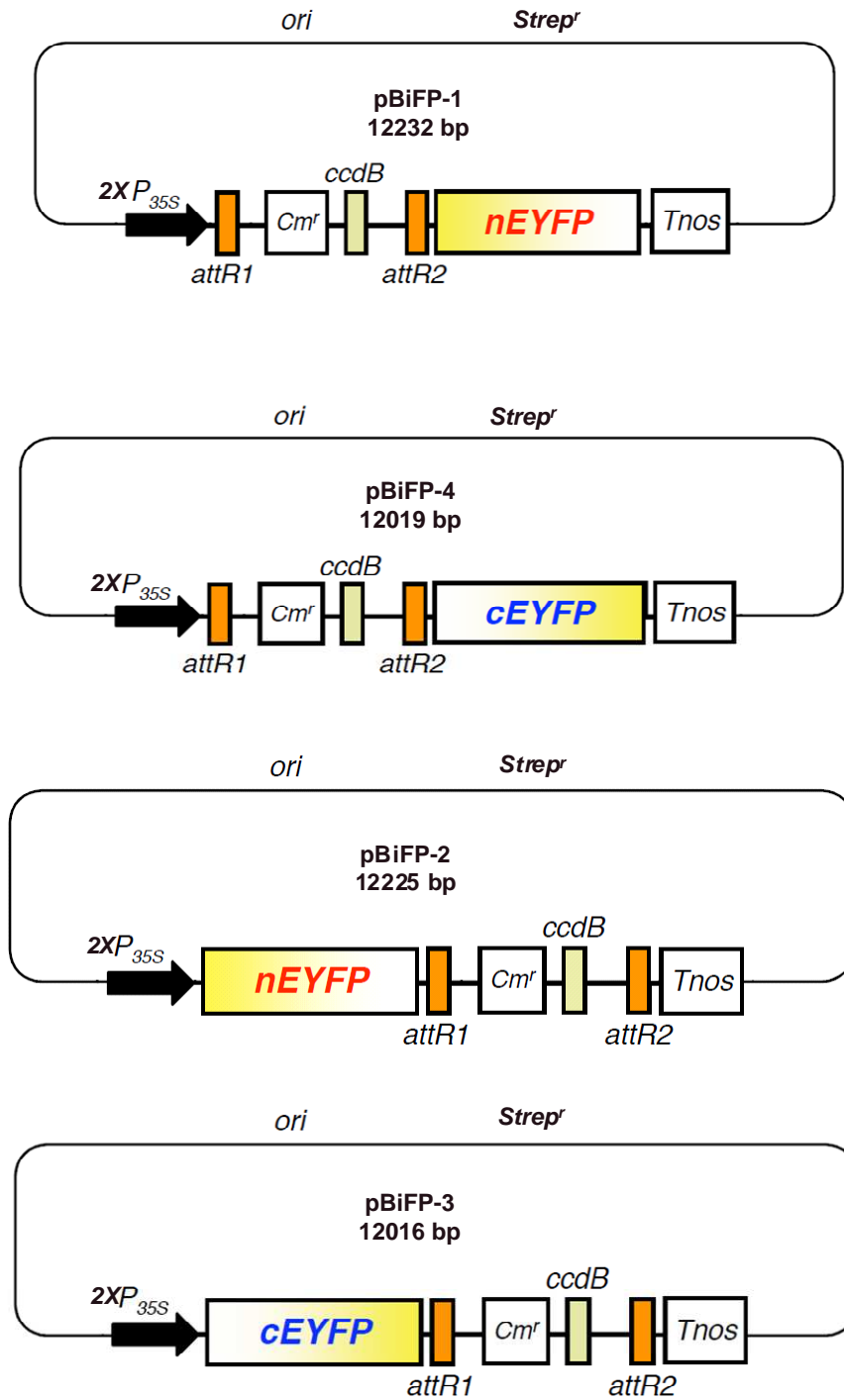


Figure 62. Représentation schématique des vecteurs binaires Gateway utilisés pour les expériences de BiFC par agro-infiltration.

pendant 2-3 heures à température ambiante, la co-infiltration des souches d'*Agrobacterium* contenant les constructions de BiFC et le plasmide exprimant la protéine P0 de *polerovirus* ayant la fonction de suppression de silencing (Pfeffer *et al.*, 2002) a été réalisée. Pour cela, chacune des cultures est mélangée (v/v/v), puis, ce mélange (200-300 μ L) est infiltré à l'aide d'une seringue (sans aiguille) sur la face inférieure d'une feuille, plus riche en stomates que la face supérieure.

Les plantes sont maintenues à l'humidité en serre et les observations de fluorescence sont faites en général 2 jours après infiltration selon les conditions décrites dans le paragraphe VII.2.2.

VIII. Outils informatiques

Les alignements nucléotidiques et protéiques ont été réalisés à l'aide des programmes ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) et MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Les logiciels pDRAW32 (ACACLONE software, <http://www.acaclone.com/>) et ApE (A plasmid Editor, <http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) ont été utilisés pour traiter et analyser de séquences d'ADN.

Références bibliographiques

- Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Walter, J., Houvenaghel, M. C., Candresse, T., *et al.* (2009) Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. *Molecular Plant Pathology*, **10**, 109-113.
- Adams, J. (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews*, **29**, 3-9.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F. and Beaudoin, F. (2005a) Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology*, **6**, 471-487.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F. and Fauquet, C. M. (2005b) Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology*, **150**, 459-479.
- Agol, V. I., Paul, A. V. and Wimmer, E. (1999) Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Research*, **62**, 129-147.
- Agrios, G. N. (1997a) GENETICS OF VIRULENCE IN PATHOGENS AND OF RESISTANCE IN HOST PLANTS. In: *Plant pathology*. (ed.^eds.). San Diego USA: Academic Press, pp. xvi + 635 pp.
- Agrios, G. N. (1997b) PLANT DISEASES CAUSED BY VIRUSES. In: *Plant pathology*. (ed.^eds.). San Diego USA: Academic Press, pp. xvi + 635 pp.
- Alamillo, J. M., Saenz, P. and Garcia, J. A. (2006) Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J*, **48**, 217-227.
- Albar, L., Bangratz-Reyser, M., Hebrard, E., Ndjiondjop, M. N., Jones, M. and Ghesquiere, A. (2006) Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. *Plant Journal*, **47**, 417-426.
- Albar, L., Ndjiondjop, M. N., Esshak, Z., Berger, A., Pinel, A., Jones, M., *et al.* (2003) Fine genetic mapping of a gene required for Rice yellow mottle virus cell-to-cell movement. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 371-378.
- Allison, R. F., Dougherty, W. G., Parks, T. D., Willis, L., Johnston, R. E., Kelly, M., *et al.* (1985a) Biochemical-Analysis of the Capsid Protein Gene and Capsid Protein of Tobacco Etch Virus - N-Terminal Amino-Acids Are Located on the Virions Surface. *Virology*, **147**, 309-316.
- Allison, R. F., Sorenson, J. C., Kelly, M. E., Armstrong, F. B. and Dougherty, W. G. (1985b) Sequence Determination of the Capsid Protein Gene and Flanking Regions of Tobacco Etch Virus - Evidence for Synthesis and Processing of a Polyprotein in Potyvirus Genome Expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 3969-3972.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H., *et al.* (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 13079-13084.
- Andino, R., Boddeker, N. and Gamarnik, A. V. (1999) Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends in Microbiology*, **7**, 76-82.
- Andrade, M., Abe, Y., Nakahara, K. S. and Uyeda, I. (2009) The cyv-2 resistance to Clover yellow vein virus in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E. *Journal of General Plant Pathology*, **75**, 241-249.
- Andrew J, M., Carole, C. and Margaret I, B. (2007) Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. (ed.^eds.). pp. 223-231.
- Aranda, M. and Maule, A. (1998) Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology*, **243**, 261-267.

- Aranda, M. A., Escaler, M., Wang, D. W. and Maule, A. J. (1996) Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 15289-15293.
- Arroyo, R., Soto, M. J., MartinezZapater, J. M. and Ponz, F. (1996) Impaired cell-to-cell movement of potato virus Y in pepper plants carrying the y(a)(pr2(1)) resistance gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **9**, 314-318.
- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y. and Lecoq, H. (2001) Principes de virologie végétale: Génome, pouvoir pathogène, écologie des virus. INRA Editions.
- Atreya, C. D., Atreya, P. L., Thornbury, D. W. and Pirone, T. P. (1992) Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology*, **191**, 106-111.
- Atreya, C. D. and Pirone, T. P. (1993) Mutational Analysis of the Helper Component-Proteinase Gene of a Potyvirus - Effects of Amino-Acid Substitutions, Deletions, and Gene Replacement on Virulence and Aphid Transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 11919-11923.
- Atreya, C. D., Raccach, B. and Pirone, T. P. (1990) A Point Mutation in the Coat Protein Abolishes Aphid Transmissibility of a Potyvirus. *Virology*, **178**, 161-165.
- Atreya, P. L., Atreya, C. D. and Pirone, T. P. (1991) Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7887-7891.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A. and Moury, B. (2007) Molecular dissection of the potato virus YVPg virulence factor reveals complex adaptations to the pvr2 resistance allelic series in pepper. *Journal of General Virology*, **88**, 1594-1601.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A., *et al.* (2006) Different mutations in the genome-linked protein VPg of Potato virus Y confer virulence on the pvr2(3) resistance in pepper. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 557-563.
- Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amiour, N., *et al.* (2008) Arabidopsis TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell*, **20**, 2146-2159.
- Ballut, L., Drucker, M., Pugniere, M., Cambon, F., Blanc, S., Roquet, F., *et al.* (2005) HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *J Gen Virol*, **86**, 2595-2603.
- Ballut, L., Petit, F., Mouzeyar, S., Le Gall, O., Candresse, T., Schmid, P., *et al.* (2003) Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, **1645**, 30-39.
- Balme-Sinibaldi, V., Tribodet, M., Croizat, F., Lefeuvre, P., Kerlan, C. and Jacquot, E. (2006) Improvement of Potato virus Y (PVY) detection and quantitation using PVYN- and PVYO-specific real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods*, **134**, 261-266.
- Baratova, L. A., Efimov, A. V., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Hunt, B., Badun, G. A., *et al.* (2001) In situ spatial organization of potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment. *Journal of Virology*, **75**, 9696-9702.
- Basso, J., Dallaire, P., Charest, P. J., Devantier, Y. and Laliberte, J. F. (1994) Evidence for an Internal Ribosome Entry Site within the 5' Non-Translated Region of Turnip Mosaic Potyvirus Rna. *Journal of General Virology*, **75**, 3157-3165.
- Baures, I., Candresse, T., Leveau, A., Bendahmane, A. and Sturbois, B. (2008) The Rx Gene Confers Resistance to a Range of Potexviruses in Transgenic Nicotiana Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 1154-1164.

- Beauchemin, C., Boutet, N. and Laliberte, J. F. (2007) Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of Turnip mosaic virus, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta. *Journal of Virology*, **81**, 775-782.
- Beauchemin, C. and Laliberte, J. F. (2007) The poly(A) binding protein is internalized in virus-induced vesicles or redistributed to the nucleolus during turnip mosaic virus infection. *Journal of Virology*, **81**, 10905-10913.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R. and Dangl, J. L. (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 391-399.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D. C. (1999) The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, **11**, 781-791.
- Bendahmane, A., Kohn, B. A., Dedi, C. and Baulcombe, D. C. (1995) The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. *Plant J*, **8**, 933-941.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. and Baulcombe, D. C. (2000) Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. *Plant Journal*, **21**, 73-81.
- Bent, A. F. and Mackey, D. (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol*, **45**, 399-436.
- Bi, X. P., Ren, J. H. and Goss, D. J. (2000) Wheat germ translation initiation factor eIF4B affects eIF4A and eIFiso4F helicase activity by increasing the ATP binding affinity of eIF4A. *Biochemistry*, **39**, 5758-5765.
- Blanc, S., Ammar, E. D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V. V., Llave, C., Baker, J., *et al.* (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology*, **79**, 3119-3122.
- Blanc, S., LopezMoya, J. J., Wang, R. Y., GarciaLampasona, S., Thornbury, D. W. and Pirone, T. P. (1997) A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology*, **231**, 141-147.
- Blancard, D., Lot, H. and Maisonneuve, B. (2003) Diseases of lettuces: identification, detection and control. *Maladies des salades: identifier, connaitre et maitriser*, 375 pp.
- Bokros, C. L., Hugdahl, J. D., Kim, H. H., Hanesworth, V. R., Vanheerden, A., Browning, K. S., *et al.* (1995) Function of the P86 Subunit of Eukaryotic Initiation-Factor (Iso)4f as a Microtubule-Associated Protein in Plant-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 7120-7124.
- Borgstrom, B. and Johansen, I. E. (2001) Mutations in Pea seedborne mosaic virus genome-linked protein VPg alter pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 707-714.
- Bos, L., Huijberts, N. and Cuperus, C. (1994) Further Observations on Variation of Lettuce Mosaic-Virus in Relation to Lettuce (*Lactuca-Sativa*), and a Discussion of Resistance Terminology. *European Journal of Plant Pathology*, **100**, 293-314.
- Botha, C. E. J. (1992) Plasmodesmatal Distribution, Structure and Frequency in Relation to Assimilation in C3 and C4 Grasses in Southern Africa. *Planta*, **187**, 348-358.
- Bradford, M. M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brodersen, P. and Voinnet, O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, **22**, 268-280.

- Brommonschenkel, S. H., Frary, A., Frary, A. and Tanksley, S. D. (2000) The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 1130-1138.
- Bruun-Rasmussen, M., Moller, I. S., Tulinius, G., Hansen, J. K., Lund, O. S. and Johansen, I. E. (2007) The same allele of translation initiation factor 4E mediates resistance against two Potyvirus spp. in *Pisum sativum*. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 1075-1082.
- Bruylants, G. and Bartik, K. (2005) Utilisation de la Calorimétrie à Titrage isotherme pour l'étude des interactions entre (bio)molécules. *Chimie nouvelle*, **23**, 9-14.
- Buschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., *et al.* (1997) The barley mlo gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, **88**, 695-705.
- Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, **25**, 169-193.
- Candresse, T., Le Gall, O., Maisonneuve, B., German-Retana, S. and Redondo, E. (2002) The use of green fluorescent protein-tagged recombinant viruses to test Lettuce mosaic virus resistance in lettuce. *Phytopathology*, **92**, 169-176.
- Carrasco, P., Daros, J. A., Agudelo-Romero, P. and Elena, S. F. (2007a) A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of tobacco etch virus in competition experiments. *Journal of Virological Methods*, **139**, 181-188.
- Carrasco, P., de la Iglesia, F. and Elena, S. F. (2007b) Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in tobacco etch virus. *Journal of Virology*, **81**, 12979-12984.
- Carrington, J. C., Cary, S. M. and Dougherty, W. G. (1988) Mutational Analysis of Tobacco Etch Virus Polyprotein Processing - Cis and Trans Proteolytic Activities of Polyproteins Containing the 49-Kilodalton Proteinase. *Journal of Virology*, **62**, 2313-2320.
- Carrington, J. C., Freed, D. D. and Sanders, T. C. (1989) Autocatalytic Processing of the Potyvirus Helper Component Proteinase in *Escherichia-Coli* and *Invitro*. *Journal of Virology*, **63**, 4459-4463.
- Carrington, J. C., Jensen, P. E. and Schaad, M. C. (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal*, **14**, 393-400.
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K. and Schaad, M. C. (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell*, **8**, 1669-1681.
- Castello, M. J., Carrasco, J. L. and Vera, P. (2010) DNA-binding protein phosphatase AtDBP1 mediates susceptibility to two potyviruses in *Arabidopsis*. (ed. ^eds.). pp. 110.158923.
- Chapman, E. J., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V. and Carrington, J. C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*, **18**, 1179-1186.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J. L., Robaglia, C., Moury, B. T., Palloix, A., *et al.* (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant Journal*, **54**, 56-68.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B. J. (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**, 803-814.
- Chisholm, S. T., Mahajan, S. K., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L. and Carrington, J. C. (2000) Cloning of the *Arabidopsis* RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 489-494.

- Chisholm, S. T., Parra, M. A., Anderberg, R. J. and Carrington, J. C. (2001) Arabidopsis RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiology*, **127**, 1667-1675.
- Chung, B. Y. W., Miller, W. A., Atkins, J. F. and Firth, A. E. (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 5897-5902.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. (1977) Characteristics of Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Plant-Viruses. *Journal of General Virology*, **34**, 475-483.
- Cohn, J., Sessa, G. and Martin, G. B. (2001) Innate immunity in plants. *Current Opinion in Immunology*, **13**, 55-62.
- Collar, J. L., Avilla, C. and Fereres, A. (1997) New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. *Environmental Entomology*, **26**, 537-544.
- Cooley, M. B., Pathirana, S., Wu, H. J., Kachroo, P. and Klessig, D. F. (2000) Members of the Arabidopsis HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell*, **12**, 663-676.
- Cosson, P., Sofer, L., Le, H., Leger, V., Schurdi-Levraud, V., Whitham, S. A., *et al.* (2010) RTM3 which controls long distance movement of potyviruses is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology (MATH) domain-containing protein. (ed.^eds.). pp. pp.110.155754.
- Cotton, S., Dufresne, P. J., Thivierge, K., Ide, C. and Fortin, M. G. (2006) The VPgPro protein of Turnip mosaic virus: In vitro inhibition of translation from a ribonuclease activity. *Virology*, **351**, 92-100.
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T. Y., *et al.* (2009) Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *Journal of Virology*, **83**, 10460-10471.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldemancahill, R., Schaad, M. C. and Carrington, J. C. (1995) Long-Distance Movement Factor - a Transport Function of the Potyvirus Helper Component Proteinase. *Plant Cell*, **7**, 549-559.
- Daros, J. A., Schaad, M. C. and Carrington, J. C. (1999) Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *Journal of Virology*, **73**, 8732-8740.
- Dasgupta, I., Malathi, V. G. and Mukherjee, S. K. (2003) Genetic engineering for virus resistance. *Current Science*, **84**, 341-354.
- Davies, R. M., Subbarao, K. V., Raid, R. N. and Kurtz, E. A. (1997) *Compendium of Lettuce Diseases*. APS Press, St Paul, 79p.
- Davy, A., Bello, P., Thierry-Mieg, N., Vaglio, P., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., *et al.* (2001) A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. *Embo Reports*, **2**, 821-828.
- De la Iglesia, F. and Elena, S. F. (2007) Fitness declines in Tobacco etch virus upon serial bottleneck transfers. *Journal of Virology*, **81**, 4941-4947.
- Decroocq, V., Sicard, O., Alamillo, J. M., Lansac, M., Eyquard, J. P., Garcia, J. A., *et al.* (2006) Multiple resistance traits control Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 541-549.
- Deom, C. M., Murphy, J. F. and Paguio, O. R. (1997) Resistance to Tobacco Etch Virus in *Capsicum annuum*: Inhibition of Virus RNA Accumulation. (ed.^eds.). pp. 917-921.
- Desbiez, C., Gal-On, A., Girard, M., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H. (2003) Increase in Zucchini yellow mosaic virus symptom severity in tolerant zucchini cultivars is

- related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathology*, **93**, 1478-1484.
- Dever, T. E. (1999) Translation initiation: adept at adapting. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**, 398-403.
- Diaz-Pendon, J. A., Truniger, V., Nieto, C., Garcia-Mas, J., Bendahmane, A. and Aranda, M. A. (2004) Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, **5**, 223-233.
- Diaz, J. A., Nieto, C., Moriones, E., Truniger, V. and Aranda, M. A. (2004) Molecular characterization of a Melon necrotic spot virus strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 668-675.
- Dielen, A. S., Badaoui, S., Candresse, T. and German-Retana, S. (2010a) The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-seek game. *Molecular Plant Pathology*, **11**, 293-308.
- Dielen, A. S., Sasaki, F. T., Walter, J., Michon, T., MÉNard, G., Pagny, G., *et al.* (2010b) The 20S proteasome $\alpha 5$ subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the Lettuce mosaic potyvirus HcPro protein.
- Dinant, S. and Lot, H. (1992) Lettuce Mosaic-Virus. *Plant Pathology*, **41**, 528-542.
- Ding, B., Turgeon, R. and Parthasarathy, M. V. (1992) Substructure of Freeze-Substituted Plasmodesmata. *Protoplasma*, **169**, 28-41.
- Ding, S. W. and Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, **130**, 413-426.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I. A., Ayliffe, M. A., *et al.* (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 8888-8893.
- Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A. and Carrington, J. C. (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, **206**, 1007-1016.
- Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G. and Carrington, J. C. (1994) Distinct Functions of Capsid Protein in Assembly and Movement of Tobacco Etch Potyvirus in Plants. *Embo Journal*, **13**, 1482-1491.
- Dombrovsky, A., Gollop, N., Chen, S. B., Chejanovsky, N. and Raccah, B. (2007) In vitro association between the helper component-proteinase of zucchini yellow mosaic virus and cuticle proteins of *Myzus persicae*. *Journal of General Virology*, **88**, 1602-1610.
- Dombrovsky, A., Huet, H., Chejanovsky, N. and Raccah, B. (2005) Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. *Arch Virol*, **150**, 287-298.
- Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988) High-Efficiency Transformation of *Escherichia-Coli* by High-Voltage Electroporation. *Nucleic Acids Research*, **16**, 6127-6145.
- Dreher, T. W. and Miller, W. A. (2006) Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology*, **344**, 185-197.
- Druegeon, G. and Jupin, I. (2002) Stability in vitro of the 69K movement protein of Turnip yellow mosaic virus is regulated by the ubiquitin-mediated proteasome pathway. *Journal of General Virology*, **83**, 3187-3197.
- Duarte, E., Clarke, D., Moya, A., Domingo, E. and Holland, J. (1992) Rapid Fitness Losses in Mammalian Rna Virus Clones Due to Muller Ratchet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 6015-6019.

- Dufresne, P. J., Thivierge, K., Cotton, S., Beauchemin, C., Ide, C., Ubalijoro, E., *et al.* (2008) Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology*, **374**, 217-227.
- Dunoyer, P., Thomas, C., Harrison, S., Revers, F. and Maule, A. (2004) A cysteine-rich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *Journal of Virology*, **78**, 2301-2309.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S. and Robaglia, C. (2002) The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant Journal*, **32**, 927-934.
- Edwardson, J. R. (1992) Inclusion-Bodies. *Archives of Virology*, 25-30.
- Egger, D. and Bienz, K. (2005) Intracellular location and translocation of silent and active poliovirus replication complexes. *Journal of General Virology*, **86**, 707-718.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E. and Bienz, K. (2000) Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *Journal of Virology*, **74**, 6570-6580.
- English, J. J., Davenport, G. F., Elmayan, T., Vaucheret, H. and Baulcombe, D. C. (1997) Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant Journal*, **12**, 597-603.
- Erickson, F. L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C., *et al.* (1999) The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant Journal*, **18**, 67-75.
- Fellers, J., Wan, J. R., Hong, Y. L., Collins, G. B. and Hunt, A. G. (1998) In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology*, **79**, 2043-2049.
- Fernandez-Calvino, L., Goytia, E., Lopez-Abella, D., Giner, A., Urizarna, M., Vilaplana, L., *et al.* (2010) The HCPro transmission factor of Tobacco etch potyvirus binds specifically to an aphid ribosomal protein homologous to the laminin receptor precursor. (ed.^eds.). pp. vir.0.022335-022330.
- Fernandez-Fernandez, M. R., Camafeita, E., Bonay, P., Mendez, E., Albar, J. P. and Garcia, J. A. (2002) The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 135-140.
- Fernandez, A., Guo, H. S., Saenz, P., SimonBuela, L., deCedron, M. G. and Garcia, J. A. (1997) The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4474-4480.
- Fernandez, A., Lain, S. and Garcia, J. A. (1995) Rna Helicase Activity of the Plum Pox Potyvirus CI Protein Expressed in Escherichia-Coli - Mapping of an Rna-Binding Domain. *Nucleic Acids Research*, **23**, 1327-1332.
- Fitzgibbon, J., Bell, K., King, E. and Oparka, K. (2010) Super-Resolution Imaging of Plasmodesmata Using Three-Dimensional Structured Illumination Microscopy. *Plant Physiology*, **153**, 1453-1463.
- Flasinski, S. and Cassidy, B. G. (1998) Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. *Archives of Virology*, **143**, 2159-2172.
- Fraser, R. S. S. (1990) The Genetics of Resistance to Plant-Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, **28**, 179-200.
- Freire, M. A. (2005) Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene*, **345**, 271-277.

- Freire, M. A., Tourneur, C., Granier, F., Camonis, J., El Amrani, A., Browning, K. S., *et al.* (2000) Plant lipoxxygenase 2 is a translation initiation factor-4E-binding protein. *Plant Molecular Biology*, **44**, 129-140.
- Froissart, R., Michalakakis, Y. and Blanc, S. (2002) Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant virus. *Phytopathology*, **92**, 576-579.
- Fromant, M., Blanquet, S. and Plateau, P. (1995) Direct Random Mutagenesis of Gene-Sized DNA Fragments Using Polymerase Chain-Reaction. *Analytical Biochemistry*, **224**, 347-353.
- Fuchs, M. and Gonsalves, D. (2007) Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annual Review of Phytopathology*, **45**, 173-202.
- Gabrenaite-Verkhovskaya, R., Andreev, I. A., Kalinina, N. O., Torrance, L., Taliansky, M. E. and Makinen, K. (2008) Cylindrical inclusion protein of potato virus A is associated with a subpopulation of particles isolated from infected plants. *J Gen Virol*, **89**, 829-838.
- Gallie, D. R. (2001) Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *Journal of Virology*, **75**, 12141-12152.
- Gallie, D. R. (2002) Protein-protein interactions required during translation. *Plant Molecular Biology*, **50**, 949-970.
- Gallie, D. R., Tanguay, R. L. and Leathers, V. (1995) The Tobacco Etch Viral 5'-Leader and Poly(a) Tail Are Functionally Synergistic Regulators of Translation. *Gene*, **165**, 233-238.
- Gallois, J. L., Charron, C., Sanchez, F., Pagny, G., Houvenaghel, M. C., Moretti, A., *et al.* (2010) Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards Arabidopsis thaliana mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *Journal of General Virology*, **91**, 288-293.
- Gao, Z., Evers, S., Thomas, C., Ellis, N. and Maule, A. (2004a) Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to Pea seed-borne mosaic virus. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**, 488-494.
- Gao, Z. H., Johansen, E., Evers, S., Thomas, C. L., Noel Ellis, T. H. and Maule, A. J. (2004b) The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant Journal*, **40**, 376-385.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A. and Malpica, J. M. (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, **39**, 157-186.
- German-Retana, S., Candresse, T., Alias, E., Delbos, R. P. and Le Gall, O. (2000) Effects of green fluorescent protein or beta-glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking Lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 316-324.
- German-Retana, S., Redondo, E., Tavert-Roudet, G., Le Gall, O. and Candresse, T. (2003) Introduction of a NIa proteinase cleavage site between the reporter gene and HC-Pro only partially restores the biological properties of GUS- or GFP-tagged LMV. *Virus Research*, **98**, 151-162.
- German-Retana, S., Walter, J., Doublet, B., Roudet-Tavert, G., Nicaise, V., Lecampion, C., *et al.* (2008b) Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *Journal of Virology*, **82**, 7601-7612.
- German-Retana, S., Walter, J. and Le Gall, O. (2008a) Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 127-136.

- Goldenberg, O., Landt, O., Schumann, R. R., Gobel, U. B. and Hamann, L. (2005) Use of locked nucleic acid oligonucleotides as hybridization/FRET probes for quantification of 16S rDNA by real-time PCR. *Biotechniques*, **38**, 29-+.
- Govier, D. A. and Kassanis, B. (1974) Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y. *Virology*, **57**, 285-286.
- Granier, F., Durand-Tardif, M., Casse-Delbart, F., Lecoq, H. and Robaglia, C. (1993) Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *J Gen Virol*, **74** (Pt 12), 2737-2742.
- Grzela, R., Strokowska, L., Andrieu, J. P., Dublet, B., Zagorski, W. and Chroboczek, J. (2006) Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Biochimie*, **88**, 887-896.
- Guiraud, T. (2004) Les facteurs viraux restaurant la compatibilité entre un potyvirus et une plante dont l'eIF4E est non-permissif. In *Ecole Doctorale Biologie-Santé. Université Victor Ségalen Bordeaux 2, Bordeaux*.
- Guo, D. Y., Spetz, C., Saarma, M. and Valkonen, J. P. T. (2003) Two potato proteins, including a novel RING finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HCpro. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 405-410.
- Hajimorad, M. R., Eggenberger, A. L. and Hill, J. H. (2005) Loss and gain of elicitor function of Soybean mosaic virus G7 provoking Rsv1-mediated lethal systemic hypersensitive response maps to P3. *Journal of Virology*, **79**, 1215-1222.
- Haldeman-Cahill, R., Daros, J. A. and Carrington, J. C. (1998) Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *Journal of Virology*, **72**, 4072-4079.
- Hayes, A. J., Jeong, S. C., Gore, M. A., Yu, Y. G., Buss, G. R., Tolin, S. A., *et al.* (2004) Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to soybean mosaic virus in soybeans. *Genetics*, **166**, 493-503.
- Haywood, V., Kragler, F. and Lucas, W. J. (2002) Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell*, **14**, S303-S325.
- Hebrard, E., Bessin, Y., Michon, T., Longhi, S., Uversky, V. N., Delalande, F., *et al.* (2009) Intrinsic disorder in Viral Proteins Genome-Linked: experimental and predictive analyses. *Virology Journal*, **6**.
- Hebrard, E., Pinel-Galzi, A., Bersoult, A., Sire, C. and Fargette, D. (2006) Emergence of a resistance-breaking isolate of Rice yellow mottle virus during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *Journal of General Virology*, **87**, 1369-1373.
- Hebrard, E., Pinel-Galzi, A. and Fargette, D. (2008) Virulence domain of the RYMV genome-linked viral protein VPg towards rice rymv1-2-mediated resistance. *Archives of Virology*, **153**, 1161-1164.
- Heinemeyer, W., Ramos, P. C. and Dohmen, R. J. (2004) Ubiquitin-proteasome system - The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**, 1562-1578.
- Herold, J. and Andino, R. (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Molecular Cell*, **7**, 581-591.
- Hjulsager, C. K., Olsen, B. S., Jensen, D. M. K., Cordea, M. I., Krath, B. N., Johansen, I. E., *et al.* (2006) Multiple determinants in the coding region of Pea seed-borne mosaic virus P3 are involved in virulence against sbm-2 resistance. *Virology*, **355**, 52-61.
- Holt, B. F., Hubert, D. A. and Dangl, J. L. (2003) Resistance gene signaling in plants - complex similarities to animal innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, **15**, 20-25.

- Hong, Y. L. and Hunt, A. G. (1996) RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, **226**, 146-151.
- Hong, Y. L., Levay, K., Murphy, J. F., Klein, P. G., Shaw, J. G. and Hunt, A. G. (1995) A Potyvirus Polymerase Interacts with the Viral Coat Protein and Vpg in Yeast-Cells. *Virology*, **214**, 159-166.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. and Kerppola, T. K. (2002) Visualization of interactions among bZip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, **9**, 789-798.
- Hu, C. D. and Kerppola, T. K. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology*, **21**, 539-545.
- Huang, T.-S., Wei, T., Laliberte, J.-F. and Wang, A. (2010) A Host RNA Helicase-Like Protein, AtRH8, Interacts with the Potyviral Genome-Linked Protein, VPg, Associates with the Virus Accumulation Complex, and Is Essential for Infection. (ed.^eds.). pp. 255-266.
- Huet, H., Galon, A., Meir, E., Lecoq, H. and Raccach, B. (1994) Mutations in the Helper Component Protease Gene of Zucchini Yellow Mosaic-Virus Affect Its Ability to Mediate Aphid Transmissibility. *Journal of General Virology*, **75**, 1407-1414.
- Hulbert, S. H., Webb, C. A., Smith, S. M. and Sun, Q. (2001) Resistance gene complexes: Evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology*, **39**, 285-312.
- Hwang, J., Li, J., Liu, W., An, S., Cho, H., Her, N., et al. (2009) Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer recessive resistance to chilli veinal mottle virus in pepper. *Molecules and Cells*, **27**, 329-336.
- Irwin, S. V., Kesseli, R. V., Waycott, W., Ryder, E. J., Cho, J. J. and Michelmore, R. W. (1999) Identification of PCR-based markers flanking the recessive LMV resistance gene *mo1* in an intraspecific cross in lettuce. *Genome*, **42**, 982-986.
- Ivanov, K. I., Puustinen, P., Gabrenaite, R., Vihinen, H., Ronnstrand, L., Valmu, L., et al. (2003) Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell*, **15**, 2124-2139.
- Ivanov, K. I., Puustinen, P., Merits, A., Saarma, M. and Makinen, K. (2001) Phosphorylation down-regulates the RNA binding function of the coat protein of potato virus A. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 13530-13540.
- Jagadish, M. N., Huang, D. X. and Ward, C. W. (1993) Site-Directed Mutagenesis of a Potyvirus Coat Protein and Its Assembly in Escherichia-Coli. *Journal of General Virology*, **74**, 893-896.
- Janzac, B., Montarry, J., Palloix, A., Navaud, O. and Moury, B. (2010) A Point Mutation in the Polymerase of Potato virus Y Confers Virulence Toward the Pvr4 Resistance of Pepper and a High Competitiveness Cost in Susceptible Cultivar. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **23**, 823-830.
- Jenner, C. E., Wang, X. W., Ponz, F. and Walsh, J. A. (2002) A fitness cost for Turnip mosaic virus to overcome host resistance. *Virus Research*, **86**, 1-6.
- Jenner, C. E., Wang, X. W., Tomimura, K., Ohshima, K., Ponz, F. and Walsh, J. A. (2003) The dual role of the potyvirus P3 protein of turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 777-784.
- Jin, H. L., Li, S. T. and Villegas, A. (2006) Down-regulation of the 26S proteasome subunit RPN9 inhibits viral systemic transport and alters plant vascular development. *Plant Physiology*, **142**, 651-661.
- Johansen, E., Edwards, M. C. and Hampton, R. O. (1994) Seed Transmission of Viruses - Current Perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, **32**, 363-386.

- Johansen, I. E., Dougherty, W. G., Keller, K. E., Wang, D. and Hampton, R. O. (1996) Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. *Journal of General Virology*, **77**, 3149-3154.
- Kang, B. C., Yeam, I., Frantz, J. D., Murphy, J. F. and Jahn, M. M. (2005a) The pvr1 locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant Journal*, **42**, 392-405.
- Kang, B. C., Yeam, I. and Jahn, M. M. (2005b) Genetics of plant virus resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 581-621.
- Kanyuka, K., Druka, A., Caldwell, D. G., Tymon, A., McCallum, N., Waugh, R., *et al.* (2005) Evidence that the recessive bymovirus resistance locus rym4 in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Molecular Plant Pathology*, **6**, 449-458.
- Kanyuka, K., McGrann, G., Alhudaib, K., Hariri, D. and Adams, M. J. (2004) Biological and sequence analysis of a novel European isolate of Barley mild mosaic virus that overcomes the barley rym5 resistance gene. *Archives of Virology*, **149**, 1469-1480.
- Kapust, R. B. and Waugh, D. S. (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science*, **8**, 1668-1674.
- Kassanis, B. and Govier, D. A. (1971) New Evidence on Mechanism of Aphid Transmission of Potato-C and Potato Aucuba Mosaic Viruses. *Journal of General Virology*, **10**, 99-&.
- Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. (1995) Requirement for Hc-Pro Processing During Genome Amplification of Tobacco Etch Potyvirus. *Virology*, **209**, 268-273.
- Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology*, **285**, 71-81.
- Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J. (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 460-465.
- Kekarainen, T., Savilahti, H. and Valkonen, J. P. T. (2002) Functional genomics on Potato Virus A: Virus genome-wide map of sites essential for virus propagation (vol 12, pg 584, 2002). *Genome Research*, **12**, 840-840.
- Keller, K. E., Johansen, I. E., Martin, R. R. and Hampton, R. O. (1998) Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**, 124-130.
- Kempers, R. and vanBel, A. J. E. (1997) Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta*, **201**, 195-201.
- Khan, M. A., Miyoshi, H., Gallie, D. R. and Goss, D. J. (2008) Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ in vitro translation - Interactions with translation initiation factors eif4f and eifiso4f. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 1340-1349.
- Khan, M. A., Miyoshi, H., Ray, S., Natsuaki, T., Suehiro, N. and Goss, D. J. (2006) Interaction of genome-linked protein (VPg) of turnip mosaic virus with wheat germ translation initiation factors eIFiso4E and eIFiso4F. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 28002-28010.
- Kim, J. Y., Yuan, Z. and Jackson, D. (2003) Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in Arabidopsis. *Development*, **130**, 4351-4362.
- Kim, S. H., Ryabov, E. V., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Gillespie, T., MacFarlane, S., *et al.* (2007) Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *Embo Journal*, **26**, 2169-2179.

- Kostrub, C. F., Lei, E. P. and Enoch, T. (1998) Use of gap repair in fission yeast to obtain novel alleles of specific genes. *Nucleic Acids Research*, **26**, 4783-4784.
- Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., *et al.* (2002) Molecular and biological characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology*, **92**, 563-572.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Forget-Richard, F., Peypelut, M., Candresse, T. and Lot, H., *et al.* (2001) Caractérisation moléculaire d'une souche brésilienne de type Most du virus de la mosaïque de la laitue. In: *8èmes Rencontres de Virologie Végétale*. (ed.^eds.). (ed.^eds.).
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., *et al.* (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 95-125.
- Kuehne, T., Shi, N., Proeseler, G., Adams, M. J. and Kanyuka, K. (2003) The ability of a bymovirus to overcome the rym4-mediated resistance in barley correlates with a codon change in the VPg coding region on RNA1. *Journal of General Virology*, **84**, 2853-2859.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**, 150-163.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, **227**, 680-&.
- Lain, S., Riechmann, J. L. and Garcia, J. A. (1990) Rna Helicase - a Novel Activity Associated with a Protein Encoded by a Positive Strand Rna Virus. *Nucleic Acids Research*, **18**, 7003-7006.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., *et al.* (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *Embo Journal*, **25**, 2768-2780.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. and Burgyan, J. (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *Embo J*, **23**, 876-884.
- Lanfermeijer, F. C., Dijkhuis, J., Sturre, M. J. G., de Haan, P. and Hille, J. (2003) Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-2(2) from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology*, **52**, 1037-1049.
- Lanfermeijer, F. C., Warmink, J. and Hille, J. (2005) The products of the broken Tm-2 and the durable Tm-2(2) resistance genes from tomato differ in four amino acids. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 2925-2933.
- Langenberg, W. G. and Zhang, L. Y. (1997) Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology*, **118**, 243-247.
- Le Gall, O. (2003) Lettuce mosaic virus. "CML/AAB Description of Plant Viruses" n°399. Edited by A. T. Jones, D. J. Robinson, N. Boonham & R. Mumford. Wellesbourne, UK: Assoc. Appl. Biol.. [<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=399>].
- Le Gall, O., B. Maisonneuve, S. Souche, H. Lot and Candresse., a. T. (1999) Resistance against Lettuce mosaic virus in wild *Lactuca*. *Poster presented at the 9th Molecular Plant-Microbe Interactions Meeting, Amsterdam, NL, 26-29 July 1999*.
- Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M., *et al.* (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 16247-16255.

- Lee, J., Muhsin, M., Atienza, G. A., Kwak, D., Kim, S., Leon, T. B. d., *et al.* (2010) Single nucleotide polymorphisms in a gene for translation initiation factor (eIF4G) of rice (*Oryza sativa*) associated with resistance to Rice tungro spherical virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **23**, 29-38.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A. and Carrington, J. C. (2002) Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology*, **12**, 1046-1051.
- Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G. and Laliberte, J. F. (2000) Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, **74**, 7730-7737.
- Leonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M. G. and Laliberte, J. F. (2004) Interaction of VPg-Pro of Turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *Journal of General Virology*, **85**, 1055-1063.
- Lepoivre, P. (2003) *Phytopathologie*. Edition De Boeck.
- Li, H. W., Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., Ji, L. H., Wong, S. M., *et al.* (1999) Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *Embo J*, **18**, 2683-2691.
- Li, X. H. and Carrington, J. C. (1995) Complementation of Tobacco Etch Potyvirus Mutants by Active Rna-Polymerase Expressed in Transgenic Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 457-461.
- Li, X. H., Valdez, P., Olvera, R. E. and Carrington, J. C. (1997) Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): Subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology*, **71**, 1598-1607.
- Ling, K. S., Harris, K. R., Meyer, J. D. F., Levi, A., Guner, N., Wehner, T. C., *et al.* (2009) Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the watermelon eIF4E gene are closely associated with resistance to Zucchini yellow mosaic virus. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **120**, 191-200.
- LinGoerke, J. L., Robbins, D. J. and Burczak, J. D. (1997) PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. *Biotechniques*, **23**, 409-&.
- Llave, C., Martinez, B., Diaz-Ruiz, J. R. and Lopez-Abella, D. (2002) Amino acid substitutions within the Cys-rich domain of the tobacco etch potyvirus HC-Pro result in loss of transmissibility by aphids. *Arch Virol*, **147**, 2365-2375.
- López-Moya, J. J. and Garcia, J. A. (1999) Potyviruses. In: *Encyclopedia of virology*. (ed.^eds.).
- López-Moya, J. J. and Garcia, J. A. (2008) Potyviruses. In *Encyclopedia of virology*.
- Lopez-Moya, J. J., Wang, R. Y. and Pirone, T. P. (1999) Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *Journal of General Virology*, **80**, 3281-3288.
- Lucas, W. J. and Lee, J. Y. (2004) Plant cell biology - Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**, 712-726.
- Lucas, W. J. and Wolf, S. (1993) Plasmodesmata: The intercellular organelles of green plants. *Trends in Cell Biology*, **3**, 308-315.
- Lunello, P., Mansilla, C., Conci, V. and Ponz, F. (2004) Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent (Taqman (R)) RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods*, **118**, 15-21.
- Mahajan, S., Dolja, V. V. and Carrington, J. C. (1996) Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: Requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology*, **70**, 4370-4379.

- Maisonneuve, B. (2003) *Lactuca virosa*, a source of disease resistance genes for lettuce breeding: results and difficulties for gene introgression. *EUCARPIA leafy vegetables 2003. Proceedings of the EUCARPIA Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding, Noordwijkerhout, Netherlands, 19-21 March 2003*, 61-67.
- Maisonneuve, B., Bellec, Y., Souche, S. and Lot, H. (1999) New resistance against downy mildew and lettuce mosaic potyvirus in wild *Lactuca* spp. In: *Lebeda, A. and Kristkova, E. (eds): Eucarpia Leafy Vegetables '99. Palacky University, Olomouc, pp. 191-197.*
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Bartel, D., Vance, V. B. and Bowman, L. H. (2002) A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15228-15233.
- Marandel, G., Pascal, T., Candresse, T. and Decroocq, V. (2009) Quantitative resistance to Plum pox virus in *Prunus davidiana* P1908 linked to components of the eukaryotic translation initiation complex. *Plant Pathology*, **58**, 425-435.
- Marathe, R., Anandalakshmi, R., Smith, T. H., Pruss, G. J. and Vance, V. B. (2000) RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology*, **43**, 295-306.
- Martin, B., Collar, J. L., Tjallingii, W. F. and Fereres, A. (1997) Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *Journal of General Virology*, **78**, 2701-2705.
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J. and Sessa, G. (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*, **54**, 23-61.
- Martin, M. T., Cervera, M. T., Bonay, P. and Garcia, J. A. (1995) Properties of the Active Plum Pox Potyvirus Rna-Polymerase Complex in Defined Glycerol Gradient Fractions (Vol 37, Pg 127, 1995). *Virus Research*, **38**, 317-317.
- Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H. and Hataya, T. (1999) A single amino acid change in viral genome-associated protein of potato virus Y correlates with resistance breaking in 'Virgin A Mutant' tobacco. *Phytopathology*, **89**, 118-123.
- Matthews, R. E. F. (1991) *Plant Virology Fourth Edition. Matthews, R. E. F. Plant Virology, Third Edition. Xxii+835p. Academic Press, Inc.: San Diego, California, USA; London, England, Uk. Illus. Maps, XXII+835P.*
- Maule, A. J., Caranta, C. and Boulton, M. I. (2007) Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 223-231.
- McDonald, J. G. and Bancroft, J. B. (1977) Assembly Studies on Potato Virus-Y and Its Coat Protein. *Journal of General Virology*, **35**, 251-263.
- McDowell, J. M. and Woffenden, B. J. (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, **21**, 178-183.
- Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E. (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, **99**, 81-92.
- Merits, A., Guo, D. Y., Jarvekulg, L. and Saarma, M. (1999) Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology*, **263**, 15-22.
- Merits, A., Guo, D. Y. and Saarma, M. (1998) VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *Journal of General Virology*, **79**, 3123-3127.
- Merits, A., Rajamaki, M. L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., et al. (2002) Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *Journal of General Virology*, **83**, 1211-1221.

- Michon, T., Estevez, Y., Walter, J., German-Retana, S. and Le Gall, O. (2006) The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *Febs Journal*, **273**, 1312-1322.
- Miyamoto-Sato, E., Ishizaka, M., Horisawa, K., Tateyama, S., Takashima, H., Fuse, S., *et al.* (2005) Cell-free cotranslation and selection using in vitro virus for high-throughput analysis of protein-protein interactions and complexes. *Genome Research*, **15**, 710-717.
- Miyoshi, H., Okade, H., Muto, S., Suehiro, N., Nakashima, H., Tomoo, K., *et al.* (2008) Turnip mosaic virus VPg interacts with *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E and inhibits in vitro translation. *Biochimie*, **90**, 1427-1434.
- Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T., Tsukamoto, T., *et al.* (2006) Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie*, **88**, 329-340.
- Mizumoto, H., Iwakawa, H. O., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2006) Cap-independent translation mechanism of Red clover necrotic mosaic virus RNA2 differs from that of RNA1 and is linked to RNA replication. *Journal of Virology*, **80**, 3781-3791.
- Mlotshwa, S., Pruss, G. J. and Vance, V. (2008) Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends in Plant Science*, **13**, 375-382.
- Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C. and Burgyan, J. (2005) Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of Virology*, **79**, 7812-7818.
- Monzingo, A. F., Dhaliwal, S., Dutt-Chaudhuri, A., Lyon, A., Sadow, J. H., Hoffman, D. W., *et al.* (2007) The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond. *Plant Physiology*, **143**, 1504-1518.
- Moury, B., Desbiez, C., Jacquernond, M. and Lecoq, H. (2006) Genetic diversity of plant virus populations: Towards hypothesis testing in molecular epidemiology. In: *Plant Virus Epidemiology*. (ed. ^eds.). pp. 49-87.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., *et al.* (2004) Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 322-329.
- Murphy, J. F., Klein, P. G., Hunt, A. G. and Shaw, J. G. (1996) Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology*, **220**, 535-538.
- Murray, K. E. and Barton, D. J. (2003) Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*, **77**, 4739-4750.
- Naderpour, M., Lund, O. S., Larsen, R. and Johansen, E. (2010) Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying bc-3 is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele. *Molecular Plant Pathology*, **11**, 255-263.
- Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., *et al.* (2007) Improved gateway binary vectors: High-performance vectors for creation of fusion constructs in Transgenic analysis of plants. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **71**, 2095-2100.
- Nakahara, K. S., Shimada, R., Choi, S. H., Yamamoto, H., Shao, J. and Uyeda, I. (2010) Involvement of the P1 cistron in overcoming eIF4E-mediated recessive resistance against Clover yellow vein virus in pea. *Mol Plant Microbe Interact.*
- Neumann, E., Schaeferidder, M., Wang, Y. and Hofschneider, P. H. (1982) Gene-Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric-Fields. *Embo Journal*, **1**, 841-845.

- Ng, J. C. K. and Falk, B. W. (2006) Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 183-212.
- Nicaise, V., Gallois, J. L., Chafiai, F., Allen, L. M., Schurdi-Levraud, V., Browning, K. S., *et al.* (2007) Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, **581**, 1041-1046.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., *et al.* (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiology*, **132**, 1272-1282.
- Nicaise, V. and Revers, F. (2006) Plant Resistance to Infection by Viruses. In: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. (ed.^eds.).
- Nicholson, B. L., Wu, B. D., Chevtchenko, I. and White, K. A. (2010) Tombusvirus recruitment of host translational machinery via the 3' UTR. *Rna-a Publication of the Rna Society*, **16**, 1402-1419.
- Nicolas, O., Dunnington, S. W., Gotow, L. F., Pirone, T. P. and Hellmann, G. M. (1997) Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology*, **237**, 452-459.
- Niepel, M. and Gallie, D. R. (1999) Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology*, **73**, 9080-9088.
- Nieto, C., Morales, M., Orjeda, G., Clepet, C., Monfort, A., Sturbois, B., *et al.* (2006) An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *Plant Journal*, **48**, 452-462.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. E. and Dangl, J. L. (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, **37**, 579-609.
- Okade, H., Fujita, Y., Miyamoto, S., Tomoo, K., Muto, S., Miyoshi, H., *et al.* (2009) Turnip Mosaic Virus Genome-Linked Protein VPg Binds C-Terminal Region of Cap-Bound Initiation Factor 4E Orthologue Without Exhibiting Host Cellular Specificity. *Journal of Biochemistry*, **145**, 299-307.
- Oparka, K. J. and Turgeon, R. (1999) Sieve elements and companion cells - Traffic control centers of the phloem. *Plant Cell*, **11**, 739-750.
- Oruetxebarria, I., Guo, D. Y., Merits, A., Mäkinen, K., Saarma, M. and Valkonen, J. P. T. (2001) Identification of the genome-linked protein in virions of Potato virus A, with comparison to other members in genus Potyvirus. *Virus Research*, **73**, 103-112.
- Overall, R. L. and Blackman, L. M. (1996) A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends in Plant Science*, **1**, 307-311.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. and Wimmer, E. (1998) Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, **393**, 280-284.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., *et al.* (2006) F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 1994-1999.
- Peng, Y. H., Kadoury, D., Gal-On, A., Wang, Y. and Raccah, B. (1998) Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *Journal of General Virology*, **79**, 897-904.
- Perez, J. d. J., Juarez, S., Chen, D., Scott, C. L., Hartweck, L. M., Olszewski, N. E., *et al.* (2006) Mapping of two O-GlcNAc modification sites in the capsid protein of the potyvirus Plum pox virus. *FEBS Letters*, **580**, 5822-5828.

- Perez, K., Kang, B.-C., Yeam, I. and Jahn, M. (2007) The VPg of tobacco etch virus is the virulence determinant for recessive resistance gene *pvr1* in Capsicum. *Plant Biology (Rockville)*, **2007**, 91.
- Pestova, T. V., Borukhov, S. I. and Hellen, C. U. T. (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature*, **394**, 854-859.
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G. and Ziegler-Graff, V. (2002) P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, **76**, 6815-6824.
- Pink, D. A. C., Kostova, D. and Walkey, D. G. A. (1992a) Differentiation of Pathotypes of Lettuce Mosaic-Virus. *Plant Pathology*, **41**, 5-12.
- Pink, D. A. C., Lot, H. and Johnson, R. (1992b) Novel Pathotypes of Lettuce Mosaic-Virus - Breakdown of a Durable Resistance. *Euphytica*, **63**, 169-174.
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D., *et al.* (2003) Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J Biol Chem*, **278**, 23753-23761.
- Pouch, M. N., Petit, F., Buri, J., Briand, Y. and Schmid, H. P. (1995) Identification and Initial Characterization of a Specific Proteasome (Prosome) Associated Rnase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 22023-22028.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., *et al.* (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218-229.
- Puustinen, P. and Makinen, K. (2004) Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 38103-38110.
- Puustinen, P., Rajamaki, M. L., Ivanov, K. I., Valkonen, J. P. T. and Makinen, K. (2002) Detection of the potyviral genome-linked protein VPg in virions and its phosphorylation by host kinases. *Journal of Virology*, **76**, 12703-12711.
- Qu, F. and Morris, T. J. (2005) Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *Febs Letters*, **579**, 5958-5964.
- Querci, M., Baulcombe, D. C., Goldbach, R. W. and Salazar, L. F. (1995) Analysis of the Resistance-Breaking Determinants of Potato-Virus-X (Pvx) Strain Hb on Different Potato Genotypes Expressing Extreme Resistance to Pvx. *Phytopathology*, **85**, 1003-1010.
- Rai, M. (2006) Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Molecular Biology*, **61**, 399-414.
- Rajamaki, M. L. and Valkonen, J. P. T. (1999) The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicandra physaloides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**, 1074-1081.
- Rajamaki, M. L. and Valkonen, J. P. T. (2002) Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**, 138-149.
- Rajamaki, M. L. and Valkonen, J. P. T. (2003) Localization of a potyvirus and the viral genome-linked protein in wild potato leaves at an early stage of systemic infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 25-34.
- Rajamaki, M. L. and Valkonen, J. P. T. (2004) Detection of a natural point mutation in Potato virus A that overcomes resistance to vascular movement in *Nicandra physaloides*, and studies on seed-transmissibility of the mutant virus. *Annals of Applied Biology*, **144**, 77-86.

- Rajamaki, M. L. and Valkonen, J. P. T. (2009) Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in *Nicotiana* species. *Plant Cell*, **21**, 2485-2502.
- Ratcliff, F., Harrison, B. D. and Baulcombe, D. C. (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, **276**, 1558-1560.
- Redondo, E., Krause-Sakate, R., Yang, S. J., Lot, H., Le Gall, O. and Candresse, T. (2001) Lettuce mosaic virus pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 804-810.
- Regenmortel, M. H. V. v., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., *et al.* (2000) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* (ed.^eds.). San Diego USA: Academic Press, pp. xii + 1162 pp.
- Reichel, C. and Beachy, R. N. (2000) Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *Journal of Virology*, **74**, 3330-3337.
- Restrepohartwig, M. A. and Carrington, J. C. (1994) The Tobacco Etch Potyvirus 6-Kilodalton Protein Is Membrane-Associated and Involved in Viral Replication. *Journal of Virology*, **68**, 2388-2397.
- Revers, F., Lot, H., Souche, S., LeGall, O., Candresse, T. and Dunez, J. (1997a) Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. *Phytopathology*, **87**, 397-403.
- Riechmann, J. L., Lain, S. and Garcia, J. A. (1992) Highlights and Prospects of Potyvirus Molecular-Biology. *Journal of General Virology*, **73**, 1-16.
- Robaglia, C. and Caranta, C. (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, **11**, 40-45.
- Roberts, A. G. (2005) Plasmodesmal structure and development. In: *Plasmodesmata, Annual Plant Reviews.* (ed.^eds.). Blackwell Publishing Ltd.
- Roberts, I. M., Wang, D., Findlay, K. and Maule, A. J. (1998) Ultrastructural and Temporal Observations of the Potyvirus Cylindrical Inclusions (CIs) Show That the CI Protein Acts Transiently in Aiding Virus Movement. *Virology*, **245**, 173-181.
- Roberts, I. M., Wang, D., Thomas, C. L. and Maule, A. J. (2003) Pea seed-borne mosaic virus seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. *Protoplasma*, **222**, 31-43.
- Robinson, R. W. and Provvidenti, R. (1993) Breeding lettuce for viral resistance. In: *Resistance to Viral Diseases of Vegetables* (Ed. Kyle M.M., T. P., Portland, p, ed.^eds.). pp. 61-79.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. and Lucas, W. J. (1997) Capsid protein and helper component proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, **237**, 283-295.
- Roth, B. M., Pruss, G. J. and Vance, V. B. (2004) Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research*, **102**, 97-108.
- Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E. and Le Gall, O. (2007) Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *Journal of General Virology*, **88**, 1029-1033.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., *et al.* (2002) A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper

- corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal*, **32**, 1067-1075.
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Lesage, M. L. and Caranta, C. (2005) The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Molecular Genetics and Genomics*, **274**, 346-353.
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A. and Caranta, C. (2006) Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper. *Journal of General Virology*, **87**, 2089-2098.
- Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., Lopez-Abella, D., *et al.* (2005) Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission. *J Virol*, **79**, 3758-3765.
- Rusholme, R. L., Higgins, E. E., Walsh, J. A. and Lydiate, D. J. (2007) Genetic control of broad-spectrum resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). *Journal of General Virology*, **88**, 3177-3186.
- Saenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K. D., Carrington, J. C. and Garcia, J. A. (2002) Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *Journal of Virology*, **76**, 1922-1931.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Second Edition. NY: CSH Laboratory Press.
- Sanjuan, R., Moya, A. and Elena, S. F. (2004) The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 8396-8401.
- Sanz, M. A., Castello, A. and Carrasco, L. (2007) Viral translation is coupled to transcription in Sindbis virus-infected cells. *Journal of Virology*, **81**, 7061-7068.
- Sato, M., Masuta, C. and Uyeda, I. (2003) Natural resistance to Clover yellow vein virus in beans controlled by a single recessive locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 994-1002.
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M. and Uyeda, I. (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *Febs Letters*, **579**, 1167-1171.
- Saunal, H., Witz, J. and Vanregenmortel, M. H. V. (1993) Inhibition of In vitro Cotranslational Disassembly of Tobacco Mosaic-Virus by Monoclonal-Antibodies to the Viral Coat Protein. *Journal of General Virology*, **74**, 897-900.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J. and Carrington, J. C. (2000) Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology*, **273**, 300-306.
- Schaad, M. C., HaldemanCahill, R., Cronin, S. and Carrington, J. C. (1996) Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: Effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology*, **70**, 7039-7048.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. and Carrington, J. C. (1997b) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *Embo Journal*, **16**, 4049-4059.
- Schaad, M. C., Lellis, A. D. and Carrington, J. C. (1997a) VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology*, **71**, 8624-8631.
- Scholthof, K., Scholthof, H. B. and Jackson, A. O. (1993) Control of Plant Virus Diseases by Pathogen-Derived Resistance in Transgenic Plants. *Plant Physiol*, **102**, 7-12.

- Seo, J.-K., Kang, S.-H., Seo, B. Y., Jung, J. K. and Kim, K.-H. (2010) Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Molecular Plant Pathology*, **11**, 265-276.
- Seo, Y. S., Rojas, M. R., Lee, J. Y., Lee, S. W., Jeon, J. S., Ronald, P., *et al.* (2006) A viral resistance gene from common bean functions across plant families and is up-regulated in a non-virus-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11856-11861.
- Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H. and Ward, C. W. (1988) The N-Termini and C-Termini of the Coat Proteins of Potyviruses Are Surface-Located and the N-Terminus Contains the Major Virus-Specific Epitopes. *Journal of General Virology*, **69**, 1497-1508.
- Shukla, D. D., Ward, C. W. and Brunt, A. A. (1994) The Potyviridae. *The Potyviridae.*, xii + 516 pp.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Simeonov, A. and Nikiforov, T. T. (2002) Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection. *Nucleic Acids Research*, **30**.
- SimonBuela, L., Guo, H. S. and Garcia, J. A. (1997) Long sequences in the 5' noncoding region of plum pox virus are not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. *Virology*, **233**, 157-162.
- Soosaar, J. L. M., Burch-Smith, T. M. and Dinesh-Kumar, S. P. (2005) Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 789-798.
- Spetz, C., Taboada, A. M., Darwich, S., Ramsell, J., Salazar, L. F. and Valkonen, J. P. T. (2003) Molecular resolution of a complex of potyviruses infecting solanaceous crops at the centre of origin in Peru. *Journal of General Virology*, **84**, 2565-2578.
- Spetz, C. and Valkonen, J. P. T. (2004) Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 502-510.
- Stein, N., Perovic, D., Kumlehn, J., Pellio, B., Stracke, S., Streng, S., *et al.* (2005) The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant Journal*, **42**, 912-922.
- Takahashi, H., Miller, J., Nozaki, Y., Takeda, M., Shah, J., Hase, S., *et al.* (2002) RCY1, an *Arabidopsis thaliana* RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J*, **32**, 655-667.
- Takizawa, M., Goto, A. and Watanabe, Y. (2005) The tobacco ubiquitin-activating enzymes NtE1A and NtE1B are induced by tobacco mosaic virus, wounding and stress hormones. *Molecules and Cells*, **19**, 228-231.
- Tameling, W. I. and Baulcombe, D. C. (2007) Physical association of the NB-LRR resistance protein Rx with a Ran GTPase-activating protein is required for extreme resistance to Potato virus X. *Plant Cell*, **19**, 1682-1694.
- Teycheney, P. Y., Aaziz, R., Dinant, S., Salanki, K., Tourneur, C., Balazs, E., *et al.* (2000) Synthesis of (-)-strand RNA from the 3' untranslated region of plant viral genomes expressed in transgenic plants upon infection with related viruses. *Journal of General Virology*, **81**, 1121-1126.
- Thivierge, K., Cotton, S., Dufresne, P. J., Mathieu, I., Beauchemin, C., Ide, C., *et al.* (2008) Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. *Virology*, **377**, 216-225.

- Thivierge, K., Nicaise, V., Dufresne, P. J., Cotton, S., Laliberte, J. F., Le Gall, O., *et al.* (2005) Plant virus RNAs. Coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. *Plant Physiology*, **138**, 1822-1827.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876-4882.
- Thornbury, D. W., Hellmann, G. M., Rhoads, R. E. and Pirone, T. P. (1985) Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology*, **144**, 260-267.
- Tomita, R., Murai, J., Miura, Y., Ishihara, H., Liu, S., Kubotera, Y., *et al.* (2008) Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene L-3 of *Capsicum chinense* in a 400-kb region of R-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences. *Theoretical and Applied Genetics*, **117**, 1107-1118.
- Torrance, L., Andreev, I. A., Gabrenaite-Verhovskaya, R., Cowan, G., Makinen, K. and Taliansky, M. E. (2006) An unusual structure at one end of potato potyvirus particles. *J Mol Biol*, **357**, 1-8.
- Truniger, V. and Aranda, M. A. (2009) Recessive Resistance to Plant Viruses. *Advances in Virus Research*, Vol 75, **75**, 119-+.
- Truniger, V., Nieto, C., Gonzalez-Ibeas, D. and Aranda, M. (2008) Mechanism of plant eIF4E-mediated resistance against a Carmovirus (Tombusviridae): cap-independent translation of a viral RNA controlled in cis by an (a)virulence determinant. *Plant Journal*, **56**, 716-727.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L. and Bernardi, F. (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, **74**, 157-175.
- Vallejos, C. E., Astua-Monge, G., Jones, V., Plyler, T. R., Sakiyama, N. S. and Mackenzie, S. A. (2006) Genetic and molecular characterization of the I locus of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, **172**, 1229-1242.
- Valli, A., Martin-Hernandez, A. M., Lopez-Moya, J. J. and Garcia, J. A. (2006) RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing Ipomovirus, a member of the family Potyviridae that lacks the cysteine protease HCPro. *Journal of Virology*, **80**, 10055-10063.
- Van Bel, A. J. E. (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell and Environment*, **26**, 125-149.
- van der Biezen, E. A. and Jones, J. D. G. (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 454-456.
- Van der Hoorn, R. A. L., De Wit, P. and Joosten, M. (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in Plant Science*, **7**, 67-71.
- van der Pahlen, A. and Crnko, J. (1965) El virus del mosaico de la lechuga (*Marmor lactucae* Holmes) en Mendoza y Buenos Aires. *Rev. Invest. Agropecu. Ser. 5, Patol. Veg.* 2: 25-31.
- vanBel, A. J. E. (1995) Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons. In: *International Conference on the Transport of Photoassimilates*. (ed. ^eds.). Canterbury, England: Oxford Univ Press United Kingdom, pp. 1129-1140.
- Verchot, J. and Carrington, J. C. (1995) Evidence That the Potyvirus P1 Proteinase Functions in Trans as an Accessory Factor for Genome Amplification. *Journal of Virology*, **69**, 3668-3674.
- Verchot, J., Herndon, K. L. and Carrington, J. C. (1992) Mutational Analysis of the Tobacco Etch Potyviral 35-Kda Proteinase - Identification of Essential Residues and Requirements for Autoproteolysis. *Virology*, **190**, 298-306.

- Verchot, J., Koonin, E. V. and Carrington, J. C. (1991) The 35-Kda Protein from the N-Terminus of the Potyviral Polyprotein Functions as a 3rd Virus-Encoded Proteinase. *Virology*, **185**, 527-535.
- Vidal, S., Cabrera, H., Andersson, R. A., Fredriksson, A. and Valkonen, J. P. T. (2002) Potato gene Y-1 is an N gene homolog that confers cell death upon infection with potato virus Y. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**, 717-727.
- Vlot, A. C., Klessig, D. F. and Park, S.-W. (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 436-442.
- Vogel, F., Hofius, D. and Sonnewald, U. (2007) Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in Transgenic Arabidopsis. *Traffic*, **8**, 1205-1214.
- Walsh, J., Jenner, C. E., Barker, G. C. and Nellist, C. F. (2010) Turnip mosaic virus (TuMV) is able to use alleles of both eIF4E and eIF(iso)4E from multiple loci of the diploid *Brassica rapa*. (ed.^eds.).
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., *et al.* (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant Journal*, **40**, 428-438.
- Wang, D. W. and Maule, A. J. (1992) Early Embryo Invasion as a Determinant in Pea of the Seed Transmission of Pea Seed-Borne Mosaic-Virus. *Journal of General Virology*, **73**, 1615-1620.
- Wang, D. W. and Maule, A. J. (1994) A Model for Seed Transmission of a Plant-Virus - Genetic and Structural-Analyses of Pea Embryo Invasion by Pea Seed-Borne Mosaic-Virus. *Plant Cell*, **6**, 777-787.
- Wang, D. W. and Maule, A. J. (1995) Inhibition of Host Gene-Expression Associated with Plant-Virus Replication. *Science*, **267**, 229-231.
- Wang, R. Y., Ammar, E. D., Thornbury, D. W., LopezMoya, J. J. and Pirone, T. P. (1996) Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *Journal of General Virology*, **77**, 861-867.
- Wang, X., Ullah, Z. and Grumet, R. (2000) Interaction between Zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology*, **275**, 433-443.
- Weber, H., Schultze, S. and Pfitzner, A. J. P. (1993) 2 Amino-Acid Substitutions in the Tomato Mosaic-Virus 30-Kilodalton Movement Protein Confer the Ability to Overcome the Tm-2(2) Resistance Gene in the Tomato. *Journal of Virology*, **67**, 6432-6438.
- Wei, T., Huang, T.-S., McNeil, J., Laliberte, J.-F., Hong, J., Nelson, R. S., *et al.* (2010a) Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J Virol*, **84**, 799-809.
- Wei, T. and Wang, A. (2008) Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *Journal of Virology*, **82**, 12252-12264.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K. D., Zhou, X., *et al.* (2010b) Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog*, **6**, e1000962.
- Wen, R. H. and Hajimorad, M. R. (2010) Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology*, **400**, 1-7.
- Whitham, S., Dineshkumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. (1994) The Product of the Tobacco Mosaic-Virus Resistance Gene-N - Similarity to Toll and the Interleukin-1 Receptor. *Cell*, **78**, 1101-1115.

- Whitham, S. A., Anderberg, R. J., Chisholm, S. T. and Carrington, J. C. (2000) Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell*, **12**, 569-582.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G. and Laliberte, J. F. (1997) Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of Arabidopsis thaliana using the yeast two-hybrid system. *Virology*, **234**, 84-92.
- Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R. N. and Lucas, W. J. (1989) Movement Protein of Tobacco Mosaic-Virus Modifies Plasmodesmatal Size Exclusion Limit. *Science*, **246**, 377-379.
- Wright, K. M., Wood, N. T., Roberts, A. G., Chapman, S., Boevink, P., Mackenzie, K. M., *et al.* (2007) Targeting of TMV movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network: evidence from FRAP. *Traffic*, **8**, 21-31.
- Wu, X. J. and Shaw, J. G. (1998) Evidence that assembly of a potyvirus begins near the 5' terminus of the viral RNA. *Journal of General Virology*, **79**, 1525-1529.
- Xie, Q. and Guo, H.-S. (2006) Systemic antiviral silencing in plants. *Virus Research*, **118**, 1-6.
- Yamakawa, H., Mitsuhashi, I., Ito, N., Seo, S., Kamada, H. and Ohashi, Y. (2001) Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *European Journal of Biochemistry*, **268**, 3916-3929.
- Yang, P. Z., Fu, H. Y., Walker, J., Papa, C. M., Smalle, J., Ju, Y. M., *et al.* (2004) Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome - Biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 6401-6413.
- Yang, S. J., Revers, F., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T., *et al.* (1998) Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in Escherichia coli and on their infectivity to plants. *Archives of Virology*, **143**, 2443-2451.
- Yang, Z. N., Ye, X. R., Molina, J., Roose, M. L. and Mirkov, T. E. (2003) Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) locus in Poncirus trifoliata L. Raf. *Plant Physiology*, **131**, 482-492.
- Yeaman, I., Cavatorta, J. R., Ripoll, D. R., Kang, B. C. and Jahn, M. M. (2007) Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell*, **19**, 2913-2928.
- Yi, G. H., Gopinath, K. and Kao, C. C. (2007) Selective repression of translation by the brome mosaic virus 1a RNA replication protein. *Journal of Virology*, **81**, 1601-1609.
- Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S., *et al.* (2004) The Arabidopsis Cucumovirus multiplication 1 and 2 loci encode tip translation initiation factors 4E and 4G. *Journal of Virology*, **78**, 6102-6111.
- Yoshii, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M. and Naito, S. (1998a) Isolation of an Arabidopsis thaliana mutant in which accumulation of cucumber mosaic virus coat protein is delayed. *Plant Journal*, **13**, 211-219.
- Yoshii, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M. and Naito, S. (1998b) Isolation of an Arabidopsis thaliana mutant in which the multiplication of both cucumber mosaic virus and turnip crinkle virus is affected. *Journal of Virology*, **72**, 8731-8737.
- Zabarovsky, E. R. and Winberg, G. (1990) High-Efficiency Electroporation of Ligated DNA into Bacteria. *Nucleic Acids Research*, **18**, 5912-5912.
- Zeenko, V. and Gallie, D. R. (2005) Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 26813-26824.

- Ziebuhr, J., Bayer, S., Cowley, J. A. and Gorbalenya, A. E. (2003) The 3C-like proteinase of an invertebrate nidovirus links coronavirus and potyvirus homologs. *Journal of Virology*, **77**, 1415-1426.
- Zwickl, P., Voges, D. and Baumeister, W. (1999) The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **354**, 1501-1511.

Annexes

Annexe 1

*Mise en place d'un test de détection du LMV par
RT-PCR quantitative*

I. Principe de la PCR en temps réel

La PCR en temps réel, initialement mise au point par Higuchi *et al.*, (1992) est une technique d'amplification de l'ADN qui repose sur la mesure continue d'une libération de fluorescence au cours des cycles de PCR reflétant l'accumulation de produit PCR.

Grâce à cette technique, la fluorescence d'agents intercalants fluorescents ou de sondes fluorescentes est suivie à chaque cycle de la PCR. Aussi, à partir d'un certain nombre de cycles, la fluorescence dépasse de manière significative le bruit de fond ; ce cycle porte le nom de cycle seuil ou threshold cycle (Ct). Aussi, plus le Ct est faible, plus la séquence cible est abondante au départ.

Deux principales méthodes de quantifications sont utilisées en PCR quantitative. La quantification absolue, en nombres de copies, consiste à mesurer la quantité de cible par rapport à des standards dont le nombre de copies est connue. L'autre méthode, la quantification relative, consiste à mesurer la différence de quantité d'un échantillon par rapport à d'autres, en ayant normalisé les quantités mesurées par rapport à une référence mesurée en même temps pour normaliser les résultats. Un échantillon calibrateur peut aussi être utilisé et l'on parle alors de méthode du delta delta Ct (Kubista *et al.*, 2006).

La détection de la quantité d'amplicons peut se faire par des agents s'intercalant dans l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) ou par des sondes marquées avec des molécules fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, il existe une multitude de technologies dont les principales sont : sondes d'hydrolyse (Taqman), sondes d'hybridation (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers). Ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente mais présentent cependant des différences au niveau de la spécificité (Kubista *et al.*, 2006).

II. Les méthodes de détection des produits amplifiés

II.1. Méthode de détection en Sybr Green I

Le Sybr Green I est une molécule intercalante de l'ADN double brin qui agit comme le BET (Bromure d'Ethidium). Cette molécule n'émet une intense fluorescence que lorsqu'elle est liée à l'ADN double brin et aucune sous forme libre ou en présence d'acide nucléique

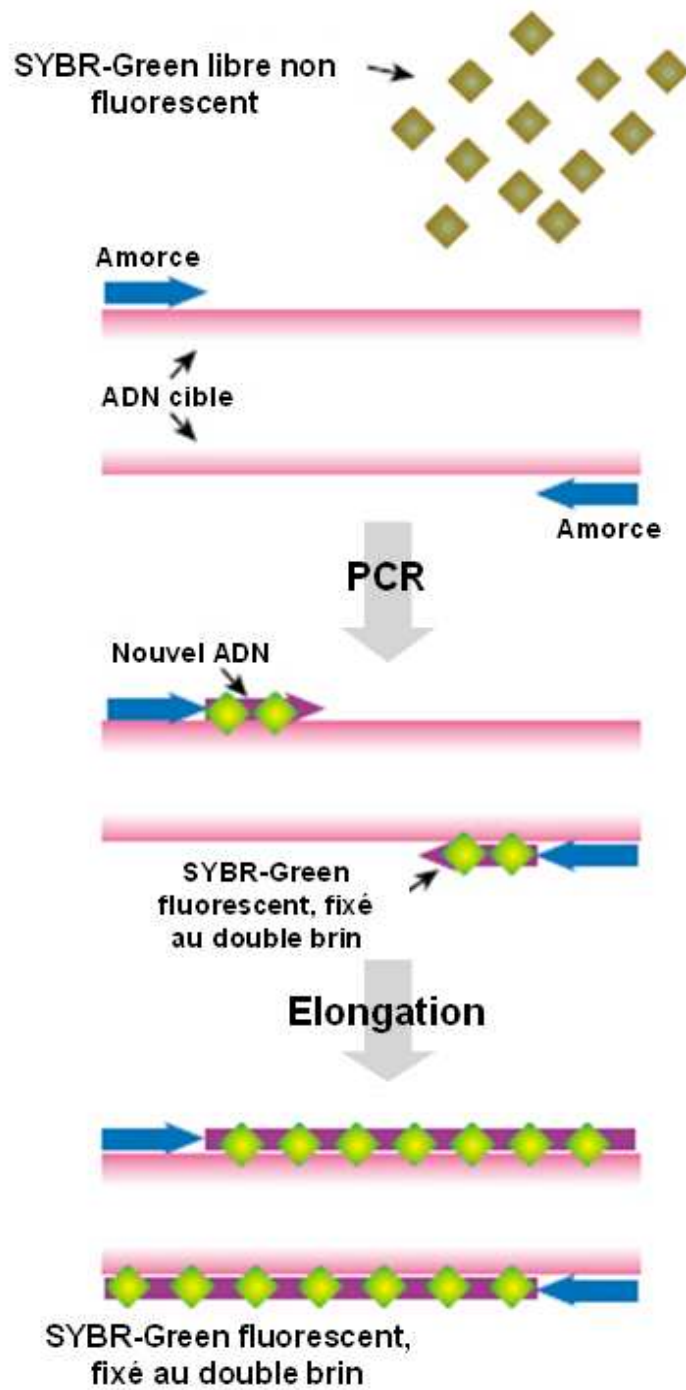


Figure 63. Principe de la PCR en temps réel avec le Sybr Green I.

simple brin. A chaque cycle de PCR, lors de l'élongation, la molécule de Sybr Green I se fixe à l'ADN double brin et fluoresce (**Figure 63**). Il s'en suit une émission de fluorescence mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation du signal fluorescent durant la réaction de PCR (Bustin, 2000) (**figure 63**). Au cours des cycles de PCR, la fluorescence émise augmente proportionnellement au nombre de copies d'ADN amplifiées. Elle est donc directement liée à la quantité initiale et au nombre de cycle de PCR.

Le Sybr Green I est très stable, seulement 6% de son activité est perdue au bout de 30 cycles de PCR. La technologie basée sur le SYBR Green I ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces (Bustin, 2000). Cependant, étant donné que le SYBR Green I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, la fluorescence peut provenir ici d'un produit d'amplification non spécifique et notamment de dimères d'amorces. Pour contourner ce problème et vérifier la spécificité du produit d'amplification, on étudie la courbe de fusion du produit amplifié (**Figure 64**). En effet, chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (ou T_m) spécifique, définie comme la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme de double brin, l'autre moitié sous forme de simple brin. La courbe de fusion est obtenue en traçant la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température. La température de fusion d'une molécule d'ADN double brin correspond au pic majoritaire de la courbe.

II.2. Méthode de détection en sonde TaqMan[®]

La méthode de détection en sonde d'hybridation Taqman est basée sur l'utilisation de l'activité exonucléasique 5'-3' de l'enzyme Taq polymérase et d'une sonde fluorescente doublement marquée (Kubista et al., 2006). La sonde est marquée par un fluorochrome émetteur (reporter) fixé à l'extrémité 5' qui n'émet de fluorescence que s'il est suffisamment éloigné d'un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. En effet, le Quencher a la propriété d'absorber l'énergie émise par le reporter, par un mécanisme appelé FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*).

Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences

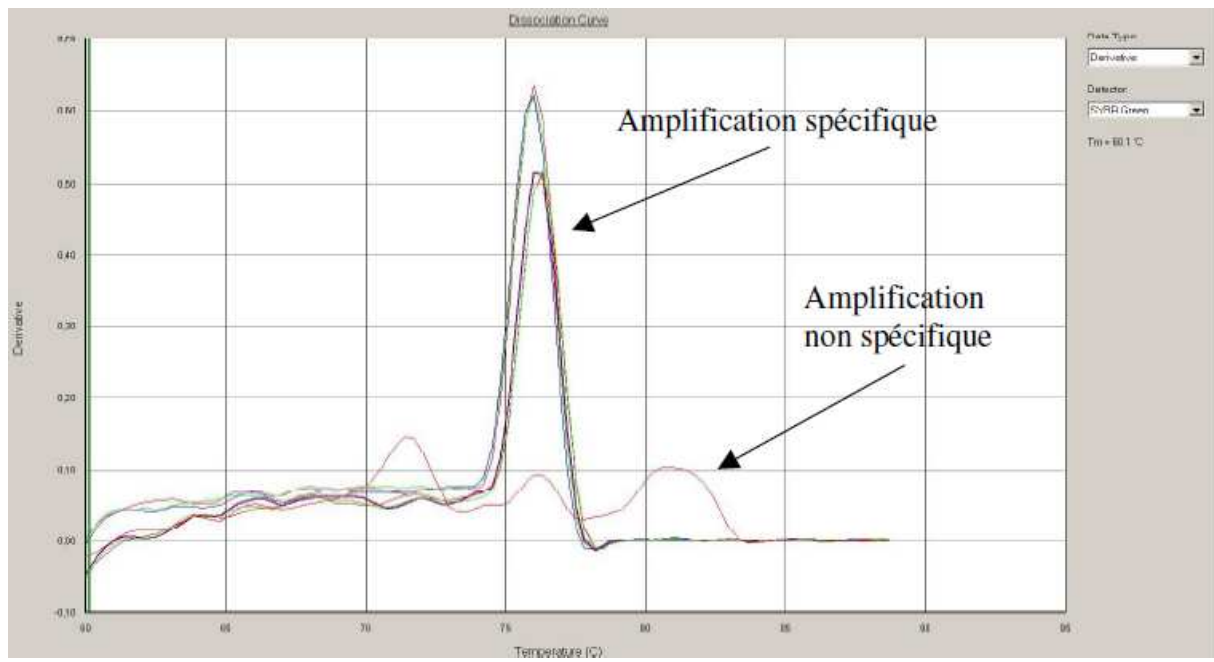


Figure 64. Courbe de dissociation

complémentaires respectives. La sonde doit se localiser entre les 2 amorces sur la région ciblée.

Lorsque l'enzyme synthétise un nouveau brin, la sonde est hydrolysée par l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase qui allonge le brin initié par l'amorce fixée; le reporter se retrouve alors libre en solution, permettant ainsi son émission de fluorescence, qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (**figure 65**). Cette technique possède comme avantage par rapport à la technique Sybr Green I d'être plus spécifique mais aussi d'avoir la capacité de multiplexage. La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible empêche l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (*primer-dimers*). Des réactions multiplexes peuvent être élaborées en utilisant des sondes avec fluorochromes à longueur d'onde d'émissions différentes, dans une même réaction de PCR.

III. Mise au point et optimisation des systèmes de détection, quantification et identification du LMV

Afin de quantifier l'accumulation virale dans les plantes, nous utilisons actuellement au laboratoire, une méthode qui n'est pas optimale car semi-quantitative, basée sur la technique ELISA.

Ces dernières années, de nombreuses publications ont mis en évidence l'optimisation de la RT-PCR quantitative pour la détection et la quantification des Potyvirus (Balme-Sinibaldi *et al.*, 2006, Lunello *et al.*, 2004). En collaboration avec Carole Couture au laboratoire, nous avons donc développé deux systèmes qui nous permettront de quantifier l'accumulation du LMV dans des plantes infectées. Le premier système développé avec la chimie SYBR Green nous permet de comparer et de quantifier l'accumulation des virus recombinants obtenus (hybrides entre LMV-0 et LMV-E) au sein des différents génotypes de laitue. Le deuxième système, développé avec la chimie TaqMan, permet de quantifier des isolats viraux en mélange dans une plante infectée. Trois isolats représentant la diversité biologique du LMV dont les clones infectieux sont disponibles au labo ont été utilisées pour développer cet outil : LMV-0, le LMV-E, et LMV-AF199 (un isolat de type « Most »).

L'analyse de l'alignement des séquences nucléotidique des trois isolats LMV-0, LMV-E et LMV-AF199 à l'aide du logiciel Beacon Designer 7.01 (*PREMIER Biosoft International*), nous a permis d'identifier une région nucléotidique où il est possible de positionner de façon

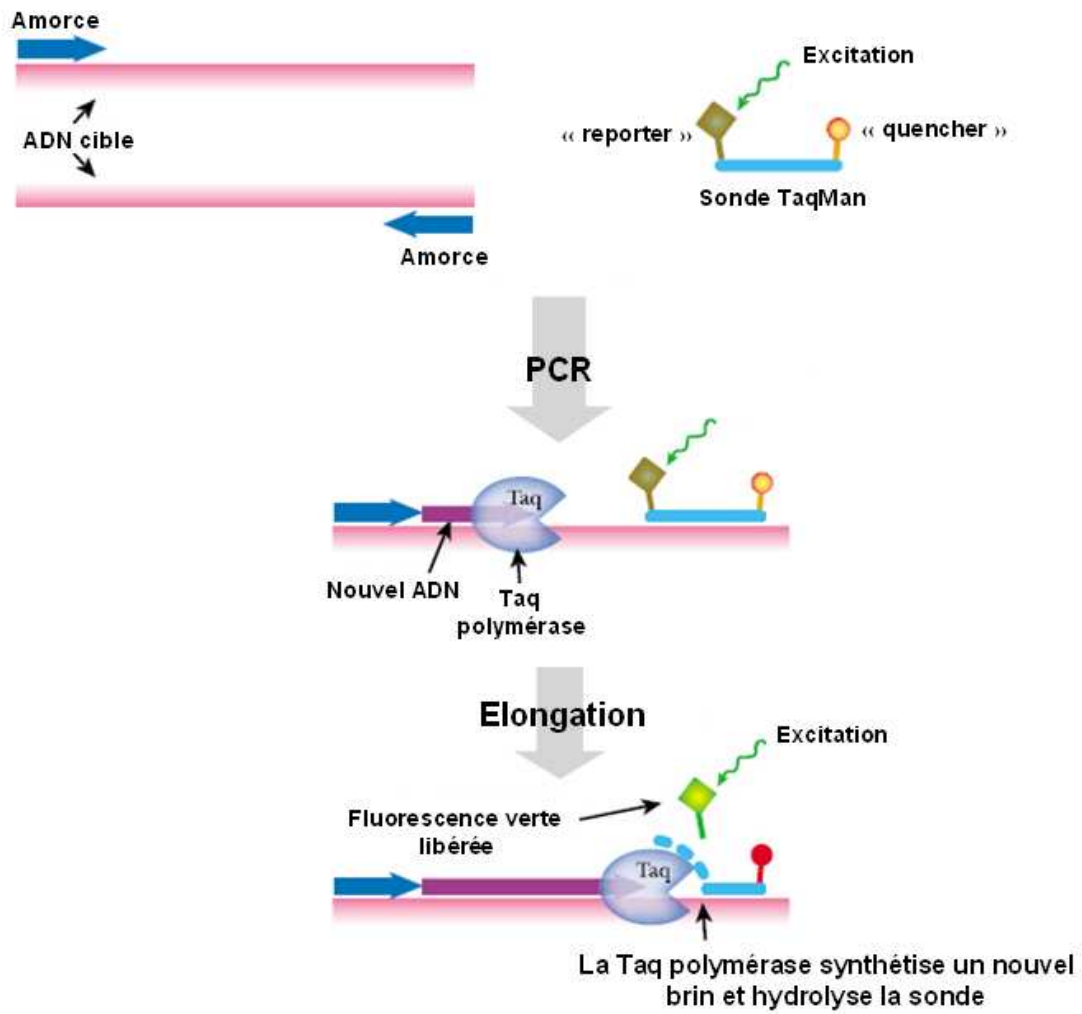


Figure 65. Principe de la PCR en temps réel avec une sonde TaqMan[®], "Reporter Quencher".

optimale un couple d'amorces commun aux trois isolats, ainsi que trois sondes spécifiques discriminant ces isolats, afin de mettre au point des réactions de QPCR permettant de tester le taux de multiplication d'isolats de LMV en mélange (**Figure 66**). Les séquences des amorces et des sondes utilisées sont listés dans le **tableau 25**.

Les amorces ont été sélectionnées pour contenir le minimum de structures secondaires, afin d'éviter la formation de dimères d'amorces susceptibles de gêner l'amplification. Un certain nombre de précautions ont été également prises concernant leur composition en acides nucléiques (éviter les répétitions d'un même nucléotide), leur température d'hybridation (la plus proche possible entre les deux amorces et supérieure à 57°C) ou encore la taille de l'amplicon obtenu par PCR (75-200 pb).

Les principes à respecter dans le design des sondes TaqMan comprennent comme règles générales : 1) une longueur de 20-40 nucléotides, 2) un contenu en G-C variant de 40- 60%, 3) aucune séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec les amorces et, 4) un Tm de 5 à 10°C plus élevé que les amorces afin de s'assurer qu'elles s'hybrident avant les amorces et qu'elles demeureront hybridées pendant l'étape combinée d'hybridation et de polymérisation (Bustin, 2000).

Les trois sondes ont été dessinées initialement avec la technologie Taqman classique, mais n'étant pas suffisamment spécifiques, Les sondes TaqMan « LMV-E » et « LMV-0 » ont été redessinées avec des bases LNA (*Locked Nucleic Acid*TM) pour augmenter leur spécificité au niveau des mésappariements. Les bases LNA sont modifiées au niveau du sucre, " bloqué ou verrouillé " de façon adaptative, ce qui leur donne une affinité d'hybridation incomparable pour l'ADN et l'ARN et assure ainsi une grande stabilité thermique à l'oligonucléotide, permettant la construction de très courtes sondes fluorescentes (8-11 nt), encore plus courtes que les sondes TaqMan MGB (Goldenberg *et al.*, 2005, Simeonov & Nikiforov, 2002).

III.1. Système de détection et quantification du LMV par Sybr Green I

Le système Sybr Green I a été dessiné à partir des amorces décrites dans le **tableau 25**. Ce système a été développé pour quantifier l'accumulation virale à partir d'ARN totaux de plantes infectées extrait par le kit Promega en utilisant un Kit qRT-PCR Sybr Green I (*ABsolute*TM *MAX QRT-PCR SYBR*[®] *Green mix*) (Thermo Scientific) en une seule étape. Ce système a permis l'amplification d'un fragment 169 pb de la région codant pour la CI du

LMV. Les conditions de réactions ainsi que le programme de RT-PCR utilisés sont listés dans les **tableaux 26 et 27**.

La spécificité du couple d'amorce pour la séquence cible à amplifier a été validée en vérifiant l'absence de formation de dimères d'amorce ou d'amplifications aspécifiques par observation de la courbe de fusion.

L'efficacité de la PCR (chimie SYBR GREEN) a été calculée et validée initialement en utilisant une gamme d'ADN plasmidique en dilution sériée (1, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ copies) ainsi qu'une gamme d'ADNc pour les trois cibles. En suite, l'efficacité de la QRT-PCR a été validée en utilisant une gamme étalon d'ARN des trois cibles.

En effet, L'efficacité de la PCR est une donnée importante. Aussi, en théorie, lorsque l'efficacité de la PCR durant la phase exponentielle de croissance est de 100%, à chaque cycle de PCR la quantité d'ADN cible est multipliée par deux. Aussi, plus l'efficacité relative diverge des 100% plus l'interprétation relative est difficile.

III.2. Système de détection et quantification simultanées de isolats du LMV par TaqMan[®]

Le but de développement de ce système est de pouvoir étudier la fitness des isolats de LMV en étudiant la compétition entre deux isolats dans le cas de co-infection dans les différents génotypes de laitue. Comme par exemple la compétition entre LMV-0 et LMV-E, LMV-0 et LMV-AF199 ou LMV-E et LMV-AF199.

Le système Taqman développé repose sur l'utilisation du couple d'amorce commun aux trois isolats ainsi que les trois sondes TaqMan spécifique décrits dans le **tableau 25**. Afin de normaliser les données obtenues dans ce système, nous avons choisi d'utiliser le gène de référence *Nad 5* de la laitue (Menzel *et al.*, 2002) pour lequel un couple d'amorces ainsi qu'une sonde TaqMan spécifique ont été dessinés (**tableau 28**).

Ce système a été développé pour quantifier l'accumulation virale à partir d'ARN totaux de plantes infectées extrait par le kit Promega en utilisant un Kit qRT-PCR TaqMan (*VersoTM 1-step QRT-PCR kit*) (Thermo Scientific) en une seule étape. Ce système a permis l'amplification d'un fragment 169 pb de la région CI. Les conditions de réactions ainsi que le programme de RT-PCR utilisés sont listés dans les **tableaux 29 et 30**. L'efficacité qRT-PCR

Réactifs	Concentration finale	Volume par puit (µL)
Max QRTPCR Sybr Green I (enzyme + tampon + dNTP)	1X	12,5
Eau milliQ (ultrapure)		5,125
Amorce sens Multi LMV4253sp	500 nM	0,5
Amorce antisens MultiLMV4422m	500 nM	0,5
Reverse it RTase Blend	0,12u/µl	0,125
QRTase Enhancer		1,25
Matrice (ARN totaux)		5
Volume final de la réaction		25µL

Tableau 26. Réactif pour la RT-PCR en temps réel du système de quantification du LMV.

Etape		Température	Durée	Répétition
RT	Synthèse d'ADNc	50°C	50 minutes	x 1
	inactivation de QRTase et activation de la Taq Polymérase	95°C	15 minutes	x 1
PCR	Denaturation	95°C	15 secondes	x 40
	Hybridation / d'élongation	60°C	30 secondes	
		70°C	10 minutes	x 1

Tableau 27. Programme de RT-PCR en temps réel du système de quantification du LMV.

Oligos	Séquence	Position	Polarité
Nad5 F	5' gatgcttctggggcttctgtt 3'	968	Amorce sens
Nad5 R	5' ctccagtcaccaacattggcataa 3'	1996	Amorce antisens
ProNad5 LNA	5'-(HEX)* AtaGccCgaCcgTagtgat (BHQ1)-3'	1841	Sonde sens

Tableau 28. Amorces et sonde du gène de référence Nad5 mises au point pour la quantification des isolats de LMV.

En minuscule sont indiquées les bases normales, et en majuscules, les bases LNA (*Locked Nucléique acid*).

* le fluorophore HEX est détecté avec le même filtre que le fluorophore Yakima_yellow. ainsi, les sondes LMV-AF199 et Nad5 ne peuvent pas être utilisés dans le même puit. en cas d'un test deuplex contenant la cible LMV-AF199, l'amplification du gène de référence doit se faire dans un puit séparé.

et la spécificité des sondes TaqMan LMV-0, LMV-E LNA et LMV-AF199 LNA ont été testées et validées sur les plasmides de référence, ainsi que sur les ARN des trois cibles en qPCR « simplex » et « multiplex ».

III.3. Validation des tests développés

Que se soit pour le test en SYBR Green ou le test en Taqman, ces résultats restent préliminaires et doivent être complétés par une validation sur un plus grand nombre d'échantillons. Nous pourrions ainsi confirmer les valeurs d'efficacité (simplex/duplex), de spécificité, de reproductibilité et de sensibilités, précédemment obtenues mais non citées dans le texte.

Réactifs	Concentration finale	Volume par puit (µL)
Max QRTPCR TaqMan (enzyme + tampon + dNTP)	1X	12,5
Eau milliQ (ultrapure)		2,625
Amorce sens MultiLMV4253sp	500 nM	0,5
Amorce antisens MultiLMV4422m	500 nM	0,5
Amorce sens du gène de référence Nad5F	500 nM	0,5
Amorce antisens du gène de référence Nad5R	500 nM	0,5
Sonde première cible	200nM	0,5
Sonde deuxième cible	200nM	0,5
Sonde Nad5	200nM	0,5
Reverse it RTase Blend	0,12u/µl	0,125
QRTase Enhancer		1,25
Matrice (ARN totaux)		5
Volume final de la réaction		25µL

Tableau 29. Réactif pour la RT-PCR en temps réel du système de quantification simultanée se deux isolats du LMV.

Etape	Température	Durée	Répétition	
RT	Synthèse d'ADNc	50°C	50 minutes	x 1
	inactivation de QRTase et activation de la Taq Polymérase	95°C	15 minutes	x 1
PCR	Denaturation	95°C	15 secondes	x 40
	Hybridation / d'élongation	60°C	30 secondes	
		70°C	10 minutes	

Tableau 30. Programme de RT-PCR en temps réel du système de quantification simultanée de deux isolats du LMV.

Annexe 2

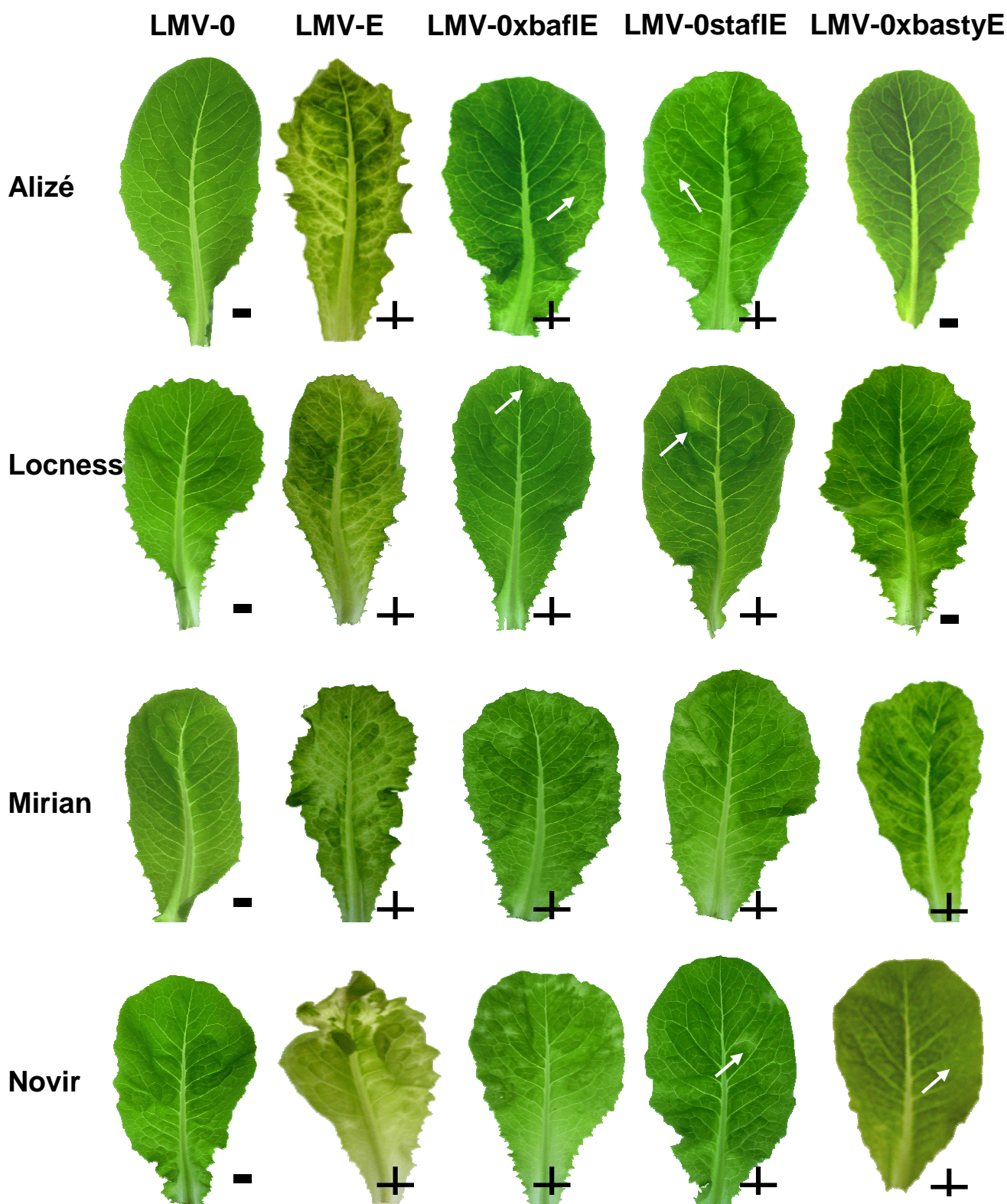


Figure 67. Symptômes des clones recombinants du LMV sur des variétés résistantes *mo1^l*. Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur plantes d'Alizé, Locness, Mirian, Novir (variétés exprimant *Ls-eIF4E^l*) infectés par le LMV-0, le LMV-E et les différents virus recombinants : LMV-0xbafIE, LMV-0stafIE, LMV-0xbastyE. Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus. Les flèches blanches montrent les symptômes du LMV quand ils ne sont pas évidents sur la photographie.

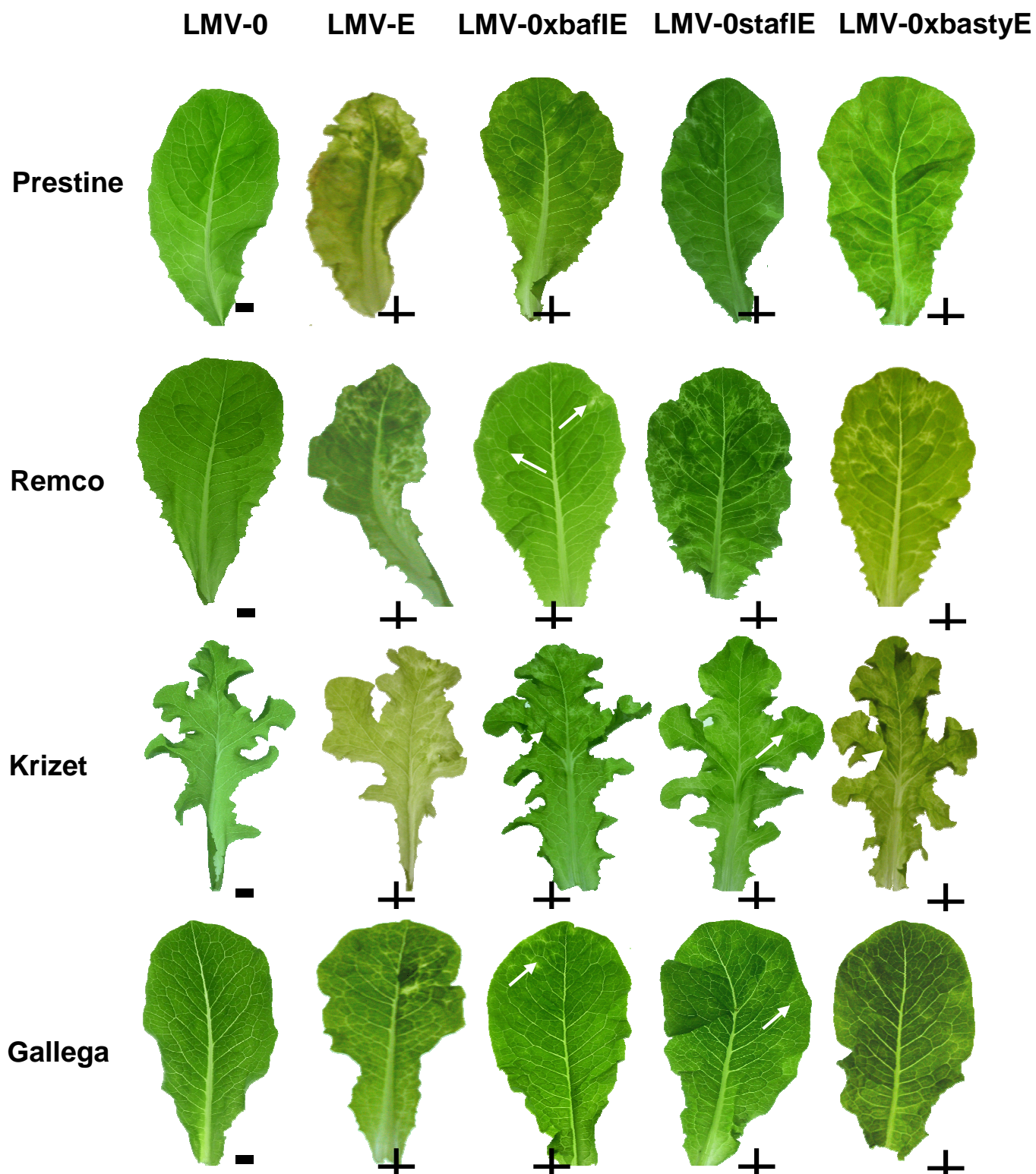


Figure 68. Symptômes des clones recombinants du LMV sur des variétés résistantes *mo1^l*. Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur plantes Prestine, Remco, Krizet, Gallega (variétés exprimant *Ls-eIF4E^l*) infectés par le LMV-0, le LMV-E et les différents virus recombinants : LMV-0xbafIE, LMV-0stafIE, LMV-0xbastyE. Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus. Les flèches blanches montrent les symptômes du LMV quand ils ne sont pas évidents sur la photographie.

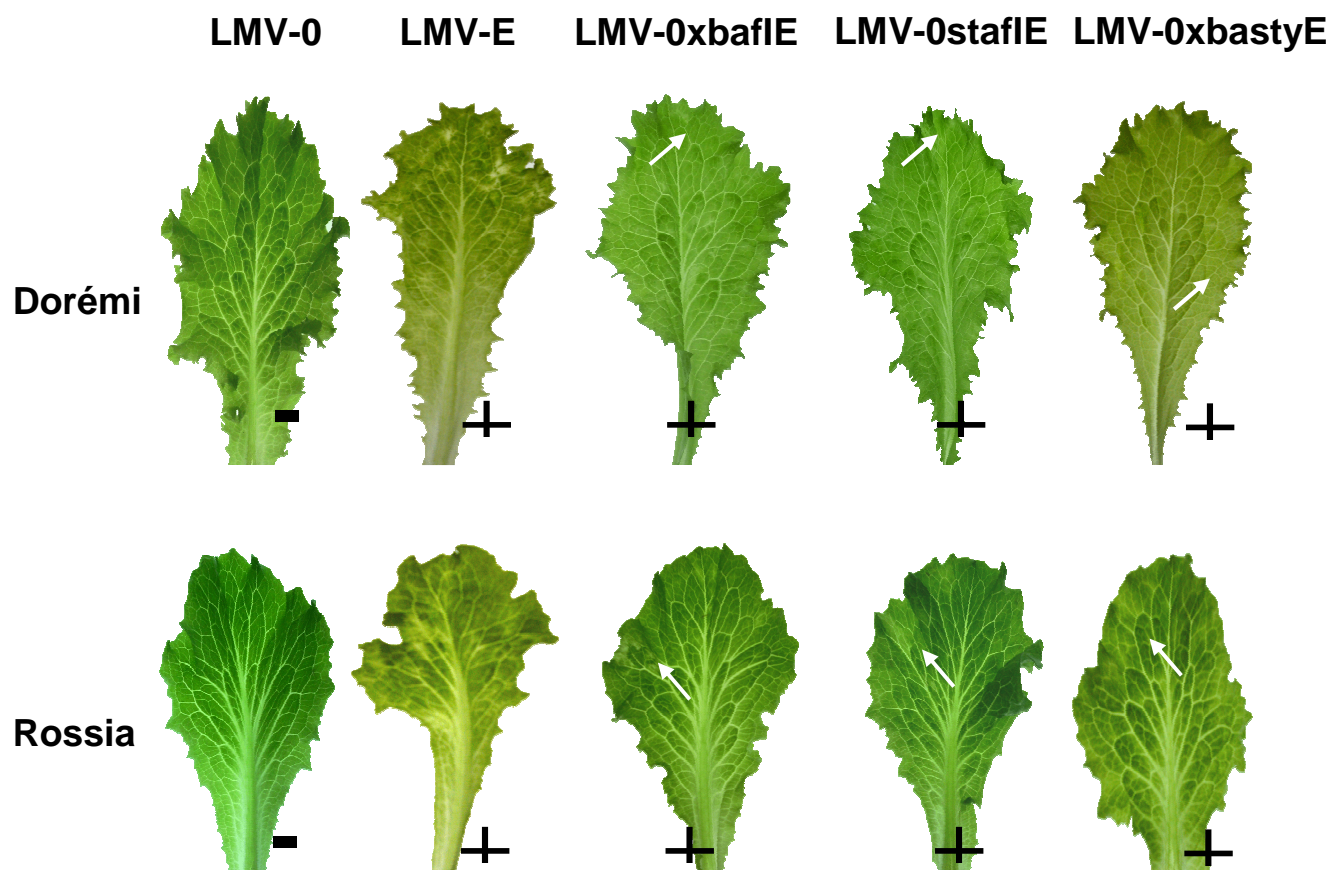


Figure 69. Symptômes des clones recombinants du LMV sur des variétés résistantes *mo1*¹. Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur plantes Dorémi, et Rossia (variétés exprimant *Ls-eIF4E*¹) infectés par le LMV-0, le LMV-E et les différents virus recombinants : LMV-0xbafIE, LMV-0stafIE, LMV-0xbastyE. Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus. Les flèches blanches montrent les symptômes du LMV quand ils ne sont pas évidents sur la photographie.

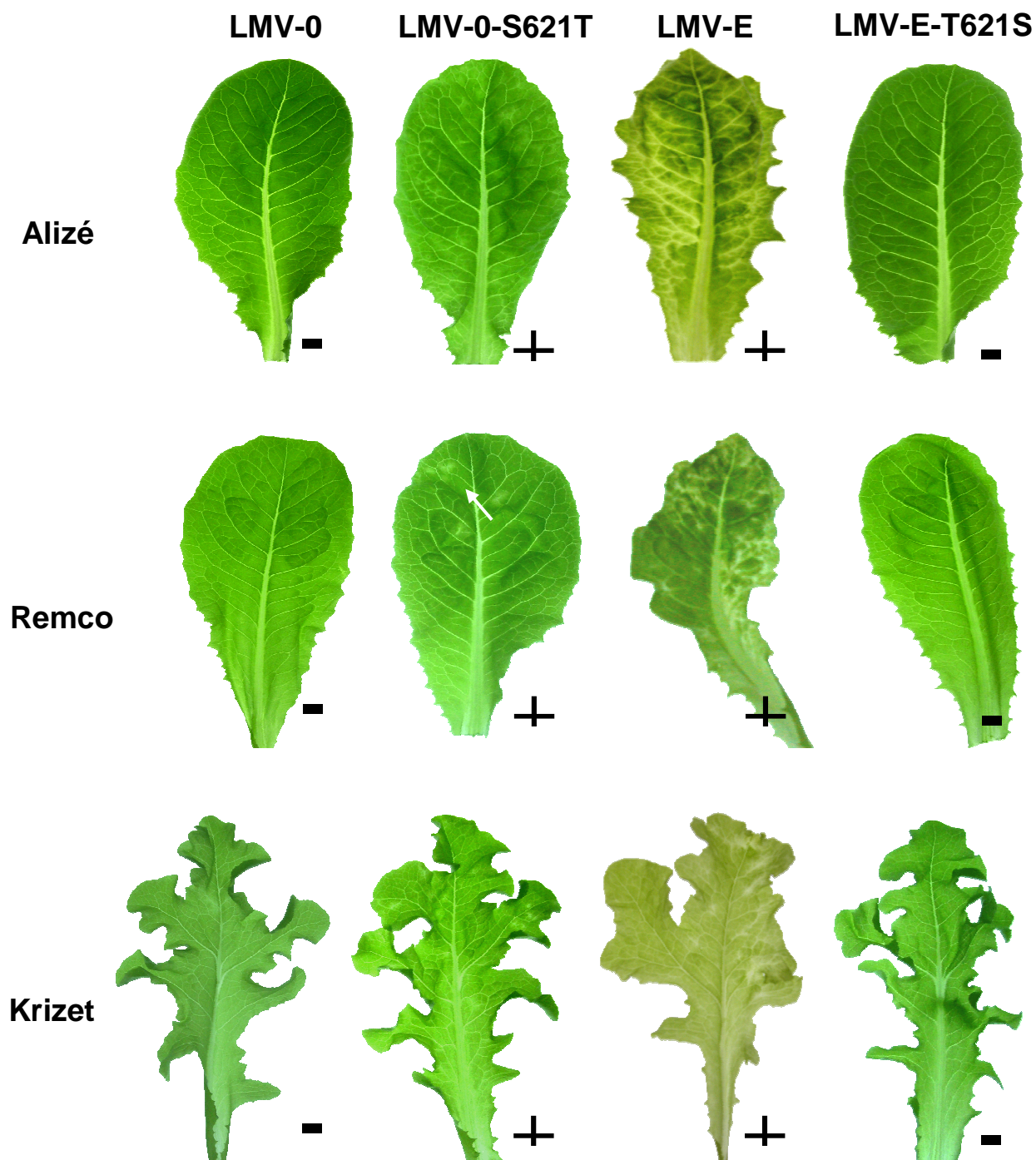


Figure 70. Symptômes des virus mutants du LMV sur les variétés résistantes Alizé, Remco et Krizet.

Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur plantes Alizé, Remco, et Krizet (variétés exprimant *Ls-eIF4E^l*) infectés par le LMV-0, le LMV-E et les deux virus mutants : LMV-0-S621T et LMV-E-T621S. Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus. Les flèches blanches montrent les symptômes du LMV quand ils ne sont pas évidents sur la photographie.

Annexe 3

LMV-0	F	Q	S	F	K	D	G	M	A	D	A	V	R	H	Q//G	K	G	K	R	Q	R	Q	K	L	R	Y	R	Q	A	R	D	N	K	V	G	I	E	V	Y						
AF198	I	///		
Dg	///		
Tn2	///		
A435	///		
CL117	.	.	.	N	///		
CL248	.	.	.	N	///		
CL427	///	
LMV-9	///	
LMV-1	V	I	///	
Cordoue	V	I	///	
LMV-E	V	I	///
C12	///
AF199	///
LMV-13	I	///
Tn4	///
CL464	///
CL480	///

40 2010 50 20206K2//VPg 30 2030 10 2040 20

LMV-0	G	D	D	A	T	M	E	H	Y	F	G	A	A	Y	T	E	K	G	K	K	S	G	K	T	K	G	M	G	T	K	N	R	R	F	V	N	M	Y	G	Y					
AF198
Dg
Tn2
CL117
CL248	
CL427	
LMV-9	
LMV-1	
Cordoue	
LMV-E	
C12	
AF199	
LMV-13	
Tn4	
CL464	
CL480	

VPg 2050 30 2060 40 2070 50 2080 60

LMV-0	N	P	E	D	F	S	F	I	R	F	L	D	P	L	T	G	K	T	M	D	E	Q	V	F	D	I	L	V	Q	D	A	F	K	E	R	L	K							
AF198
Dg
Tn2
CL117	
CL248	
CL427	
LMV-9	Y	
LMV-1	Y		
LMV-E	Y		
C12	Y		
AF199		
LMV-13		
Tn4		
CL464	Y		
CL480	Y		

VPg 2090 70 2100 80 2110 90 2120 100

