L'Etude Fonctionnelle des Enzymes RTLs chez les plantes Nahid SHAMANDI

Introduction:

L'ARN interférence (ou RNA silencing)

Dans les noyaux des cellules pendant l'expression des gènes, l'ADN est transcrit en ARN, qui est ensuite exporté vers le cytoplasme où il est traduit en protéines. Cependant au cours du RNA silencing ou ARN interférence (ARNi), les molécules d'ARN peuvent inhiber l'expression des gènes, au niveau transcriptionnel (TGS) via les modifications de chromatine ou au niveau post-transcriptionnel (PTGS) par la dégradation des ARN messagers ou l'inhibition de leur traduction (Ghildiyal and Zamore, 2009; Lee et al., 2010). Ces deux événements sont les résultats de l'action de complexes ribonucléoprotéiques appelés *RNA induced silencing complexes* (RISC).

En 1990, Napoli et al ont été les premiers chercheurs à décrire un phénomène de cosuppression d'un transgène et du gènes endogène homologue chez les plantes de pétunia. Pour produire des nouvelles variétés de pétunia avec des pétales violets foncés, Napoli et al. ont cloné le gène de pétunia pour Chalcone Synthase (CHS) sous le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). CHS est un facteur clé dans la biosynthèse des flavonoïdes pendant la pigmentation des fleurs de pétunia. L'introduction de 35S :: CHS chez les plantes pétunia a abouti à une réduction inattendue de la pigmentation floral due à la cosuppression du transgène 35S :: CHS et des gènes CHS endogènes (Napoli et al., 1990).

En 1998, Fire et Mello, ont suggéré que l'ARN doubles brin, et pas l'ARN simple brin était le déclencheur de l'ARNi (Fire et al., 1998). Bien que Fire et Mello aient fourni la première explication pour les observations paradoxales précédentes, les mécanismes par lesquels l'ARN double brin pourrait causer la dégradation de l'ARN messager endogène sont restés incertains.

En 1999, Hamilton et Baulcombe ont réussi à détecter la présence des séquences courtes d'ARN chez les plantes portant des transgènes silencés par PTGS. Ils ont conclu que ces petits ARN étaient assez longs pour d'apparier aux séquences spécifiques de l'ARNm et encore assez petits pour se déplacer à travers des plasmodesmes, ce qui en fait les candidats idéaux pour les signaux systémiques de l'ARNi (Hamilton and Baulcombe, 1999).

Peu de temps après, des ARNs de 21 à 23nt ont été co-purifiés avec l'ARNi dans les cellules de Drosophile, suggérant que les longs ARN double brin ont été convertis en court intermédiaires - petits ARN interférents (siRNA) - qui peuvent se lier à leurs ARN messager cibles homologues et provoquer leur clivage (Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000).

En 2001, Bersntein et al. ont découvert Dicer, l'enzyme qui est capable de couper les longs ARNs double brin et de produire en conséquence les petits duplex de siRNA.

Cependant, ces petites séquences d'ARNs ne sont pas suffisantes pour l'ensemble du processus de l'ARN interférence, elles ont besoin d'autres co-facteurs pour livrer leurs messages silencieux.

En 2002, Martinez et al. ont purifié des petits ARNs avec leurs complexes protéiques associés et ils ont identifié une protéine ribonucléase qu'ils ont appelée Argonaute en référence à une protéine similaire identifiée chez Arabidopsis.

En fait, il était déjà connu que la protéine d'Argonaute d'Arabidopsis interférait avec les voies ARNi (Fagard et al, 2000), mais Martinez et al. étaient les premières à montrer qu'elle était le co-facteur clé dans les mécanismes d'ARNi.

Depuis, des siRNAs ont été identifiés dans chaque royaume eucaryote à l'exception notable de Sacharomyces cerevisiae (Drinnenberg et al., 2009). Leurs rôles crucials dans différentes voies sont devenus de plus en plus clairs. Beaucoup des facteurs et des enzymes associées à l'ARNi ont été découverts.

Les séquences d'ARNs non codantes, de 20 à 30 nucléotides (nt) en longueur, jouent des rôles centraux dans les voies d'ARNi (Baulcombe, 2004; Ghildiyal and Zamore, 2009; Mello and Conte, 2004). Différentes classes de petits ARNs ont été trouvées chez les eucaryotes qui peuvent reconnaître l'ARNm cible par des interactions de pair de bases, et qui diffèrent par leur taille, leur origine et leur biogenèse (Castel and Martienssen, 2013).

Il existe deux classes major des petits ARNs chez les plantes: Les micro ARN (miRNA) et les short interfering ARNs (siRNAs).

Les miRNAs sont les résultats des gènes spécifiques non codants, appelés MIR. Ces gènes sont transcrits par l'action de POL II et les ARN simple-brin adoptent une structure caractéristique de tige-boucle. Chez les plantes, la conversion des pré-micro ARNs en micro ARNs matures est catalysée par DCL1.

La deuxième catégorie des petits ARNs, les siRNAs, constitue la majorité de la population des petits ARNs chez les plantes et peuvent subdiviser en quatre sous-classes : ta-siRNA, nat-siRNAs, endoIR siRNAs et p4/p5 siRNAs.

Les ta-siRNAs sont aussi les résultats des gènes non-codants TAS, qui sont transcrits par Pol II. En fait, les transcrits TAS contiennent un site de liaison spécifique à un miARN et peuvent donc être reconnus et coupés par un complexe miRNA/AGO. Les RNA TAS simple brins clivés par complexe RISC, sont utilisés par 1'ARN Polymérase ARN Dépendente 6 (RDR6) pour générer un ARN double brin (ARNdb). Ces ARN double brin sont reconnus par DCL4, qui les coupe en duplex de 21-nt de ta-siARN. Cette action de DCL4 nécessite la présence de *Double Stranded Binding protein 4* (DRB4). Les microRNAs et les ta-siRNAs fonctionnent principalement dans les voies de développement.

Les nat-siRNAs dérivent des transcriptions convergentes de deux gènes chevauchants. Les nat-siRNAs semblent d'être importantes au cours de l'adaptation des plantes à des stress biotiques (par ex. en réponse à l'infection par Pseudomonas syringae) ou abiotiques (par ex. en réponse au stress salin).

Le troisième groupe, les endoIR-siRNA, sont dérivées des locus correspondant aux séquences répétitives inversées (IR) de différentes tailles. Au cours de leurs transcriptions, ils peuvent naturellement se replier et produire des longs ARNs double brin. DCL2, DCL3 et DCL4 peuvent cliver ces ARNdb et produire des endoIR-siRNA de différente tailles. L'évolution, la génétique et les rôles biologiques des endoIR-siRNAs restent relativement inexplorés, mais il a été proposé que leurs voies puissent avoir des implications importantes en adaptation aux stresses, l'épiallelisme et la mémoire épigénétique.

L'ensemble de ces trois premières sous-classes de petits ARN plus des miRNAs sont capables de contrôler l'expression de leurs gènes cibles au niveau post-transcriptionnel (PTGS).

La dernière sous-classe de siRNAs correspond aux p4/p5 siRNAs de 24-nt. Pol IV est nécessaire pour la transcription des locus génomiques spécifiques. Les RNAs simples brins (ssRNAs) résultats, sont transformés aux ARNs doubles brins par l'action de RDR2. DCL3 ensuite découpe ces ARNs doubles brins en duplex de 24-nt siRNAs. Ces 24-nt siRNAs et ceux des endoIR-siRNA qui sont produites par DCL3 sont capables de contrôler l'expression de leurs gènes cibles au niveau transcriptionnel (TGS).

La famille des RNaseIII

Malgré de nombreuses différences dans leur biogénèse la plupart des petits ARNs sont produits final de synthèse des molécules d'ARNs parfaitement ou imparfaitement double brin. Ces molécules d'ARNs ont clivées spécifiquement par DICER ou DICER-LIKE (DCL) protéines qui appartiennent à la famille de dsARNs spécifiques RNase III endoribonucleases (Chapman and Carrington, 2007; Ghildiyal and Zamore, 2009). Les enzymes RNaseIII, sont trouvées chez tous les eucaryotes et les bactéries. Tous les membres de la famille de la RNase III sont caractérisés par une série hautement conservée de neuf résidus d'acides aminés, appelée signature motif des RNaseIII(Comella et al., 2008). Les enzymes RNaseIII ont une longueur d'environ de 200 à 2000 résidus en fonction du nombre de domaines supplémentaires qu'elles contiennent. En conséquence, elles sont divisées en quatre catégories en fonction de leurs poids moléculaire et de la complexité structurelle (Filippov et al., 2000).

La Classe I a un seul domaine RNase III et un seul domaine de dsRNA binding (DRB)(Kharrat et al., 1995). Les enzymes de cette classe sont trouvées chez les bactéries et les virus. Les RNase III d'*Escherichia coli* et d'*Aquifex aeolicus* sont des enzymes représentatifs de cette classe.

La classe II diffère de la classe I par la présence d'une extension du domaine N-terminal très variable d'environ 200 résidus d'acides aminés. L'enzyme Rnt1de Saccharomyces cerevisiae

et PAC1 de *S.pombe* sont tous les deux les membres de la classe II (Lamontagne et al., 2004; Rotondo et al., 1997; Wu et al., 2004).

La Classe III contient deux domaines RNase III, un domaine de DRB et une grande extension N-terminale. Drosha, qui traite pri-miARN chez les animaux, est un membre de cette classe (Du et al., 2008).

La classe IV est la classe la plus grande et structurellement la plus compliquée. Elle correspond aux enzymes Dicer. Elles contiennent généralement deux domaines RNase III, un ou deux domaines de DRB, un domaine PAZ, un domaine d'ARN hélicase et un domaine avec la fonction inconnue (DUF283).

Le génome d'Arabidopsis code quatre Dicer-Like (DCL) protéines ayant des fonctions connues. DCL1 produit micro ARN à partir d'une tige-boucle doubles brins imparfaits qui est résultat de MIR gènes (Park et al., 2005). DCL2, DCL3 et DCL4 traitent les précurseurs longs d'ARN double brin presque parfait pour générer les siRNA ou les jeunes miARN. Les p4/p5-siRNAs 24 nt sont dérivées de l'action de DCL3 (Daxinger et al., 2009). DCL4 produit 21-nt miRNA jeune, ta-siARN et virus-siRNAs au cours des infections virales (Bouche et al., 2006; Gasciolli et al., 2005). DCL2 produit les 22 endoIR-siRNAs et peut remplacer DCL4 et DCL3 en leurs absences (Bozorov et al., 2012; Deleris et al., 2006; Dunoyer et al., 2010).

A côté des quatre protéines DCLs, le génome d'Arabidopsis code potentiellement cinq protéines de RNASE THREE LIKE (RTL), qui n'ont pas encore été bien étudiées.

RTL1 ne contient qu'un seul domaine de RNase III et un domaine de DRB. RTL1 n'est exprimé que dans les racines d'Arabidopsis à des niveaux très faibles, et sa fonction est inconnue.

RTL2 contient un domaine RNaseIII et deux domaines de DRB et est exprimé de manière ubiquitaire dans toutes les tissues. RTL2 clive le *3'External Transcrit Spacer* (EST) de 45S-pré-ARNr ribosomal *in vitro* et *in vivo* (Comella et al., 2008). Un essai *in vitro* a révélé que RTL2 traite l'ARN double brin en 21-25-nt siRNAs (Kiyota et al., 2011). Les mutants *rtl2* ne présentent pas de défauts développementaux évidents (Comella et al., 2008).

RTL3 est le plus grand membre de la famille RTL avec deux domaines RNase III et trois domaines DRB. L'ARNm de RTL3 n'a été détecté dans aucune des tissus testés (Comella et al., 2008).

RTL 4 contient un seul domaine RNaseIII mais pas de domaine DRB, qui ressemble à la structure de Mini-III de *Bacillus subtilis* (Redko et al., 2008). RTL4 est exprimée dans presque tous les tissus. Les mutants *rtl4* sont altérés dans la formation des gaméthophytes males et femelles, mais la fonction de RTL4 reste toujours incertaine (Portereiko et al., 2006).

RTL 5 contient également un seul domaine RNaseIII mais aucun de domaine DRB. RTL 5 est exprimée dans presque tous les tissues. Elle est similaire à l'enzyme RNC1 du maïs, qui mature plusieurs groupes des introns chloroplastique II (Watkins et al., 2007).

Les RTLs ont des structures plus simples que celles de DCLs, et ils sont plus proches des enzymes RNaseIII qui existent chez les bactéries, les virus ou les champignons. Plus précisément, leur structure est très proche de celle de Dicer de *S. castelli* qui a qu'un domaine RNAseIII et deux domaines de DRBs et qui a récemment été montré à produire 22 - à 23-nt ARN à partir de précurseurs d'ARN double brin.

Compte tenu de leurs similitudes avec Dicer de *S.castelli*, on peut supposer que certains RTLs mature des long ARNdb et modulent la production de certains petits ARNs

Le but de ce travail de thèse était d'élargir notre compréhension des fonctions de RTL1 et d'éclairer son interaction potentielle dans les voies des petites d'ARNs chez les plantes.

Résultats

Les plantes sur-exprimant RTL1 n'accumulent pas les siRNA

Pour mieux comprendre la fonction biochimique et les rôles biologiques de RTL1, le répertoire des petits ARNs des plantes d'Arabidopsis surexprimantes RTL1 a été comparé à celui de plantes de type sauvage (WT). Lers plantes sur-exprimant RTL1 (35S::RTL1) présentent des défauts de développement. Elles restent naines, ont des feuilles jaunes, fleurissent tardivement et sont généralement peu fertiles. Toutes les plantes de la descendance portantes le transgène 35S::RTL1 présentent ces défauts développementaux alors que les fratries qui avaient ségrégaé le transgène ressemblaient aux plantes WT, indiquant que ces défauts développementaux sont directement causés par le transgène 35S::RTL1.

La distribution des ARN de 21 - , 22 - , 23 - et 24 -nt correspondant au génome d'Arabidopsis a été examinée (à l'exclusion des ARN derivés de l'ARNt et l'ARNr). L'analyse des plantes 35S::RTL1 utilisées pour le séquençage, a montré que les niveaux de miRNAs conservés étaient inchangées entre les plantes 35S::RTL1 et les plantes WT , alors que les niveaux de tasiRNA, nat-siRNA et p4/p5 - siRNA étaient fortement réduits .Cette distribution pour les plantes 35S::RTL1 ressemblait à celle du triple mutant *dcl2 dcl3 dcl4*.

RTL1 inhibe le PTGS

Étant donné la capacité de RTL1 pour inhiber l'accumulation de siRNAs endogènes, nous avons examiné si la surexpression de RTL1 pourrait également toucher les siRNA dérivés d'un transgene. À cette fin, un transgène 35S::GU-UG exprimant une séquence inversée répétée de la partie 5 'de la séquence de gène rapporteur GUS (GU) a été introduit de manière transitoire dans les plantes *Nicotiana benthamiana* soit avec un 35S:: RTL1 ou avec un

contrôle 35S: : GFP. Comme prévu, les feuilles infiltrées avec 35S::GU-UG + 35S::GFP accumulent en hauts niveaux des GU-siRNAs de 21 - et 24-nt, alors que les feuilles infiltrées avec 35S :: GU-UG + 35S :: RTL1 n'ont pas accumulé des niveaux détectables de GU siRNAs, indiquant que RTL1 empêche l'accumulation de siRNAs dérivants d'une séquence inversée répétée transgènique.

L'inhibition de transgene de PTGS méditée par RTL1 a été confirmée dans la lignée d'Arabidopsis L1. La lignée L1 est une lignée classiquement utilisée pour étudier le PTGS chez Arabidopsis. En fait, une lignée L1 porte un transgène 35S::GUS qui provoque une forte accumulation de 21-nt GUS siRNA. Cela conduit à la suppression de l'ARNm GUS et de l'activité GUS par conséquent. Les plantes L1 transformées avec 35S:: RTL1 n'accumulent pas de GUS siRNA. Comme il n'y a plus de siRNA, il n'y a donc pas de PTGS, et par conséquent on peut détecter l'activité GUS chez les plantes L1/35S::RTL1.

L'activité de RTL1 nécessite des domaines RNaseIII et DRB fonctionnels

Pour définir la fonction de RTL1, on a généré un RTL1 muté dans le domaine de RNaseIII. L'idée était de voir si RTL1 conserve son effet négatif sur l'accumulation de siRNAs. On a muté deux acides aminés conservés du domaine RNase III de RTL1 (RTL1mR3). Les études précédentes chez Aquafix ont montrées que la mutation de ces deux acides aminés peut endommager l'activité de RNaseIII.

Les résultats de l'agro-infiltration dans les feuilles de *N. bentamiana* montrent que lorsque qu'on mute le domaine RNase III de RTL1, on ne bloque pas la production de GUS siRNA. Cela signifie que l'action du domaine RNase III est essentielle pour l'effet inhibiteur de RTL1 sur l'accumulation de siRNAs.

Ces résultats ont été vérifiés chez les plantes L1. On a observé que les plantes L1 avec surexpression de RTL1 avaient une réduction significative de TAS2 tandis que dans les plantes surexprimant RTL1mR3 on a le même profil que les plantes WT. On a ensuite mesuré l'activité d'enzymatique GUS. Alors que chez les plantes L1/35S ::RTL1, on peut détecter une activité GUS, les plantes L1/35S ::RTL1mR3 on n'a pas d'activité GUS, ce qui signifie que le PTGS n'a pas été affecté.

Donc nous pouvons dire que le domaine RNase III est essentiel pour l'action de RTL1.

On a également produit une protéine RTL1 qui contenait un domaine RNase III intact mais pas de domaine DRB. Une fois qu'on a plus de domaine de DRB on perd l'effet inhibiteur de RTL1 sur l'accumulation des siRNAs, suggérant que le domaine DRB est essentiel pour l'activité inhibitrice de RTL1

RTL1 affecte les longs ARNs doubles brins

Pour trouver où RTL1 agit sur la voie de synthèse des siRNAs, on a utilisé l'analyses de Northern pour regarder le niveau d'accumulation des ARN précurseurs de l'IRI71 chez les plantes Col et les mutants *dcl234* en présence ou en absence de 35S ::RTL1.

Les résultats montrent que chez les plantes Col sans RTL1, les précurseurs IR71 sont coupées par différents DCLs, et il n'y a pas donc d'accumulation détectable de ces précurseurs. Chez les plantes Col avec surexpression de RTL1 aussi, il n'y a pas de bande correspondant à précurseur d'IR 71. Si RTL1 avait un effet inhibiteur sur les activités de DCL, chez les Col avec surexpression de RTL1 on devrait être en mesure de voir une bande correspondant à précurseur d'IR 71 ce qui n'était pas le cas et donc RTL1 n'interfère pas avec les activités de DCLs. Ensuite on a regardé le niveau des précurseurs d'IR71 chez triple mutant *dcl234* avec ou sans surexpression de RTL1. Comme prévu dans le contrôle mutant234 triple on pouvait détecter une bande correspondant à précurseurs IR71, alors que chez *dcl234* avec surexpression de RTL1 nous ne pouvons pas le voir, suggérant que RTL1 clive le précurseur de l'IR71.

On a fait une série des analyses *in vitro* en collaboration avec nos partenaires du LGDP à Perpignan. Lorsque RTL1 est incubé avec le précurseur d'IR 71 double brin *in vitro*, RTL1 est capable de les couper et les rende indétectables. Mais lorsqu'on incube RTL1 avec le même substrat qui est dénaturé et donc est simple brin, il n'est pas en mesure de le couper. Tous ensembles, il parait que RTL1 peut couper les longs précurseurs doubles brins et inhiber leur accumulation.

Il est également possible que RTL1 peut affecter les duplex finals puisque les siRNAs dérivants de milliers de locus, sont absents quand RTL1 est surexprimé. Cependant, malgré toutes les diminutions des populations de différents siRNA, il y a quelques-unes (MIR3440b, MIR862a, MIR839a, MIR828a, At2g33255 and At4g26255), qui sont très accumulé chez les plantes 35S:: RTL1. Si l'effet inhibiteur du RTL1 était par dégradation des petits duplex de siRNAs on ne devrait pas voir un tel effet stimulant dans certains locus. Il est donc peu probable que RTL1 agit sur les petits duplex.

Rôle biologique de RTL1

Bien qu'on ait établi l'existence d'une vraie activité de RNaseIII pour RTL1, ses rôles biologiques restent inexpliqués. Sous les conditions standards de croissance en serre, RTL1 est très peu exprimé dans les racines des plantes Arabidopsis et pas du tout dans les feuilles. Nous avons donc recherché si RTL1 est exprimé dans les feuilles dans certaines conditions, en particulier au cours des infections virales. En effet, lorsque les virus avec les génomes d'ARN se propagent dans leurs cellules hôtes, ils produisent habituellement un long ARN double brin qui est coupé par DCL4 ou DCL2, résultant en la production des vsiRNA primaires. Ces vsiRNAs peuvent guider le complexe RISC à l'ARN viral, ce qui conduit à la dégradation de l'ARN viral. En même temps, SGS3 et RDR6 peuvent utiliser ces ARN clivés et les transformer en l'ARN double brin qui conduit à la production de vsiRNAs secondaires. Ceux-ci renforceront les voies de PTGS contre les virus. Sachant que RTL1 inhibe

l'accumulation de siRNA on se demande s'il interfère pendant les infections virales. Si oui, son expression doit être induite via une infection virale.

Pour tester cette hypothèse, on a inoculé des plantes de Col WT et Col/35S ::RTL1 avec deux virus différents: turnip crinkle virus (TCV) and turnip yellow mosaic virus (TYMV). On a ensuite testé le niveau de RTL1mRNA chez Col WT trois semaines après l'inoculation avec ces virus. Les résultats de RT PCR montrent que suite à l'inoculation, ARNm de RTL1 s'accumulent dans les feuilles des plantes infectées alors qu'il était indétectable dans les contrôles. Cela indiquerait que l'expression RTL1 est généralement induite en réponse à une infection virale et ça étaye notre hypothèse d'un rôle RTL1 au cours de l'infection virale.

En même temps on avait des diffèrent niveaux des symptômes chez les plantes infectées. Les plantes Col WT et Col/35S ::RTL1 infecté avec TCV avaient même niveau de chlorose et nécrose de leurs feuilles. Par contre, la surexpression de RTL1 provoque une forte aggravation des symptômes chez les plantes infectées avec TYMV, tandis que les plantes de Col WT ont montré que des symptômes très légers.

On a détecté l'accumulation de l'ARN viral dans les plantes infectées et observée une bonne corrélation entre les niveau d'ARN viral et les symptomes. On a ensuite regardé le niveau d'accumulation de vsiRNAs. Les TYMV vsiRNAs accumulent dans les feuilles des plantes Col WT infectée, mais ils étaient indétectables chez les Col/35S ::RTL1 inoculés avec TYMV. Cela signifie que RTL1 empêche l'accumulation de TYMV vsiRNA aussi efficacement qu'il empêche l'accumulation d'autres siRNAs transgéniques et en conséquence il compromise la défenses PTGS contre TYMV chez Col/35S ::RTL1. C'est pourquoi les plantes 35S::RTL1, présentaient des symptômes graves de l'infection virale. Par contre, les siRNA dérivés de TCV s'accumulent à des niveaux similaires chez Col WT et Col/35S ::RTL1, comme si RTL1 était incapable d'agir sur eux. Ces résultats indiquent que les virus induisent l'expression de RTL1, mais que certains d'entre eux, comme le TCV, ont la capacité d'inhiber l'activité de RTL1.

Pour tester cette hypothèse, on a comparé les niveaux d'accumulation de TAS2-siRNA endogènes chez les plantes infectées avec les virus. Les résultats de Northorn blot montrent que les TAS2-siRNAs accumulent chez Col WT et Col /35::RTL1 infectées par TCV. Par contre, les TAS2-siRNAs étaient absents chez les plantes Col WT et Col/35S::RTL1 inoculées avec TYMV, confirmant que TYMV n'inhibe pas l'activité de RTL1. En revanche, l'accumulation de TAS2 ta-siRNA chez les plantes 3S::RTL1 inoculées par le TCV confirme que le TCV inhibe l'activité de RTL1.

VSR vs RTL1

Bien que le mécanisme de PTGS chez les plantes puisse arrêter la propagation des virus au cours d'une infection virale, il est connu depuis longtemps que la plupart des virus codent des protéines qui inhibent les composants du PTGS de la plante. Ces protéines sont appelés Viral Suppresseur de RNA Silencing (VSR). Les VSRs peuvent cibler le PTGS dans différentes

étapes à l'aide de différentes stratégies. Pour déterminer si les protéines VSR sont également responsables de l'inhibition de l'activité RTL1, le VSR bien caractérisé de TCV, P38 a été utilisé dans des expériences Agro-infiltration.

Les feuilles de *N. benthamiana* ont été co-infiltrées avec la construction GUS IR, plus RTL1 et avec ou sans P38. Les feuilles infiltrées avec 35S :: RTL1 + 35S :: P38 accumulent les GU siRNA à un niveau similaire à celui de feuilles infiltrées avec 35S :: P38 tout seul. Ces résultats montrent que P38 est suffisante pour empêcher l'inhibition de l'accumulation des siRNA dérivés de transgène par RTL1, et suggère que P38 empêche également l'effet inhibiteur de RTL1 sur les siRNA dérivés de TCV.

Conclusion

Sur la base de sa structure protéique RTL1 peut être considéré comme un membre de Class I de RNaseIII. Sa fonction est cependant très différente du rôle classique de traitement de l'ARN des autres membres de la famille RNaseIII. En fait, nos résultats ont révélé que, chez les plantes 35S::RTL1, il n'y a pas d'accumulation de siRNA qui sont habituellement produits par DCL2, DCL3 ou DCL4.

Comme la surexpression de RTL1 semble être inefficace sur la population des miRNAs, qui sont les produits de traitement de DCL1, à partir d'une tige-boucle doubles brins imparfaits, il est probable que RTL1 pourrait seulement affecter les longs d'ARN doubles brins parfaitement appariés.

Les protéines analogues de RTL1 peuvent être trouvées dans de nombreuses autres espèces de plantes. Cela semble prouver l'importance de l'activité RTL1 dans chez les plantes. Cependant, sous les conditions contrôlées de croissance, RTL1 n'est que très peu exprimé dans les racines d'Arabidopsis et pas dans les feuilles et les fleurs (Comella et al., 2008). Pour déterminer si l'expression RTL1 endogène dans les racines peut effectivement réguler l'accumulation des siRNAs dans ce tissu, on a comparé le niveau des petits ARNs entre les racines et les fleurs chez les plantes WT. Le rapport entre le siRNA et miRNA était plus faible dans les racines (351415/175233 = 2,0) par rapport à fleurs (11416165/1797097 = 6,4), ce qui est cohérent avec l'activité de suppression RTL1 sur les siRNA.

Nous avons également montré que RTL1 pourrait interférer avec l'accumulation des siRNA exogènes, tels que les siRNA dérivés d'un transgène. Par conséquent RTL1 apparaît comme un suppresseur général des voies de siARN chez les plantes. On s'est ensuite demandé si RTL1 pourrait aussi supprimer l'accumulation de siRNA dérivés des virus et affecter le mécanisme de défense de PTGS.

En fait, le PTGS est connu pour agir comme un mécanisme antiviral chez les plantes, les mouches et les vers. Chez les plantes DCL2 et DCL4 sont en mesure de traiter l'ARN double

brin viral pour produire les siRNAs, qui sont chargés sur AGO1 ou AGO2 et qui peuvent cibler les ARNs virales.

Cependant, les virus sont également capables d'interférer avec ce mécanisme en produisant des VSRs. Les VSR peuvent interagir avec PTGS en différentes étapes et ils présentent également différentes forces dans le blocage de la machinerie de défense de PTGS. Par exemple, l'activité de VSR de TYMV p69 est plus faible que TCV P38. Cela provoque des symptômes légers chez Arabidopsis infecté par TYMV des symptômes très sèvères chez Arabidopsis infecté par TCV.

Nos résultats ont montré que RTL1 a le potentiel pour contrecarrer la machinerie antiviral de PTGS par clivage des précurseurs d'ARN double brin de vsiRNA et empêcher le chargement de siRNA dérivés de virus en protéines AGOs. En effet, les plantes 35S:: RTL1 présentent une hyper-sensibilité à l'infection par TYMV et n'accumument pas de siRNA dérivés de TYMV. D'autre part, les plantes 35S:: RTL1 qui ont été infectées par le TCV accumulent les siRNA dérivés de virus qui suggère que l'activité de RTL1 est inhibée par ce virus.

Par ailleurs, l'infection causée par TCV provoque des symptômes similaires entre les plantes WT et les plantes 35S::RTL1. Il est donc possible que l'infection par ce virus se base sur sa capacité à inhiber le PTGS et pas RTL1. Le fait que TCV inhibe fortement l'activité de RTL1 suggère que l'inhibition de RTL1 par certains virus est essentielle pour d'autres raisons. Par exemple, si RTL1 clive leurs ARNs doubles brins intermédiaires nécessaires pour leur propagation il est important pour les virus à inhiber l'activité de RTL1.

Ainsi, il est raisonnable de supposer que certains virus qui sont sensibles à RTL1 pendant leurs étapes de réplication, ont développé des stratégies pour inhiber ou contrecarrer l'activité de RTL1. La suppression de RTL1 médiée par les virus pourrait aussi être une stratégie pour prolonger la vie de leurs plantes hôtes de sorte qu'une infection réussie peut être établie avant que la plante succombe à l'infection.

Notre étude a révélé une nouvelle protéine végétale impliquée dans les interactions plantevirus. Dans le cas de TYMV, RTL1 sert comme un suppresseur de la voie endogène de la défense PTGS qui peut aider les virus d'infecter les plantes, probablement par dégradation des précurseurs d'ARN double brins de vsiRNA.

En fait RTL1 n'est pas le seul exemple des protéines qui neutralisent la défense antiviral de PTGS. Par exemple, le gène de XRN4 code un 5'-> 3 'exoribonucléase qui dégrade des substrats virales nécessaire pour PTGS. En effet, les mutants *xrn4* présentent d'une hyper résistance à l'infection virale, ce qui indique que XRN4 contrecarre PTGS chez les plantes WT (Gy et al., 2007).

Cependant, l'inhibition de l'activité RTL1 par TCV suggère que RTL1 peut aussi servir comme un acteur des défenses cellulaires qui aident les plantes à lutter contre les virus, par

exemple en dégradant l'ARNs doubles brins intermédiaires de la réplication du virus. D'autres expériences seront nécessaires pour répondre à l'action précise de RTL1 vers chaque virus.

Référence:

Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. Nature 431, 356-363.

Bouche, N., Lauressergues, D., Gasciolli, V., and Vaucheret, H. (2006). An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. EMBO J 25, 3347-3356.

Bozorov, T.A., Pandey, S.P., Dinh, S.T., Kim, S.G., Heinrich, M., Gase, K., and Baldwin, I.T. (2012). DICER-like proteins and their role in plant-herbivore interactions in Nicotiana attenuata. J Integr Plant Biol *54*, 189-206.

Buhler, M., and Moazed, D. (2007). Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. Nat Struct Mol Biol *14*, 1041-1048.

Castel, S.E., and Martienssen, R.A. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. Nat Rev Genet *14*, 100-112.

Chapman, E.J., and Carrington, J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. Nat Rev Genet *8*, 884-896.

Comella, P., Pontvianne, F., Lahmy, S., Vignols, F., Barbezier, N., Debures, A., Jobet, E., Brugidou, E., Echeverria, M., and Saez-Vasquez, J. (2008). Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in Arabidopsis. Nucleic Acids Res *36*, 1163-1175.

Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., van der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A.J., and Matzke, M. (2009). A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation. EMBO J 28, 48-57.

Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., and Voinnet, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. Science *313*, 68-71.

Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R., and Bartel, D.P. (2009). RNAi in budding yeast. Science *326*, 544-550.

Du, Z., Lee, J.K., Tjhen, R., Stroud, R.M., and James, T.L. (2008). Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: a conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 2391-2396.

Dunoyer, P., Brosnan, C.A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C., and Voinnet, O. (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. EMBO J 29, 1699-1712.

Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., and Gill, S.S. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. Gene *245*, 213-221.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature *391*, 806-811.

Gasciolli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P., and Vaucheret, H. (2005). Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. Curr Biol *15*, 1494-1500.

Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. Nat Rev Genet *10*, 94-108.

Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286, 950-952.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature *404*, 293-296.

Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M., and Pastore, A. (1995). Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. EMBO J *14*, 3572-3584.

Kiyota, E., Okada, R., Kondo, N., Hiraguri, A., Moriyama, H., and Fukuhara, T. (2011). An Arabidopsis RNase III-like protein, AtRTL2, cleaves double-stranded RNA in vitro. J Plant Res *124*, 405-414.

Lamontagne, B., Hannoush, R.N., Damha, M.J., and Abou Elela, S. (2004). Molecular requirements for duplex recognition and cleavage by eukaryotic RNase III: discovery of an RNA-dependent DNA cleavage activity of yeast Rnt1p. J Mol Biol *338*, 401-418.

Lee, H.C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S.K., Pertsemlidis, A., Lewis, Z.A., Freitag, M., Selker, E.U., Mello, C.C., *et al.* (2010). Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. Mol Cell *38*, 803-814.

Mello, C.C., and Conte, D., Jr. (2004). Revealing the world of RNA interference. Nature *431*, 338-342.

Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell *2*, 279-289.

Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., and Poethig, R.S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 3691-3696.

Portereiko, M.F., Sandaklie-Nikolova, L., Lloyd, A., Dever, C.A., Otsuga, D., and Drews, G.N. (2006). NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1 encodes the Arabidopsis RPL21M protein and is required for karyogamy during female gametophyte development and fertilization. Plant Physiol *141*, 957-965.

Redko, Y., Bechhofer, D.H., and Condon, C. (2008). Mini-III, an unusual member of the RNase III family of enzymes, catalyses 23S ribosomal RNA maturation in B. subtilis. Mol Microbiol *68*, 1096-1106.

Rotondo, G., Huang, J.Y., and Frendewey, D. (1997). Substrate structure requirements of the Pac1 ribonuclease from Schizosaccharmyces pombe. RNA *3*, 1182-1193.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science *305*, 1434-1437.

Watkins, K.P., Kroeger, T.S., Cooke, A.M., Williams-Carrier, R.E., Friso, G., Belcher, S.E., van Wijk, K.J., and Barkan, A. (2007). A ribonuclease III domain protein functions in group II intron splicing in maize chloroplasts. Plant Cell *19*, 2606-2623.

Wu, H., Henras, A., Chanfreau, G., and Feigon, J. (2004). Structural basis for recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p RNase III. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 8307-8312.

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