



HAL
open science

Caractérisation de la protéine 140K impliquée dans l'adressage aux chloroplastes des complexes de réplication du virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV)

Lucille Moriceau

► **To cite this version:**

Lucille Moriceau. Caractérisation de la protéine 140K impliquée dans l'adressage aux chloroplastes des complexes de réplication du virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV). Sciences agricoles. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT: 2015SACLS255 . tel-01967604

HAL Id: tel-01967604

<https://theses.hal.science/tel-01967604>

Submitted on 1 Jan 2019

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.

NNT : 2015SACLS255

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème
Spécialité de doctorat : Biologie

Par

Mme Lucille MORICEAU

Caractérisation de la protéine 140K impliquée dans l'adressage aux chloroplastes
des complexes de réplication du virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV)

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 21 décembre 2015 :

Composition du Jury :

Mme SHYKOFF Jacqui	Directrice de Recherche, CNRS	Présidente du Jury
M. GILMER David	Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
M. MONGRAND Sébastien	Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
M. LEON Sébastien	Chargé de Recherche, CNRS	Examineur
Mme JUPIN Isabelle	Directrice de Recherche, CNRS	Directeur de thèse



NNT : 2015SACLS255

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

Spécialité de doctorat : Biologie

Par

Mme Lucille MORICEAU

Caractérisation de la protéine 140K impliquée dans l'adressage aux chloroplastes
des complexes de réplication du virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV)

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 21 décembre 2015 :

Composition du Jury :

Mme SHYKOFF Jacqui	Directrice de Recherche, CNRS	Présidente du Jury
M. GILMER David	Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
M. MONGRAND Sébastien	Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
M. LEON Sébastien	Chargé de Recherche, CNRS	Examineur
Mme JUPIN Isabelle	Directrice de Recherche, CNRS	Directeur de thèse



Remerciements

La tradition entretient ce petit rituel des lignes de remerciements, juste avant de commencer les choses sérieuses : le contenu du manuscrit de thèse. Pourtant, aucun nom n'est cité dans cette page (j'aurais trop peur d'en oublier !) : chacun pourra se reconnaître dans ces quelques lignes.

Une exception, bien sûr, pour Isabelle, depuis notre première rencontre outre Atlantique à Cold Spring Harbor, jusqu'à l'écriture de ces lignes, merci de m'avoir offert la chance de terminer mon Master et de réaliser ma thèse dans ton laboratoire.

Il est vrai que plus de trois années (presque quatre !) se sont écoulées, entre le moment où j'ai fait mes premiers pas dans le laboratoire et la rédaction de ce manuscrit. Autant de temps propice à de nombreuses rencontres : collègues, amis, personnes de passage... avec qui, quelques mots et sourires ont volontiers été échangés.

Ainsi,

Merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse, de l'avant concours de l'école doctorale (et sa préparation !), jusqu'à la soutenance finale (bientôt !...).

Egalement merci à tous ceux qui m'ont écoutée (eh oui, la « simple » oreille attentive est parfois précieuse !), soutenue dans les moments de doute et de fatigue, et ramenée sur terre alors que les idées fusaient. Je n'oublie pas, bien sûr, tout le « staff » attentionné qui a veillé à mon état de santé, surtout pendant la rédaction du manuscrit, et qui m'a supportée (dans tous les sens du terme !) pendant ces années.

Remerciements à tous ceux qui m'ont conseillée tant sur les plans technique et pratique, que sur le plan personnel, lors de pauses autour d'un thé dans le bureau, au moment du déjeuner dans « la salle du fond », au détour d'un couloir, ou encore autour d'un verre.

Cette thèse a également été enrichie par l'expérience associative, grâce aux membres de « Doc'en herbe » et aux précieux conseils de l'équipe de l'école doctorale. Merci à tous pour cette aventure, ponctuée par les « PhD days » et surtout, embellie par les « EPSR » d'Amsterdam et de Paris !

Indiscutablement, merci à tous pour cette expérience unique !

TABLE DES MATIERES

Abréviations et symboles	15
Introduction	23
1 Généralités sur les virus à ARN positif et leur réplication	27
1.1 Présentation générale des virus ARN(+).....	27
1.2 Réplication des virus à ARN(+)	29
1.2.1 Cycle infectieux et mécanisme de la réplication.....	29
1.2.2 Déterminants et acteurs viraux de la réplication.....	31
2 Localisation des complexes de réplication viraux aux membranes intracellulaires.....	33
2.1 Nature des membranes ciblées	33
2.1.1 Réticulum endoplasmique (RE) et appareil de Golgi.....	33
2.1.2 Peroxysomes et mitochondries.....	37
2.1.3 Endosomes et lysosomes	37
2.1.4 Chloroplastes.....	37
2.1.5 Tonoplaste.....	37
2.2 Modifications des membranes par les infections virales.....	39
2.2.1 Types de structures formées	39
2.2.2 Déterminants responsables des réarrangements membranaires.....	45
2.2.3 Voies et facteurs cellulaires détournés pour l'adressage des protéines virales.....	55
2.3 Conclusion.....	67
3 Le Turnip yellow mosaic virus (TYMV).....	69
3.1 Site de réplication du TYMV	69
3.2 Organisation du génome viral et expression des protéines	69
3.3 Fonctions des différentes protéines virales.....	71
3.3.1 La protéine de capsid.....	71
3.3.2 La protéine de mouvement (69K).....	73

3.3.3	La polyprotéine 206K.....	73
4	Adressage de la protéine 140K du TYMV aux chloroplastes.....	79
4.1	Spécificités du chloroplaste	79
4.2	Voies d'adressage des protéines aux chloroplastes.....	81
4.2.1	Adressage par la voie dépendante du peptide de transit : le « General Import Pathway » (GIP).....	81
4.2.2	Adressage des précurseurs sans peptide de transit	81
4.3	Objectifs de la thèse	83
	Chapitre 1	85
1	La protéine 140K est adressée aux chloroplastes via son domaine minimal d'adressage.....	87
1.1	Délimitation du domaine d'adressage aux chloroplastes	87
1.1.1	Délétions en C-terminal de la protéine EGFP-140K	89
1.1.2	Délétions en N-terminal de la protéine EGFP-140K.....	91
1.2	Délimitation de la séquence minimale du DAC.....	93
1.2.1	Prédictions des structures secondaires entre les bornes 372 et 585 de la protéine 140K	93
1.2.2	Effets des délétions du DAC en C-terminal en fonction des prédictions de structures secondaires.....	93
2	Le DAC contient deux hélices alpha A et B	97
2.1	Représentations des hélices A et B du DAC	97
2.1.1	Représentations par HeliQuest.....	97
2.1.2	Représentation des hélices A et B du DAC par PyMol.....	99
2.2	Validation de la conformation en hélice alpha du DAC par dichroïsme circulaire	101
3	Les hélices amphipathiques A et B du DAC sont impliquées dans l'adressage des protéines 140K/98K.....	103
3.1	Importance de la structuration en hélice pour l'adressage aux chloroplastes	103

3.2	Importance de la propriété amphipathique des hélices pour l'adressage des protéines 140K/98K aux chloroplastes.....	105
4	Les protéines 140K/98K sont associées et ancrées aux membranes subcellulaires.....	109
4.1	Recherche de l'association des protéines aux membranes par fractionnements subcellulaires.....	109
4.2	Tests de l'ancrage des protéines 140K/98K aux membranes cellulaires.....	111
5	Le repliement du DAC en hélices amphipathiques est nécessaire pour la réplication virale	117
5.1	Effets des mutations sur la réplication virale.....	117
5.2	Effets des mutations sur l'interaction des protéines 98K et 66K.....	119
6	Discussion du chapitre	123
6.1	Importance des hélices alpha amphipathiques pour l'association membranaire des protéines virales.....	123
6.1.1	Détection d'hélices alpha amphipathiques, au sein du DAC des protéines 140K/98K	125
6.1.2	Adressage des protéines 140K/98K via les hélices alpha amphipathiques A et B du DAC	127
6.1.3	Insertion probable de la protéine 140K dans la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes via son DAC	127
6.1.4	L'association aux membranes de la protéine 140K est-elle requise pour son clivage ?	131
6.2	Précisions sur le déroulement des étapes précédant la réplication virale	133
6.3	Les mutations des hélices affectent-elles l'activité méthyltransférase ?	135

Chapitre 2..... 137

1	Observations de différentes distributions des protéines 140K et 98K sauvages fusionnées à l'EGFP.....	139
1.1	Description des classes de distribution du signal EGFP à partir des observations avec des cellules exprimant l'EGFP-140K.....	141

1.1.1	Traits, arcs et anneaux d'EGFP, à la périphérie des chloroplastes (I).....	141
1.1.2	Traits d'EGFP en présence de quelques structures ponctuées regroupées (RSPt+)	141
1.1.3	Signal d'EGFP sous forme de structures ponctuées regroupées en présence de quelques traits (RSPt-)	141
1.1.4	Regroupement de structures ponctuées d'EGFP (RSP).....	141
1.1.5	Les structures ponctuées (SP).....	143
1.2	Comparaison des classes de distribution des signaux fluorescents de l'EGFP-140K et l'EGFP-98K	143
2	Evolution temporelle de la distribution du signal de fluorescence, dans les cellules exprimant la protéine de fusion.....	147
2.1	Evolution de la distribution du signal de l'EGFP-140K en time-lapse	147
2.2	Intensification de la fluorescence de la protéine EGFP-140K au cours du temps.....	151
3	Le taux d'expression de la protéine EGFP-140K est responsable des classes de distribution du signal fluorescent.	153
3.1	Effet de la quantité de plasmide pΩ-EGFP-140K sur le taux d'expression de la protéine EGFP-140K	153
3.2	Corrélation entre le taux d'accumulation de l'EGFP-140K et la distribution du signal dans les cellules transfectées.....	155
4	Capacité de dimérisation de la protéine 98K sauvage.....	159
5	Discussion du chapitre	161
5.1	Le taux d'accumulation et l'oligomérisation de la protéine EGFP-140K sont responsables de l'évolution temporelle de la distribution du signal fluorescent	161
5.2	Interactions entre protéines 140K/98K et/ou avec des partenaires viraux et cellulaires...	165
5.2.1	Limitations de la technique du BiFC pour attester des interactions entre partenaires protéiques	165
5.2.2	Quelle partie de la protéine 98K est impliquée dans l'oligomérisation ?	165

5.2.3	Implications éventuelles de l'hélicase et de la protéine 66K dans la dimérisation et/ou l'adressage de la protéine 140K aux chloroplastes	165
5.2.4	Des facteurs cellulaires sont-ils impliqués dans le processus d'adressage ?	167

Chapitre 3..... 171

1	Sélection des résidus à substituer	173
1.1	Altération de la propriété amphipathique des hélices A et B	173
1.1.1	Modification des faces hydrophobes	175
1.1.2	Modification des faces hydrophiles des hélices A et B	179
1.2	Altération de la structuration en deux hélices A et B	181
2	Taux d'expression et profils de distribution des différentes protéines mutantes fusionnées à l'EGFP	183
2.1	Expression des différentes protéines EGFP-140K mutantes	183
2.2	Variations dans les proportions des classes de distribution du signal fluorescent des protéines EGFP-140K mutantes	185
2.2.1	Groupe vérifiant H_0 pour « $65 < X < 130$ » et « $130 < X < 200$ »	187
2.2.2	Groupe vérifiant H_0 seulement pour « $65 < X < 130$ »	189
2.2.3	Groupe vérifiant H_0 seulement pour « $130 < X < 200$ »	189
2.2.4	Groupe rejetant H_0 pour « $65 < X < 130$ » et pour « $130 < X < 200$ »	191
3	Dimérisation des protéines 98K mutantes	195
3.1	Seules certaines protéines mutantes conservent leur capacité à dimériser	195
3.2	Absence de dimérisation pour les autres protéines mutantes	197
4	Infectivité des ARN viraux contenant les mutations affectant significativement l'adressage de la protéine 140K	199
5	Discussion du chapitre	201
5.1	Les étapes de l'adressage pourraient correspondre à des seuils d'accumulation de protéines	201

5.1.1	Les défauts d'adressage dus aux faces hydrophobes réduite ou enlevée peuvent être compensés par l'augmentation de la quantité de protéine	201
5.1.2	L'augmentation de la face hydrophobe provoque un défaut d'adressage lors de l'accumulation de la protéine.....	203
5.2	Importance de la conformation pour l'adressage et pour la réplication virale	205
5.2.1	Nécessité de la proline entre les hélices A et B.....	205
5.2.2	Contribution à l'adressage des résidus chargés	207
5.3	L'oligomérisation des protéines 98K.....	209
5.3.1	L'oligomérisation est dispensable pour la réplication virale.....	209
5.3.2	L'oligomérisation impliquerait les faces hydrophobes des hélices A et B du DAC	209
5.4	Les mutations introduites affectent-elles l'ancrage ?	211
Conclusions et Perspectives		213
1	Comment la cellule hôte pourrait-elle être impliquée dans l'adressage de la protéine 140/98K ?.....	215
1.1	Recherche d'une colocalisation avec la voie de sécrétion.....	215
1.2	La protéine adressée perturbe le fonctionnement de la cellule hôte.....	219
2	Les protéines 140K/98K sont-elles impliquées dans la formation des invaginations de l'enveloppe du chloroplaste ?	223
2.1	La formation des sphérules nécessite d'autres partenaires viraux et/ou cellulaires.....	223
2.2	La composition en lipides a-t-elle un rôle dans l'efficacité de l'infection virale ?	225
3	Conclusion.....	227
Matériel et méthodes.....		229
1	Matériel	230
1.1	Matériel biologique	230
1.1.1	Matériel végétal	230

1.1.2	Vecteurs d'expression	230
1.1.3	Préparations de transcrits <i>in vitro</i> à partir de plasmides du TYMV sauvage ou muté ARN infectieux.....	233
1.1.4	Souches bactériennes : <i>Escherichia coli</i>	233
1.2	Matériel de microscopie.....	233
1.2.1	Les microscopes utilisés	233
1.2.2	Supports d'observation.....	234
1.2.3	Traitements des images de microscopie.....	235
1.2.4	Comparaison des données de microscopie par test statistique.....	235
1.3	Autres logiciels employés.....	236
1.3.1	Séquences d'acides nucléiques.....	236
1.3.2	Logiciels de prédictions	236
2	Méthodes de biologie moléculaire	237
2.1	Préparations d'acides nucléiques	237
2.1.1	Extractions d'ADN à partir des cultures bactériennes, par lyse alcaline.....	237
2.1.2	Extraction d'ARN à partir de protoplastes transfectés.....	238
2.2	Quantification d'acides nucléiques.....	238
2.2.1	Quantification rapide	238
2.2.2	Quantification des ARN viraux.....	238
2.3	Mutagenèse dirigée	239
2.3.1	Dessin des amorces spécifiques	239
2.3.2	Réactions de PCR.....	239
2.3.3	Vérification et préparation du produit PCR.....	240
2.4	Clonages.....	240
2.4.1	Par digestions enzymatiques	240
2.4.2	Par méthode GIBSON (Gibson et al., 2009).....	241
2.5	Transformations bactériennes.....	242
2.6	Vérification des séquences d'ADN.....	243

2.6.1	Par digestions enzymatiques	243
2.6.2	Par séquençage.....	243
3	Protocoles relatifs aux expériences réalisées dans les systèmes végétaux	244
3.1	Préparation et transfection de protoplastes <i>d'A. thaliana</i>	244
3.1.1	Préparation des protoplastes.....	244
3.1.2	Transfections des protoplastes.....	244
3.2	Vérification, quantification et analyse des transfections	244
3.2.1	Quantification des transfections en protoplastes	244
3.2.2	Récoltes des protoplastes	245
4	Méthodes de Biochimie.....	245
4.1	Electrophorèse en conditions dénaturantes.....	245
4.2	Immunodétection par western blot.....	246
4.2.1	Transfert semis-sec.....	246
4.2.2	Hybridation des anticorps	246
4.2.3	Révélations	247
4.3	Fractionnements subcellulaires.....	248
4.4	Tests de solubilisation de protéines membranaires	248
4.5	Détermination de la structure secondaire du peptide par dichroïsme circulaire (CD)..	249

Annexes.....252

Plasmides créés par PCR (mutagenèse dirigée).....	253
Liste des plasmides	253
Listes des amorces	254
Dans l'hélice A.....	254
Dans l'hélice B.....	255
Plasmides créés par digestions enzymatiques.....	256
Clonages pour les tests BiFC	256

Clonage dans le p Ω -Nt-YFP-98K	256
Clonage dans le p Ω -Ct-YFP-98K.....	257
Clonage dans E17-stop69K par digestion enzymatique	257
Clonages pour les marqueurs des compartiments.....	258
Plasmides créés par clonage Gibson.....	258
Bibliographie.....	261

Abréviations et symboles

Abréviations et symboles courants

A	Ampère
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
Arf	ADP ribosylation factor
ARN	acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
ATP	adénosine triphosphate
b ou pb	base ou paire de base
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate sel dissodique
BET	bromure d'éthidium
BHK	baby hamster kidneys
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation, complémentation de fluorescence bi-moléculaire
BrUTP	5-bromouridine 5'-triphosphate ou bromo-UTP
BSA	sérum albumine bovine
°C	degrés Celsius
c	centi, 10^{-2}
cDNA	ADN complémentaire
cfu	colony forming unit
CIP	calf intestinal phosphatase
COP	coat protein
2D (3D)	2 (3) dimensions
Da	Dalton
DMF	diméthylformamide
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	éthylène diamine tétraacétate de sodium

(E)GFP	(Enhanced) Green Fluorescent Protein
F	Farrad
g	gramme
g	gravité
GTP	guanosine triphosphate
h	heure
HRP	horseradish peroxidase, peroxydase de raifort
K	kilo, 10^3
L	litre
LB	Luria Bertani
m	mètre
M	molaire
m	milli, 10^{-3}
min	minute
mol	mole
μ	micro, 10^{-6}
n	nano, 10^{-9}
NB	Northern blot
NBT	Nitro Blue Tetrazolium Chlorid Monohydrat
nt(s)	nucléotide(s)
Ω	ohms
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyéthylène glycol
p. i.	post inoculation ou post-infection
p.t.	post transfection
%	pour cent
qPCR	quantitative PCR
qsp	quantité suffisante pour
RdRp	RNA-dependant RNA polymerase
RNase	ribonucléase
rpm	révolution par minute
RuBisCO	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase

RT	Room temperature
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
Sar	Secretion-Associated and Ras-related
SDS	sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
u	unité d'enzyme
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TB	Terrific Bross
TBE	tampon Tris-Borate-EDTA
TE	Tampon Tris-EDTA
TEMED	NNN'N' tétraméthyl éthylène diamine
TFE	2,2,2-Trifluoroethanol
Tm	melting temperature, temperature de fusion
Tris	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
UV	ultra-violet
V	volt
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
W	Watt
WB	Western blot, technique de détection des protéines
YFP	Yellow Fluorescent Protein, protéine fluorescente jaune

Abréviations des noms scientifiques

Pour un nom scientifique cité, le genre et l'espèce sont écrits en entier lors de la première citation.

Par la suite, seule la première lettre du genre suivie du nom d'espèce sont indiqués.

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (arabette des dames)
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>B. rapa</i>	<i>Brassica rapa pekinensis</i> (chou chinois)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> (tabac)
<i>N. clevelandii</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i> (tabac)

Abréviation des acides aminés

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

Abréviations des virus

Tableau A 1 - Classements de quelques virus à ARN(+), dont la majorité est citée dans le manuscrit.

Les classes et les ordres suivis d'un astérisque n'ont pas de valeur taxonomique et ont été proposés par (Koonin et al., 1993) sur la base des homologies de séquences des RdRp virales. Les autres ordres, familles, sous-familles et genres sont définis et approuvés par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.

Classe*	Ordres	Familles	Sous-famille	Genre	Exemples de virus	Abréviation	Hôte	
Picornavirus-like	Picornavirales	<i>Dicistroviridae</i>	-	<i>Cripavirus</i>	<i>Drosophila C virus</i>	DCV	Insecte	
		<i>Picornaviridae</i>	-	<i>Aphthovirus</i>	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>	FMDV	Animal	
			-	<i>Cardiovirus</i>	<i>Encephalomyocarditis virus</i>	EMCV	Animal	
			-	<i>Enterovirus</i>	<i>Poliovirus</i>		PV	Animal
					<i>Coxsackie virus 18</i>		CAV 18	Animal
					<i>Human echovirus 11</i>		EV11	Animal
					<i>Human enterovirus 71</i>		hEV71	Animal
		-	<i>Hepatovirus</i>	<i>Hepatitis A virus</i>	HAV	Animal		
		-	<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus 1</i>	ParV1	Animal		
		<i>Secoviridae</i>	<i>Comovirinae</i>	<i>Comovirus</i>	<i>Coupea mosaic virus</i>	CPMV	Animal	
				<i>Nepovirus</i>	<i>Grapevine fanleaf virus</i>	GFLV	Plante	
					<i>Tomato ringspot virus</i>	ToRSV	Plante	
	-		<i>Alphanodavirus</i>	<i>Flock house virus</i>	FHV	Insecte		
	-		<i>Potyviridae</i>	-	<i>Potyvirus</i>	<i>Tobacco etch virus</i>	TEV	Plante
						<i>Turnip mosaic virus</i>	TuMV	Plante
	<i>Nidovirales</i>	<i>Arteriviridae</i>	-	<i>Arterivirus</i>	<i>Equine arteritis virus</i>	EAV	Animal	
					<i>Porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>	PRRSV	Animal	
		<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirinae</i>	<i>Betacoronavirus</i>	<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>	SARS	Animal	
<i>Mouse hepatitis virus</i>					MHV	Animal		
			<i>Gamacoronavirus</i>	<i>Infectious bronchitis virus</i>	IBV	Animal		

Suite du tableau A 2 - Classements de quelques virus à ARN(+), dont la majorité est citée dans le manuscrit.

Le TYMV (surligné en gris) correspond au virus modèle employé pendant ma thèse.

Flavivirus-like	-	<i>Flaviviridae</i>	-	<i>Flavivirus</i>	<i>Yellow fever virus</i>	YFV	Animal	
					<i>Dengue virus</i>	DENV	Animal	
					<i>West Nile virus</i>	WNV	Animal	
					<i>Kunjin virus</i>	KUNV	Animal	
				<i>Hepacivirus</i>	<i>Hepatitis C virus</i>	HCV	Animal	
					<i>Pestivirus</i>	<i>Bovine viral diarrhea virus</i>	BVDV	Animal
	-	<i>Tombusviridae</i>	-	<i>Dianthovirus</i>	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>	RCNMV	Plante	
					<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i>	CarMV	Plante
				<i>Tombusvirus</i>	<i>Tomato bushy stunt virus</i>	TBSV	Plante	
					<i>Cucumber necrosis virus</i>	CNV	Plante	
<i>Cymbidium ringspot virus</i>					CymRSV	Plante		
<i>Carnation Italian ringspot virus</i>					CIRV	Plante		
Alphavirus-like	<i>Rubivirales*</i>	<i>Togaviridae</i>	-	<i>Alphavirus</i>	<i>Semliki Forest virus</i>	SFV	Animal	
				<i>Rubivirus</i>	<i>Rubella virus</i>	RV	Animal	
			<i>Hepeviridae</i>	-	<i>Hepevirus</i>	<i>Hepatitis E virus</i>	HEV	Animal
		<i>Tobamovirales*</i>	<i>Virgaviridae</i>	-	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	TMV	Plante
	<i>Tomato mosaic virus</i>					ToMV	Plante	
	<i>Bromoviridae</i>		-	<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	AMV	Plante	
				<i>Bromovirus</i>	<i>Brome mosaic virus</i>	BMV	Plante	
				<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	Plante	
	<i>Tymovirales</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>	-	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i>	PVX	Plante	
					<i>Bamboo mosaic virus</i>	BaMV	Plante	
		<i>Tymoviridae</i>	-	<i>Tymovirus</i>	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>	TYMV	Plante	

Introduction

Les maladies virales, comme la variole, la poliomyélite ou encore la rage, sont connues depuis l'Antiquité.

La mise en évidence d'agents pathogènes plus petits que les bactéries a été réalisée en 1892 par D. I. Ivanovski avec ses travaux sur la mosaïque du tabac.

En 1898, M. W. Beijerinck a démontré expérimentalement que l'agent infectieux pouvait traverser des filtres ne laissant pas passer les bactéries et a employé le terme de « **virus** », mot latin signifiant « poison ».

La microscopie électronique, conçue en 1938, a permis la visualisation des particules virales et leur étude.

Dans les années 1950, pour désigner les particules virales et les distinguer de leurs effets pathologiques, A. Lwoff a introduit le terme de « virions ». Il a également proposé une définition des virus (Lwoff, 1957), comme des entités strictement intracellulaires et potentiellement pathogènes avec une phase infectieuse, qui :

1. possèdent un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN),
2. se multiplient à partir de leur matériel génétique,
3. sont incapables de croître et de se diviser,
4. sont dénués du métabolisme permettant la synthèse de ses propres constituants.

Cette définition en quatre points est toujours employée à l'heure actuelle. Les virus sont donc des parasites intracellulaires obligatoires.

A partir de la nature et de l'organisation des génomes viraux connus, D. Baltimore (1971) a proposé une classification des virus, en six grandes catégories.

Dans ce manuscrit, nous nous intéressons plus particulièrement à la classe IV du classement de D. Baltimore qui correspond aux virus à ARN monocaténaux de polarité positive, ou virus à ARN(+). Après une brève description de ces virus, nous détaillerons ensuite la mise en place de leurs complexes de réplication, impliquant des membranes intracellulaires de natures variées, ainsi que des protéines et lipides de l'hôte. Puis, notre modèle d'étude, le *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) ou virus de la mosaïque jaune du navet, sera présenté, suivi des objectifs de la thèse.

Nature du génome	Groupe	Type de virus
ADN	I	virus à ADN double brin
	II	virus à ADN simple brin
ARN	III	virus à ARN double brin
	IV	virus à ARN simple brin de polarité positive : virus à ARN (+)
	V	virus à ARN simple brin de polarité négative : virus à ARN (-)
ARN ou ADN à transcription inverse	VI	rétrovirus à ARN simple brin
	VII	rétrovirus à ADN double brin

Tableau I 1 – Classification des virus selon la nature du génome viral, d'après D. Baltimore (1971) et l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

1 Généralités sur les virus à ARN positif et leur réplication

1.1 Présentation générale des virus ARN(+)

Les virus à ARN(+) constituent la plus large classe de virus infectant les animaux, les insectes, les végétaux et certains champignons, et incluant de nombreux pathogènes aux enjeux médicaux majeurs et retombées aux économiques importantes, comme l'hépatite C et la fièvre aphteuse, ou encore récemment le SARS. La lutte antivirale nécessite une meilleure compréhension du déroulement de l'infection et plus particulièrement de la réplication des virus.

Face à la diversité de morphologie, de génomes et d'hôte ciblés, une classification de ces virus a été initiée en 1971 par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) qui a encore pour tâche de définir et approuver les ordres, familles, sous-familles et genres des différents virus connus. Néanmoins, Koonin et al. (1993) ont proposé une classification de ces virus sur la base d'une de leurs protéines universellement conservée, la polymérase à ARN dépendante de l'ARN (RdRp). Leurs séquences contiennent huit motifs conservés, dont trois le sont complètement et correspondent aux motifs « core » qui pourraient être impliqués dans la liaison du substrat NTP. Ces derniers ont également permis de définir une signature pour identifier les RdRps des virus à ARN(+). En effet, les séquences de ces enzymes présentent également des similarités avec celles des RdRps des virus à ARN double-brin, dont elles sont les plus proches, et également des polymérases à ADN dépendantes de l'ARN, des polymérases à ADN dépendantes de l'ADN et des RdRp des virus à ARN(-). Ces mêmes auteurs ont défini onze groupes sur la base des alignements des motifs restants et les ont répartis en trois super-groupes (ou classes) grâce à leurs similarités de séquences : Picornavirus-like, Flavivirus-like et Alphavirus-like. Le tableau A1 en annexe présente ces deux classifications, qui se recoupent, ainsi que des exemples de virus correspondants, dont ceux cités dans ce manuscrit.

Parasites intracellulaires obligatoires, les virus dépendent de la machinerie de l'hôte pour synthétiser leurs protéines et reproduire leur génome. Des constituants cellulaires variés interviennent dans la reconnaissance et l'interaction avec la structure et la séquence nucléique des virus. Des facteurs cellulaires interagissent également avec certaines protéines virales, provoquant leur détournement et implication dans la réplication des virus. Ces changements drastiques du fonctionnement de l'hôte provoqués par l'infection virale conduisent à l'inhibition de certaines voies cellulaires ou à la modification de l'organisation des membranes intracellulaires.

Malgré une grande variété d'hôtes, de morphologies et d'organisations génétiques, les étapes du cycle infectieux des virus à ARN(+) sont très conservées.

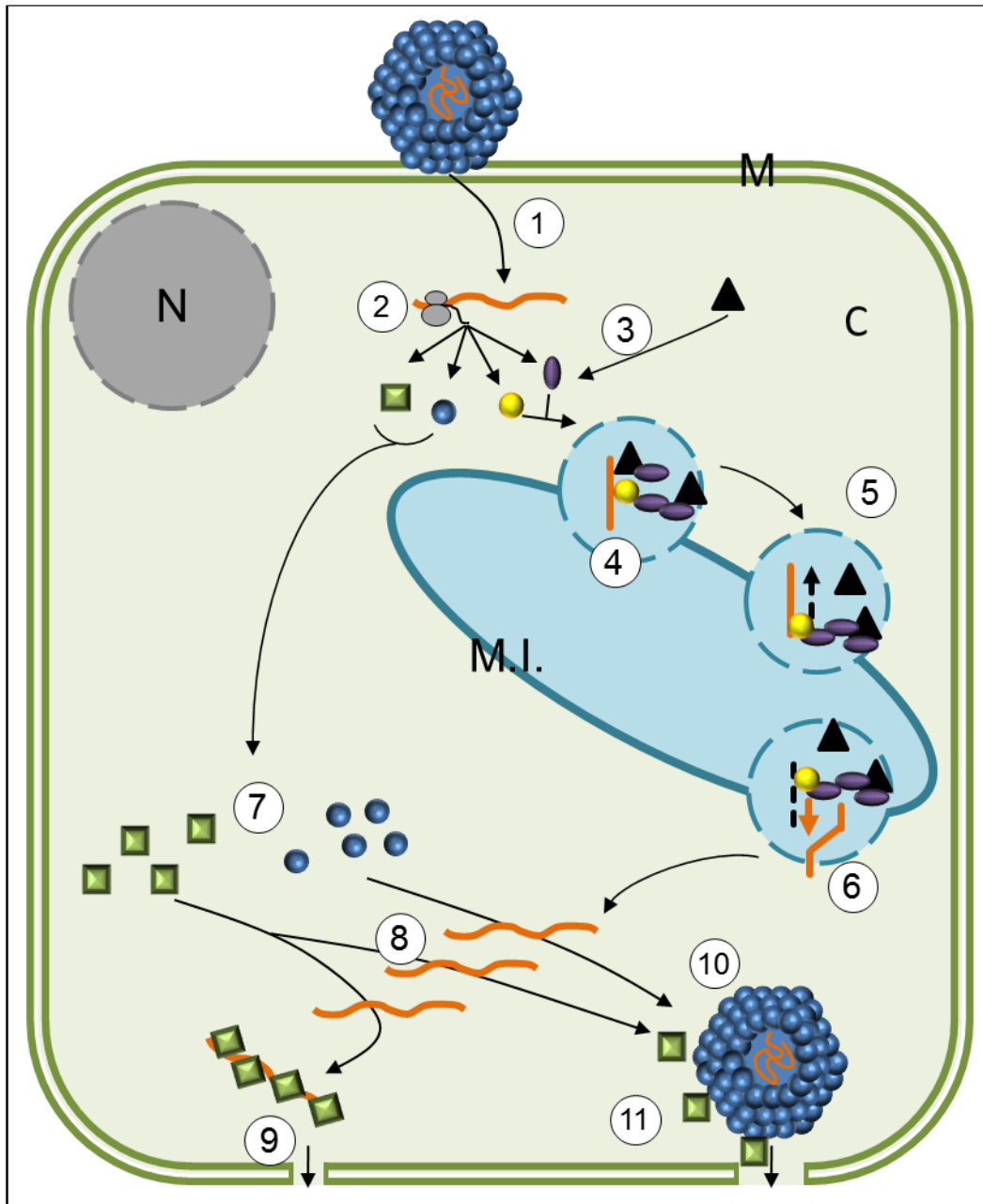


Figure I 1 – Cycle de réplication des virus à ARN(+) en cellule végétale.

L'entrée d'un virion dans la cellule cible est suivie et/ou concomitante de la décapsidation du virion (1) correspondant au dessassemblage des protéines de capsid. Le génome viral, i.e. de l'ARN(+), est alors accessible à la machinerie de traduction de l'hôte (2) qui synthétise les différentes protéines virales (3). Parmi celles-ci, certaines vont interagir avec l'ARN génomique et d'autre(s) protéine(s) cellulaire(s) (triangles noirs) pour former des complexes de réplication viraux, adressés à des membranes intracellulaires (M.I.). Ils y induisent des réarrangements, comme des invaginations ou des proliférations membranaires (4). La réplication du génome est réalisée par la polymérase virale, une RdRp, qui synthétise d'abord le brin d'ARN complémentaire non codant (5). Ce brin ARN viral complémentaire sert ensuite de matrice à la RdRp pour synthétiser de grandes quantités de brins ARN complémentaires de polarité positive (6). Ces ARN(+) nouvellement synthétisés sont ensuite assemblés (8) avec des protéines de mouvement et/ou avec des protéines de capsid (7), afin de sortir de la cellule via les plasmodesmes (9 et 11) qui seront responsables de l'infection virale à la fois de cellules en cellules et sur de longues distances pour infecter la plante entière. Les nouveaux virions encapsidés (10) permettront les infections d'autres plantes.

M, membrane plasmique et paroi ; N, noyau ; C, cytoplasme.

1.2 Réplication des virus à ARN(+)

1.2.1 Cycle infectieux et mécanisme de la réplication

L'entrée des particules virales dans les cellules permet leur désassemblage libérant leur génome dans le cytoplasme. Les génomes de ces virus consistent en un ou plusieurs ARN monocaténaire de polarité positive, c'est-à-dire doués de propriétés messagères. Ils sont reconnus par la machinerie de traduction de l'hôte, qui synthétise alors les protéines virales (1 à 3 et 7, Figure I 1). Les produits de traduction initiaux correspondent toujours aux protéines non-structurales virales, qui recrutent le génome viral et forment des complexes de réplication en s'associant à des protéines cellulaires et à des membranes intracellulaires (4, Figure I 1).

La première étape de la réplication consiste en la synthèse du brin ARN viral complémentaire (vc), par la polymérase virale (5, Figure I 1). Ce brin ARN(vc) sert ensuite de matrice à la RdRp pour la production en large excès de nouveaux brins ARN(+) génomiques (revu dans Astier et al., 2001) (6, Figure I 1), dont les rapports entre les quantités d'ARN(+) et (vc) sont variables et définissent la réplication asymétrique : par exemple de 7:1 lors de la réplication *in vitro* du TMV (Hayes and Buck, 1990), ou encore de 100:1 dans le cas du BMV (Marsh et al., 1991). Chez de nombreux virus, l'ARN(vc) sert également de matrice pour la synthèse d'ARN subgénomiques qui permettent d'exprimer des gènes viraux codés par la partie distale du génome.

Les ARN(+) néosynthétisés sont ensuite assemblés avec les protéines virales (7, Figure I 1) de mouvement et/ou de capsid. Les protéines de mouvement peuvent s'associer à la séquence nucléotidique des ARN(+) (9, Figure I 1), ou avec les protéines de capsid des virions nouvellement formés (10 et 11, Figure I 1), pour permettre leur traversée des ponts cytoplasmiques entre les cellules, ou plasmodesmes. Ce mode de passage entre cellules permet leur infection d'abord de proche en proche, puis à longue distance lorsque l'ARN viral, associé aux protéines de mouvement et/ou de capsid, se retrouve dans le phloème de la plante.

L'infection d'autres plantes est réalisée par les ARN viraux encapsidés, véhiculés par des vecteurs (Bozarth et al., 1992; Bransom et al., 1995; Astier et al., 2001).

1.2.2 Déterminants et acteurs viraux de la réplication

Les ARN viraux génomiques et complémentaires possèdent des séquences promotrices spécifiques (Gargouri et al., 1989; Weiland and Dreher, 1989) ou des structures secondaires (Barends et al., 2003) qui leur sont propres permettant l'initiation de la synthèse du brin complémentaire.

Comme évoqué précédemment, tous les virus à ARN(+) codent pour une polymérase virale. Elle catalyse l'incorporation des ribonucléosides triphosphates à l'extrémité 3'OH des brins d'ARN en cours de synthèse et complémentaires à la matrice ARN.

Par ailleurs, retrouvée chez la grande majorité des virus à ARN(+) dont le génome excède 6 kb, l'hélicase assure la séparation des brins néosynthétisés de leur matrice et l'élimination des structures secondaires de l'ARN matriciel (Koonin et al., 1993; Kadaré et al., 1996).

Les virus du supergroupe des alphavirus-like et du groupe des nodavirus ont leur ARN génomique coiffé en 5'. Ils possèdent un domaine assurant les fonctions de méthyltransférase et de guanylyltransférase impliquées dans la méthylation de la guanine et de son transfert sur l'extrémité 5' de l'ARN (Ahola and Karlin, 2015). Chez les picornavirus-like, une VPg (viral protein genome-linked) est associée de manière covalente à l'extrémité 5' des ARN. Cette protéine sert d'amorce à la polymérase pour le *Poliovirus* (PV, genre *Enterovirus*) (Towner et al., 1996) et également pour le *Turnip mosaic virus* (TuMV, genre *Potyvirus*), dont le domaine VPg a été démontré comme interagissant avec les protéines cellulaires eIF(iso)4E (eukaryotic initiation factor) et PABP2 (Poly(A) binding protein 2) (Léonard et al., 2004). Cette protéine de l'hôte, ainsi que la protéine Hsc 70-3 (heat shock cognate 70-3), ont par ailleurs été retrouvées associées à la RdRp du TuMV *in vitro* (Dufresne et al., 2008). Ces exemples d'illustrent succinctement l'implication des protéines cellulaires dans les complexes de réplication viraux.

Les observations de cellules infectées par des virus à ARN(+) en microscopie électronique ont mis en évidence des changements dans l'organisation des membranes intracellulaires, pouvant être par ailleurs comparables entre les cellules animales et végétales.

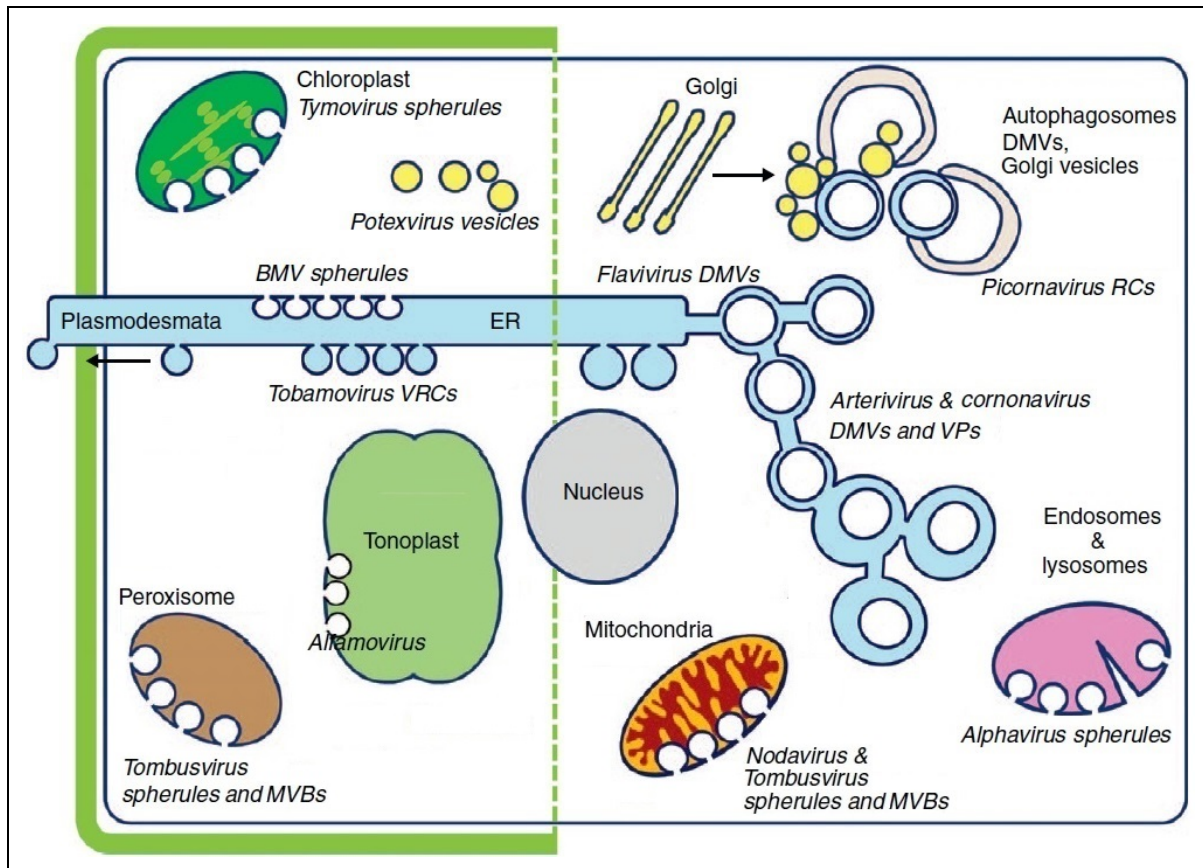


Figure I 2 – Représentations des membranes ciblées par les virus animaux et végétaux.

Ce schéma montre les localisations des complexes de réplication viraux (VRCs) identifiés pour plusieurs virus à ARN(+).

La partie gauche représente les cellules végétales entourées d'une paroi et de membranes qui sont interrompues par les plasmodesmes. Le réticulum endoplasmique (ER) est dessiné en bleu et s'étend depuis la région périnucléaire vers les plasmodesmes. Les *Bromovirus* (BMV), *Tobamovirus* et *Potexvirus* sont associés avec les sphérules et vésicules dérivées du RE. Des invaginations de membranes sont induites aux chloroplastes par les *Tymovirus*, aux peroxyosomes et mitochondries par les *tombusvirus* jusqu'à former des corps multivésiculaires (MVBs). Les *Alfamovirus* provoquent des invaginations des tonoplastes. De plus, des facteurs dérivés de l'appareil de Golgi, de la voie d'endocytose ou des tonoplastes sont détournés par certains virus de végétaux.

La droite du schéma représente les cellules animales. Les *Alphavirus* et *Nodavirus* induisent des sphérules, respectivement aux endosomes et lysosomes, et aux mitochondries. Dérivées du RE, des vésicules à double membranes (DMVs) sont formées par les *Flavivirus*, *Coronavirus* et *Arterivirus*, ces deux derniers provoquant également des paquets de vésicules (VPs). Les membranes participant aux complexes de réplication (RCs) des picornavirus pourraient provenir de l'appareil de Golgi, du RE et/ou des autophagosomes.

Adaptation d'après Netherton and Wileman, 2011; Verchot, 2011.

2 Localisation des complexes de réplication viraux aux membranes intracellulaires

Les virus à ARN(+) se répliquent au niveau de membranes intracellulaires. Suite aux infections, nous pouvons observer une grande variété de membranes ciblées ainsi que des différences dans les modifications de leurs arrangements.

2.1 Nature des membranes ciblées

Les études des virus infectant les cellules animales, végétales ou encore d'insectes, ont mis en évidence des réarrangements de membranes intracellulaires particulières et dépendants des virus. Ces membranes ciblées sont présentées, avec quelques exemples de virus associés, dans la Figure I 2 et ci-dessous.

2.1.1 Réticulum endoplasmique (RE) et appareil de Golgi

Dans le cas de l'infection des cellules animales par des virus de l'ordre des *Nidovirales*, la réplication virale s'effectue au niveau de la membrane du RE. En effet, pour l'Equine arteritis virus (EAV, genre *Arterivirus*), le complexe de réplication colocalise avec la protéine disulfide isomérase (PDI), marqueur du RE et du compartiment intermédiaire (ERGIC), et avec les ARN en cours de synthèse marqués au bromo-UTP (BrUTP) (van der Meer et al., 1998). En ce qui concerne le *Severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV, genre *Betacoronavirus*), les complexes de réplication ont été retrouvés associés au RE en immunomarquages en fluorescence et en microscopie électronique, et contenant l'ARN viral par hybridation *in situ* (Stertz et al., 2007). Avec ces mêmes techniques, les auteurs ont démontré que l'appareil de Golgi est impliqué dans l'assemblage et le bourgeonnement des nouvelles particules virales.

Des virus de la famille des *Flaviviridae* sont également retrouvés associés au RE et Golgi. Ainsi, les protéines du virus de l'hépatite C (HCV, genre *Hepacivirus*) sont associées au RE et Golgi, comme démontré avec les protéines structurales (core, glycoprotéines E1 et E2). Elles ont été retrouvées dans les fractions membranaires correspondantes ainsi que colocalisées en immuno-marquages par microscopies à fluorescence et électronique (Martire et al., 2001). Quant aux protéines non-structurales (NS3, NS4A, NS4B, NS5B et NS5A), elles ont également été retrouvées dans les fractions membranaires et colocalisant en immunofluorescence, entre elles et avec des marqueurs du RE (Hügler et al., 2001; Mottola et al., 2002).

Cette même famille comprend également les virus du genre *Flavivirus*, comme le *Kunjin virus* (KUNV) ou le virus de la Dengue (DENV). Par des immuno-marquages observés en fluorescence et en microscopie électronique, Mackenzie et al. (1999) ont démontré que les complexes de réplication du KUNV sont localisés aux membranes dérivées du RE, du ERGIC et du Golgi, dont également du *trans*-Golgi. Dans le cas du DENV, sa protéine NS4A est localisée aux membranes dérivées du RE et avec les complexes de réplication viraux, comme démontré par immunofluorescence avec des marqueurs de compartiments et anticorps anti-ARNds (Miller et al., 2007).

Parmi le supergroupe des Picornavirus-like, certains virus de végétaux se répliquent aux membranes du RE.

Pour le *Tobacco etch virus* (TEV, genre *Potyvirus*), la protéine non-structurale de 6 kDa se comporte comme une protéine intégrale membranaire, permettant l'association du complexe de réplication à la membrane du RE (Schaad et al., 1997).

La famille des *Secoviridae* regroupe les virus du genre *Comovirus*, étudié avec le *Coupea mosaic virus* (CPMV), et du genre *Nepovirus*, dont le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) et le *Tomato ringspot virus* (ToRSV) sont étudiés. La recherche des protéines de réplication 110K et VPg du CPMV par immunofluorescence a montré leur colocalisation avec le RE (Carette et al., 2000). La réplication virale du GFLV a lieu au RE, comme démontré par la recherche de colocalisation des protéines virales et des sites de synthèses de l'ARN, en employant du BrUTP et des immunomarquages révélés en fluorescence (Ritzenthaler et al., 2002). Quant au ToRSV, l'ARN1 code pour une polyprotéine dont les domaines X2 et NBT sont associés aux membranes du RE et induisent l'ancrage des complexes de réplication à ces membranes (Han and Sanfaçon, 2003; Zhang and Sanfaçon, 2006).

Enfin, des complexes de réplication de certains virus de plantes appartenant au supergroupe des Alphavirus-like sont rapportés comme étant localisés au niveau de la membrane du RE. Concernant le *Potato virus X* (PVX, genre *Potexvirus*), la fusion GFP de la protéine TGBp3 (triple gene block protein 3) a permis de démontrer sa colocalisation avec un marqueur du RE et avec la réplicase de 166 kDa par immunomarquages en fluorescence et microscopie électronique (Bamunusinghe et al., 2009). Quant au *Brome mosaic virus* (BMV, genre *Bromovirus*), les expérimentations d'immunofluorescence et d'incorporation de BrDU menées par Restrepo-Hartwig et Ahlquist, (1996) ont démontré la réalisation de la réplication virale au niveau du RE.

2.1.2 Peroxysomes et mitochondries

Les quatre virus du genre *Tombusvirus* les plus étudiés ont leurs sites de réplication localisés soit aux peroxysomes pour le *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), le *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), et le *Cucumber necrosis virus* (CNV), soit aux mitochondries pour le *Carnation Italian ringspot virus* (CIRV).

La protéine de réplication auxiliaire p33 et la protéine de réplication p92 sont colocalisées aux peroxysomes pour le TBSV (McCartney et al., 2005), ainsi que pour le CymRSV (Navarro et al., 2006) et le CNV (Panavas et al., 2005; Rochon et al., 2014).

Apparentées aux p33 et p92, les protéines p36 et p95 sont localisées aux mitochondries lors de l'infection par le CIRV (Weber-Lotfi et al., 2002).

Outre le tombusvirus CIRV, le *Flock house virus* (FHV, genre *Alphanodavirus*) se réplique également au niveau des mitochondries, comme l'atteste la localisation de la protéine A non-structurale par immunomarquage en microscopie électronique et la colocalisation en immunofluorescence de cette protéine A et de l'ARN marqué au BrUTP (Miller et al., 2001).

2.1.3 Endosomes et lysosomes

Les quatre protéines nsP1 à nsP4 (sous-unité catalytique de la RdRp) du *Semliki Forest virus* (SFV, genre *Alphavirus*) s'associent en complexes localisés aux membranes dérivées d'endosomes et de lysosomes, comme démontré par les co-immunomarquages de Kujala et al. (2001) qui ont ensuite suggéré que ces protéines soient impliquées dans la réplication virale.

2.1.4 Chloroplastes

L'ARN et les protéines impliquées dans la réplication du *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV, genre *Tymovirus*) sont localisées au niveau des chloroplastes (Garnier et al., 1980, 1986; Prod'homme et al., 2001).

En ce qui concerne le *Turnip mosaic virus* (TuMV, genre *Potyvirus*), la protéine non-structurale 6K est d'abord localisée à la membrane du RE, puis s'accumule au niveau de la membrane des chloroplastes, siège de la réplication virale (Wei et al., 2010).

2.1.5 Tonoplaste

Les protéines P1 et P2 requises pour la réplication de l'*Alfalfa mosaic virus* (AMV, genre *Alfamovirus*) interagissent et colocalisent au tonoplaste comme démontré par Heijden et al. (2001) lors d'expériences d'immunofluorescence.

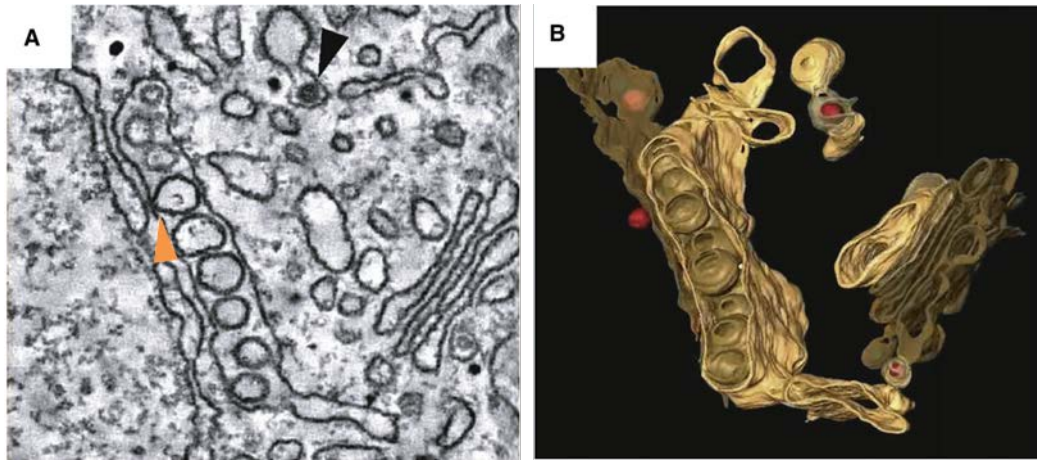


Figure I 3 – Image de microscopie électronique à transmission d’une cellule infectée par le virus de la Dengue et reconstitution 3D par tomographie des membranes du RE et du Golgi affectées par la présence du virus.

(A) Vue en 2D en microscopie électronique d’une section d’environ 2 nm d’épaisseur d’une cellule infectée par le DENV. Les pointes de flèches indiquent la continuité des membranes des vésicules et du RE (orange) et une particule virale (noir). (B) A partir de la tomographie en microscopie électronique, représentation 3D de la surface des membranes du RE et du Golgi (jaune), de la membrane externe de l’enveloppe nucléaire (semi-transparente), des vésicules induites par le DENV dans le RE (marron clair) et des particules virales (rouge). Figure adaptée d’après Welsch et al. (2009) et den Boon et al. (2010).

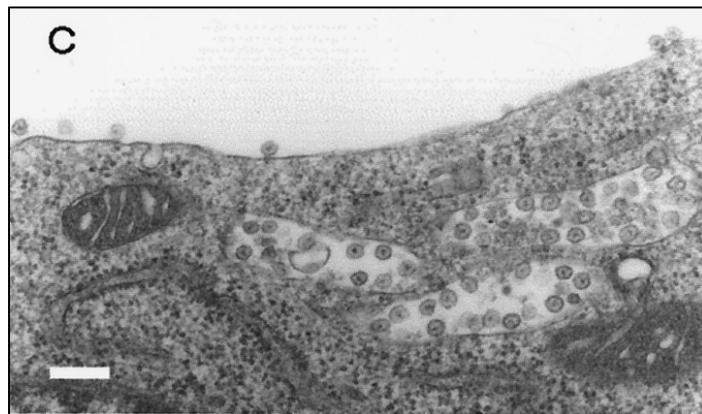


Figure I 4 – Image de microscopie électronique de cellules infectées par le SFV montrant des endosomes et lysosomes modifiés par la présence du virus.

Cellules BHK (baby hamster kidney) infectées par le SFV à 5 h p.i. La barre d’échelle représente 200 nm. Les sphères sont localisées dans des endosomes ou lysosomes et certaines sont également à l’extérieur de la cellule. Image d’après Kujala et al. (2001)

2.2 Modifications des membranes par les infections virales

L'établissement des complexes de réplication viraux aux membranes intracellulaires y induisent des réarrangements, visibles en microscopie électronique. Ces structurations membranaires peuvent être regroupées en trois grands ensembles ayant des caractéristiques communes, et sont induites par des facteurs viraux et/ou en association avec des facteurs cellulaires.

2.2.1 Types de structures formées

Les réarrangements des membranes résultant des infections virales peuvent être classés en trois ensembles, décrits ci-après.

2.2.1.1 Sphérules à la surface des membranes

Les infections virales peuvent induire localement des déformations de membranes ressemblant à des vésicules, appelées également « sphérules », qui restent connectées au cytoplasme par des cols étroits. Ces sphérules correspondent à des invaginations des membranes des compartiments ciblés et possèdent une membrane soit simple, soit double.

Les cellules infectées par les *Flavivirus*, dont le virus de la Dengue, présentent des invaginations de 80 à 100 nm de la membrane du RE (Figure I 3). Les reconstitutions en 3D des membranes réarrangées par le DENV montrent un réseau continu des membranes du RE, connectées entre des vésicules et des membranes complexes (CMs). La plupart des vésicules ont des doubles membranes ce qui permet de suggérer qu'elles sont formées à partir d'invaginations dans la membrane du RE (Welsch et al., 2009).

L'infection par certains Alphavirus-like provoque la formation de sphérules invaginées à double membrane, comme observé avec les *Bromovirus* (Schwartz et al., 2002) au niveau de la membrane du RE et avec les *Alphavirus*, *Semliki forest virus* (SFV) ou le *Sindbis virus* (SINV) aux endosomes et lysosomes modifiés. Ces derniers, de 600 à 2000 nm forment des vacuoles cytopathiques (CPVs) présentant à leurs surfaces des petites invaginations de taille homogène d'environ 50 nm (Figure I 4Figure I 5) (Kujala et al., 2001).

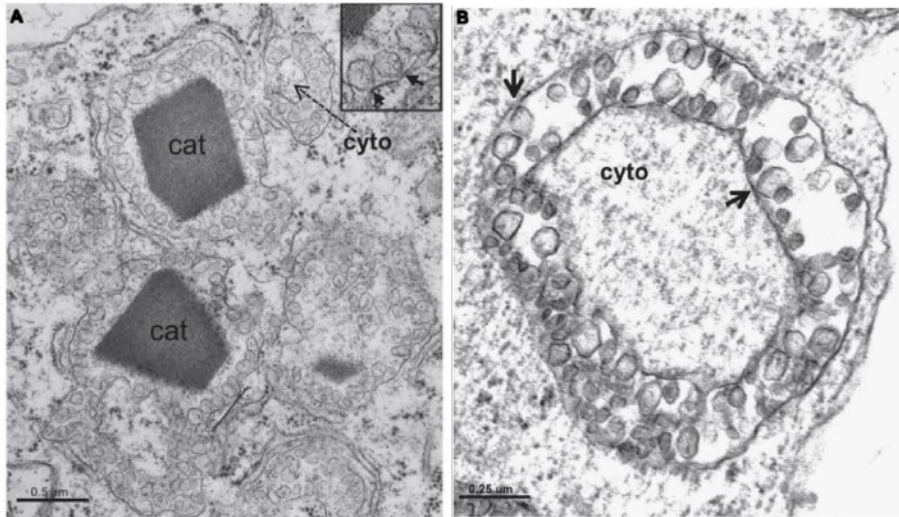


Figure I 5 – Images de microscopie électronique à transmission de corps multivésiculaires (MVBs) induits par un clone infectieux du CNV chez *N. clelandii* (A) et *N. benthamiana* (B).

(A) Regroupement de MVBs, dont deux présentent un cristal de catalase (cat). La flèche en pointillés indique du matériel cytoplasmique présent à l'intérieur d'un peroxyosome en forme de « donut ». L'encadrement en haut à droite détaille des sphérules et les flèches indiquent de possibles cols orientés vers le cytoplasme. (B) Peroxyosome en forme de « donut » avec du cytoplasme (cyto) en son centre et présentant des sphérules, tout le long des membranes, orientées vers le cytoplasme (flèches). La matrice du peroxyosome se trouve entre les deux rangs de sphérules. Images d'après (Rochon et al., 2014).

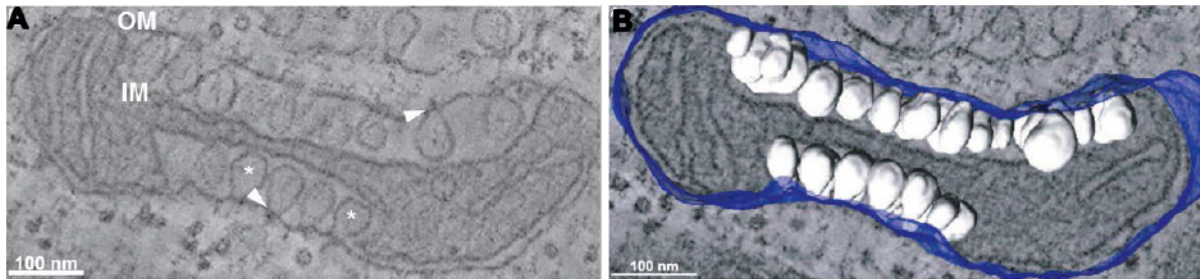


Figure I 6 – Image de microscopie électronique à transmission d'une cellule infectée par le FHV et reconstitution 3D par tomographie des membranes des mitochondries affectées par la présence du virus.

(A) Image de EM en deux dimensions, d'une cellule de drosophile, illustrant les invaginations de la membrane externe des mitochondries, qui sont soit connectées au cytoplasme par des cols dans le plan de la section (pointes de flèches), soit non reliées au cytoplasme (astérisques). OM et IM désignent les membranes externe et interne, respectivement. (B) Reconstitution 3D des images multiples en tomographie montrant la membrane externe (bleu) et les sphérules (blanc). Images d'après Kopek et al. (2007).

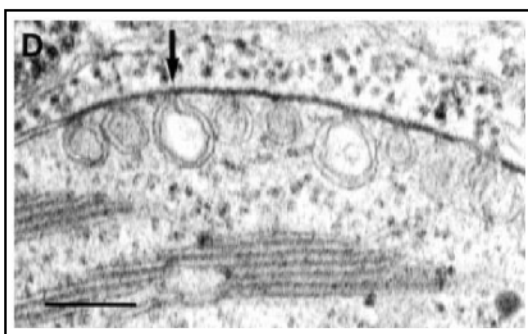


Figure I 7 – Image de microscopie électronique à transmission de feuilles de chou chinois infectées par le TYMV.

La flèche indique une invagination formant un canal dont le col est orienté vers le cytoplasme. La barre d'échelle représente 100 nm.

Images d'après Prod'homme et al. (2001).

Les peroxysomes sont délimités par une membrane simple, qui peut être ciblée par des tombusvirus (McCartney et al., 2005; Rochon et al., 2014), provoquant parfois une réorganisation complète de ce compartiment des corps multivésiculaires (MVBs) (Figure I 5).

Les mitochondries et chloroplastes sont isolés du cytoplasme par une enveloppe constituée d'une membrane externe, séparée d'une membrane interne par un espace inter-membranaire.

Les infections par le FHV ou certains tombusvirus, provoquent la formation de sphérules observées uniquement à la membrane externe des mitochondries (Miller et al., 2001). Ces sphérules consistent en des invaginations de la membrane externe dans l'espace inter-membranaire et restent connectées au cytoplasme (Figure I 6).

En revanche, l'infection par le TYMV des chloroplastes provoquent l'invagination de l'enveloppe, donnant des sphérules à double membrane, toujours connectées au cytoplasme (Figure I 7) (Prod'homme et al., 2001).

2.2.1.2 Vésicules à double membranes (DMVs)

Il a pu être démontré, dans certains cas, que ces vésicules proviennent du RE, bien que le mode de formation ne soit pas élucidé, il pourrait faire intervenir la voie de l'autophagie.

L'infection par le *Poliovirus* (PV) provoque des réarrangements membranaires intracellulaires résultant de la formation de DMVs. L'équipe de Kirkegaard a découvert la colocalisation de marqueurs du RE, du *trans*-Golgi, du TGN et des lysosomes avec ces DMVs, et a proposé que ces structures soient dérivées du processus d'autophagie (Schlegel et al., 1996). Le travail avec les protéines 2BC, 2C et 3A exprimées individuellement, a permis de suggérer que les DMVs du PV soient originaires du RE, ce qui est compatible avec l'hypothèse de l'implication de l'autophagie (Suhly et al., 2000).

L'autophagie résulte de la dégradation d'une partie du cytoplasme cellulaire et peut être initiée en réponse au stress, à l'infection par des pathogènes, ou encore par la restriction pour l'accès aux nutriments. Ce processus commence par la séquestration du contenu cytoplasmique dans une double membrane en forme de croissant, qui évolue en formant des DMVs. Ils sont appelés autophagosomes et leur diamètre varie de 500 à 1500 nm chez les mammifères, et de 400 à 900 nm chez les levures. Dès que les autophagosomes fusionnent avec les endosomes et lysosomes, ils acquièrent des enzymes lysosomales qui dégradent leur contenu interne. L'origine de cette double membrane est encore sujet à débat, car, si les observations en microscopie électronique peuvent suggérer une origine du RE, les autophagosomes contiennent des marqueurs provenant de différents compartiments (revu dans Kirkegaard et al., 2004).

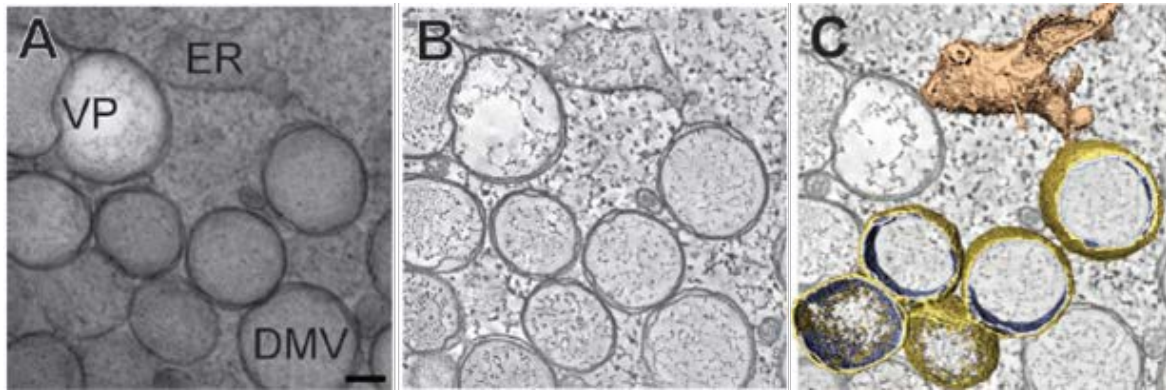


Figure I 8 – Image de microscopie électronique à transmission d’une cellule Vero E6 infectée par le SARS-CoV et reconstitution 3D par tomographie des membranes affectées par la présence du virus.

(A) Image en microscopie électronique à transmission d’une section de 200 nm d’épaisseur, incluse dans de la résine, montrant le RE, un paquet de vésicules (VP) et les regroupements de DMVs. Cellules cryofixées à 7 h p.i. La barre d’échelle représente 100 nm. (B) Tranche de 1,2 nm d’épaisseur issue de la reconstitution de l’assemblage des images de tomographie. (C) Reconstitution en 3D par tomographie révélant la nature interconnectée des DMVs induites par le SARS-CoV. Images de Knoops et al. (2008)

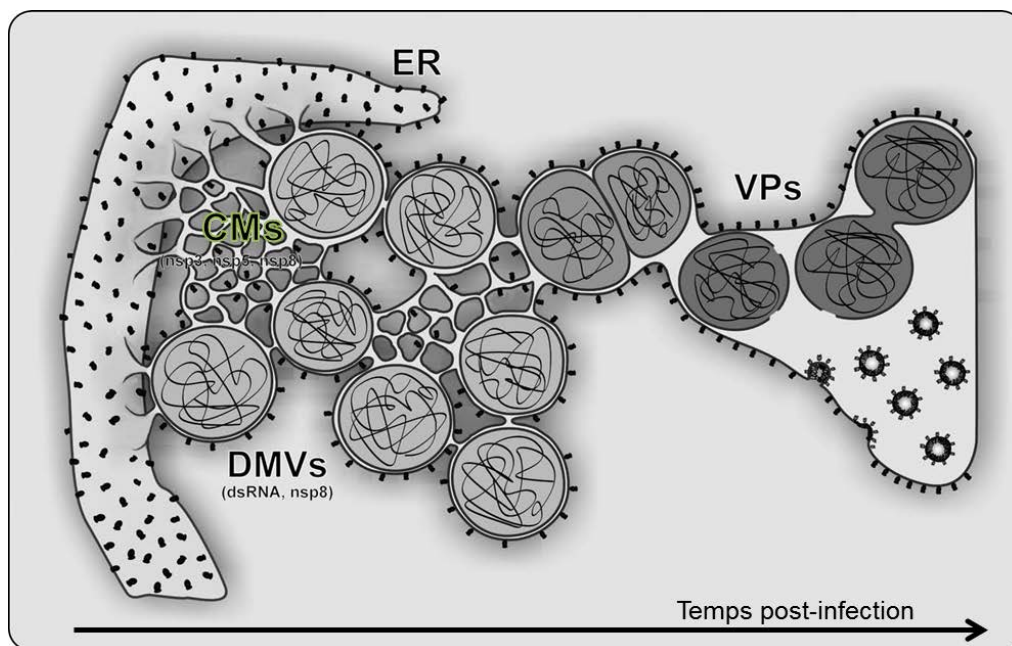


Figure I 9 – Modèle du réseau de membranes modifiées du RE permettant la réplication du SARS.

Basé sur les résultats de tomographie à électrons, ce modèle montre le réseau réticulo-vésiculé, induit par l’infection du SARS, avec lequel sont associés les protéines de la réplication et les ARN doubles brins. Le RE rugueux, mis en évidence par la présence de ribosomes (petits traits noirs épais), est continu et entoure les CMs et les membranes externes des DMVs, et VPs. Les membranes internes des DMVs et l’intérieur des vésicules contiennent les ARN doubles brins. Ce réseau connecte l’ensemble des membranes, reliant les lieux de synthèse de l’ARN et ceux de l’assemblage des virions, contribuant à l’organisation spatiale et temporelle du cycle viral. Les protéines virales non-structurales nsp3, nsp5 et nsp8 sont impliquées dans la réplication du SARS. D’après Knoops et al. (2008).

La reconstitution en trois dimensions des vésicules induites par le SARS, réalisée par Knoops et al. (2008), montre des DMVs entre 150 et 300 nm de diamètre, entourés par deux membranes étroitement apposées et reliées au RE (Figure I 8).

Les DMVs contiennent de l'ARN double brin mais aucune protéine de réplication virale. De plus, ce type de vésicule ne présente aucune ouverture vers le cytoplasme. L'ensemble de ces observations a conduit les auteurs à proposer que ces DMVs serviraient à stocker les ARN viraux produits en excès.

Adjacentes aux DMVs, il est possible d'observer des membranes complexes (CMs) contenant des petites membranes tubulaires, formant un réseau réticulo-vésiculé du RE modifié. Elles abritent les protéines de réplication virale et pourraient donc être le siège de la synthèse des ARN viraux.

L'observation des cellules, à des temps plus tardifs post-infection, permet de voir des paquets de vésicules (VPs) contenant des virions et correspondant à des membranes simples ceintées par la membrane externe du RE. Ces VPs sont connectés aux CMs, permettant probablement le transfert, depuis les CMs vers les VPs, des ARN génomiques à encapsider (Figure I 9). Comme il a été observé que les ribosomes sont localisés à l'extérieur des DMVs, les auteurs ont proposé qu'ils soient impliqués dans les traductions initiales de l'ARN viral. Les protéines ainsi synthétisées ciblent les membranes, y induiraient la formation de vésicules du RE rugueux, et seraient donc directement importées dans ces vésicules. De même, les nouveaux ARN répliqués pourraient aussi être traduits par les ribosomes voisins, à l'origine de nouvelles vésicules.

Toutefois, une étude plus récente regroupant des virus de l'ordre des *Nidovirales*, les coronavirus *Infectious bronchitis virus* (IBV), SARS et *Mouse hepatitis virus* (MHV), et un arterivirus, le *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV), a mis en évidence que la réplication de l'ARN viral n'avait pas lieu dans les DMVs ressemblant aux autophagosomes, dont la taille est réduite d'un tiers. Ils ont proposé que l'activation de l'autophagie ne serait pas requise pour former les DMVs, bien que le marqueur LC3 (Light-chain 3) y soit recruté, et suggèrent que l'activation de cette voie soit en réalité une réponse immunitaire induite par la présence des particules virales (Cottam et al., 2011).

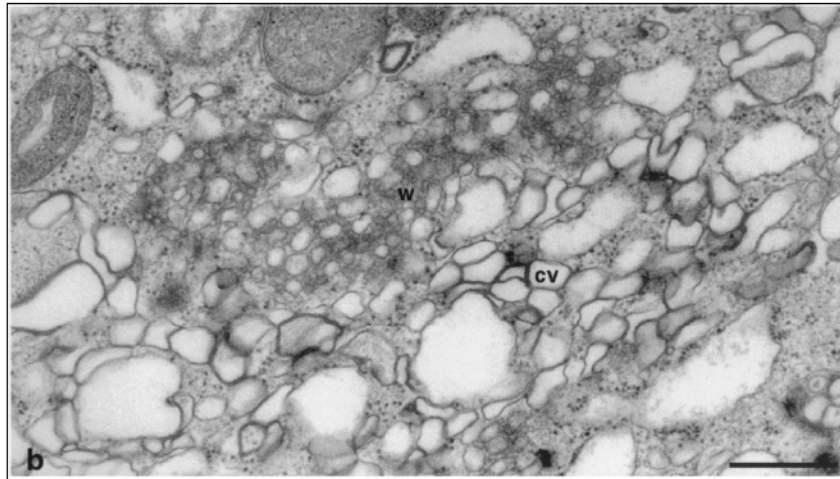


Figure I 10 – Image de microscopie électronique à transmission de cellule exprimant la polyprotéine entière de l'HCV.

Grossissement du « membranous web » (w), entouré par des regroupements de vésicules contiguës (cv). La barre représente 0,5 µm. Image d'après Egger et al. (2002)

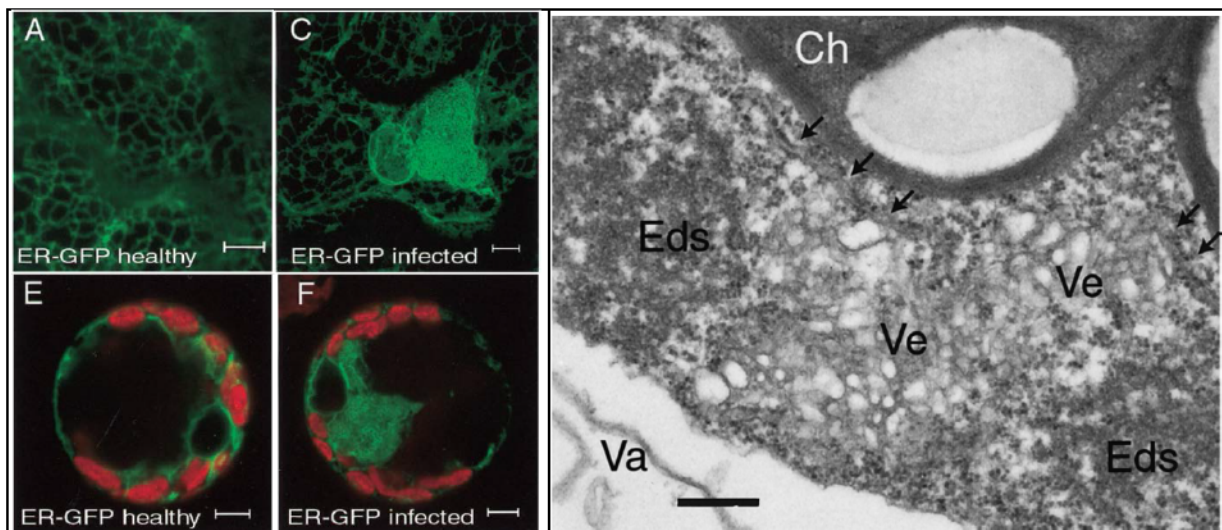


Figure I 11 – Images de microscopie confocale à fluorescence et de microscopie électronique à transmission de cellules saines ou infectées par le CPMV.

Pannel de gauche : microscopie confocale à fluorescence de cellules exprimant mGFP5-ER permettant la visualisation de la réorganisation du RE lors de l'infection virale (A et C) de l'épiderme de *N. benthamiana* et (E F) de protoplastes de mésophylle de niébé (Cowpea). (A et E) cellules saines avec pattern réticulé du réseau cortical du RE (A) et des tubules désorganisés dans le cytoplasme entourant les chloroplastes et le noyau (E). (C et F) cellules infectées par le CPMV avec large excroissance de RE (F) adjacent au noyau (C). (A, E et F) Images sur un plan de la section, (C) projections d'une série de coupes optiques. Le signal GFP est coloré en vert, l'autofluorescence de la chlorophylle en rouge. Les barres d'échelle représentent 5 µm.

Pannel de droite : microscopie électronique de cellules de mésophylle de *N. benthamiana*, portant le transgène codant pour mGFP5-ER. Les flèches indiquent les tubules de RE, localisés près des structures denses aux électrons (Eds) et des petites vésicules membranaires (Ve). Ch, chloroplaste; Va, vacuole. La barre représente 300 nm.

Images adaptées d'après Carette et al. (2000).

2.2.1.3 Extensions de la membrane du RE

Les cellules infectées par l'HCV sont caractérisées par la présence d'une multitude de petites vésicules, issues du bourgeonnement du réticulum endoplasmique rugueux (RER), incluses dans un réseau de membranes, appelé « membranous web ». D'autres vésicules sont y parfois étroitement associées (Figure I 10) (Egger et al., 2002).

L'infection de cellules végétales par le CPMV provoque une prolifération de la membrane du RE, comme démontré par les images de microscopie à épifluorescence de cellules exprimant un marqueur du RE fusionné à la GFP (Figure I 11A). L'observation en microscopie électronique des cellules infectées a permis de montrer la présence de nombreuses petites vésicules en périphérie du RE (Figure I 11B) (Carette et al., 2000).

2.2.2 Déterminants responsables des réarrangements membranaires

Suite aux observations des modifications membranaires lors des infections virales, les problématiques concernant les mécanismes sous-jacents à l'origine de ces réarrangements ont été posées. Des déterminants viraux et/ou cellulaires ont parfois pu être identifiés et leurs implications décryptées, au moins partiellement.

2.2.2.1 Déterminants viraux pour l'adressage et l'association aux membranes des complexes de réplication

Comme mentionné précédemment, les complexes de réplication viraux, incluant les protéines non-structurales, dont la RdRp, sont localisés au niveau des membranes intracellulaires. Les recherches effectuées sur différentes protéines virales ont mis en évidence plusieurs déterminants impliqués dans leur adressage et leur association aux membranes ciblées.

- Domaines hydrophobes au sein des protéines non-structurales virales

L'association de protéines avec les membranes est possible notamment grâce à des domaines transmembranaires ou à des hélices amphipathiques qui permettent l'incorporation de la protéine dans la bicouche lipidique. Les domaines transmembranaires permettent de traverser l'épaisseur de la membrane, tandis que les hélices amphipathiques s'insèrent dans l'une des couches, leur côté hydrophile étant contact avec les têtes polaires des lipides, et son opposé hydrophobe, en interaction avec leurs queues hydrophobes.

Parmi les différentes protéines non-structurales caractérisées chez les virus à ARN(+), certaines possèdent à la fois des domaines transmembranaires et des hélices amphipathiques, comme rapporté pour les réplicases apparentées du *Coupea mosaic virus* (CPMV), du *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), du *Tomato ringspot virus* (ToRSV) et du PV (Han and Sanfaçon, 2003; Sanfaçon, 2013; Zhang and Sanfaçon, 2006; Zhang et al., 2005) ou encore pour la protéine NS4B de l'HCV (Gouttenoire et al., 2009a) et du DENV (Stern et al., 2013).

La réplication du FHV et du CIRV est réalisée à la membrane externe des mitochondries. Des domaines transmembranaires de leurs protéines A et 36K, respectivement, ont été identifiés et montrés comme suffisants pour localiser la protéine entière aux mitochondries (Miller and Ahlquist, 2002; Weber-Lotfi et al., 2002). Il en va de même des protéines 3AB et 3A du PV (Towner et al., 1996) et NS5B de l'HCV (Dubuisson et al., 2002) qui présentent un domaine transmembranaire en C-terminal de leur séquence, permettant leur association post-traductionnelle avec les membranes.

De nombreuses protéines virales, impliquées dans la liaison des complexes de réplication aux membranes, contiennent des hélices amphipathiques telles NsP1 du SFV (Lampio et al., 2000; Spuul et al., 2007), 1a du BMV (Liu et al., 2009), NS5A de l'HCV (Brass et al., 2002; Elazar et al., 2003, 2004; Gouttenoire et al., 2009a, 2009b), 2C des picornavirus *human enterovirus 71* (hEV71), *coxsackie virus 18* (CAV 18), *human rhinovirus 14* (HRV14), *foot-and-mouth disease virus* (FMDV) et *encephalomyocarditis virus* (EMCV) (Teterina et al., 2006). Ces auteurs ont par ailleurs montré que les hélices amphipathiques des protéines 2C des poliovirus cités ci-dessus, et de la protéine NS5A de l'HCV, sont très conservées et interchangeables.

Une analyse récente du domaine méthyltransférase-guanylyltransférase (MTase-GTase) des réplicases des alphavirus-like a montré que si leur séquence peptidique n'était pas toujours conservée, leurs structures secondaires le sont (Ahola and Karlin, 2015). Elles auraient en commun des hélices alpha amphipathiques, en C-terminal de leur séquence, qui seraient impliquées dans l'interaction avec les membranes. Ces auteurs ont également comparé les séquences des MTase-GTPase des nodavirus, entre eux et avec les alphavirus-like, et ont relevé des similitudes dans les structures secondaires. Toutefois, les modes d'associations aux membranes chez les nodavirus semblent moins conservés, mais font intervenir des domaines transmembranaires et des hélices.

- *Acylations des protéines non-structurales virales*

Les modifications post-traductionnelles, consistant en l'ajout d'un groupement lipidique sur une protéine pour permettre son interaction avec les membranes, ont été rapportées pour la protéine Nsp1 des alphavirus SFV et SINV (Ahola et al., 2000; Lampio et al., 2000; Spuul et al., 2007). Ces auteurs ont démontré que certaines de leurs cystéines sont palmitoylées, mais que ces modifications ne sont pas essentielles pour l'infection virale et que l'adressage aux membranes est dirigé par l'hélice amphipathique située en aval.

Il a également été rapporté que la protéine NS4B de l'HCV possède deux résidus cystéine bien conservés entre les différents variants génotypiques testés. Leur palmitoylation est requise à la fois pour l'interaction avec les autres protéines non-structurales des complexes de réplication et pour la réplication virale (Yu et al., 2006).

- *Interactions indirectes aux membranes des protéines non-structurales virales*

Certaines protéines virales des complexes de réplication sont dépourvues de domaine permettant l'interaction avec des membranes. Leur localisation membranaire est alors assurée indirectement via une interaction étroite avec d'autres protéines des complexes étant ancrées dans les membranes.

Ainsi, pour la protéine 2a du BMV, son interaction avec la protéine 1a permet sa localisation aux sphérules abritant les complexes de réplication (Chen and Ahlquist, 2000).

De même, la polymérase du TYMV est recrutée à l'enveloppe des chloroplastes via son interaction avec la protéine non-structurale 140K (Prod'homme et al., 2003).

Pour le KUNV, les protéines non-structurales et hydrophobes NS2A et NS4A interagissent avec les autres composants des complexes de réplication, dont NS3 et NS5, et pourraient être responsables de leur recrutement (Mackenzie et al., 1998).

Enfin, chez le SFV, la polyprotéine P123 interagit avec la protéine Nsp1 pour être recrutée aux membranes et permettre la réplication virale (Spuul et al., 2007).

- Interactions entre protéines virales responsables des modifications de membranes

Il a été démontré que la protéine NS4B de l'HCV est capable d'oligomériser principalement par son hélice amphipathique en partie N-terminale (AH2) (Gouttenoire et al., 2010). Les auteurs proposent que cette oligomérisation soit requise pour constituer le réseau membranaire nécessaire à la réplication virale et à la formation des complexes de réplication faisant intervenir différents partenaires viraux. Un autre exemple d'oligomérisation est fourni avec la protéine NS4A du DENV, qui, de plus, possède une région C-terminale hautement hydrophobe constituée par quatre domaines transmembranaires (Miller et al., 2007). D'après ces auteurs, les protéines ancrées dans les membranes seraient responsables des déformations locales de membranes, qui seraient amplifiées par leur oligomérisation et aboutiraient aux déformations observées. Ils ont par ailleurs établi le parallèle avec les travaux de Yu et al. (2006) sur la protéine NS4B de l'HCV. Celle-ci nécessite au préalable d'être palmitoylée pour établir des interactions protéines-protéines. Les chercheurs ont alors suggéré que ces interactions entre protéines soient à l'origine des déformations de membranes lors de l'infection virale, et de la formation de supports nécessaires à l'assemblage du complexe de réplication.

Au cours de l'infection par le PV, il a été montré que la protéine 3A est associée au RE lorsqu'elle est exprimée seule, tandis que, lors de sa co-expression avec la protéine 2BC, elle est observée relocalisée aux membranes (Suhy et al., 2000). Les auteurs suggèrent donc que l'interaction entre les protéines virales est responsable des modifications de la membrane du RE évoluant vers la formation des vésicules observées lors de l'infection virale.

Comme dans le cas de la protéine 1a du BMV, les changements membranaires peuvent aussi être dépendants de la quantité de protéine exprimée, ainsi que des interactions en oligomères avec elle-même ou avec ses protéines partenaires virales (Schwartz et al., 2004). En effet, dans cet exemple, les niveaux d'expression des protéines virales, 1a et 2a^{pol}, seules ou en interaction, ont pu être modulés provoquant des changements dans l'organisation des membranes, depuis de petites vésicules invaginées jusqu'à de larges piles de doubles membranes en couches multiples.

- Rôle(s) putatif(s) de l'ARN

Élément incontournable des complexes de réplication viraux, l'ARN génomique pourrait jouer un rôle dans l'association aux membranes de ces complexes.

En ce sens, Kopek et al. (2010) ont démontré que la protéine A du FHV est nécessaire mais pas suffisante pour la formation des sphérules à la membrane externe des mitochondries. En effet, la présence de l'ARN1 est requise pour cette formation de sphérules ainsi que l'activité polymérase de la protéine A.

Plus récemment, Ibrahim et al. (2012) ont recherché la localisation des protéines de réplication P1 et P2 de l'AMV, seules ou en présence soit de cDNAs de l'AMV, soit de l'ARN génomique. L'expression de la protéine P1 seule induit sa localisation au niveau des compartiments prévacuolaires et elle y recrute la protéine P2 lorsqu'elles sont co-exprimées. En revanche, la co-expression de ces protéines avec les ARN complets de l'AMV permet la localisation de la protéine P1 au tonoplaste, siège de la réplication virale en contexte infectieux. Ainsi, la présence de l'ARN est nécessaire pour la localisation appropriée des complexes de réplication. Toutefois, la protéine de capsid est également présente et pourrait avoir un rôle dans cette localisation des complexes de réplication.

Ces exemples illustrent donc la contribution des molécules d'ARN pour la formation et la localisation des complexes de réplication aux membranes ciblées.

Néanmoins, si pour l'ARN3 du BMV sa séquence d'association avec la protéine 1a a été identifiée (Sullivan and Ahlquist, 1999) et permet la localisation de l'ARN au sein des complexes, la protéine 1a ne nécessite pas l'interaction préalable à l'ARN pour se lier aux membranes du RE et y induire les sphérules caractéristiques (Chen and Ahlquist, 2000).

Ainsi, l'implication de l'ARN viral pour la formation et l'adressage des complexes de réplication n'est pas universellement requise et il pourrait être intéressant d'adresser la problématique pour d'autres virus ciblant d'autres membranes.

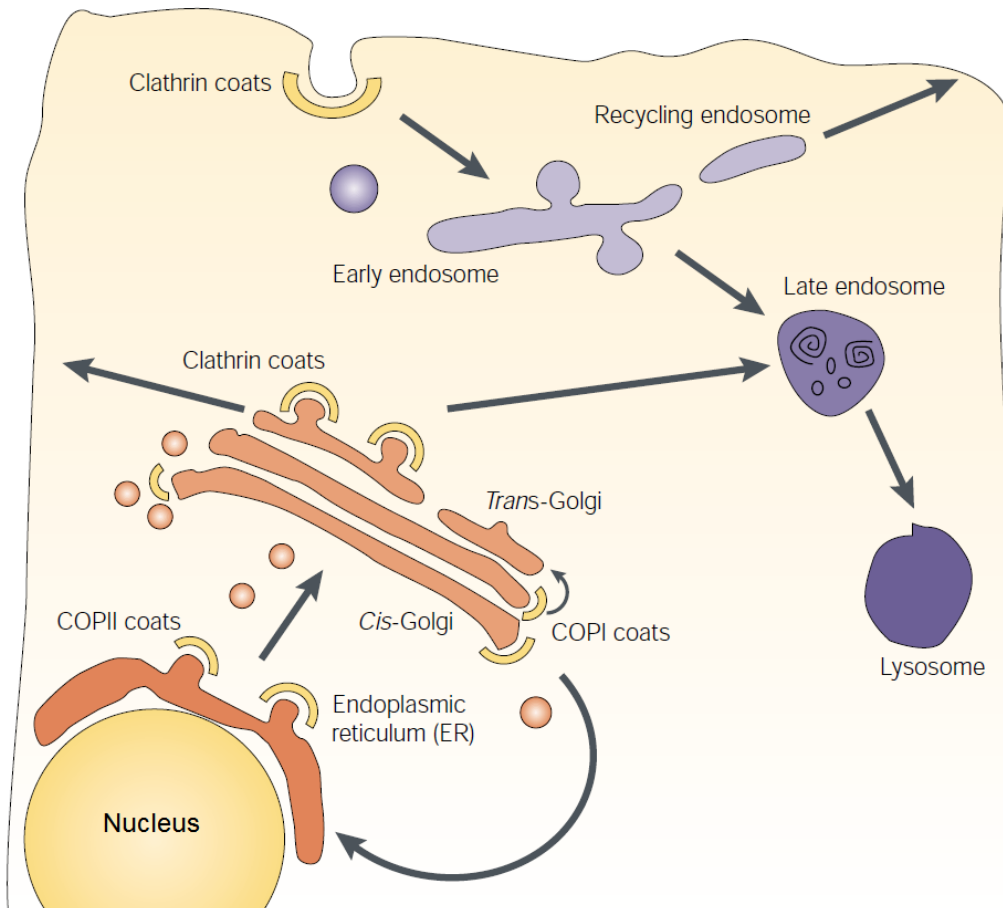


Figure I 12 – Schématisation des voies de trafic intracellulaires majeures en cellules eucaryotes.

La voie de sécrétion dépend des trafics entre le RE et le Golgi (couleurs orangées) : les molécules synthétisées sont transportées dans des vésicules recouvertes de COPII du RE vers la citerne du *cis*-Golgi, puis dans des vésicules recouvertes de COPI jusqu'à atteindre le réseau *trans*-Golgien. Les vésicules COPI assurent également le transport rétrograde entre le Golgi et le RE. La sortie des molécules se fait alors dans des vésicules recouvertes de clathrine, soit en direction de la membrane plasmique ou des endosomes. La voie dépendante des endosomes (couleurs violettes) permet d'internaliser des macromolécules par endocytose depuis la membrane plasmique, via des vésicules à clathrine, vers des endosomes précoces. De là, elles sont soit recyclées à la membrane plasmique, en passant par les endosomes de recyclage, soit dégradées en passant par les endosomes tardifs et les lysosomes. Figure d'après (Kirchhausen, 2000).

Outre les déterminants viraux impliqués dans la réplication de l'ARN génomique, des facteurs cellulaires sont retrouvés au sein des complexes ou interagissant transitoirement avec les protéines virales.

2.2.3 Voies et facteurs cellulaires détournés pour l'adressage des protéines virales

Les voies et facteurs cellulaires sont impliqués à plusieurs niveaux des cycles viraux, que ce soit pour le recrutement de l'ARN et la synthèse des brins complémentaires, ou pour l'aide à la conformation des protéines virales, ou encore pour leur recrutement au niveau des membranes et leur assemblage en complexes.

2.2.3.1 Protéines cellulaires impliquées dans l'adressage aux membranes ciblées

Le genre des *Tobamovirus* fait partie du supergroupe des Alphavirus-like, et est représenté, notamment, par le *Tobacco mosaic virus* (TMV) et le *Tomato mosaic virus* (ToMV). Ces virus ont la particularité de se répliquer seulement si les protéines intégrales du tonoplaste, TOM (Tombamovirus multiplication) sont exprimées par la plante (Ishikawa et al., 1993; Nishikiori et al., 2006). Toutefois, les protéines de réplication du TMV ont été localisées au RE par immunofluorescence (Heinlein et al., 1998), alors que celles du ToMV sont associées de manière prédominante avec le tonoplaste, mais également avec des fractions membranaires moins bien définies, incluant celles du RE, comme démontré par microscopie à fluorescence et des méthodes biochimiques de fractionnement (Hagiwara et al., 2003). La nature des membranes impliquées dans la réplication de ces deux virus n'est donc pas encore complètement élucidée.

Quant au TBSV, il requiert la protéine de navette peroxysomale PEX19, nécessaire pour la formation des membranes des peroxysomes, et la chaperonne heat shock protein 70 (HSP70) pour cibler les protéines virales aux peroxysomes (Dufresne et al., 2008; Jonczyk et al., 2007; Wang et al., 2009).

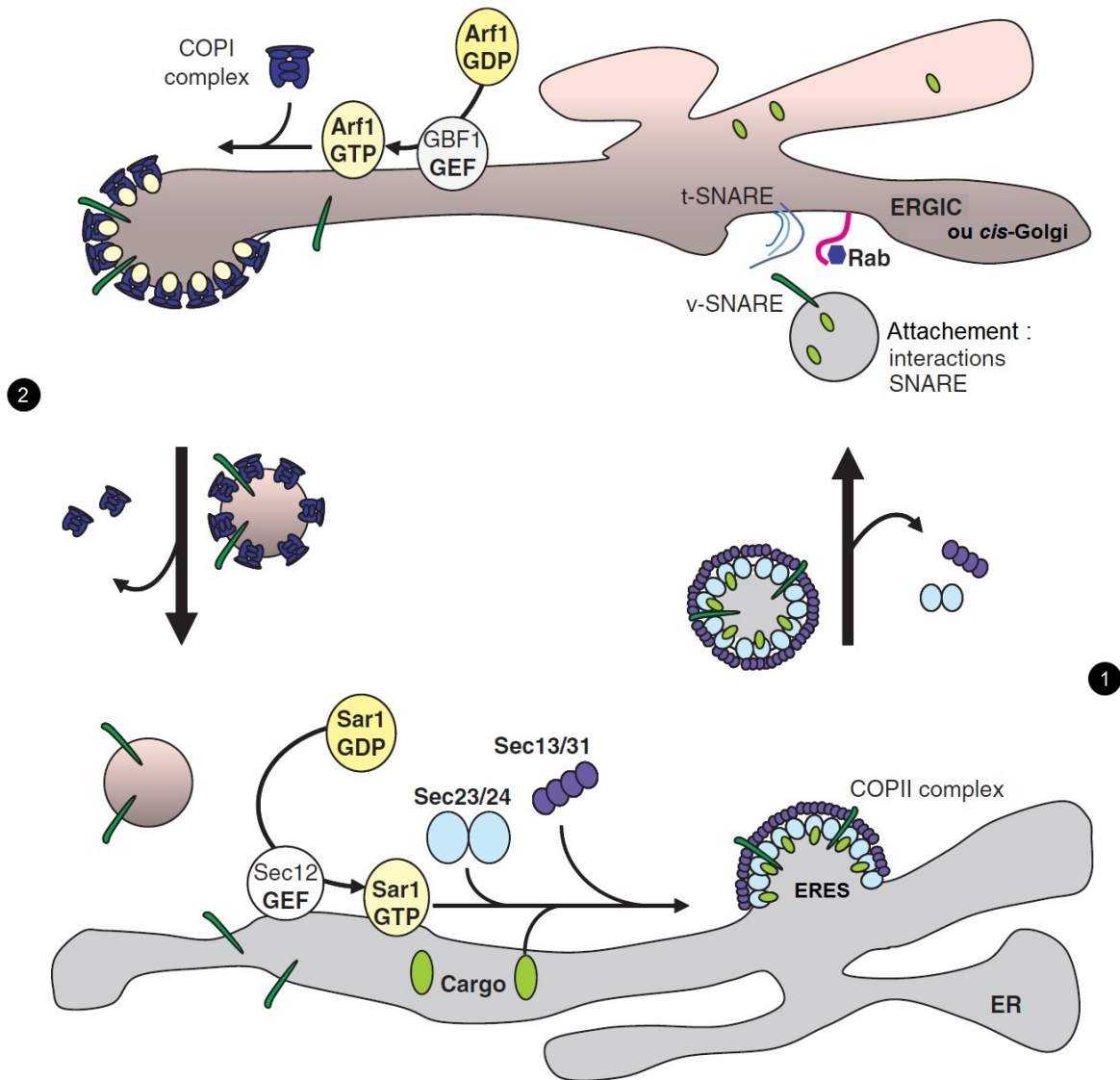


Figure I 13 – Schématisation du trafic des protéines dans la voie de sécrétion précoce.

1. Transport antérograde depuis le RE vers l'ERGIC ou le *cis*-Golgi, via les vésicules recouvertes de COPII. La formation des manteaux COPII est régulée par le Sar1p-GTPase. L'attachement de Sar1p avec le RE requiert la liaison de GTP, processus facilité par la protéine d'échange de GTP (GEF) Sec12. Sar1p-GTP recrute les sous-complexes Sec23-Sec24p (bleu clair) du manteau COPII, ce qui permet le recrutement des protéines de cargo (vert clair), vers les sites de sorties du RE (ERES), et des protéines Sec13-Sec31p (violet), qui induisent la courbure de membrane et la formation de vésicules. L'hydrolyse du GTP de Sar1p par Sec23p a pour conséquence de désassembler le manteau COPII. La vésicule s'arrime ensuite aux membranes du ERGIC (ou *cis*-Golgi) par l'attachement de ses protéines, et les interactions entre v-SNARE et t-SNARE permettent la fusion de la protéine.

2. Transport rétrograde depuis l'ERGIC (ou *cis*-Golgi) vers le RE pour rapporter les protéines du Golgi et du ERGIC au RE, via les vésicules recouvertes de COPI. La formation des manteaux de COPI est régulée par l'Arf1-GTPase. L'interaction d'Arf1 avec l'ERGIC requiert la liaison de GTP, facilitée par les protéines GEF GBF1 ou BIG1/2. Arf1-GTP recrute les complexes de manteau de COPI (bleu foncé) du cytosol, provoquant la courbure des membranes et la formation de vésicules adressée au RE. L'hydrolyse d'Arf1-GTP, par une protéine activatrice d'Arf1-GTP (Arf-GAP), conduit à la dissociation du manteau COPI.

Figure d'après (Netherton et al., 2007).

2.2.3.2 Détournement de la voie de sécrétion

Les voies de trafic intracellulaire impliquent celles de la sécrétion des protéines et de l'endocytose (Figure I 12).

Il a été rapporté que les répliquions virales du PV et de l'HCV sont empêchées lorsque les cellules infectées sont traitées par la bréfeldine A (BFA). Cette drogue cible GBF1 (Figure I 13), en bloquant l'activation d'Arf1 (Richter et al., 2007). En conséquence, la production de vésicules COPI est inhibée. Cependant, l'expression des protéines du PV et de l'HCV en présence de BFA se traduit par l'apparition de nouvelles structures membranaires, non différenciables de celles observées sans la drogue, ce qui indique que GBF1 est probablement impliqué plutôt dans le fonctionnement que dans la formation des complexes de répliquion (Belov and van Kuppeveld, 2012).

Un autre exemple, bien documenté, de l'utilisation de la voie de sécrétion de l'hôte par un virus, est fourni par les potyvirus *Tobacco etch virus* (TEV) et *Turnip mosaic virus* (TuMV). La répliquion virale a lieu au niveau de vésicules localisées aux chloroplastes. Il a été démontré que ces vésicules sont induites par la protéine virale non-structurale 6K, en interagissant avec les protéines Sar1, Sec23 et Sec24 au niveau des ERES (Figure I 13). Ces vésicules transitent ensuite dans la cellule via les microfilaments d'actine ; l'infection est également dépendante de la voie des COPI (Figure I 12 et Figure I 13) (Cotton et al., 2009; Cui et al., 2010; Grangeon et al., 2012; Wei and Wang, 2008; Wei et al., 2010). La fusion des vésicules induites par la 6K, avec les chloroplastes est réalisée par la protéine SNARE Syp71. Cette protéine interagit indirectement avec la protéine 6K et elle est essentielle pour l'infection virale (Wei et al., 2013).

2.2.3.3 Utilisation des protéines cellulaires impliquées dans le modelage des membranes

- Recrutement des protéines ESCRT

La voie dépendante des endosomes est employée par les cellules pour trier les protéines, en régulant par endocytose celles situées à la membrane plasmique, ou en triant les nouvelles protéines membranaires synthétisées présentes dans les vésicules issues du *trans*-Golgi vers les endosomes, les lysosomes ou la membrane plasmique (Figure I 12). Cette voie fait intervenir en particulier les protéines ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) qui jouent un rôle majeur dans le tri des protéines de cargo depuis la membrane des endosomes vers le lumen, via des invaginations de membranes et la formation de corps multivésiculaires (MVBs).

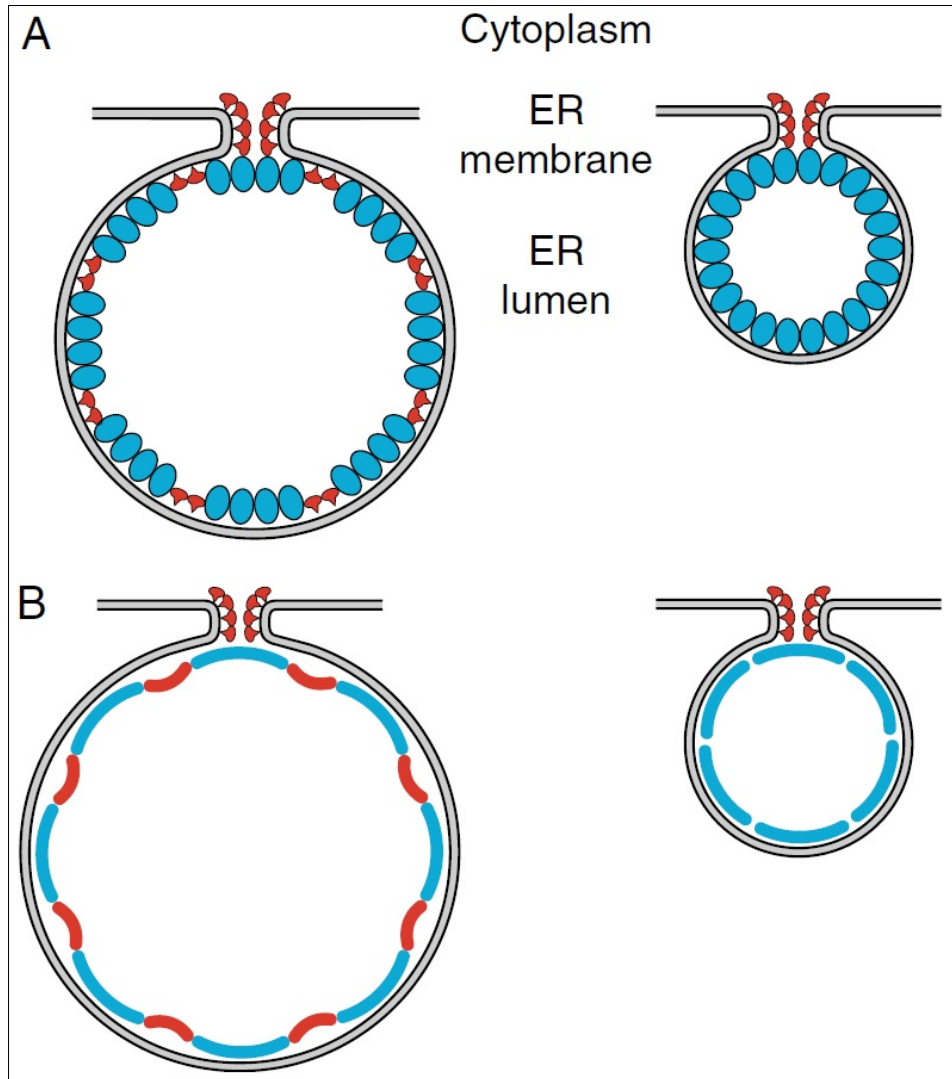


Figure I 14 – Modèles des rôles potentiels des RHPs dans la formation et/ou la maintenance des sphérules induites par le BMV.

(A) Le schéma des sphérules du BMV montre comment la protéine 1a (bleue) peut induire et stabiliser la courbure négative de la membrane dans le corps de la vésicule, tandis que les multimères RHPs forment des arcs (rouges) pouvant stabiliser la courbure positive des cols tout en étant aussi incorporée dans le corps de la vésicule.

(B) Le schéma indique la protéine 1a et les groupes de RHPs en arcs (bleus et rouges, respectivement) pour montrer que l'expansion de la taille de la sphérule, contenant des RHPs en (A), est essentiellement due à l'action des RHPs. Ils neutralisent partiellement le taux intrinsèque de la courbure de la membrane induite par la protéine 1a seule.

Figure d'après (Diaz et al., 2010)

Il a été démontré que les tombusvirus, tel le TBSV, se répliquent au niveau de la membrane des peroxysomes en recrutant différentes protéines ESCRT. Ainsi, la protéine non-structurale p33 virale, ubiquitylée, interagit avec la protéine Vps23 (protéine ESCRT-I) et Bro1 (un facteur ESCRT accessoire) qui sont alors relocalisés aux peroxysomes. S'ensuit un recrutement des protéines ESCRT-III (Snf7 and Vps24) permettant l'assemblage optimal des complexes de réplication, facilitant la colocalisation des protéines virales de réplication p33 et p92 dans une zone restreinte de la membrane, et promouvant la formation de sphérules par déformation des membranes, ou par « stabilisation » les cols des sphérules. La réplication virale est dépendante de ces protéines ESCRT, pour la formation des complexes de réplication aux membranes des peroxysomes. Puis les protéines ESCRT sont détachées des complexes viraux et recyclées (Barajas et al., 2009).

- Recrutement des réticulons et RHPs

Les protéines RHPs correspondent à l'ensemble des protéines ayant un domaine d'homologie avec les réticulons. Les réticulons sont un groupe de protéines responsables de la mise en forme des membranes du RE, en cloisonnant et stabilisant les tubules des membranes du RE, qui sont fortement courbées. Les RHPs ont la propriété d'oligomériser, ce qui pourrait être important pour leur aptitude à former les domaines tubulaires du RE et à y être localisées. L'oligomérisation pourrait aussi jouer un rôle dans l'induction et la stabilisation de la courbure de la membrane (Diaz and Ahlquist, 2012).

La protéine 1a du BMV interagit avec elle-même et est indispensable pour la formation des sphérules (Schwartz et al., 2002). Ces auteurs ont proposé que la protéine 1a tapisse l'intérieur des sphérules en formant un manteau, qui contribuerait à la formation et à la maintenance de la déformation des membranes. Les RHPs sont requises pour une réplication efficace en levure du BMV : la protéine 1a interagit avec les RHPs et les incorpore à l'intérieur des sphérules (Diaz et al., 2010). Dans le corps des sphérules, les RHPs auraient alors un rôle antagoniste des protéines 1a, qui induisent la courbure négative, expliquant la forme et la taille réduite des invaginations, en l'absence de RHPs. De par leur fonction, les RHPs seraient également impliquées dans la formation et le maintien des cols des sphérules.

L'implication des réticulons a également été démontrée lors d'infections par des picornavirus. En effet, la protéine RTN3 (human reticulon 3) interagit avec les protéines 2C du PV, *Coxsackievirus A16* et *Entérovirus 71*. Les protéines 2C sont les plus conservées chez les picornavirus et sont impliquées dans la formation des vésicules associées aux compartiments de réplication (Tang et al., 2007).

La protéine RTN3 a également été retrouvée impliquée dans la formation des compartiments de réplication de l'HCV, dans lesquels elle interagit avec la protéine NS4B (Wu et al., 2014). Ces chercheurs ont d'abord proposé que la protéine RTN3 aide la protéine NS4B pour la formation du réseau membranaire. Or, ils ont constaté que la protéine RTN3 affecte la réplication virale en se liant au domaine AH2, structuré en hélice alpha. Cette hélice AH2 est normalement impliquée dans l'oligomérisation de la protéine NS4B, processus requis pour la réplication virale (Gouttenoire et al., 2010). Donc, la protéine RTN3 est en compétition avec l'oligomérisation des protéines NS4B. Puisque la protéine RTN3 est impliquée dans la stabilisation du RE, Wu et al. (2014) ont proposé qu'elle contre l'action de la protéine NS4B, qui induit les réarrangements des membranes du RE.

2.2.3.4 Implications des lipides

Composants majoritaires des membranes cellulaires, les lipides sont depuis longtemps soupçonnés de jouer un rôle dans les réplifications virales. Les travaux de Wu et al. (1992) sur la synthèse *in vitro* de la réplication de l'ARN du FHV ont permis de montrer qu'une composition particulière en lipides influence la réplication virale. Dans cet exemple, ils ont montré que la présence de glycérophospholipides (GPL) était nécessaire pour la réplication virale, contrairement aux lipides cationiques, et que la longueur et la saturation de la chaîne acyl des phosphatidylcholines influençaient également la synthèse de l'ARN. Ils ont par ailleurs proposé que la présence de GPL permette l'activation de la polymérase.

Confortant cette suggestion, Ahola et al. (1999) ont montré que l'activité de l'enzyme de coiffe du SFV nécessite son association avec les phospholipides anioniques de la membrane. De même, l'initiation de la synthèse d'ARN du BMV requiert la présence d'acides gras insaturés, comme démontré par l'absence de réplication dans des levures mutantes pour l'enzyme responsable de la synthèse de ces lipides (Lee et al., 2001).

La modification de la synthèse des lipides induit des changements dans leur métabolisme et dans la composition et la fluidité des membranes.

Des cofacteurs impliqués dans le métabolisme des lipides sont utilisés par des entérovirus et l'HCV.

La liaison de la protéine 3A des entérovirus au GBF1 active Arf1 (Belov et al., 2007) et augmente le recrutement aux membranes d'un effecteur protéique alternatif d'Arf1, le phosphatidylinositol-4-kinase III β (PIAIII β) (Hsu et al., 2010). Le détournement de cette protéine conduit à l'enrichissement du compartiment membranaire en lipides phosphoinositides, tel le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P), facilitant le recrutement de la RdRp, 3D^{pol}, puisqu'elle se lie sélectivement aux PI4P. Ces lipides influencent à la fois l'association de la polymérase aux membranes et sa capacité à synthétiser de l'ARN.

L'infection par l'HCV, ou l'expression de sa protéine NS5A, stimule la production cellulaire de PIAP, en interagissant avec l'enzyme PIAKIII α , dont l'activité est requise pour la formation du réseau de membranes abritant les complexes de réplication (Reiss et al., 2011).

Il a également été démontré que la protéine de coiffe du SFV nécessite une liaison à la phosphatidylsérine pour être active. Ainsi, l'association de la protéine à des lipides particuliers pourrait entraîner un changement de conformation de la protéine, indispensable à son activité (Ahola et al., 1999).

L'emploi de la céruléine, un antibiotique issu de champignon, qui inhibe la synthèse *de novo* de phospholipides, dans les premiers temps de l'infection de cellules par le SFV - entre 0 et 1 h p.i. - bloque la réplication virale, alors que l'effet est moindre dès 2 h p.i. (Perez et al., 1991). Ces résultats ont permis aux auteurs de suggérer que l'infection par le SFV induit la synthèse de phospholipides pendant les premières heures de l'infection virale. En employant différentes concentrations de céruléine, Carette et al. (2000) ont également démontré que la réplication du CPMV nécessite la synthèse *de novo* de lipides, contrairement à celles du TMV et de l'AMV. Puisque le CPMV cible le RE, site de synthèse de la majorité des phospholipides, ils ont proposé que le CPMV stimule cette synthèse conduisant à la prolifération du RE et à la formation de vésicules observées lors de l'infection virale. De même, il a été démontré que le GFLV (Ritzenthaler et al., 2002) et le PVX (Bamunusinghe et al., 2009) nécessitent la synthèse *de novo* de lipides pour leur réplication.

Les virus ne requièrent pas uniquement une composition particulière en lipides pour la formation appropriée de leurs complexes mais peuvent stimuler, *de novo*, la synthèse de lipides. Dans le cas des infections par le *West Nile virus* (WNV) ou le DENV, des enzymes de synthèse du cholestérol et le cholestérol cellulaire sont redistribués aux complexes de réplication (revu dans Heaton and Randall, 2011).

Enfin, l'ajout d'inhibiteurs de la géranylgeranylation provoque la dissolution des complexes de réplication de l'HCV. L'assemblage de ces complexes, ainsi que la réplication de l'HCV, peuvent être restaurés par l'addition de geranylgeraniol, un donneur de groupes prenyl. Puisque le génome ne code pas pour des protéines pouvant être géranylgeranylées, les auteurs ont proposé que l'infection nécessite la présence de protéines de l'hôte possédant ce type de modification post-traductionnelle (Ye et al., 2003).

2.3 Conclusion

En laboratoire, certains virus, tels le FHV (Miller and Ahlquist, 2002), le TBSV (Yamamura and Scholthof, 2005) ou encore le BMV (Chen and Ahlquist, 2000), sont capables de se répliquer dans d'autres organismes que ceux naturellement ciblés, signifiant leur aptitude à exploiter les membranes de leurs hôtes. Dans le cas du FHV qui infecte les insectes en ciblant leurs mitochondries, la réplication peut également être réalisée en levure, avec réarrangements des membranes mitochondriales, alors que leur composition diffère de celles des insectes. Afin de comprendre si la nature de la membrane - celle de la mitochondrie pour le FHV- ou si la présence d'une membrane sont requises pour la réplication virale, la séquence d'adressage aux membranes mitochondriales a été échangée avec des séquences d'adressage pour le RE provenant soit de protéines de levure, soit de la protéine NS5B du virus de l'hépatite C (HCV). Ces échanges ont permis la réplication virale, tandis que les réarrangements membranaires étaient localisés aux membranes du RE (Miller et al., 2003).

Ces résultats obtenus avec le FHV sont en adéquation avec ceux obtenus avec le TBSV, qui se réplique au niveau de la membrane peroxysomale. En effet, faute de peroxysome, les protéines du TBSV ciblent la membrane du RE et permettent la réplication virale. Les auteurs suggèrent donc que les virus à ARN ont une certaine flexibilité dans l'utilisation des membranes intracellulaires ciblées, qui semblent néanmoins requises pour la réplication (Jonczyk et al., 2007).

Il a également été démontré que la construction de virus chimériques à partir d'échanges de séquences génomiques entre les tombusvirus CymRSV et le CIRV, se répliquant respectivement aux peroxysomes et aux mitochondries, permet les réplifications virales (Burgyan et al., 1996).

Ces quelques exemples illustrent la flexibilité de certains virus pour utiliser une membrane - pas toujours celle préférentiellement ciblée - pour assembler leurs complexes de réplication.

Si les virus à ARN(+) ciblent les membranes intracellulaires pour leur réplication, le(s) rôle(s) de celles-ci n'est (ne sont) pas encore bien compris. Il a été proposé (i) qu'elles servent de support physique pour l'organisation des complexes de réplication (Schlegel et al., 1996), (ii) qu'elles permettent la compartimentation et la concentration locale des produits viraux (Schwartz et al., 2002), (iii) qu'elles contribuent à l'apport de constituants lipidiques requis pour la réplication (Ahola et al., 1999; Wu et al., 1992) et (iv) qu'elles offrent la protection contre la défense de l'hôte, dirigée contre les formes d'ARN doubles brins, intermédiaires de réplication ou de la structuration secondaire de l'ARN (revu dans Voinnet, 2005).

Pour explorer ces différentes problématiques, nous travaillons au laboratoire avec le *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV).

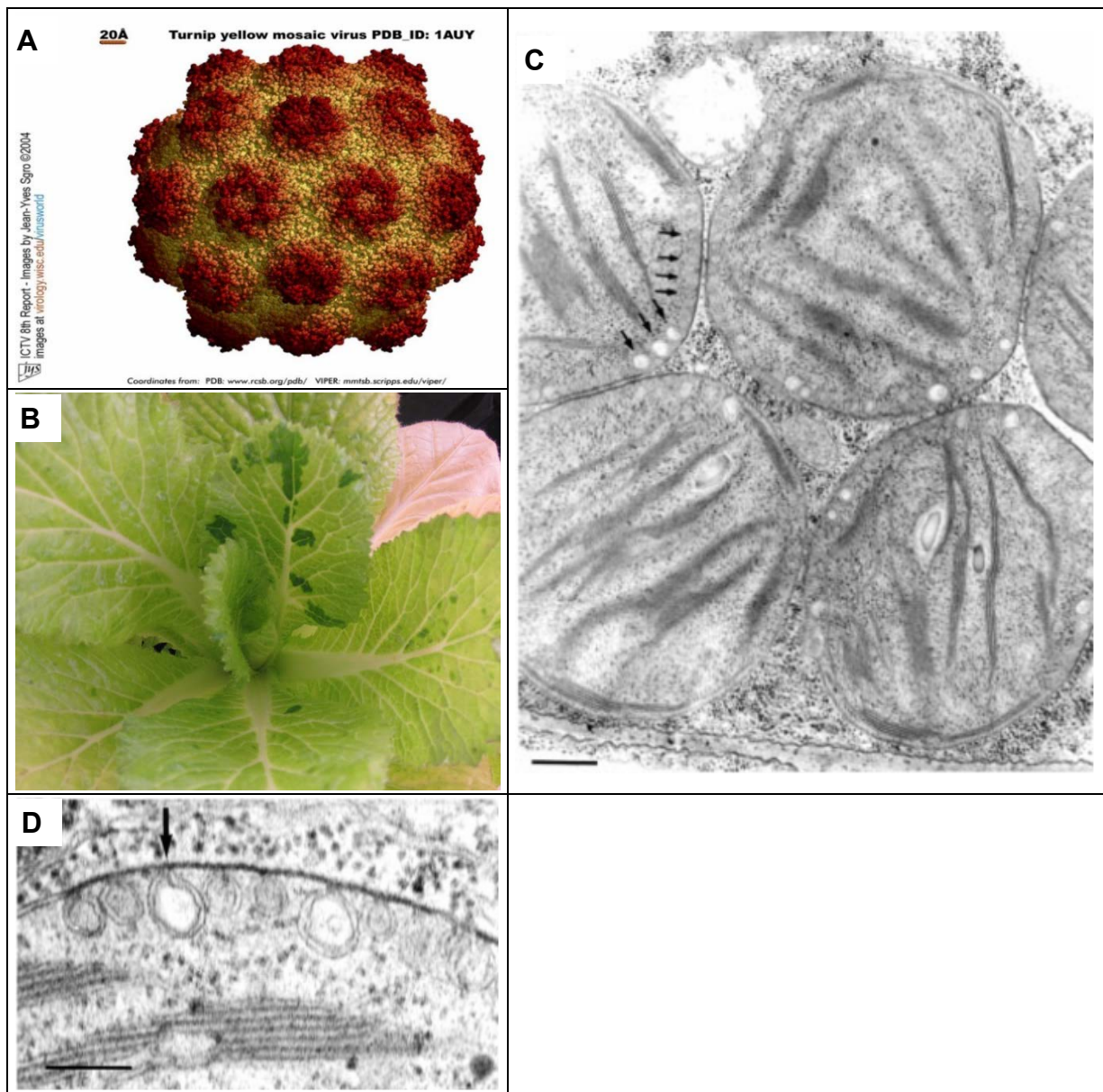


Figure I 15 – Particule virale et effets de l'infection par le TYMV sur les plantes infectées.

(A) Modélisation de la particule virale du TYMV (Source : ICTV).

(B) Photographie de chou chinois infecté par le TYMV dont les feuilles présentent une mosaïque.

(C et D) Effets cytologiques de l'infection de feuilles de chou chinois infectées par le TYMV. Images de microscopie électronique (Prod'homme et al., 2001). Les flèches (C) indiquent les invaginations de l'enveloppe des chloroplastes. Il est à noter que les chloroplastes sont arrondis et regroupés. La flèche (D) indique une invagination dont le canal forme un col orienté vers le cytoplasme. Les barres d'échelle correspondent à 400 nm (C) et 100 nm (D).

3 Le Turnip yellow mosaic virus (TYMV)

Le TYMV est un virus à particule icosaédrique (Figure I 15A) de 28 nm de diamètre, composée de 180 protéines de capsid (Canady et al., 1996). Il est transmis naturellement par des coléoptères, ou mécaniquement au laboratoire. Il infecte les plantes de la famille des Crucifères, dont le navet (*Brassica rapa*), le chou chinois (*Brassica pekinensis*) et l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) sont employés pour les besoins expérimentaux (revu dans (Dreher, 2004)). Dans la taxonomie, le TYMV appartient à l'ordre des *Tymovirales*, à la famille des *Tymoviridae* et au genre *Tymovirus* dont il est le membre type (<http://www.ictvonline.org/>).

Les plantes infectées par le TYMV présentent sur leurs feuilles des symptômes macroscopiques, sur lesquelles des jaunissements hétérogènes forment des mosaïques (Figure I 15B).

3.1 Site de réplication du TYMV

L'observation en microscopie électronique des plantes infectées a permis d'identifier les effets cytologiques de l'infection. Les chloroplastes semblent être les seuls affectés par le virus : ils sont regroupés, arrondis et présentent des rassemblements d'invaginations de leur enveloppe de 50 à 80 nm de diamètre (Figure I 15C) (Matthews, 1973). Ces invaginations de l'enveloppe des chloroplastes sont connectées au cytoplasme par un col de 10 à 30 nm de diamètre (Figure I 15D) (Matthews, 1973; Prod'homme et al., 2001). Ces sphérules sont le siège de la réplication virale comme l'attestent le marquage *in vivo* de l'ARN viral (Garnier et al., 1980) et la détection par immunohistochimie des protéines virales non-structurales (Garnier et al., 1986; Prod'homme et al., 2001).

3.2 Organisation du génome viral et expression des protéines

Le génome du TYMV est constitué d'un ARN simple brin, de polarité positive, d'une longueur de 6,3 kb (Morch et al., 1988), présentant une coiffe à son extrémité 5' et une structure ressemblant aux ARN de transfert en 3', appelée « tRNA-like structure » ou TLS (Figure I 16A) (Giegé et al., 1993). Le 3' TLS a une structure caractéristique en pseudo-nœud pouvant être aminoacylée par une valine (Yot et al., 1970). Cette structure en pseudo-nœud est indispensable pour la réplication virale *in vitro* (Skuzeski et al., 1996) et son extrémité 3' CCA correspond au site d'initiation de la réplication virale (Deiman et al., 1998; Singh and Dreher, 1997) La valylation du TLS a été proposée comme jouant un rôle dans la régulation du trafic sur l'ARN viral des ribosomes et de la polymérase virale (Dreher, 2009).

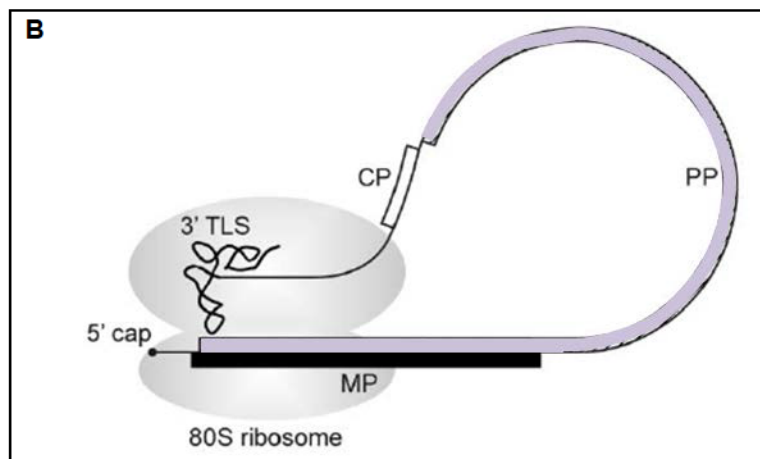
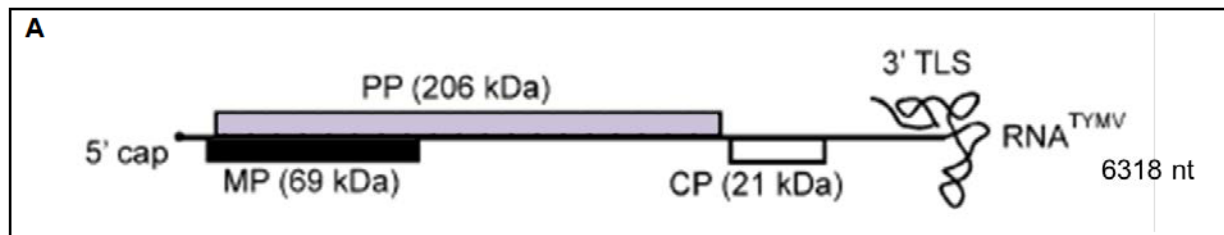


Figure I 16 – Schématisations de l'ARN génomique du TYMV et d'initiation de la traduction de sa polyprotéine 206K.

(A) Organisation de l'ARN génomique viral (6318 nucléotides). L'extrémité 5' porte une coiffe 7mG (cap), l'extrémité 3' porte le TLS. Les 3 cadres ouverts de lecture sont indiqués et codent pour les protéines de mouvement (MP), capsid (CP) et pour la polyprotéine 206K (PP) (schéma adapté d'après Barends et al., 2003).

(B) Schématisation de l'initiation de la traduction de la polyprotéine 206K. La structure TLS 3', amino-acylée par une valine, permettrait la reconnaissance par le ribosome 80S et donc initierait la traduction de la protéine (schéma adapté de Barends et al., 2003).

Le séquençage complet de l'ARN génomique (Morch et al., 1988) et les expériences de traduction *in vitro* (Morch et al., 1989) ont permis de révéler la présence de trois cadres ouverts de lecture (ORFs) au sein du génome viral (Figure I 16A).

Les deux premiers ORFs se chevauchent en 5' de l'ARN génomique et codent pour la protéine de mouvement de 69 kDa (appelée 69K), qui est indispensable au mouvement du TYMV dans la plante entière (Bozarth et al., 1992), et pour la polyprotéine de 206 kDa (206K), indispensable à la réplication du TYMV (Weiland and Dreher, 1989). L'initiation de la traduction de la polyprotéine 206K nécessite la présence du TLS (Barends et al., 2003) (Figure I 16B).

Le troisième ORF code pour la seule protéine structurale du TYMV : la protéine de capsid (CP) de 20 kDa. Située à la fin du cadre ouvert de lecture de la polyprotéine 206K, une séquence conservée « tymobox » permet d'initier la synthèse d'un ARN subgénomique (Gargouri et al., 1989), colinéaire à la région 3' du génome viral, codant pour la protéine de capsid (Pleij et al., 1976). Cet ARN subgénomique est synthétisé à partir du brin ARN(vc) et est donc entièrement dépendant de l'activité de la RdRp.

3.3 Fonctions des différentes protéines virales

L'ARN génomique est traduit par la machinerie de la cellule hôte en protéines virales, dont certaines sont nécessaires pour la réplication virale.

3.3.1 La protéine de capsid

Bien qu'impliquée dans la protection des ARN(+) nouvellement synthétisés, cette protéine n'est pas essentielle pour la réplication virale (Weiland and Dreher, 1993). Elle est capable d'agir en *trans* pour encapsider l'ARN génomique, mais interagirait préférentiellement avec l'ARN subgénomique dont elle est issue (Cho and Dreher, 2006). Elle est par ailleurs nécessaire pour l'infection systémique de la plante (Bransom et al., 1995).

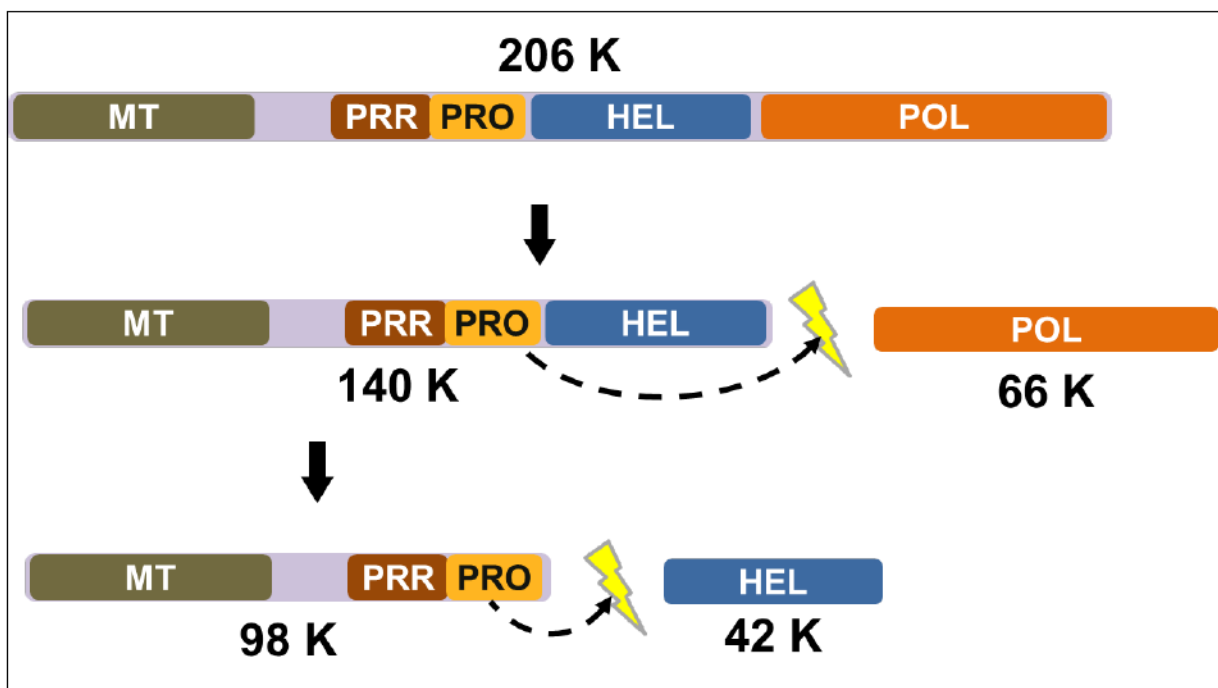


Figure I 17 – Polyprotéine 206K et ses différents clivages.

La polyprotéine 206K du TYMV présente différents domaines : le domaine méthyltransférase (MT), la région riche en proline (PRR), le domaine protéase (PRO), le domaine hélicase (HEL) et le domaine polymérase (POL). Le domaine protéase est responsable des clivages de la polyprotéine 206K, d'abord en protéines 140K et polymérase (66K), puis en protéines 98K et hélicase (42K) (Jakubiec et al., 2004).

3.3.2 La protéine de mouvement (69K)

Elle est responsable du mouvement de cellules en cellules de l'ARN viral, auquel elle se lie, résultant *in fine* en l'infection systémique des plantes. L'introduction d'un codon stop dans le génome viral pour empêcher sa production, a permis de montrer qu'elle n'est pas nécessaire pour la réplication virale mais que son absence engendre une diminution de l'efficacité de la réplication (Bozarth et al., 1992; Prod'homme et al., 2003). Il a été démontré *in vitro* que cette protéine est ubiquitylée à plusieurs endroits de sa séquence peptidique et il a été proposé qu'elle soit dégradée par la voie du protéasome, contribuant à son accumulation transitoire pendant l'infection virale (Drugeon and Jupin, 2002).

3.3.3 La polyprotéine 206K

Elle est la seule protéine essentielle pour la réplication virale (Weiland and Dreher, 1989, 1993). Les comparaisons des séquences peptidiques incluant d'autres protéines de réplication non-structurales putatives de virus à ARN(+) ont révélé des similarités et ont permis d'identifier ses différents domaines. Ils présentent les activités méthyltransférase (MT) à l'extrémité N-terminale, puis protéase (PRO), NTPase/hélicase (HEL) et enfin en C-terminal, polymérase à ARN dépendante de l'ARN (RdRp) (POL) (Gorbalenya et al., 1989; Kamer and Argos, 1984; Morch et al., 1988; Rozanov et al., 1992). L'ensemble de ses signatures ont conduit au classement du virus parmi le genre des *Tymovirus*, dans le super-groupe des alphavirus-like (Koonin et al., 1993).

Le domaine méthyltransférase pourrait jouer un rôle dans la méthylation de la coiffe à l'extrémité 5' des ARN néo-synthétisés. Ce domaine est séparé de celui de la protéase par une séquence riche en proline d'environ 200 acides aminés, prédite comme ayant une structure secondaire désordonnée qui pourrait constituer une sorte de charnière entre les deux domaines (Jakubiec et al., 2004) (Figure I 17).

Le domaine protéase est localisé entre les domaines méthyltransférase et NTPase/hélicase. La protéase codée par le TYMV a un résidu cystéine dans son site catalytique et fait partie des protéases à cystéine de type papaine-like (Bransom and Dreher, 1994; Rozanov et al., 1995). Son implication a été montrée dans la maturation en deux étapes de la polyprotéine 206K.

3.3.3.1 Clivage de la polyprotéine 206K

Un premier site a été identifié entre les résidus A1259 et T1260. Il permet le clivage autoprotéolytique co-traductionnel de la polyprotéine 206K en protéines 140K et 66K, à la fois *in vitro* (Morch et al., 1989; Bransom et al., 1991; Kadare et al., 1995; Bransom et al., 1996) et *in vivo* (Prod'homme et al., 2001).

Le clivage de la polyprotéine en protéines 140K et 66K est essentiel pour la réplication virale (Bransom and Dreher, 1994; Jakubiec et al., 2007).

La protéine 66K contient le domaine RdRp, permettant la synthèse de nouveaux ARN(vc) et ARN(+) à partir d'une matrice ARN (+) ou ARN(vc) (Weiland and Dreher, 1993). Elle est localisée au niveau des invaginations de la membrane des chloroplastes, induites par le virus, et s'accumule transitoirement pendant l'infection virale (Prod'homme et al., 2001). La polymérase est phosphorylée et ces modifications post-traductionnelles sont requises pour la réplication virale et pour la dégradation de la protéine par la voie de dégradation du protéasome liée à l'ubiquitine (Héricourt et al., 2000; Jakubiec et al., 2006; Camborde et al., 2010). Ne portant pas les déterminants de son adressage aux chloroplastes, elle est dépendante de la protéine 140K (Prod'homme et al., 2003) avec laquelle elle interagit (Jakubiec et al., 2004) pour y être localisée.

Correspondant à la partie N-terminale de la polyprotéine 206K, la protéine 140K porte les activités méthyltransférase, protéase et NTPase/hélicase (Kadare et al., 1995; Bransom et al., 1996) et est essentielle pour la réplication virale (Weiland and Dreher, 1993).

Elle contient les déterminants de son adressage aux chloroplastes et induit leur regroupement. Elle est l'organisateur clé de l'adressage des complexes de réplication viraux aux chloroplastes (Prod'homme et al., 2003). En effet, le domaine protéase de la protéine 140K et la partie N-terminale de la polymérase interagissent et sont responsables de la relocalisation de la protéine 66K aux chloroplastes (Jakubiec et al., 2004). L'interaction entre la protéine 140K et la polymérase inhibe également les phosphorylations de la protéine 66K, soit en masquant ses résidus phosphorylables, soit en empêchant leur accès aux kinases (Jakubiec et al., 2006).

De plus, il a été montré que la protéase a également une activité ubiquitine hydrolase ou dés-ubiquitinase (DUB) ayant pour substrat la polymérase. Elle est capable de cliver les chaînes de polyubiquitine liées à 66K, déjouant l'adressage au protéasome de la polymérase (Chenon et al., 2012). La Figure I 18 récapitule l'évolution des protéines 140K et 66K au cours de l'infection virale.

Les protéines 140K et 66K interagiraient préférentiellement avec l'ARN génomique dont elles sont issues, directement après la synthèse et le clivage du précurseur 206K, formant un complexe d'initiation de la réplication *in cis* (Weiland and Dreher, 1993).

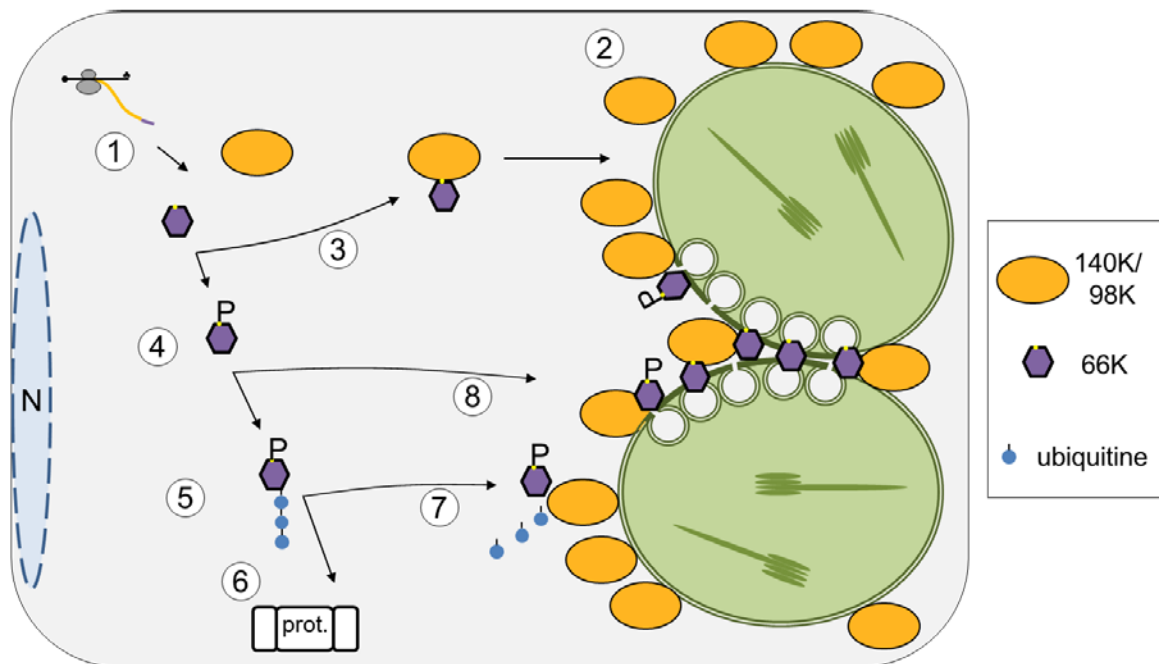


Figure I 18 – Schématisation de l'évolution des protéines 140K/98K et 66K au cours de l'infection d'une cellule végétale par le TYMV.

La traduction de l'ARN viral permet, notamment, la synthèse de la polyprotéine 206K dont le clivage génère la séparation des protéines 140K/98K et 66K (1). Les protéines 140K/98K sont adressées aux chloroplastes (2) et, par interaction protéine-protéine avec la polymérase (3), elles permettent l'association indirecte de cette dernière aux chloroplastes. La polymérase contient des résidus pouvant être phosphorylés (4). La phosphorylation de la protéine 66K est un signal pour l'attachement de molécules d'ubiquitine (5) qui vont ensuite permettre la reconnaissance de la protéine par la voie de dégradation au protéasome (prot.) (6) et réguler son accumulation dans les cellules. Mais l'interaction de la polymérase avec les protéines 140K/98K, qui possèdent une protéase ayant une activité DUB, entraîne le clivage des marques d'ubiquitine (7) permettant à la polymérase d'échapper à la voie de dégradation par le protéasome. La polymérase phosphorylée est également capable d'interagir avec les protéines 140K/98K, ce qui empêche l'ajout d'ubiquitine par l'hôte (8). Il a également été proposé que l'interaction entre les protéines 140K/98K et 66K masque les résidus phosphorylables, empêchant ainsi toute dégradation de la polymérase. N, noyau.

3.3.3.2 Clivage de la protéine 140K

Un second site de clivage a été identifié dans la séquence de la protéine 140K, entre les résidus S879 et Q880, et génère deux produits : en C-terminal, la protéine 98K et en N-terminal, l'hélicase (ou 42K) (Jakubiec et al., 2007).

La protéine 98K contient donc les domaines méthyltransférase, PRR et protéase.

Composante nécessaire du complexe réplicatif, l'hélicase présente la séquence caractéristique GX_4GKT de fixation à l'ARN et la propriété nucléoside triphosphatase (ATPase et GTPase) (Kadaré et al., 1996). Elle est supposée rompre les liaisons hydrogènes non covalentes entre les deux brins complémentaires d'ARN pour permettre leur séparation. Les hélicases forment un groupe large et varié de protéines qui partagent des motifs de séquence appelés « motifs hélicase » (Koonin et al., 1993).

Il semblerait que le clivage de l'hélicase de son précurseur 140K ne soit pas strictement nécessaire pour la réplication virale, qui peut avoir lieu, bien qu'en efficacité réduite (Jakubiec et al., 2007).

Contrairement à d'autres virus, comme le BMV (Chen and Ahlquist, 2000), l'hélicase n'est pas responsable du recrutement de la polymérase au sein du complexe de réplication (Jakubiec et al., 2007). En revanche, l'hélicase se fixant *in situ* sur l'ARN pourrait être responsable du recrutement de l'ARN génomique au niveau des complexes de réplication (Weiland and Dreher, 1993).

Le clivage de la protéine 140K en ses produits, les protéines hélicase et 98K, est proposé comme se produisant temporellement après celui de la polyprotéine 206K (Jakubiec et al., 2006), mais nous ne savons toujours pas à quelle étape du cycle infectieux est réalisé ce clivage.

4 Adressage de la protéine 140K du TYMV aux chloroplastes

L'infection des plantes par le TYMV provoque des effets cytologiques visibles au niveau des chloroplastes, notamment des sphérules à doubles membranes, correspondant aux invaginations de leur enveloppe (Matthews, 1973; Prod'homme et al., 2001), siège de la réplication virale (Garnier et al., 1980, 1986; Prod'homme et al., 2001). Parmi les protéines non-structurales localisées aux chloroplastes, la protéine 140K est également distribuée à leur voisinage lorsqu'elle est exprimée seule dans des protoplastes d'*A. thaliana* (Prod'homme et al., 2003).

La problématique de l'adressage de la protéine 140K aux chloroplastes est posée. En effet, les chloroplastes sont des organites retrouvés exclusivement chez les organismes chlorophylliens. Ils ont des caractéristiques et des voies d'adressage de leurs protéines qui leur sont propres.

4.1 Spécificités du chloroplaste

Il est admis que les chloroplastes sont issus de l'évolution de l'internalisation d'un ancêtre bactérien, par une cellule eucaryote. Le chloroplaste est le siège de la photosynthèse, processus permettant la synthèse de matière organique à partir de la lumière du soleil. Ils sont isolés du cytosol par une enveloppe constituée d'une membrane externe, séparée par un espace inter-membranaire étroit, d'une membrane interne qui entoure le stroma. Un troisième type de membranes, celles des thylakoïdes, contient les chaînes de transport d'électrons, le système photosynthétique pour la capture de la lumière et l'ATP synthase. L'intérieur des thylakoïdes - ou lumen - forme un troisième compartiment interne.

Les chloroplastes possèdent leurs propres génome et machinerie de transcription et traduction, mais une partie de leur contenu protéique est codé dans le noyau (Alberts B et al., 2002). Les gènes codant les protéines chloroplastiques sont donc transcrits et traduits par la machinerie de la cellule. Les précurseurs protéiques sont ensuite adressés à leurs compartiments appropriés.

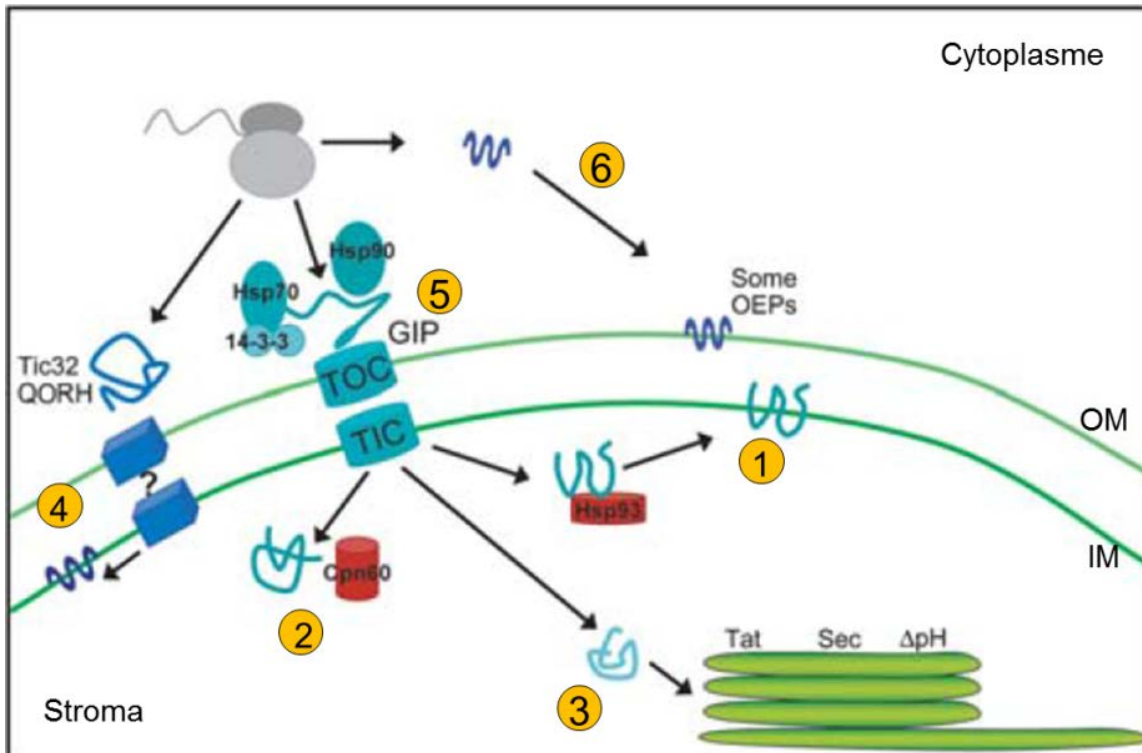


Figure I 19 – Les différentes voies d’adressage des protéines au chloroplaste.

Les protéines chloroplastiques sont adressées à la membrane interne (IM) (1 et 4), au stroma (2), aux thylakoïdes (3) ou à la membrane externe (OM) (5 et 6).

GIP : General Import Pathway, OEP : Outer Envelope Proteins.

Adapté d’après Stengel et al., 2007.

4.2 Voies d'adressage des protéines aux chloroplastes

Les précurseurs des protéines chloroplastiques sont adressés aux chloroplastes via deux voies : l'une dépendante d'une séquence N-terminale d'adressage, l'autre ne nécessitant pas cette séquence.

4.2.1 Adressage par la voie dépendante du peptide de transit : le « General Import Pathway » (GIP)

La majorité des protéines chloroplastiques codées par le génome nucléaire sont synthétisées avec une extension N-terminale clivable, appelée peptide de transit aux chloroplastes, qui permet de guider les précurseurs du cytosol vers la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste et d'initier la translocation membranaire. Ce processus fait intervenir deux complexes multiprotéiques, appelés translocons de la membrane externe (TOC) ou de la membrane interne (TIC). Pendant ou juste après son passage au travers des membranes, le peptide de transit est clivé par protéolyse. Ces protéines sont ensuite adressées à la membrane interne ou externe (1 ou 5, Figure I 19), au stroma (2, Figure I 19) ou aux thylakoïdes (3, Figure I 19), à leur membrane ou au lumen (Stengel et al., 2007). Pour les protéines adressées au lumen, le peptide de transit est bipartite : leur partie N-terminale est reconnue puis clivée après le passage du complexe TOC/TIC, tandis que leur partie C-terminale est reconnue puis clivée après le passage de la membrane du thylakoïde (Aldridge et al., 2009).

4.2.2 Adressage des précurseurs sans peptide de transit

Certains précurseurs des protéines chloroplastiques sont dénués de peptide de transit. Les protéines sont alors localisées soit à la membrane externe, ou à la membrane interne (6 et 4, Figure I 19). Celles adressées à la membrane externe sont insérées directement et spontanément dans la bicouche lipidique, soit par un domaine transmembranaire formant probablement une hélice alpha, soit par des segments transmembranaires avec des hélices alpha et des brins β formant un pore à la membrane externe (revu dans Schleiff and Klösgen, 2001). Quant aux protéines adressées à la membrane interne, comme Tic32 et ceQORH, le mécanisme par lequel elles traversent la membrane externe est encore mal connu. Tic32 interagit avec des protéines du complexe TIC (Chigri et al., 2006) et ceQORH avec des protéines de la famille PRAT (preprotein and amino acid transporter), qui pourraient être impliquées dans l'import d'autres précurseurs de protéines chloroplastiques sans peptide de transit (Rossig et al., 2013).

4.3 Objectifs de la thèse

Etape cruciale du cycle infectieux, la réplication permet la reproduction du génome viral et requiert la formation de complexes localisés en périphérie de membranes intracellulaires. La protéine 140K du TYMV est responsable de l'adressage des complexes de réplication viraux aux chloroplastes et il a été proposé qu'elle porte les déterminants de son adressage (Prod'homme et al., 2003). Mon travail de thèse a consisté en l'identification et l'étude des déterminants de la protéine 140K impliqués dans son adressage aux organites ciblés. Afin de détecter *in vivo* la localisation cellulaire de la protéine, nous travaillons avec des protoplastes d'*A. thaliana*, transfectés avec des vecteurs d'expression transitoire, codant la protéine 140K fusionnée à l'EGFP.

Avant mon arrivée au laboratoire, la recherche de la localisation de différentes versions de délétions de la protéine 140K avait été initiée, afin de délimiter le domaine minimal, nécessaire et suffisant, pour son adressage aux chloroplastes (DAC).

Cette étude a été poursuivie au cours de ma thèse et j'ai pu montrer qu'il est constitué par deux hélices alpha amphipathiques, mises en évidence grâce aux prédictions de structures secondaires associées à des tests de dichroïsme circulaire. Leur implication dans l'adressage et l'association de la protéine 140K à l'enveloppe des chloroplastes a été prouvée par des expériences de mutagenèse dirigée et l'emploi de tests biochimiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 1.

L'expression transitoire de la protéine de fusion EGFP-140K en protoplastes permet le suivi de l'évolution de son adressage dans les cellules au cours du temps. Ces patterns de distribution au sein des cellules ont pu être corrélés au taux d'expression de la protéine, qui, par ailleurs, est capable d'interagir, en BiFC, avec elle-même. Les résultats obtenus au cours de cette étude constituent le chapitre 2.

Outre la structuration secondaire du DAC en hélices alpha, nous avons recherché l'implication de certains de leurs résidus dans l'adressage de la protéine 140K. L'observation des profils d'adressage de protéines, présentant des mutations ponctuelles, associée à des tests statistiques ont conduit à l'identification de certains résidus engagés dans ce processus. Leur contribution dans l'oligomérisation a été étudiée en BiFC. L'effet des mutations sur l'efficacité de la réplication virale a été recherché par RT-qPCR. Cette analyse des résidus du DAC visant à compléter la compréhension de l'adressage de la protéine 140K aux chloroplastes est présentée au cours du chapitre 3.

Chapitre 1

Identification du domaine d'adressage aux chloroplastes
de la protéine 140K

Les complexes de réplication du TYMV sont adressés aux chloroplastes grâce à la protéine virale 140K (Prod'homme et al., 2003).

Afin de comprendre quels mécanismes sont impliqués dans l'adressage de la protéine 140K aux chloroplastes, une caractérisation approfondie de cette protéine a été menée.

Ce chapitre présente le cheminement qui a conduit à l'identification, au sein de la protéine 140K, d'un domaine minimal nécessaire et suffisant pour l'adressage de la protéine, domaine que nous nommerons DAC, pour Domaine d'Adressage au Chloroplaste. Des prédictions de structure secondaire ont permis l'identification de deux hélices alpha amphipathiques au sein du DAC. Différentes techniques biochimiques et de biologie moléculaire ont ensuite été employées pour confirmer la présence de ces hélices et déterminer leur implication dans l'ancrage aux membranes et dans la réplication virale.

1 La protéine 140K est adressée aux chloroplastes via son domaine minimal d'adressage

1.1 Délimitation du domaine d'adressage aux chloroplastes

La protéine 140K cible les chloroplastes, sans intervention d'autres éléments viraux (Prod'homme et al., 2003). Afin d'identifier la partie de la protéine 140K impliquée dans son adressage, des constructions présentant des délétions de sa séquence, tant dans sa partie N-terminale, que dans sa partie C-terminale, ont été réalisées avant mon arrivée au laboratoire et clonées dans des vecteurs d'expression p Ω -EGFP en fusion C-terminale de l'EGFP. Ces constructions ont été transfectées dans des protoplastes d'*A. thaliana*, qui ont été observés en microscopie confocale à 48 h p.t. Le signal correspondant à la protéine fusionnée à l'EGFP (émission maximale à 509 nm) est visible grâce au filtre GFP du microscope et est ensuite coloré en vert sur les images de microscopie présentées dans ce manuscrit. La chlorophylle a la propriété d'émettre de l'autofluorescence détectable entre les longueurs d'ondes 600 et 700 nm, grâce au filtre Cy5 du microscope et nous permet de localiser les chloroplastes. Cependant, l'un des inconvénients de l'autofluorescence de la chlorophylle est qu'elle est également excitable lors de l'illumination de l'EGFP (ou la YFP) et elle peut être visible dans le canal EGFP (ou YFP) si le signal de ce fluorochrome est faible. L'autre désavantage de l'autofluorescence est qu'elle est d'intensité variable selon les cellules, voire parfois non détectable. Afin de pallier ce défaut de chlorophylle, nous avons construit le plasmide p Ω -NirFP, qui code pour la petite sous-unité de la RuBisCO fusionnée à la NirFP, fluorochrome détectable avec le même filtre que la chlorophylle, son maximum d'émission de fluorescence étant à 670 nm (Shcherbo et al., 2010).

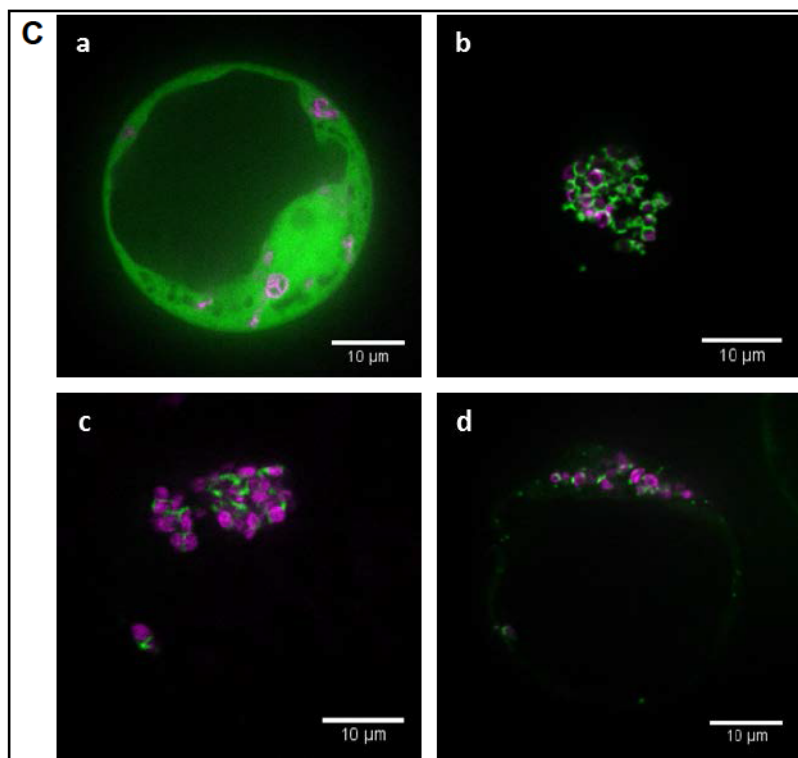
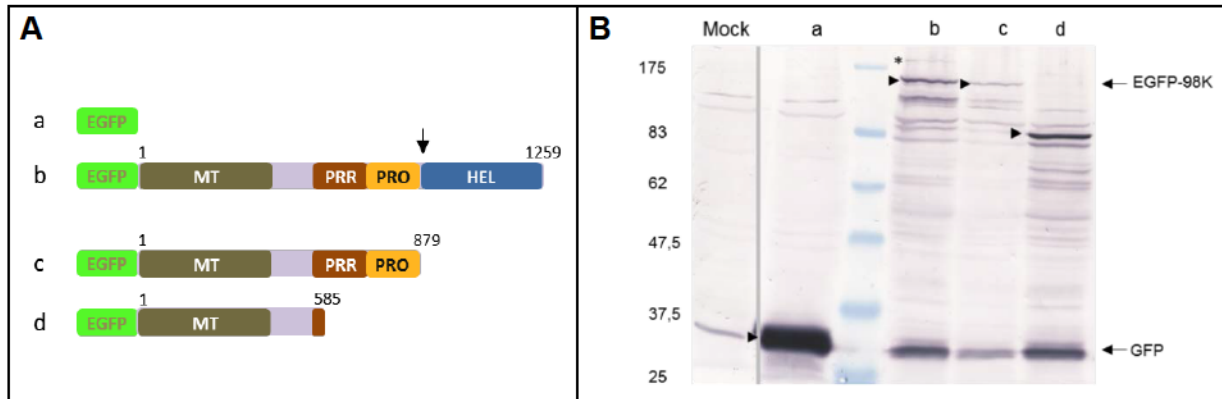


Figure 1.1 – Schématisation, expression et localisation subcellulaire des protéines EGFP, EGFP-140K entière et délétées en C-terminal.

(A) Schéma des différentes protéines de fusion : EGFP seule (a), protéine 140K entière (b), délétions C-terminales : 1-879 (c) et 1-585 (d). MT : domaine méthyltransférase, PRR : région riche en proline, PRO : domaine protéase, HEL : domaine hélicase. La flèche verticale indique le site de clivage, entre les domaines PRO et HEL.

(B) Western blot des séquences peptidiques fusionnées à l'EGFP, présentées en (A), exprimées dans des protoplastes transfectés. Les tailles du marqueur de poids moléculaire en kDa sont indiquées à gauche. Les tailles de la protéine 98K fusionnée à l'EGFP ainsi que l'EGFP seule sont marquées par une flèche. Les pointes de flèches marquent les tailles de chaque protéine exprimée et l'astérisque indique sa forme non-clivée. Mock correspond aux protoplastes transfectés avec H₂O.

(C) Localisation en protoplastes des différentes protéines exprimées et dont les séquences sont schématisées en (A). Images en microscopie confocale à spinning disk, sur un plan de la cellule, au grossissement 100X. Le signal de l'EGFP est coloré en vert, celui de la chlorophylle et de la NirFP en magenta. Barre d'échelle : 10 μm.

Afin de pouvoir systématiquement localiser les chloroplastes, le vecteur p Ω -NirFP est donc co-transfecté avec les vecteurs d'expression codant les protéines fusionnées au fluorochrome EGFP. Emettant un signal distinct de celui de l'EGFP, l'autofluorescence de la chlorophylle et la fluorescence NirFP sont donc détectées simultanément. Leur signal est ensuite coloré en magenta sur les images présentées dans ce manuscrit. Les résultats obtenus avec les différentes protéines EGFP (Figure 1. 1C a et Figure 1. 2C a), EGFP-140K (Figure 1. 1C b et Figure 1. 2C b) et EGFP-140K délétées en N- ou C-terminales sont présentés en fonction de la localisation des délétions (Figure 1. 1C c et d, Figure 1. 2C c et d).

1.1.1 Délétions en C-terminal de la protéine EGFP-140K

Le clivage de la 140K résulte en deux produits ayant été mis en évidence par le laboratoire (Jakubiec et al., 2007) : les protéines 98K et 42K, cette dernière correspondant au domaine hélicase. Le vecteur p Ω -EGFP-140K(1-879) a été construit afin de permettre l'expression de la protéine 98K seule (Figure 1. 1C c). Nous constatons alors que cette construction, transfectée en protoplastes d'*A. thaliana*, permet l'expression de la protéine de fusion 98K (Figure 1. 1B c) et qu'elle est localisée en périphérie des chloroplastes (Figure 1. 1C c), comme la protéine EGFP-140K entière (Figure 1. 1C b).

La protéine EGFP-140K(1-585) contient le domaine méthyltransférase (MET)(1-419) (Ahola and Karlin, 2015) jusqu'à la limite N-terminale de la région riche en proline (PRR) (Figure 1. 1A d). Transfecté en protoplastes, le vecteur p Ω -EGFP-140K(1-585) permet l'expression en fusion de la protéine 140K délétée (flèche Figure 1. 1A d), localisée à proximité des chloroplastes (Figure 1. 1d), comme la protéine EGFP-140K entière (Figure 1. 1C d).

Nous notons que l'absence du domaine hélicase ne semble donc pas interférer avec le processus d'adressage et en concluons que le DAC est compris entre les acides aminés 1 et 585 de la protéine 140K. Nous avons ensuite cherché à déterminer la borne N-terminale du DAC.

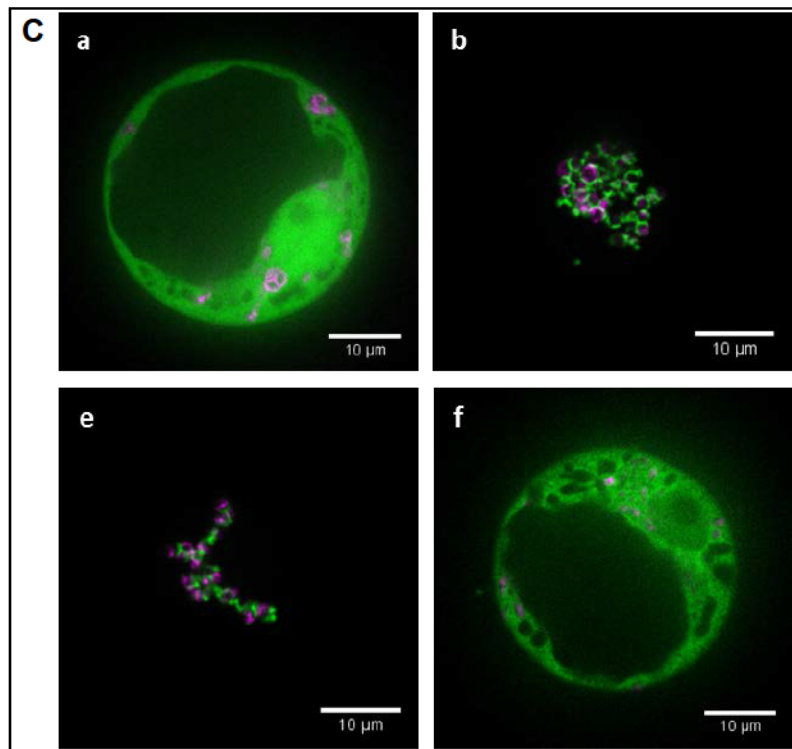
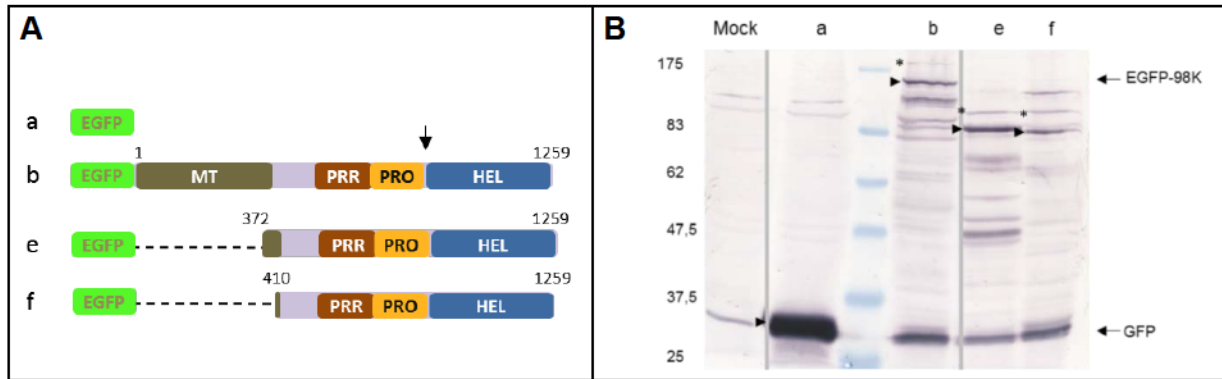


Figure 1. 2 – Schématisation, expression et localisation subcellulaires des protéines EGFP, EGFP-140K entière et délétées en N-terminal.

(A) Schéma des différentes protéines de fusion : GFP seule (a), protéine 140K entière (b), délétions N-terminales : 372-1259 (e) et 410-1259 (f). MT : domaine méthyltransférase, PRR : région riche en proline, PRO : domaine protéase, HEL : domaine hélicase.

(B) Western blot des séquences peptidiques fusionnées à la GFP, présentées en (A), dans des protoplastes transfectés. Les tailles du marqueur de poids moléculaire en kDa sont indiquées à gauche. Celles de la protéine 98K fusionnée à la GFP, ainsi que la GFP seule, sont marquées par une flèche. Les pointes de flèches marquent les tailles de chaque protéine exprimée et les astérisques indiquent leurs formes non-clivées. Mock correspond aux protoplastes transfectés avec H₂O.

(C) Localisation en protoplastes des différentes protéines exprimées et dont les séquences sont schématisées en A. Images en confocal à spinning disk, sur un plan de la cellule, au grossissement 100X. Le signal de la GFP est coloré en vert, celui de la chlorophylle et de la NirFP en magenta. Barre d'échelle : 10 μm.

1.1.2 Délétions en N-terminal de la protéine EGFP-140K

La partie N-terminale du domaine méthyltransférase a été délétée de la protéine 140K. Cette protéine appelée EGFP-140K(372-1259) contient donc la fin du domaine méthyltransférase (MET), la région riche en proline (PRR), la protéase (PRO) et l'hélicase (HEL) (Figure 1. 2A e). Le vecteur pΩ-EGFP-140K(372-1259) transfecté dans les protoplastes permet l'expression en fusion de la protéine (astérisque Figure 1. 2B e). De plus, cette protéine présente toujours le site de clivage pour la protéase, qui est fonctionnelle car nous détectons d'une part son produit de clivage fusionné à l'EGFP (partie N-terminale de la protéine, signalée par une pointe de flèche, Figure 1. 2B e), et d'autre part l'EGFP seule (e, Figure 1. 2B). Mais l'observation en microscopie confocale de cellules transfectées avec le pΩ-EGFP-140K(372-1259) permet de voir que la protéine de fusion est localisée en périphérie des chloroplastes, comme la protéine EGFP-140K entière (b, Figure 1. 2C). La protéine 372-1259 contient donc encore le DAC.

Le domaine méthyltransférase (1-419) (Ahola and Karlin, 2015) a été délété de la protéine EGFP-140K(410-1259) qui ne contient donc plus que l'ensemble « PRR-PRO-HEL ». La protéine de fusion EGFP-140K(410-1259) est correctement exprimée lorsque les cellules sont transfectées par le vecteur pΩ-EGFP-140K(410-1259) (astérisque Figure 1. 2B f) et le domaine PRO est toujours fonctionnel puisque nous détectons un produit de clivage (pointe de flèche, Figure 1. 2B f). Le signal GFP seul est également détecté (f, Figure 1. 2B), mais en quantité comparable à celle des autres constructions. Lors de l'observation de ces cellules en microscopie confocale, nous constatons que le signal GFP se retrouve sous un aspect diffus dans le cytoplasme (Figure 1. 2C f), comme lorsque l'EGFP est exprimée seule (Figure 1. 2C a). Soit la protéine EGFP-140K(410-1259) ne contient plus le DAC, soit celui-ci n'est plus fonctionnel.

Nous concluons que la borne du DAC en N-terminal de la protéine 140K se situe à l'acide aminé 372.

L'ensemble des résultats obtenus avec ces délétions permet la délimitation du DAC entre les bornes 372 et 585. Toutefois, nous avons souhaité l'affiner afin d'identifier la séquence minimale correspondante au DAC.

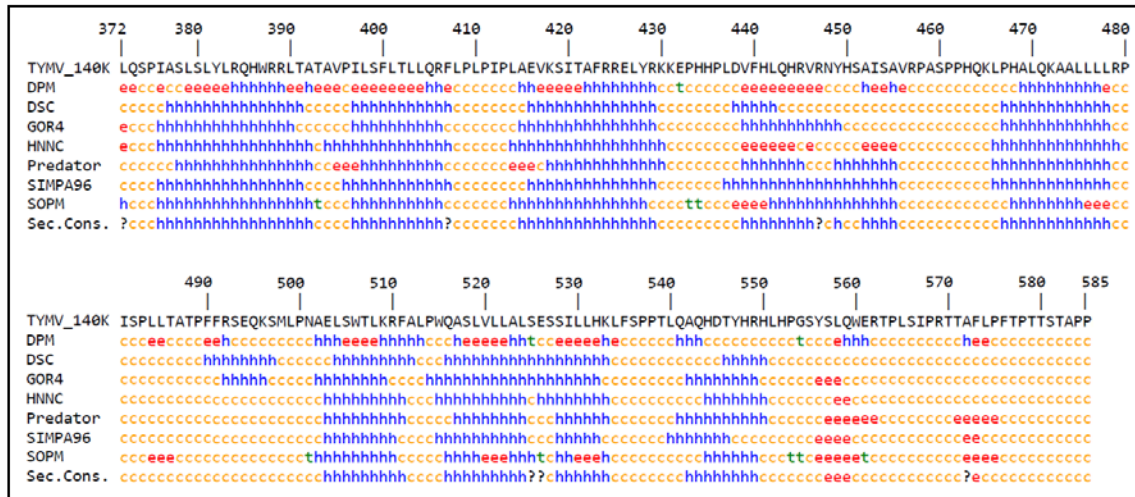


Figure 1. 3 – Prédications de structures secondaires de la région 372 - 585 de la protéine 140K.

Les différentes méthodes employées sont indiquées sur la gauche : DPM, DSC, GOR4, HNNC, Predator, SIMPA96 et SOPM. Les chiffres précisent la position des acides aminés dans la séquence de la protéine 140K entière. H ou h, correspond à la prédiction d'une hélice alpha, E ou e à un brin étendu, C ou c à un repliement en boucles (coil), t à un tour bêta.

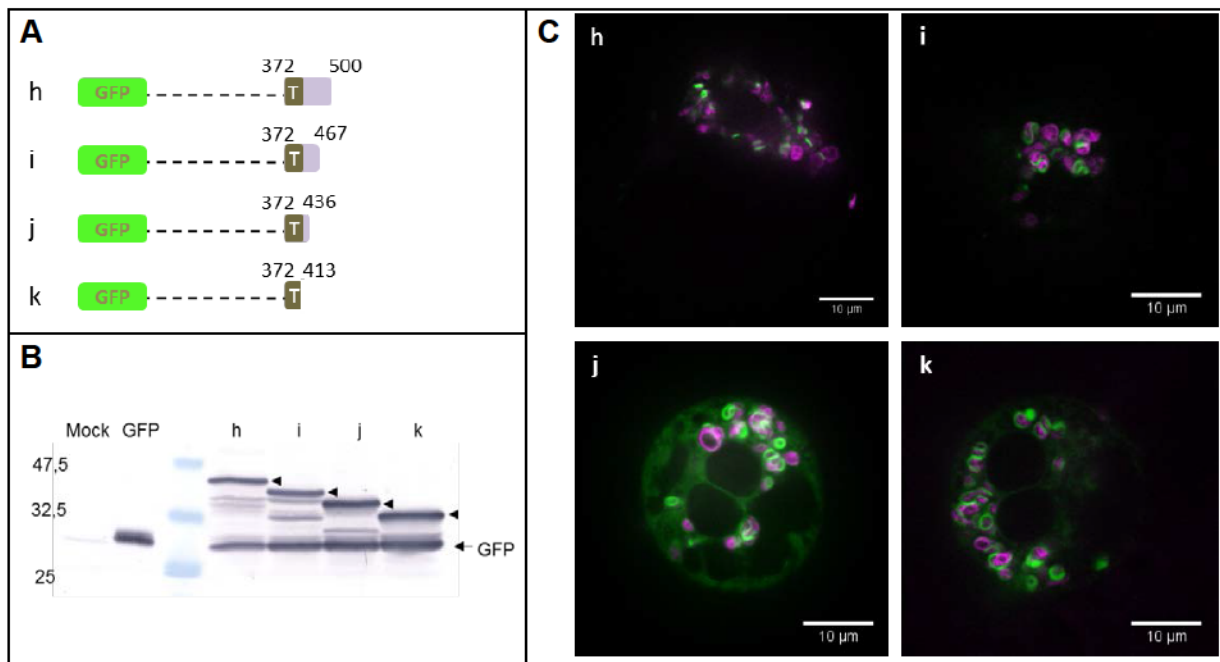


Figure 1. 4 – Délimitation plus précise du domaine d'adressage.

(A) Schéma des différentes séquences peptidiques en fusion avec la GFP : 372-500 (h), 372-467 (i), 372-436 (j) et 372-413 (k). T indique la partie C-terminale du domaine méthyltransférase.
 (B) Western blot des séquences peptidiques fusionnées à la GFP, présentées en (A), dans des protoplastes transfectés, comme illustré dans (C). Les tailles du marqueur de poids moléculaire en kDa sont indiquées à gauche. La taille de la GFP seule est marquée par une flèche. Les pointes de flèches marquent les tailles exprimées pour chaque construction. Mock correspond aux protoplastes transfectés avec H₂O.
 (C) Localisation en protoplastes d'*A. thaliana* des constructions GFP schématisées en (A). Images en confocal à spinning disk, sur un plan de la cellule, au grossissement 100X. Le signal de la GFP est coloré en vert, celui de la chlorophylle et de la NirFP en magenta. Barre d'échelle : 10 μm.

1.2 Délimitation de la séquence minimale du DAC

1.2.1 Prédiction des structures secondaires entre les bornes 372 et 585 de la protéine 140K

Pour affiner la délimitation du domaine minimal d'adressage, la séquence entre les bornes 372 et 585 a été soumise au logiciel de prédiction de structures secondaires NPS@. Les alignements de séquences obtenus (Figure 1. 3) indiquent la présence de plusieurs ensembles structurés sous forme de « coils », comme des ensembles structurés en feuillets β (« e » ou « E ») ou en hélices alpha (« h » ou « H »). Huit hélices alpha sont prédites : deux à la fin du domaine MET, donc entre les résidus 372 et 413, puis six autres entre les acides aminés 410 et 585.

1.2.2 Effets des délétions du DAC en C-terminal en fonction des prédictions de structures secondaires

En fonction des alignements de prédictions de structures secondaires, des vecteurs ont été construits avec des délétions de plus en plus importantes dans la partie C-terminale du DAC, fusionnées en N-terminal du fluorochrome EGFP, avant mon arrivée au laboratoire. Ainsi, par rapport à la séquence comprise entre les bornes 372 et 585, la protéine EGFP-140K(372-500) (Figure 1. 4A h) est déletée des trois hélices prédites en C-terminales de la région 372-585. Cette protéine est exprimée par les cellules transfectées par le vecteur p Ω -EGFP-140K(372-500) (Figure 1. 4B h) et le signal EGFP correspondant est localisé à proximité des chloroplastes (Figure 1. 4C h).

Les délétions ont été poursuivies en C-terminal pour donner une nouvelle construction, codant pour l'EGFP-140K(372-467) (Figure 1. 4A i). La protéine est exprimée par les cellules transfectées avec le vecteur p Ω -EGFP-140K(372-467) (Figure 1. 4B i) et le signal EGFP correspondant est localisé en périphérie des chloroplastes (Figure 1. 4C i).

La partie C-terminale prédite en hélice a été déletée de la séquence EGFP-140K(372-467), générant le plasmide p Ω -EGFP-140K(372-436) (Figure 1. 4A j). La construction p Ω -EGFP-140K(372-436), transfectée en protoplastes *d'A. thaliana*, permet l'expression de l'EGFP-140K(372-436) (Figure 1. 4B j) que l'on observe toujours localisée en périphérie des chloroplastes (Figure 1. 4C j).

Enfin, l'hélice en C-terminal a été déléetée de la protéine EGFP-140K(372-436), donnant la protéine EGFP-140K(372-413) (Figure 1. 4A k), qui ne contient donc plus que deux hélices alpha. Les cellules transfectées par le vecteur p Ω -EGFP-140K(372-413) expriment la protéine correspondante (Figure 1. 4B k) qui est localisée en périphérie des chloroplastes (Figure 1. 4C k).

Le DAC est donc délimité par les acides aminés 372 et 413 et, par conséquent, est une région commune aux protéines 140K et 98K. D'après les prédictions de structures secondaires le DAC comprend deux hélices alpha, qui sont désignées par la suite sous les noms d'hélices A et B.

Ignorant à quel moment le clivage de la protéine 140K a lieu, elle est mentionnée par la suite comme « 140K/98K ».

Pour chaque condition, la détection de l'EGFP seule indique qu'une partie des protéines est clivée (Figure 1. 4B), pouvant expliquer la présence d'un signal GFP de faible intensité dans le cytoplasme alors que les séquences peptidiques fusionnées sont bien adressées aux chloroplastes, avec de fortes intensités de signal EGFP (Figure 1. 4C).

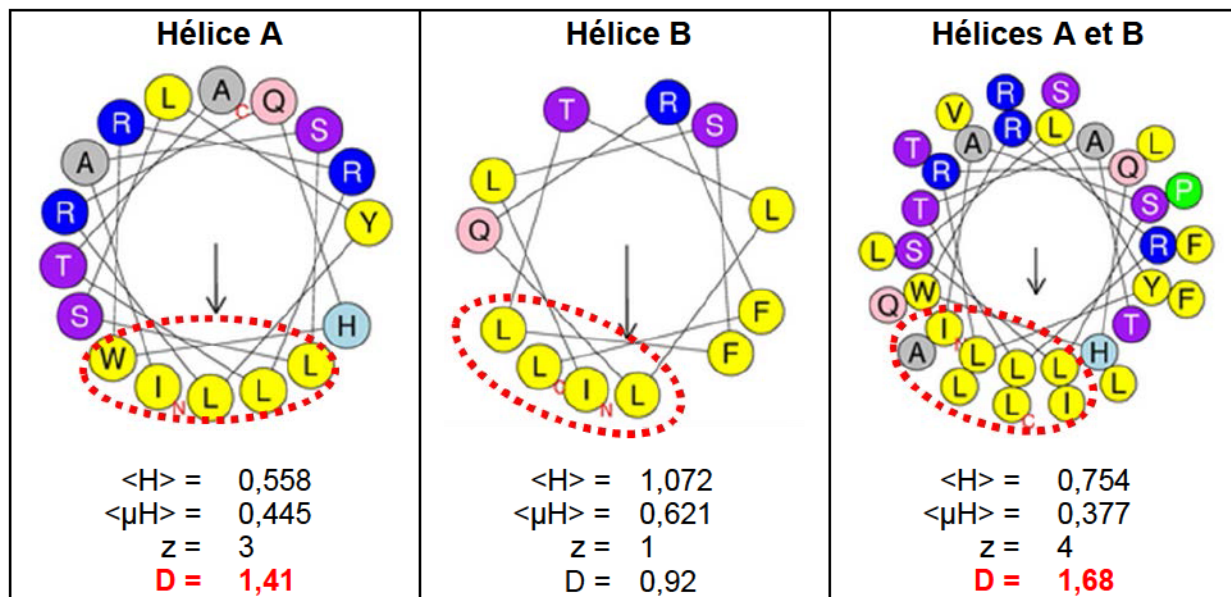


Figure 1. 5 – Représentations par HeliQuest des hélices A et B du DAC.

Représentations de l'hélice A, de l'hélice B et de la combinaison des hélices A et B. Les faces hydrophobes prédites par HeliQuest sont entourées de pointillés rouges. Les lettres rouges N et C marquent respectivement les extrémités N- et C-terminales. Sont indiquées les valeurs de $\langle H \rangle$ (hydrophobicité moyenne), $\langle \mu H \rangle$ (moment hydrophobe), z (nombre de charges nettes) et D (facteur discriminant), coloré en rouge lorsque la prédiction de l'hélice amphipathique se liant à des lipides est fiable. Le code couleurs des ronds matérialisant les acides aminés correspond à leurs propriétés physico-chimiques : bleu foncé pour les résidus hydrophiles et chargés positivement, bleu clair pour les résidus basiques et hydrophiles, gris pour les résidus apolaires et non chargés, jaune pour les hydrophobes, rose pour résidus polaires hydrophiles, vert pour la proline et violet pour les résidus polaires et neutres.

2 Le DAC contient deux hélices alpha A et B

2.1 Représentations des hélices A et B du DAC

2.1.1 Représentations par HeliQuest

En se basant sur les séquences consensus de prédictions de structures secondaires (Figure 1. 3), les séquences peptidiques correspondant à l'hélice A, à l'hélice B, ou à la combinaison des deux, ont été représentées (Figure 1. 5) grâce au logiciel HeliQuest (Gautier et al., 2008). Ce logiciel est employé lorsque la séquence à représenter est connue pour se conformer en hélice. Il tient compte des propriétés physico-chimiques des acides aminés, en leur attribuant un code couleur pour la représentation, et à partir desquelles il calcule l'hydrophobicité moyenne $\langle H \rangle$, le moment d'hydrophobicité $\langle \mu H \rangle$ et les charges nettes z . Le logiciel nous indique également que ces hélices ont chacune une face hydrophobe (entourées de pointillés rouges sur la Figure 1. 5). Nous remarquons alors que les résidus hydrophobes (colorés en jaune par HeliQuest) sont surtout regroupés d'un côté de l'hélice, tandis que les résidus hydrophiles (colorés avec des tons froids par HeliQuest) sont situés sur le côté opposé. Cette répartition dans l'hélice des acides aminés en fonction de leurs propriétés hydrophobe et hydrophile est caractéristique des hélices amphipathiques. La représentation de l'hélice est alignée sur le vecteur du moment d'hydrophobicité $\langle \mu H \rangle$. Avec ces représentations, nous pouvons également observer que la face hydrophobe prédite pour la combinaison des hélices A et B (entourée de pointillés rouges sur la Figure 1. 5C) utilise presque les mêmes résidus que ceux impliqués dans les faces hydrophobes des hélices A et B.

A partir des valeurs de $\langle \mu H \rangle$ et z , il est possible de calculer le facteur discriminant D , résultant de la formule $[(0,944 * \langle \mu H \rangle) + (0,33 * z)]$. Si D est compris entre les valeurs 0,68 et 1,34, alors l'hélice est prédite comme étant *potentiellement* capable de se lier à des lipides. Si D est équivalent ou supérieur à 1,34, alors l'hélice est prédite pour se lier *de façon fiable* aux lipides (Gautier et al., 2008). En tenant compte de ces données, nous constatons que $D_{HB} = 0,92$, l'hélice B prédite pourrait ainsi potentiellement se lier à des lipides. Comme $D_{HA} = 1,41$ - donc supérieur à 1,34 - l'hélice A prédite est capable de se lier aux lipides de façon fiable. En ce qui concerne la représentation de la combinaison des hélices A et B, la valeur de D_{HAB} égale 1,68 - donc supérieure à 1,34 - indiquant que l'ensemble de ces hélices est également amphipathique et prédit pour se lier aux lipides.

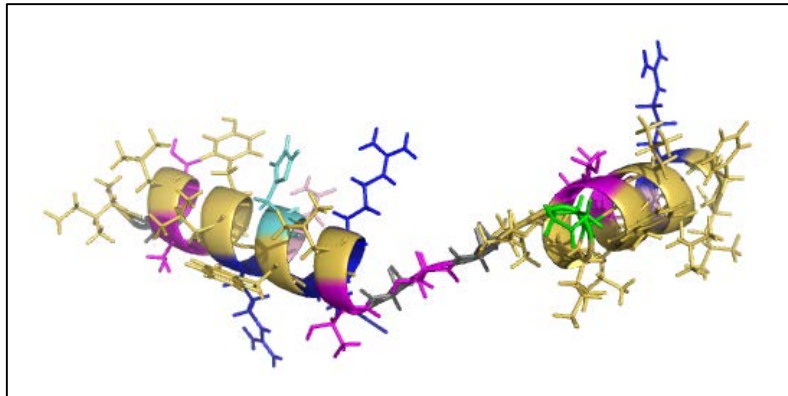


Figure 1. 6 – Représentation dans l'espace des hélices A et B du DAC des protéines 140K/98K.

Représentation grâce au logiciel PyMol de la séquence 372-413. Nous avons imposé une conformation sous la forme de deux hélices selon la prédiction de NSP@. Les chaînes latérales des acides aminés sont représentées par des lignes. Le code couleur des propriétés des acides aminés est le même que celui d'HeliQuest.

2.1.2 Représentation des hélices A et B du DAC par PyMol

Pour avoir une vision d'ensemble de l'organisation des acides aminés constituant ces hélices A et B, la séquence peptidique correspondante a été représentée dans l'espace par Patrick FUCHS (Institut Jacques Monod), grâce au logiciel PyMol, en colorant les acides aminés selon le même code que celui d'HeliQuest. Pour cette représentation tri-dimensionnelle, nous avons pris en compte les résultats des séquences consensus des prédictions secondaires : nous avons imposé une structuration en boucle entre les deux hélices A et B (Figure 1. 6).

Nous observons que la présence d'une proline en position 396 induit un coude dans la structure hélicoïdale, à cause de sa fonction amine cyclique. Ce résidu proline ne peut pas avoir de liaison hydrogène avec les chaînes latérales des autres acides aminés constituant la séquence peptidique, ce qui déstabilise localement la structure secondaire (Nilsson and von Heijne, 1998).

Les quelques acides aminés précédant la proline ne sont pas structurés en hélice alpha mais plutôt sous forme de boucle, comme indiqué par NPS@. Cette représentation permet de se rendre compte que les deux hélices pourraient à la fois présenter dans l'espace une flexibilité de l'une par rapport à l'autre et s'orienter selon des axes différents, tout en ayant la contrainte structurale du coude induit par la proline. Ce résidu serait donc le séparateur physique entre les deux hélices.

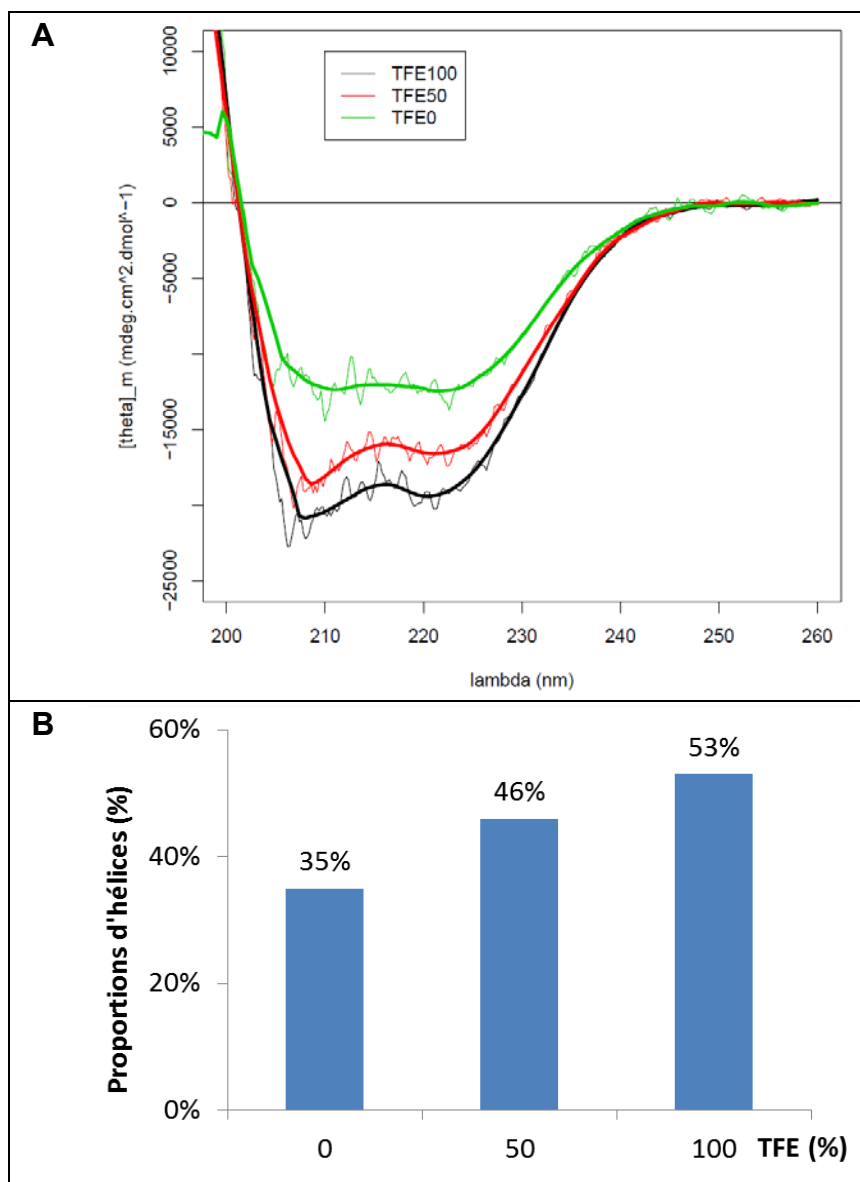


Figure 1. 7 – Dichroïsme circulaire avec le peptide AB.

(A) Spectres d'absorption à 25°C des peptides en solution dans du tampon phosphate (Na₃PO₄ 10 mM, pH 7,5, glycérol 10 %, NaCl 150 mM) (TFE 0), dans 50 % de TFE avec 50 % de tampon phosphate (TFE 50) et dans du TFE 100 % (TFE 100). (B) Estimation des taux moyens de formation d'hélices alpha (%) dans les solutions de peptides en fonction de la concentration de TFE (%) (méthode d'après Wieprecht et al., 1999).

2.2 Validation de la conformation en hélice alpha du DAC par dichroïsme circulaire

Afin de valider le repliement en hélice alpha du DAC, des expériences de dichroïsme circulaire ont été menées avec un peptide synthétique, AB (**RSPIASLSLYLRQHWRRLLTATAV-PILSFLTLLQRFLPLR**), en collaboration avec Patrick FUCHS (Institut Jacques Monod). La séquence du peptide correspond aux acides aminés 374-410, encadrée de deux acides aminés chargés supplémentaires (en gras dans la séquence), aux extrémités N- et C-terminales, pour faciliter la solubilisation du peptide. Le peptide AB a été repris, soit uniquement dans un tampon phosphate, soit dans un mélange 50 % de trifluoroéthanol (TFE) et 50 % de tampon phosphate, ou encore dans du TFE 100 %. Ce solvant mime l'environnement hydrophobe dans lequel des hélices amphipathiques vont pouvoir se replier (Luo and Baldwin, 1997; Nelson and Kallenbach, 1986; Thomas and Dill, 1993).

La structure secondaire du peptide AB solubilisé a ensuite été déterminée par dichroïsme circulaire. Les spectres obtenus ont été générés suite aux mesures au spectromètre (Figure 1. 7A), en prenant en considération la concentration du peptide dans chaque condition testée. La présence de deux minima à 208 et 222 nm est caractéristique de la présence de structures en hélices alpha (Greenfield, 2006), et ce dans les trois conditions testées.

La valeur de l'ellipticité à 222 nm permet d'estimer le taux moyen de formation en hélices alpha. Pour la solution de peptides AB en milieu aqueux, la proportion à former des hélices a été estimée à 35 %. La présence de 50 % de TFE dans le milieu porte le pourcentage d'hélices à 46 % et leur proportion atteint 53 % pour les peptides repris dans du TFE 100 % (Figure 1. 7B).

Les résultats des tests de dichroïsme circulaire permettent de conclure qu'en milieu aqueux, le peptide AB se structure en hélices alpha. L'ajout de TFE augmente le degré d'hydrophobicité de l'environnement, favorisant cette structuration en hélices. Ces résultats nous conduisent à proposer l'hypothèse selon laquelle la protéine 98K se retrouvant dans le cytosol des cellules, similaire à un milieu aqueux, aurait déjà son DAC partiellement replié en hélices alpha. Ce repliement en hélices pourrait être favorisé par l'environnement membranaire des enveloppes chloroplastiques et être à l'origine de l'adressage de la protéine aux membranes.

3 Les hélices amphipathiques A et B du DAC sont impliquées dans l'adressage des protéines 140K/98K

3.1 Importance de la structuration en hélice pour l'adressage aux chloroplastes

Le DAC étant constitué de deux hélices alpha, A et B, nous avons cherché à savoir si l'une ou l'autre des hélices, ou bien les deux, sont requises pour l'adressage des protéines 140K/98K aux chloroplastes. Pour répondre à cette interrogation, le travail a été réalisé avec la protéine 140K, fusionnée à l'EGFP, dans laquelle des mutations ponctuelles ont été introduites afin de détruire les structures en hélices alpha. Les leucine 383 et 390 dans l'hélice A (Figure 1. 8A a) et les leucine 401 et 404 dans l'hélice B (Figure 1. 8A b) ont été substituées par des résidus proline, au sein de chacune des hélices, seules ou en combinaison, générant trois protéines mutantes : EGFP-140K-A-L383P-L390P, EGFP-140K-B-L401P-L404P et EGFP-140K-AB-L383P-L401P-L404P. Par la suite, pour un souci de clarté, ces protéines sont mentionnées respectivement sous les noms d'A-LPLP, de B-LPLP et d'AB-LPLP.

Pour les trois séquences mutantes correspondantes, les prédictions des structures secondaires de leurs DAC ont été vérifiées avec NPS@, en employant les mêmes méthodes que citées précédemment (Figure 1. 8B). Les structures consensus obtenues avec les mutations dans l'hélice A (« A-LPLP » sur la Figure 1. 8B), dans l'hélice B (« B-LPLP » sur la Figure 1. 8B) ou en combinaison (« AB-LPLP » sur la Figure 1. 8B), montrent que les mutations abolissent effectivement la formation des hélices correspondantes.

Les vecteurs codant les séquences mutantes ont été transfectés en protoplastes d'*A. thaliana*. Les cellules permettent l'expression des protéines correspondantes (Figure 1. 8C), qui sont toujours aptes à être clivées en 98K et hélicase. Les observations 48 h p.t. en microscopie confocale à spinning disk de ces cellules ont révélé que les mutations affectant une seule hélice, tant l'hélice A (Figure 1. 8D a) que l'hélice B (Figure 1. 8D b), n'empêchent pas la localisation de la protéine de fusion en périphérie des chloroplastes. Une seule hélice du DAC est donc suffisante pour adresser les protéines 140K/98K aux chloroplastes. En revanche, la destruction conjointe des hélices A et B induit la perte de l'adressage aux chloroplastes, comme illustré en Figure 1. 8D c où le signal GFP présente une distribution diffuse dans le cytoplasme.

L'adressage aux chloroplastes des protéines 140K/98K est donc empêché par la destruction conjointe des hélices A et B. Ayant vu précédemment (Figure 1. 5) que ces deux hélices sont prédites comme amphipathiques, nous avons alors cherché à savoir si cette propriété contribuait à l'adressage des protéines 140K/98K aux chloroplastes.

3.2 Importance de la propriété amphipathique des hélices pour l'adressage des protéines 140K/98K aux chloroplastes

Les représentations des hélices A et B du DAC avec HeliQuest (Figure 1. 5) permettent de constater que celles-ci sont amphipathiques. Afin de tester la contribution de la face hydrophobe de chaque hélice dans l'adressage aux chloroplastes, des substitutions en alanine des isoleucine et leucine des faces hydrophobes des hélices A et/ou B ont été réalisées par mutagenèse dirigée du vecteur pΩ-EGFP-140K. Ainsi, ont été construits trois vecteurs codant pour les protéines : EGFP-140K-A-I376A-L379A-L383A-L390A, EGFP-140K-B-I397A-L401A-L404A-L408A et EGFP-140K-A-I376A-L379A-L383A-L390A-B-I397A-L401A-L404A-L408A. Pour simplifier la dénomination de ces protéines, elles sont ensuite appelées respectivement A-ILLL/AAAA, B-ILLL/AAAA et AB ILLL/AAAA.

Les séquences protéiques contenant les substitutions ont été analysées et représentées avec HeliQuest (Figure 1. 9A), où sont également mentionnées les valeurs de $\langle H \rangle$, $\langle \mu H \rangle$, z et D .

Les substitutions en alanine des résidus impliqués dans les faces hydrophobes sont responsables de la diminution des valeurs des facteurs discriminants D , calculées pour chaque hélice. Ainsi, celui de l'hélice A - compris entre 0,68 et 1,34 - signifie qu'elle est potentiellement amphipathique et liée aux lipides, contrairement à celui de l'hélice B, inférieur à 0,68. Concernant la combinaison des hélices A et B, la valeur calculée du facteur D reste supérieure à 1,34 tout en étant inférieure à celle de la protéine sauvage (Figure 1. 9A c), indiquant que la protéine aux deux hélices mutées est toujours prédite pour présenter une liaison fiable aux lipides.

Les séquences des DAC de ces protéines mutées ont été soumises à NPS@, en employant les mêmes méthodes que citées précédemment. Les prédictions de structures secondaires consensus obtenues (Figure 1. 9D) montrent que les substitutions permettent effectivement de garder les conformations hélicoïdales des deux hélices alpha.

Les vecteurs codant les protéines correspondantes ont été ensuite transfectés en protoplastes d'*A. thaliana*, permettant leur expression (Figure 1. 9C) ainsi que le clivage de la protéine 140K en protéines 98K et hélicase. Les observations 48 h p.t de ces cellules, en microscopie confocale à spinning disk, ont révélé que les mutations affectant la face hydrophobe de l'hélice A seule (Figure 1. 9D a) ou de l'hélice B seule (Figure 1. 9D b) n'empêchent pas la localisation de la protéine de fusion en périphérie des chloroplastes.

En revanche, les modifications conjointes des faces hydrophobes des hélices A et B provoquent la distribution du signal GFP sous un aspect diffus dans le cytoplasme (Figure 1. 9D c) : les protéines 140K/98K ne sont plus adressées aux chloroplastes lorsque leurs hélices A et B ont perdu leur propriété amphipathique.

Ces résultats démontrent donc l'importance de la propriété amphipathique des hélices A et B pour l'adressage aux chloroplastes.

Par ailleurs, nous constatons que l'observation en microscopie confocale de la perte d'adressage pour le mutant AB-LPLP n'est pas en accord avec le calcul du D de la combinaison A et B (Figure 1. 9A c), dont le résultat indiquait une prédiction fiable pour la liaison de l'hélice amphipathique à des lipides. Cette observation en microscopie confocale nous permet de conclure que les hélices A et B sont donc bien séparées physiquement, très probablement par la proline 396, et qu'elles constituent le DAC.

Outre l'implication des hélices A et B dans l'adressage des protéines 140K/98K, nous nous interrogeons sur leur contribution à l'ancrage des protéines dans les membranes de l'enveloppe des chloroplastes.

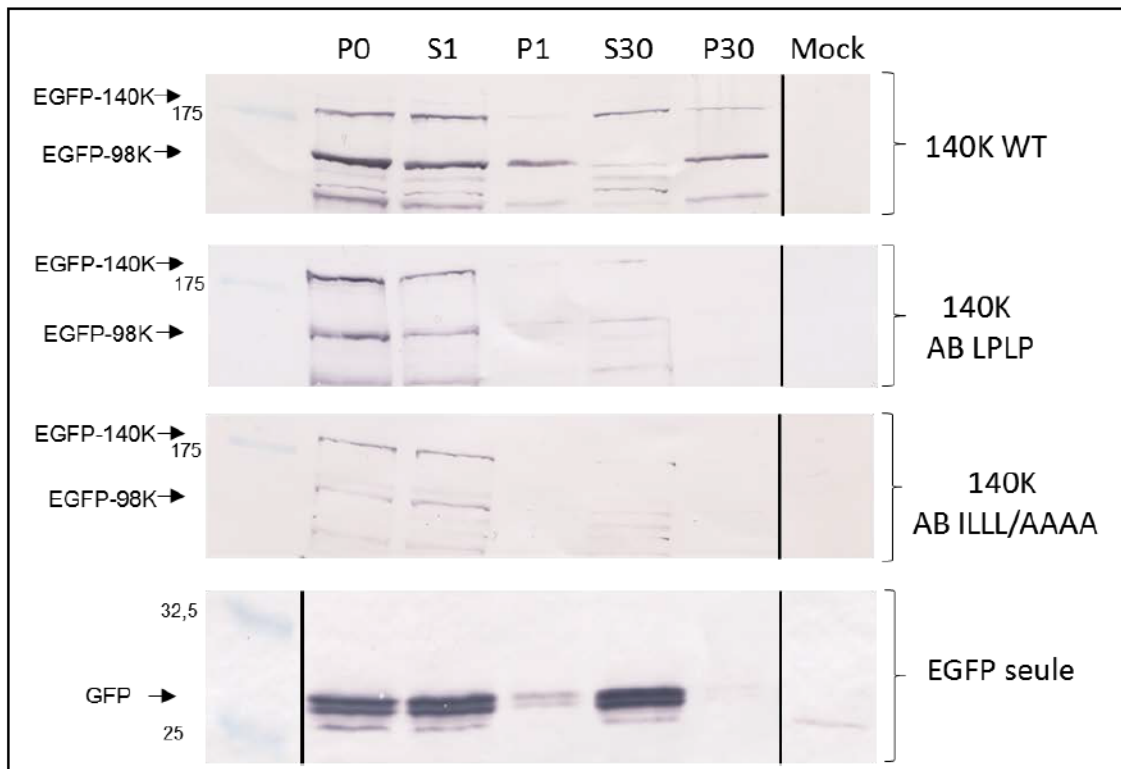


Figure 1. 10 – Tests de fractionnements subcellulaires avec des cellules transfectées par les vecteurs pΩ-EGFP seul et pΩ-EGFP-140K sauvage ou mutants.

Western blot des protéines EGFP-140K, EGFP-98K et GFP dans différentes fractions subcellulaires de protoplastes exprimant les protéines 140K sauvage (140K WT), mutantes (140K AB LPLP et 140K AB ILLL/AAAA) et la GFP seule. Les protoplastes ont été récoltés à 22 h p.t., puis lysés donnant une fraction de protéines totales (P0), ensuite soumise à des centrifugations différentielles à 1 000 g et 30 000 g, permettant de séparer les membranes (P1 et P30, respectivement) des fractions solubles (S1 et S30, respectivement). Les quantités de matériel ont été déposées en proportions selon les fractions récoltées. Les protéines 140K sauvage et mutantes ont été révélées par un anticorps anti-140K (Jakubiec et al., 2004), et l'EGFP par l'anti-GFP Abcam®.

Les tailles du marqueur de poids moléculaire en kDa sont inscrites à gauche, celles de l'EGFP-140K, de l'EGFP-98K et de la GFP seule sont indiquées par une flèche. Mock correspond aux protoplastes transfectés avec H₂O.

4 Les protéines 140K/98K sont associées et ancrées aux membranes subcellulaires

4.1 Recherche de l'association des protéines aux membranes par fractionnements subcellulaires

Afin d'étudier l'association aux membranes des protéines 140K/98K sauvage et mutantes dans les cellules, une série de tests de fractionnements cellulaires a été réalisée sur des protoplastes transfectés avec des plasmides p Ω -EGFP-140K sauvage ou mutants ou p Ω -EGFP seuls. Les cellules ont été lysées et, après une centrifugation à 300 g pour éliminer les débris cellulaires, le lysat a été soumis à des centrifugations différentielles à 1 000 g puis 30 000 g, permettant les récoltes des fractions membranaires (P1 ou P30) et solubles (S1 ou S30). La fraction subcellulaire P1 est enrichie en noyaux, chloroplastes et granules d'amidon, tandis que la fraction membranaires P30 contient le réticulum endoplasmique rugueux, les corps golgiens, les peroxysomes, les débris chloroplastiques et les mitochondries (Niesbach-Klöggen et al. 1990). Outre les protéines cytosoliques, la fraction S30 contient les petites vésicules et autres membranes qui n'ont pu être ni sédimentées ni séparées des protéines solubles.

L'EGFP exprimée seule constitue le témoin de l'expérience, elle est détectée dans les fractions solubles S1 et S30 (Figure 1. 10), ce qui est conforme à l'observation de sa distribution cytosolique. Les protéines 140K et 98K sauvages sont retrouvées associées à la fraction membranaire P30, démontrant ainsi leur capacité d'association aux membranes. En revanche, les deux protéines mutantes EGFP-AB-LPLLIP et EGFP-AB-ILLL/AAAA, ne sont pas présentes dans cette fraction prouvant que les mutations introduites empêchent l'association aux membranes des deux protéines correspondantes.

Bien que les quantités de matériel déposées des quatre western blots soient comparables, ceux réalisés avec les protéines mutantes ont dû être révélés sur un laps de temps plus long pour visualiser les bandes des protéines 140K mutantes. En effet, comparées aux protéines 140K sauvage ou EGFP seule, elles s'accumulent en quantité moindre dans les cellules.

Ces tests de fractionnements subcellulaires nous permettent de conclure que les protéines 140K et 98K exprimées en protoplastes sont associées aux membranes subcellulaires. En condition d'infection virale, il a été démontré que la protéine 140K interagit avec les membranes des chloroplastes (Jakubiec et al., 2004). Les résultats obtenus par microscopie confocale nous permettent de proposer que les membranes, auxquelles sont associées les protéines 140K et 98K, correspondent à celles de l'enveloppe des chloroplastes. Ces membranes seraient ciblées par les hélices alpha amphipathiques du DAC, qui pourraient ancrer les protéines 140K/98K dans la bicouche lipidique des enveloppes des chloroplastes.

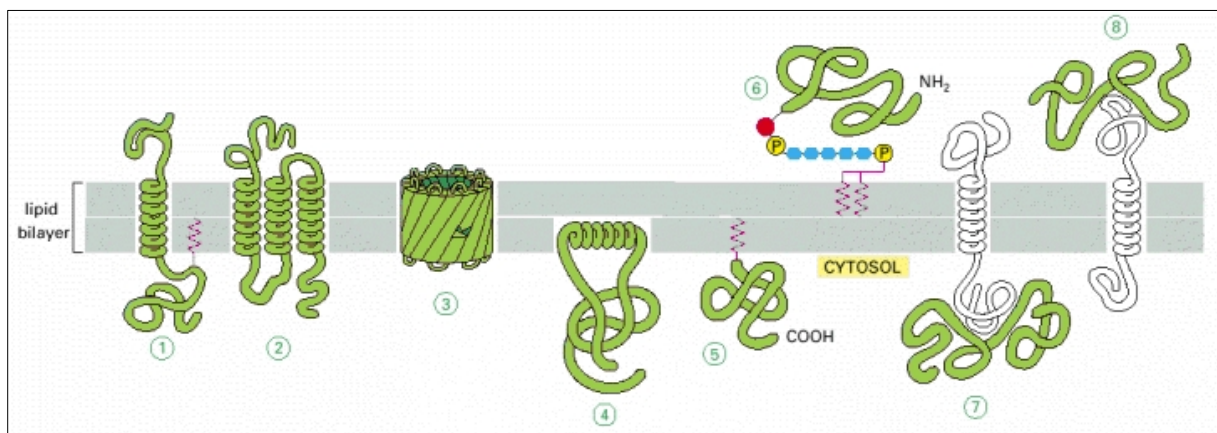


Figure 1. 11 – Schémas des différentes associations des protéines avec les membranes.

Les protéines transmembranaires peuvent traverser la bicouche lipidique avec une (1) ou plusieurs (2) hélice(s) alpha ou en tonneau β (3). Les protéines transmembranaires traversant la bicouche grâce à des hélices amphipathiques peuvent également être attachées de manière covalente avec la chaîne d'un acide gras insérée dans la couche lipidique orientée vers le cytosol (1).

Les autres protéines membranaires sont exposées seulement d'un côté de la membrane.

Certaines sont ancrées dans la couche lipidique, orientée vers la surface cytosolique, via la face hydrophobe d'une hélice amphipathique (4).

D'autres sont uniquement attachées à la bicouche lipidique par une chaîne lipidique (5) de manière covalente, soit dans la couche orientée vers le cytosol via la chaîne d'un acide gras ou via un groupe prényl, soit aux phosphatidylinositols de la couche lipidique non cytosolique via une liaison oligosaccharidique (6).

Enfin, beaucoup de protéines sont attachées à la membrane seulement par le biais d'interactions non covalentes (7 et 8) avec d'autres protéines de membrane.

Figure d'après Alberts B et al. (2002).

4.2 Tests de l'ancrage des protéines 140K/98K aux membranes cellulaires

L'association à l'enveloppe des chloroplastes des protéines 140K/98K a été démontrée en condition d'infection virale (Jakubiec et al., 2004). Nous proposons que les hélices alpha amphipathiques du DAC puissent être non seulement responsables de l'adressage, mais également de l'ancrage des protéines 140K/98K au niveau de la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes.

La structure des protéines et les propriétés physico-chimiques de leurs acides aminés influencent leurs interactions avec les constituants des membranes cellulaires. Les protéines peuvent être d'une part extrinsèques ou périphériques et, d'autre part, intrinsèques ou intégrales (Figure 1. 11) (Alberts B et al., 2002).

Les protéines extrinsèques peuvent être liées par des interactions électrostatiques ou des liaisons physiques non-spécifiques de force faible, directement avec la bicouche lipidique, ou indirectement via une protéine déjà associée à la membrane (Figure 1. 11 7 et 8). Des traitements chimiques par augmentation du pH ou de la force ionique vont permettre de dissocier cette catégorie de protéines de la membrane.

Parmi les modifications co- ou post-traductionnelles des protéines, certaines consistent en la prénylation, myristoylation ou palmitoylation d'acides gras, ou en l'ajout d'un groupement lipidique covalent de type glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) (Parmryd et al., 1997; Running, 2014; Stael et al., 2011). De par leur nature, ces acides gras et ancres GPI (Figure 1. 11 1, 5 et 6) sont ensuite insérés dans la membrane cellulaire ciblée. La protéine n'est pas dissociable de la membrane par augmentation du pH ou de la force ionique.

Quant aux protéines intrinsèques ou intégrales, elles sont insérées dans la membrane traversant la bicouche lipidique grâce à ses domaines transmembranaires (Figure 1. 11 1 et 2) ou ses feuillettes β disposés en barils (Figure 1. 11 3). Il est également possible que la protéine soit insérée uniquement dans l'une des couches de la membrane grâce à des hélices amphipathiques (Figure 1. 11 4). En effet, des interactions ont lieu entre les queues hydrophobes des lipides membranaires et les acides aminés hydrophobes, ainsi qu'entre les têtes polaires de ces lipides et les acides aminés chargés positivement. Ces protéines intégrales ne peuvent être décrochées des membranes par augmentation du pH ou de la force ionique. Seul l'emploi de détergents appropriés permet de les solubiliser (Alberts B et al., 2002).

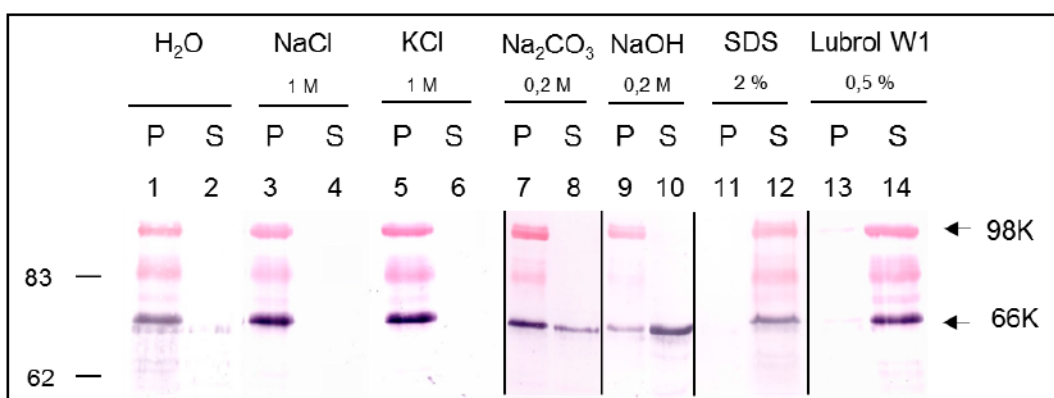


Figure 1. 12 – Tests biochimiques de l’ancrage de la protéine 98K aux membranes cellulaires en condition d’infection par le TYMV.

Western blot avec les membranes cellulaires extraites à partir de feuilles de chou infectées par le TYMV. Les membranes ont été soumises à des tests biochimiques : H₂O, NaCl 1 M, KCl 1 M, Na₂CO₃ 0,2 M, NaOH 0,2 M, SDS 2 % et lubrol W1 0,5 %. Les traitements ont été arrêtés par centrifugation à 100 000 g puis les fractions membranaires (P) et solubles (S) ont été récoltées. Les protéines ont été révélées d’une part, avec l’anticorps anti-140K (Jakubiec et al., 2004) détecté par le rouge naphthol pour la 98K, et d’autre part, avec l’anticorps anti-66K (Prod’homme et al., 2001) détecté par NBT/BCIP pour la 66K. Les tailles indiquées à gauche correspondent au marqueur de poids moléculaire en kDa, celles de droites, aux protéines 98K et 66K (flèches).

Afin de définir le mode d'interaction des protéines 140K/98K avec les membranes intracellulaires, nous avons travaillé à partir de feuilles de chou infectées par le TYMV, afin d'obtenir une plus grande quantité de matériel biologique qu'avec des protoplastes infectés. Lors de l'infection virale, la polyprotéine 206K est clivée en ses produits : la protéine 140K et la polymérase (66K). La protéine 140K, clivée en protéines 98K et hélicase, est présente en quantités extrêmement faibles (Jakubiec et al., 2004). Les fractions membranaires ont été extraites de feuilles de chou infectées, puis soumises à divers traitements chimiques pour trouver les conditions de solubilisation des protéines 98K et 66K. Les membranes traitées ont ensuite été sédimentées par ultracentrifugation permettant de récolter les fractions membranaires et solubles, puis de rechercher par western blots la présence des protéines 98K et 66K (Figure 1. 12). Ces expériences ont été réalisées au laboratoire par Stéphanie DEVIGNOT.

En l'absence de traitement (H_2O seul), les protéines 98K et 66K sont retrouvées exclusivement au niveau du culot de membranes (Figure 1. 12, puits 1 et 2). Comme témoins de solubilisation, nous avons choisi de traiter les membranes soit au SDS 2 %, soit avec le polyoxyéthylène éther W1 (ou lubrol W1) 0,5 %. Le SDS, détergent ionique, entraîne la dénaturation des protéines et dissocie la bicouche lipidique. Par ce traitement, les protéines se retrouvent bien dans la fraction soluble (Figure 1. 12, puits 11 et 12). Contrairement au SDS, le lubrol est un détergent non-ionique qui préserve l'intégrité membranaire tout en permettant l'extraction des complexes de réplication viraux fonctionnels (Deiman et al., 1997; Jakubiec et al., 2004). Les protéines 98K et 66K sont effectivement retrouvées dans la fraction soluble suite aux traitements avec ce détergent (Figure 1. 12, puits 13 et 14).

Afin de tester si la protéine 98K est dépendante des forces électrostatiques pour son interaction avec les membranes, celles-ci ont été incubées avec des concentrations élevées de sels ($NaCl$ 1 M et KCl 1 M, puits 3 à 6 sur la Figure 1. 12), ou de composés fortement basiques (Na_2CO_3 0,2 M et $NaOH$ 0,2 M, puits 7 à 10 sur la Figure 1. 12). La protéine 98K est insensible aux traitements salins et alcalins car elle reste associée aux fractions membranaires.

Ces résultats montrent, d'une part, que la protéine 98K n'est pas une protéine périphérique - son interaction n'est pas uniquement dépendante d'éventuelles forces électrostatiques - et, d'autre part, qu'elle présente les caractéristiques d'une protéine intégrale membranaire.

En ce qui concerne la protéine 66K, nous observons que les traitements salins (puits 3 à 6, Figure 1. 12) ne permettent pas sa dissociation des membranes, même partielle, contrairement aux traitements avec les composés basiques (puits 7 à 10, Figure 1. 12). Il a déjà été démontré que les complexes de réplication du TYMV sont hébergés par des structures vésiculaires invaginées situées à la périphérie de l'enveloppe du chloroplaste (Prod'homme et al., 2001) et que la protéine 66K interagit physiquement avec la protéine 98K (Jakubiec et al., 2004). Cette protection par les membranes invaginées pourrait donc empêcher l'accessibilité des complexes de réplication aux traitements salins. En revanche, les traitements basiques convertissent les formes vésiculaires des membranes en feuillettes, rendant accessibles les complexes de réplication, et permettent donc la dissociation des interactions entre les protéines 66K et 98K. Ces résultats signifient que les complexes de réplication sont protégés de l'environnement cytoplasmique, probablement grâce à l'ancrage de la protéine 98K dans les membranes de l'enveloppe externe des chloroplastes.

Ces expériences de solubilisation de la protéine 98K ont été réalisées en condition d'infection virale, faisant intervenir tous les facteurs viraux. Afin de s'affranchir de leur présence, nous avons initié des tests de solubilisation avec des protoplastes transfectés avec le p Ω -EGFP-140K. Les résultats préliminaires obtenus vont dans le sens de ceux observés en condition virale, signifiant que la seule protéine virale impliquée à la fois dans l'adressage et l'ancrage serait la protéine 140K, contenant les protéines 98K et hélicase. Cependant ces tests préliminaires n'ont pas été poursuivis, du fait des trop faibles quantités de matériel disponibles avec les protoplastes transfectés.

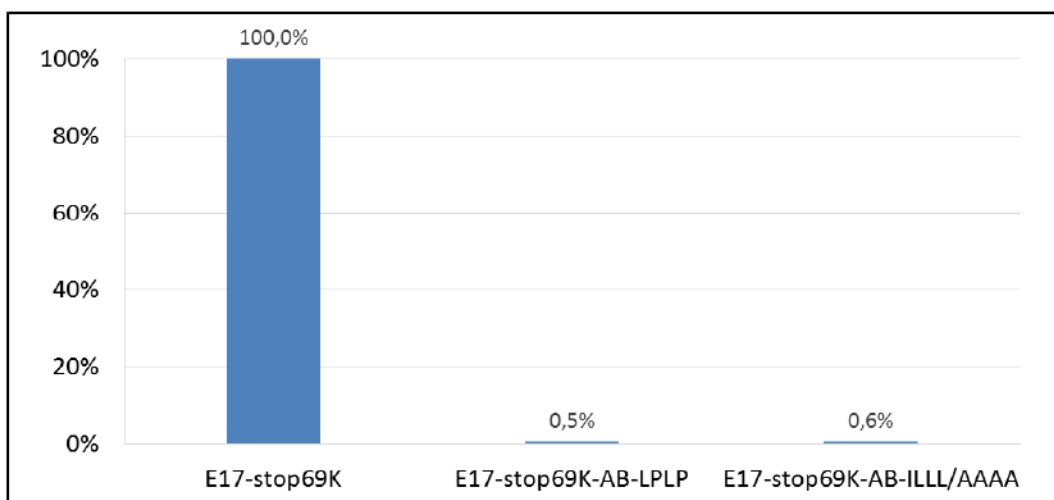


Figure 1. 13 – Réplifications des transcrits *in vitro* E17-stop69K sauvage et mutés, après transfection dans les protoplastes d'*A. thaliana*, et mesure de la quantité d'ARN viral accumulée par qPCR.

Les taux de réplication sont indiqués au-dessus de chaque transcrits : E17-stop69K, E17-stop69K-AB-LPLP et E17-stop69K-AB-ILL/AAAA.

5 Le repliement du DAC en hélices amphipathiques est nécessaire pour la réplication virale

Parmi les protéines 140K mutantes fusionnées à la GFP que nous avons créées, deux ne sont plus adressées aux chloroplastes et se retrouvent localisées dans le cytoplasme : 140K AB LPLP et 140K AB ILLL/AAAA. Afin de déterminer la contribution du phénomène d'adressage dans la réplication du TYMV, nous avons introduit les mutations responsables de la perte de l'adressage dans le génome viral.

5.1 Effets des mutations sur la réplication virale

Au laboratoire, nous disposons d'une construction, appelée plasmide E17 (Drugeon and Jupin, 2002), portant le cDNA entier du TYMV, sous le contrôle du promoteur T7 qui permet la transcription *in vitro* en ARN viraux. Ces transcrits sont ensuite transfectés en protoplastes d'*A. thaliana* dans lesquels ils sont infectieux et peuvent se répliquer. Les cellules sont récoltées à 48 h p.t., leurs ARN totaux sont extraits et l'ARN viral est quantifié par RT-qPCR, permettant l'estimation de la proportion d'ARN viraux nouvellement produits.

Une problématique rencontrée est que les mutations affectant la face hydrophobe des hélices A et B touchent également la protéine 69K (Figure I 16A). En effet, l'ORF 1 du TYMV, codant la protéine 69K, chevauche l'ORF 2 codant la protéine 206K, précurseur de la protéine 140K. La protéine 69K n'étant pas essentielle pour la réplication virale, nous avons alors travaillé avec le vecteur E17-stop69K, portant le génome viral ne codant plus pour la protéine 69K (Prod'homme et al, 2003). Les mutations 140K AB LPLP et 140K AB ILLL/AAAA ont donc été clonées dans le plasmide E17-stop69K.

Les résultats de RT-qPCR montrent que les transcrits issus du E17-stop69K permettent la réplication de l'ARN viral. En revanche, les transcrits E17-stop69K possédant les mutations AB LPLP et AB ILLL/AAAA sont très sérieusement affectés dans leur capacité à se répliquer (Figure 1. 13).

La destruction de la structuration en hélices alpha du DAC, ou la modification de leur propriété amphipathique, qui sont responsables de la localisation cytoplasmique des protéines, empêchent donc la réplication virale.

5.2 Effets des mutations sur l'interaction des protéines 98K et 66K

Afin de s'assurer que l'absence de réplication observée avec les transcrits des mutants E17-stop69K ne soit pas liée à son incapacité à interagir avec la polymérase virale 66K, nous avons entrepris de vérifier que les protéines 140K/98K et 66K sont toujours capables d'interagir entre elles en utilisant la technique de complémentation de fluorescence bi-moléculaire (BiFC).

La technique de BiFC (Hu et al., 2002) a été adaptée pour les plantes (Walter et al., 2004) et permet de visualiser des interactions entre protéines à l'intérieur des cellules vivantes. Elle consiste à fusionner chacune des deux protéines candidates à l'interaction, avec la partie N-terminale de la YFP pour l'une et avec la partie C-terminale de la YFP pour l'autre. En cas d'interaction des deux protéines candidates, les parties N- et C-terminales de la YFP se retrouvent alors suffisamment proches pour permettre l'assemblage complet et irréversible de la YFP, conduisant à l'observation d'un signal fluorescent. En revanche, si les deux protéines candidates ne sont pas suffisamment rapprochées (jusqu'à environ 10 nm, comme estimé par Hu et al., 2002), alors la YFP n'est pas formée.

Il a été montré que les protéines 140K et 66K sont impliquées dans une interaction protéine-protéine, impliquant le domaine protéase de la protéine 140K (Jakubiec et al., 2004). Or, celui-ci étant également présent dans la protéine 98K, nous avons vérifié que les protéines 66K et 98K peuvent interagir, en employant des vecteurs d'expression où les parties N- ou C-terminales de la YFP sont fusionnées à ces protéines. Les mutations AB LPLP et AB ILLL/AAAA ont ensuite été introduites dans les vecteurs pNter-YFP-98K et pCter-YFP-98K. A titre de témoins négatifs de l'expérimentation, nous avons également testé l'interaction entre la 98K et trois protéines cellulaires : la succinate déshydrogénase 5 (SDH5), la tata-binding protein 1 (TBP1) et une petite protéine ribonucléaire (IMPA) qui sont fusionnées à la partie C-terminale de la YFP dans le pCter-YFP. Des protoplastes d'*A. thaliana* ont ensuite été co-transfectés avec les plasmides pNter-YFP-98K (sauvage ou mutantes) et pCter-YFP-66K ou p-Cter-YFP- SHD5, TBP1 ou IMP4. A 48 h p.t., une fraction des cellules a été analysée par cytométrie en flux pour quantifier le pourcentage de cellules fluorescentes, reflétant donc la proportion de cellules présentant des interactions (Figure 1. 14A). Une autre fraction des cellules a été observée en microscopie confocale à spinning disk (Figure 1. 14B) afin de détecter la localisation subcellulaire des protéines en interaction.

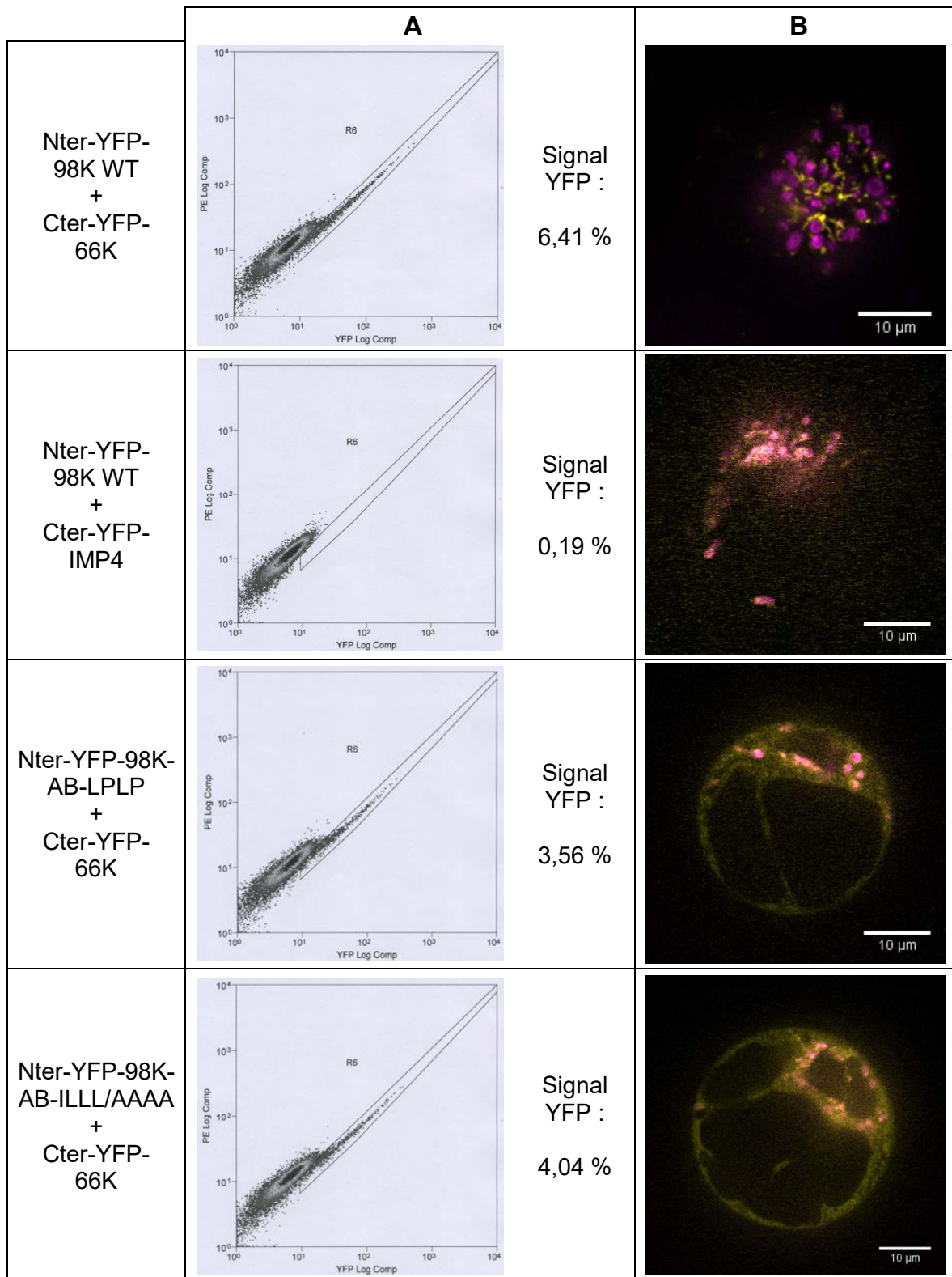


Figure 1. 14 –Analyses des interactions entre protéines 98K et 66K par BiFC.

Les protéines testées sont mentionnées à gauche de chaque condition. (A) Données issues de l'analyseur Cyan pour les tests de BiFC où R6 désigne la zone présentant des cellules avec un signal YFP significatif après compensation. A droite est indiquée la proportion de cellules ayant un signal YFP (%). (B) Visualisation en protoplastes d'*A. thaliana* des interactions pour les protéines testées. Images de microscopie confocale à spinning disk, sur un plan de la cellule, au grossissement 100X. Le marquage jaune correspond à la fluorescence de la YFP et le magenta aux fluorescences de la chlorophylle et de la NirFP. Barre d'échelle : 10 µm.

L'emploi de la cytométrie en flux permet de détecter un signal YFP significatif et de donner les proportions de cellules ayant un signal fluorescent (R6, Figure 1. 14A). Nous observons que les cellules co-exprimant les protéines 98K sauvage et 66K présentent un signal YFP pour 6,41 % des cellules.

Les observations de ces co-transfections en microscopie confocale permettent de déterminer la localisation de la fluorescence de la YFP, résultante des interactions entre les protéines 98K et la polymérase 66K. Des images représentatives de ces co-transfections (Figure 1. 14B) montrent que les protéines 98K sauvage et 66K interagissent en périphérie des chloroplastes, confirmant les résultats antérieurs (Jakubiec et al., 2004).

Les résultats de cytométrie en flux attestent que la protéine 98K n'interagit pas avec les protéines cellulaires choisies comme témoins négatifs (sur la Figure 1. 14, seule l'interaction 98K-IMP4 est représentée). Le signal YFP visible en microscopie correspond à du bruit de fond.

En ce qui concerne les protéines 98K mutantes, les données issues de la cytométrie en flux révèlent que 3,5 % des cellules pour Nter-YFP-98K-AB LPLP et 4 % des cellules pour Nter-YFP-98K-AB ILLL/AAAA présentent un signal YFP significatif (Figure 1. 14A).

L'observation des cellules en microscopie confocale a permis de visualiser le signal YFP dans le cytoplasme des cellules, ce qui est cohérent avec la localisation cytoplasmique des deux protéines mutantes EGFP-140K-AB LPLP et EGFP-140K-AB ILLL/AAAA (respectivement, Figure 1. 8F et Figure 1. 9F).

Ces résultats nous permettent de conclure que les deux protéines mutantes localisées dans le cytoplasme sont toujours capables d'interagir avec la polymérase virale 66K. Le défaut de réplication virale observé précédemment n'est donc pas causé par une interaction défectueuse entre les deux partenaires (Figure 1. 13).

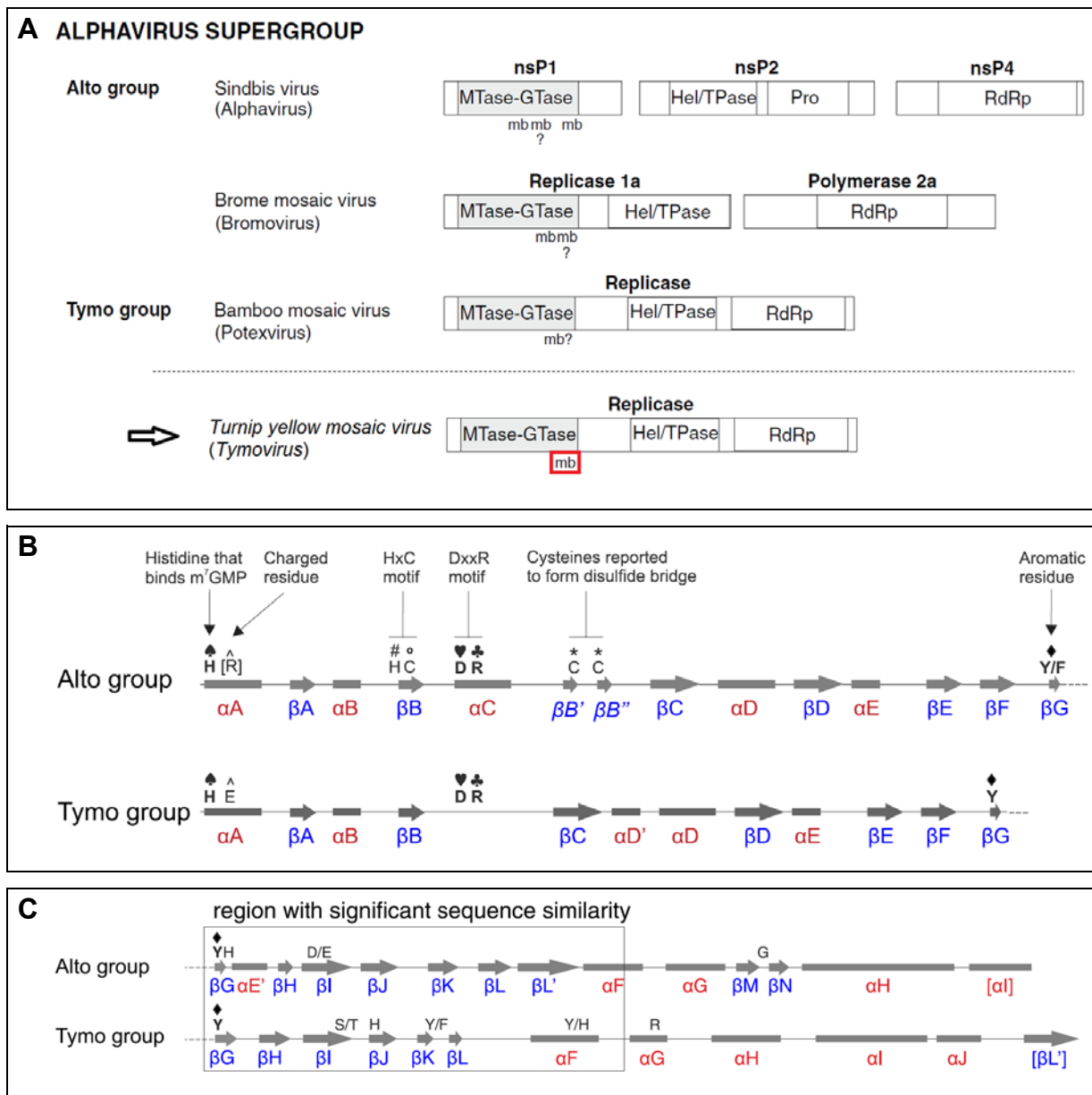


Figure 1. 15 – Comparaisons des méthyltransférases des répliques virales du supergroupe des alphavirus.

(A) organisation des domaines répliques des groupes « alto » et « tymo ». Les représentations sont approximativement à l'échelle et présentent les résultats de l'étude d'Ahola et Karlin (2015) ainsi que nos résultats pour le TYMV. Les génomes de plusieurs membres du supergroupe des alphavirus codent pour une polyprotéine, qui est clivée en plusieurs protéines, ou qui est exprimée en protéines individuelles, comme illustré par le *Sindbis virus* et le TYMV, et le *Brome mosaic virus*, respectivement. Au contraire, la réplique du *Bamboo mosaic virus* n'est pas clivée. Pour chaque virus, seuls des protéines ou domaines contenant une MTase-GTPase, une protéase, une RdRp ou une triphosphatase sont indiqués. Les segments impliqués dans une association avec les membranes (mb) sont indiqués, les putatifs présentent un point d'interrogation.

(B) Organisation de la région Core des MTase-GTase. La représentation est approximativement à l'échelle. Les hélices alpha et les brins β sont indiqués par des rectangles et flèches, respectivement. Le résidu chargé (R[^] ou E[^]), dans l'hélice αA, est localisé 7 acides aminés en aval de l'histidine H[^] et les deux cystéines (C*) en amont de βC sont espacées de 6 acides aminés. Les éléments de structure secondaire ou les positions qui ne sont pas strictement conservés sont indiqués par des crochets.

(C) Organisation de la région Iceberg, en aval de la région Core des MTase-GTase, qui débute après le résidu conservé Y♦ dans le brin βG. Les conventions sont les mêmes qu'en (B).

Figure adaptée d'après Ahola et Karlin (2015)

6 Discussion du chapitre

6.1 Importance des hélices alpha amphipathiques pour l'association membranaire des protéines virales

Les hélices alpha amphipathiques responsables de l'association aux membranes sont largement retrouvées parmi les virus à ARN(+). Les protéines ayant un domaine liant les nucléosides triphosphates, NBT-VPg du *Tomato ringspot nepovirus* (Zhang et al., 2005) et 2C du *Poliovirus* (Teterina et al., 2006), ont une hélice amphipathique s'associant avec les membranes du RE, sièges de la réplication virale. L'expression de la protéine NS4B de l'HCV, possédant quatre hélices alpha amphipathiques, induit un réarrangement en réseau des structures membranaires du RE, appelé « membranous web structure » (Elazar et al., 2004; Gouttenoire et al., 2009a, 2009b, 2010, 2014). Les complexes de réplication de l'HCV contiennent également une autre protéine virale possédant une hélice amphipathique : la protéine NS5A, dont le rôle est encore mal connu (Brass et al., 2002; Elazar et al., 2003). De manière intéressante, Teterina et al. (2006) ont identifié une homologie de structure entre l'hélice amphipathique de la protéine 2C du PV et celle de NS5A de l'HCV, toutes les deux localisées dans la partie N-terminale des protéines, alors que ces virus n'appartiennent pas aux mêmes familles virales. Ils ont proposé puis démontré que ces hélices constituent des modules indépendants et transférables entre différents virus.

Récemment, les travaux menés sur le supergroupe des alphavirus (comprenant les virus des groupes « alto » et « tymo », Figure 1. 15A) (Ahola and Karlin 2015), ont permis aux auteurs de proposer que le domaine méthyltransférase de ces virus possède deux régions : la « région Core », en N-terminal du domaine méthyltransférase (Figure 1. 15B), suivie de la « région Iceberg » (Figure 1. 15C). La séquence peptidique de la région « Core » est conservée entre les différents virus, contrairement à la région « Iceberg » pour laquelle seules les structures secondaires sont conservées. Cette dernière serait impliquée dans une interaction avec les membranes via des hélices amphipathiques prédites (Figure 1. 15). Cette proposition a par ailleurs pu être démontrée expérimentalement avec la protéine nsP1 du *Semliki forest virus* (Spuul et al., 2007), où l'hélice impliquée correspond à une $\alpha E'$ du groupe des altovirus (Figure 1. 15C). En outre, cette protéine présente des sites de palmitoylation après l'hélice αH . Dans le cas de la protéine 1a du *Brome mosaic virus*, l'hélice alpha impliquée (Liu et al., 2009) correspond à une αH du groupe des altovirus. De plus, une autre hélice, αI , est prédite pour ce virus comme pouvant contribuer à l'association aux membranes (Ahola and Karlin, 2015). Les auteurs proposent que les MTase-GTase des virus du groupe alto, à l'exception des *Alphavirus*, interagissent avec les membranes via les hélices αH et/ou αI .

Dans le cadre de notre étude avec le TYMV, membre type des *Tymovirus*, nous avons mis en évidence l'existence de deux hélices alpha A et B, requises pour les interactions avec les membranes. De par leur emplacement dans la séquence, à savoir dans la partie C-terminale de la région « Iceberg », nous proposons que les hélices A et B du TYMV correspondent aux hélices αI et αJ du groupe des tymovirus présentées dans l'étude d'Ahola et Karlin (2015) (Figure 1. 15C).

6.1.1 Détection d'hélices alpha amphipathiques, au sein du DAC des protéines 140K/98K

La réalisation de délétions a conduit à la délimitation du domaine minimal d'adressage de la protéine 140K. Quant aux prédictions de structures secondaires, elles ont permis l'identification des deux hélices alpha amphipathiques A et B séparées par une proline, et de proposer leur implication dans le processus d'adressage aux chloroplastes.

Les tests de dichroïsme circulaire, effectués avec le peptide AB en solution aqueuse ou en présence de TFE, ont démontré expérimentalement la conformation du domaine minimal en hélice alpha, comme réalisé avec d'autres protéines virales (Brass et al., 2002; Choi and Rao, 2000; Gouttenoire et al., 2014). Toutefois, la connaissance des détails atomiques de ce peptide AB ne serait possible que par cristallographie ou spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), comme réalisé pour d'autres virus à ARN(+) (Liu et al., 2009).

Afin de déterminer la contribution des lipides dans la structuration en hélices du peptide AB, des tests préliminaires de dichroïsme circulaire ont été réalisés en collaboration avec P. FUCHS et D. TARESTÉ, en présence de liposomes. Deux compositions lipidiques ont été testées : soit phosphatidylcholine (PC) 94 % et phosphatidylinositol (PI) 6 %, soit une composition proche de celle de la membrane externe des chloroplastes (PC 32 %, PI 6 %, phosphatidylglycérol (PG) 10 %, sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) 6%, digalactosyldiacylglycérol (DGDG) 29% et monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) 17 %) (Jouhet et al., 2007) pour se rapprocher davantage de la réalité de l'environnement membranaire présent lors de l'infection virale. Les résultats obtenus indiquent que la présence de lipides, par comparaison au milieu aqueux, permet d'augmenter la proportion d'hélices du peptide AB. Elle devient équivalente à celle observée avec du TFE 100 % lorsque la composition des liposomes est proche de celle de la membrane externe des chloroplastes. Bien que ces résultats soient encore préliminaires, ils signifieraient que la composition en acides aminés du DAC serait appropriée pour la conformation optimale en hélices alpha, en présence de liposomes de composition identique à celle de la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste.

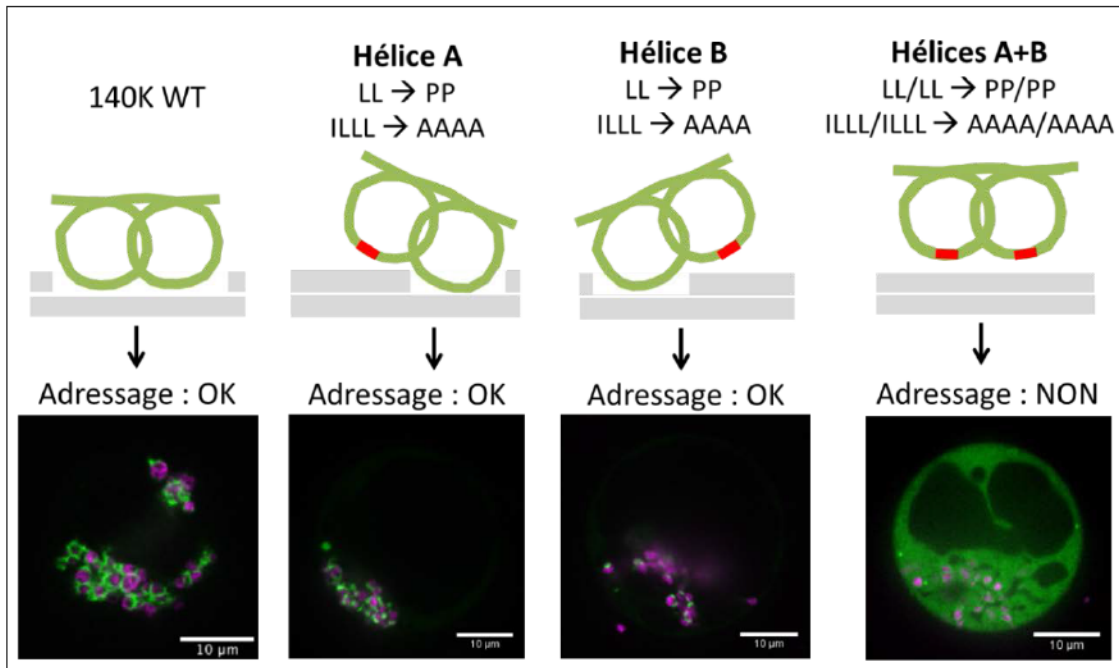


Figure 1. 16 – Modèle proposé pour l'interaction des protéines 140K/98K avec la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes.

Le DAC pourrait être inséré dans la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes par l'intermédiaire de ses deux hélices alpha amphipathiques A et B. Lorsque l'hélice A ou B est modifiée par substitution de deux leucine en proline, ou par changement de sa face hydrophobe, le processus d'adressage est maintenu grâce à la présence de l'autre hélice fonctionnelle. La modification de l'ensemble des deux hélices A et B est donc requise pour la perte de l'adressage.

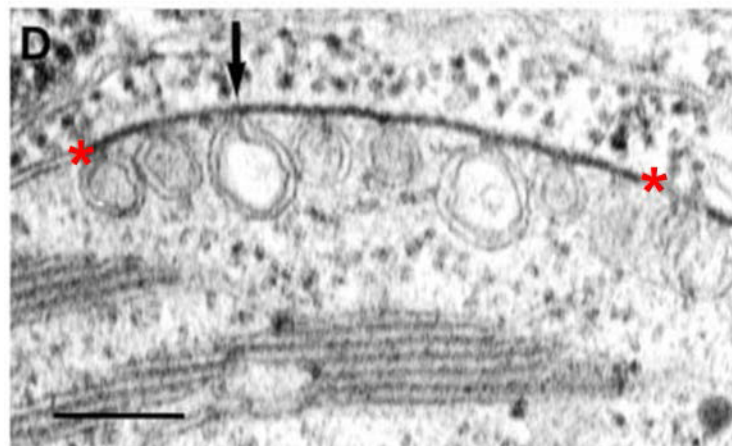


Figure 1. 17 – Observation en microscopie électronique à transmission d'une feuille de chou chinois infecté par le TYMV.

Les astérisques rouges encadrent la densification de l'enveloppe du chloroplaste. La double membrane est visible sur la gauche de l'image, avant l'astérisque. La flèche indique le canal d'une sphérule permettant sa connexion avec le cytoplasme. La barre représente 100 nm. Image d'après (Prod'homme et al., 2001).

6.1.2 Adressage des protéines 140K/98K via les hélices alpha amphipathiques A et B du DAC

Les modifications de la structuration hélicoïdale ou de la propriété amphipathique de l'hélice A ou de l'hélice B du DAC montrent que l'une ou l'autre suffit à l'adressage de la protéine entière. La combinaison des modifications dans les deux hélices du DAC a entraîné soit une déstructuration de son organisation, soit la disparition totale de sa propriété amphipathique, empêchant l'adressage aux chloroplastes des protéines mutées. Ces données révèlent donc l'importance de la structuration en hélices, ainsi que leur propriété amphipathique, pour l'adressage aux membranes des protéines 140K/98K.

L'ensemble des résultats permet la proposition d'un modèle (Figure 1. 16) selon lequel le domaine minimal d'adressage des protéines 140K/98K serait constitué par deux hélices alpha amphipathiques indépendantes, mais redondantes pour l'adressage.

6.1.3 Insertion probable de la protéine 140K dans la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes via son DAC

Une densification de l'enveloppe du chloroplaste, au niveau des parties présentant les sphérules, avec perte de l'espace inter-membranaire, est visible sur les images de microscopie électronique obtenues en condition d'infection par le TYMV (Figure 1. 17) (Prod'homme et al., 2001). Nous suggérons que ces densifications résultent de l'insertion des hélices A et B des protéines 140K/98K dans la membrane externe du chloroplaste, modifiant alors localement son organisation.

Les tests de solubilisations de la protéine, en condition d'infection, ont montré que la protéine 98K se comporte comme une protéine intégrale membranaire. Comme rapporté pour d'autres cas (Liu et al., 2009; Miller and Ahlquist, 2002; Zhang et al., 2005), nous proposons que les hélices alpha du DAC soient suffisantes pour l'ancrage de la protéine 140K dans les membranes. Pour tester cette hypothèse, il conviendrait de réaliser des expériences de solubilisation similaires avec la protéine EGFP-140K(372-413) exprimée seule. Toutefois, les protoplastes fournissent peu de matériel pour ce type d'expérimentations, qui, par conséquent, nécessitent encore des mises au point.

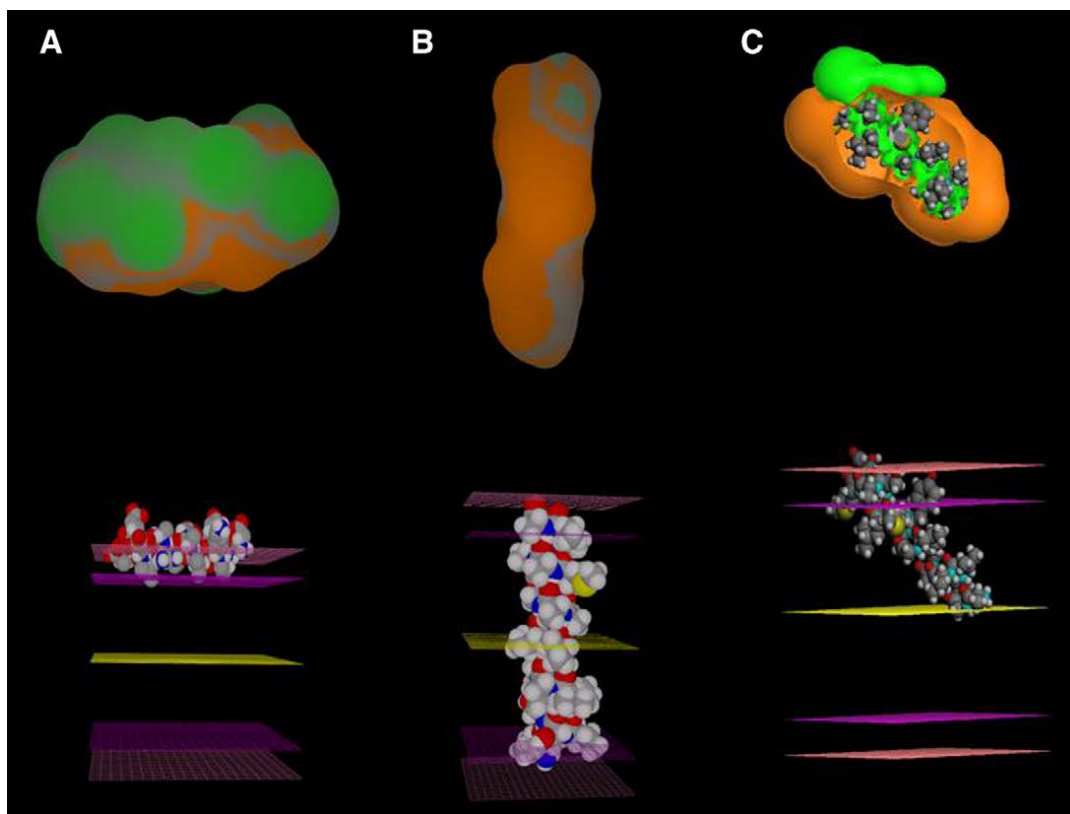


Figure 1. 18 – Représentation des tilted peptides (C) en comparaison des peptides transmembranaire (B) ou amphipathique (A).

Pour la partie supérieure, les surfaces hydrophobes sont colorées en orange, et les hydrophiles, en vert. Pour la partie inférieure, le peptide est orienté dans une membrane schématisée symétriquement : le plan jaune correspond au centre de la bicouche, les plans mauves à l'interface tête/chaîne acyle des phospholipides et les roses à l'interface tête des phospholipides/environnement aqueux.

Figure issue de la revue Lins et al. (2008).

Les hélices alpha amphipathiques ont plusieurs modes d'interactions avec les membranes (1, 2 et 4 Figure 1. 11) et, de surcroît, elles peuvent être stabilisées dans cette configuration suite à une palmytoylation ou une myristylation, sur un ou plusieurs de leurs résidus (5, Figure 1. 11), comme observé pour d'autres virus (Ahola et al., 2000; Spuul et al., 2007). Nous avons testé la possibilité des protéines 140K/98K à être palmitoylées avec le logiciel CSS-Palm 4.0 (Ren et al., 2008) qui ne détecte aucun résidu pouvant être modifié. Nous avons également recherché des sites de myristoylation dans les protéines 140K/98K avec les prédicteurs NMT (Bologna et al., 2004) et Myristoylator (Eisenhaber et al., 2003; Maurer-Stroh et al., 2002), mais aucun résidu modifiable n'a été trouvé.

Par ailleurs, les hélices alpha amphipathiques d'un peptide ou d'une protéine sont responsables de leur agencement par rapport à la bicouche lipidique. En effet, les hélices amphipathiques peuvent permettre une association de la protéine parallèle au plan de la membrane, mais elles peuvent également soit (i) former un « tilted peptide » (aussi appelé peptide oblique), soit (ii) s'organiser pour permettre l'insertion transmembranaire de la protéine (Figure 1. 18). Les tilted peptides sont des fragments protéiques de 11 à 18 acides aminés possédant un gradient d'hydrophobicité le long de l'axe de leur hélice. Ce gradient provoque l'insertion oblique partielle de la protéine, dans une seule couche lipidique de la membrane (Lins and Brasseur, 2008)(Figure 1. 18 C), contrairement au cas (ii) où la protéine transmembranaire peut traverser presque perpendiculairement la bicouche lipidique (Figure 1. 18 B).

Toutefois, la représentation PyMol des hélices A et B (Figure 1. 6) ainsi que sa propriété amphipathique ne vont pas dans le sens d'un arrangement graduel des résidus hydrophobes et hydrophiles. En ce qui concerne les prédictions de domaines transmembranaires, elles apparaissent peu fiables puisque les différents logiciels n'aboutissent pas aux mêmes résultats : certains prédisent deux, voire trois, domaines transmembranaires, d'autres n'en prédisent aucun.

Ceci nous conduit à privilégier l'hypothèse selon laquelle l'ancrage des protéines 140K/98K est réalisé parallèlement au plan de la membrane, via les hélices A et B du DAC.

6.1.4 L'association aux membranes de la protéine 140K est-elle requise pour son clivage ?

La synthèse de la protéine 140K, à partir des vecteurs d'expression transitoire, pourrait être réalisée librement dans le cytosol. Si nous ignorons où son clivage en protéines 98K et hélicase (Jakubiec et al., 2007) pourrait avoir lieu, nous suggérons qu'il soit réalisé au niveau de la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes, une fois l'adressage de la protéine 140K réalisé. Les expériences de fractionnements subcellulaires (Figure 1. 10) ont révélé une différence de répartition entre les protéines 140K et 98K : alors que la protéine 98K est toujours retrouvée avec les fractions membranaires P1 et P30, la protéine 140K est également présente dans la fraction S30 (Figure 1. 10). Ces résultats demandent à être reproduits, mais ils suggèrent que la protéine 140K puisse exister sous forme non associée aux membranes dans le cytosol. Toutefois, la présence d'hélices amphipathiques permet de proposer qu'elle puisse être soit (i) agrégée avec d'autres protéines 140K/98K permettant d'isoler leurs parties hydrophobes de l'environnement cytoplasmique ou encore avec des facteurs cellulaires, soit (ii) associée à des membranes avant d'atteindre les chloroplastes et y être clivée. Dans le cas (i), il faudrait rechercher une éventuelle interaction des protéines 140K/98K entre elles. En ce qui concerne le cas (ii), il est possible que les membranes, auxquelles les protéines 140K/98K sont associées, ne sédimentent pas aux mêmes densités que les chloroplastes, expliquant la présence de la protéine 140K dans la fraction soluble S30. Pour s'en assurer, il faudrait mettre au point des conditions de flottaisons de membranes ou d'ultracentrifugation, permettant la séparation fiable des membranes de la fraction cytosolique (Abas and Luschnig, 2010), que nous avons été dans l'impossibilité de réaliser, en raison des trop faibles quantités de matériel obtenues avec les protoplastes.

Cependant, les protéines mutantes localisées dans le cytoplasme présentent également les protéines 98K et hélicase, issues du clivage de la protéine 140K. Cela signifie que le clivage de la protéine 140K a lieu avant qu'elle n'atteigne les membranes externes des chloroplastes. Si ce clivage implique des membranes, ce ne sont vraisemblablement pas celles des chloroplastes. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure qu'une fraction des protéines puisse être clivée une fois qu'elles sont adressées - et ancrées - à l'enveloppe des chloroplastes.

6.2 Précisions sur le déroulement des étapes précédant la réplication virale

D'après les résultats obtenus par Weiland and Dreher, (1993), la polymérase serait recrutée dans le complexe de réplication par l'intermédiaire de la 140K, préférentiellement issue de la même polyprotéine 206K. Les auteurs ont suggéré que la 66K pouvait être également recrutée en *trans* par la 140K déjà associée à l'ARN(+). Par la suite, cette hypothèse a été confirmée par les expérimentations de relocalisation. En effet, l'expression des protéines 66K et 140K à partir de plasmides différents, au sein de la même cellule, n'empêche pas leur interaction et conduit au recrutement de la polymérase en périphérie des chloroplastes (Prod'homme et al., 2003).

Les expériences de BiFC entre les protéines 98K et 66K ont permis de visualiser l'interaction de ces deux protéines à proximité des chloroplastes, comme décrit antérieurement (Jakubiec et al., 2004). Cette technique de visualisation des interactions, employée avec les protéines 98K mutantes localisées dans le cytoplasme, AB LPLP et AB ILL/AAAA, a permis de démontrer qu'elles sont toujours aptes à interagir avec la protéine 66K. Nous notons que cette interaction a lieu dans le cytoplasme. Nous concluons que l'absence de réplication virale observée avec les protéines 98K mutantes n'est due ni à un défaut d'interaction avec la polymérase virale, ni à un quelconque rôle des hélices A et B du DAC dans cette interaction. De plus, l'observation des interactions avec la protéine 66K au niveau du cytoplasme suggère que le recrutement de la polymérase pourrait avoir lieu, même très précocement, dans le cytosol, avant et/ou pendant l'adressage aux chloroplastes de la protéine 140K. L'interaction de la partie N-terminale de la protéine 66K avec le domaine protéase pourrait être maintenue, alors même que le clivage de la protéine 140K en ses produits 98K et hélicase a été effectif.

Pour la poursuite de la compréhension du processus d'adressage au cours de l'infection virale, il pourrait être intéressant de regarder si l'hélicase peut se lier aux protéines 98K et 66K.

6.3 Les mutations des hélices affectent-elles l'activité méthyltransférase ?

Nous avons vu que les modifications introduites dans le génome viral, avec pour conséquence un défaut de localisation des protéines 140K/98K, empêchent également la réplication du TYMV. Nous pouvons conclure que la propriété amphipathique des hélices est cruciale pour la réplication virale. Nous proposons également que le processus d'adressage puisse être une étape nécessaire afin de positionner tous les éléments requis pour la réplication au niveau de la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes. Cependant, ces hélices étant localisées à la fin du « domaine Iceberg » de la méthyltransférase (Figure 1. 15C) (Ahola and Karlin, 2015), certains de leurs acides aminés pourraient être impliqués dans cette activité enzymatique. Toutefois, aucune baisse de cette activité n'a été constatée lorsque certains résidus des hélices α I et α J de la méthyltransférase du *Bamboo mosaic virus* (BaMV) ont été substitués (Hu et al., 2011; Huang et al., 2004). Afin de vérifier si les mutations AB LPLP et AB ILLL/AAAA dans le génome viral sont néfastes pour la réplication à cause de défauts dans l'adressage ou dans l'activité enzymatique méthyltransférase, nous pourrions envisager d'introduire en fusion, dans la séquence codante, un peptide de transit au chloroplaste pour forcer l'adressage et voir si la réplication virale pourrait être ainsi restaurée. Pour tester l'activité de la méthyltransférase, nous pourrions envisager la réalisation de tests enzymatiques comme ceux réalisés avec le BaMV (Hu et al., 2011; Huang et al., 2004).

Chapitre 2

**Relation entre profils de distribution subcellulaire et taux
d'expression de la protéine EGFP-140K**

Le travail présenté dans le chapitre 1 a permis de distinguer les protéines de fusion EGFP-140K sauvage ou mutées adressées aux chloroplastes, de celles localisées dans le cytoplasme. Toutefois, au cours des observations en microscopie confocale, nous avons remarqué des différences de distributions de la protéine EGFP-140K alors même que l'adressage était bien réalisé. Nous avons donc entrepris d'analyser en détail ces profils. Nous avons tout d'abord défini les différents patterns de distribution du signal GFP, observés lors de l'expression des protéines EGFP-140K et EGFP-98K sauvages. Puis, nous verrons que ces différentes distributions du signal fluorescent évoluent au cours du temps et qu'elles sont dépendantes du taux d'accumulation de la protéine EGFP-140K dans les cellules. Enfin, nous examinerons les capacités d'oligomérisation de la protéine 98K, qui pourraient expliquer certains des patterns observés.

1 Observations de différentes distributions des protéines 140K et 98K sauvages fusionnées à l'EGFP

Par opposition à une distribution exclusivement cytoplasmique du signal EGFP, sa localisation en périphérie des chloroplastes signifie que la protéine EGFP-140K leur est bien adressée. Toutefois, l'observation d'un grand nombre de cellules en microscopie confocale a révélé des différences dans le pattern adopté par le signal fluorescent lorsqu'il est à proximité des chloroplastes : il peut tout aussi bien former un maillage autour de ces organites, que des structures ponctuées associées aux chloroplastes. Nous avons donc entrepris de caractériser ces différentes distributions avec des protoplastes d'*A. thaliana* transfectés avec les constructions pΩ-EGFP-140K et pΩ-EGFP-98K, codant les protéines 140K et 98K sauvages fusionnées à l'EGFP. Les cellules ont été observées en microscopie confocale à spinning disk à 48 h p.t. L'examen de plus de 1300 cellules transfectées avec le vecteur d'expression pΩ-EGFP-140K ont permis la caractérisation de cinq classes de distribution du signal GFP. Nous avons ensuite recherché si elles étaient présentes dans les cellules transfectées par le plasmide pΩ-EGFP-98K. Enfin, les proportions de chaque classe ont été estimées pour chaque protéine exprimée, puis comparées entre les deux protéines.

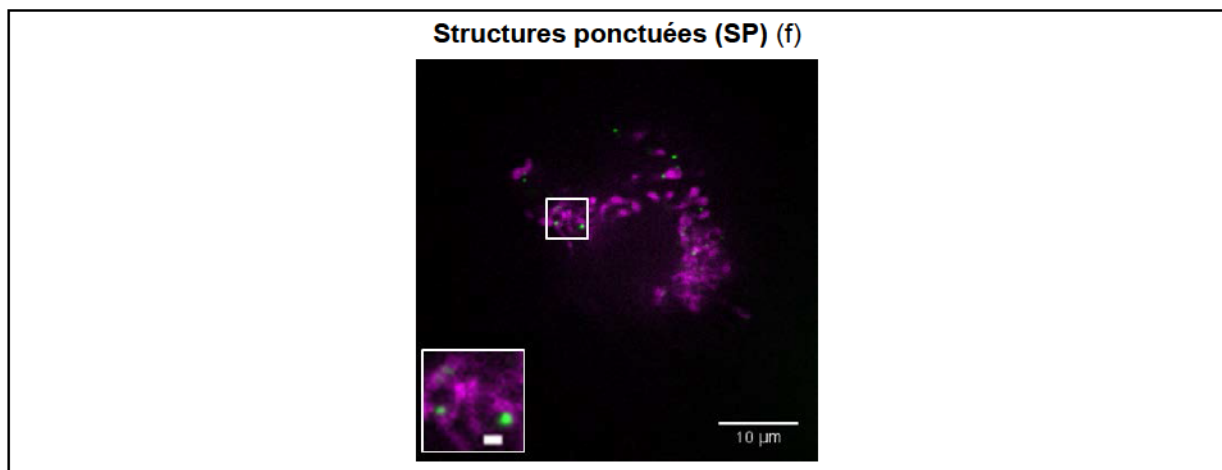
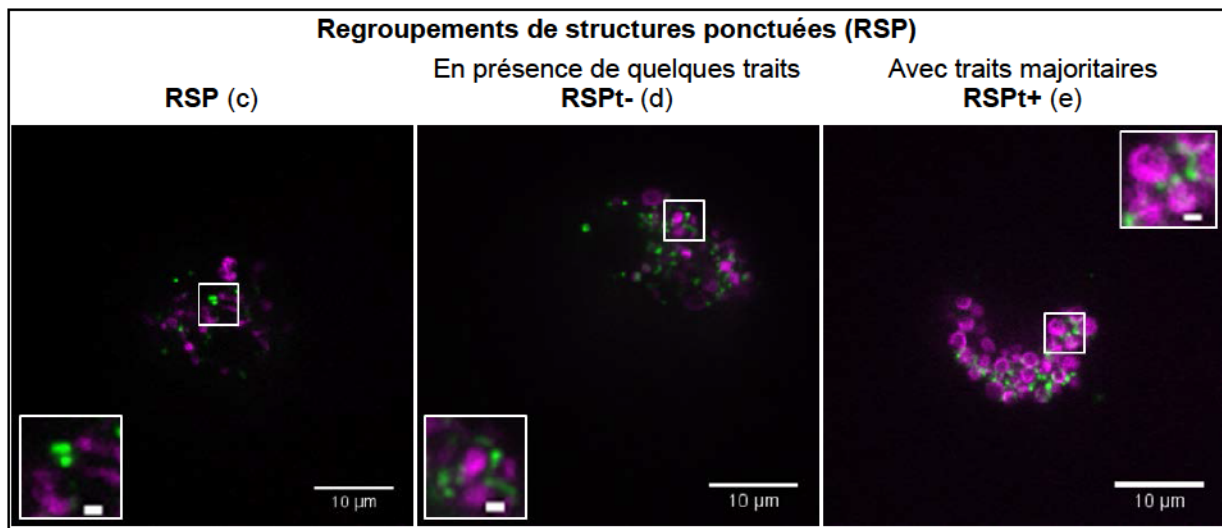
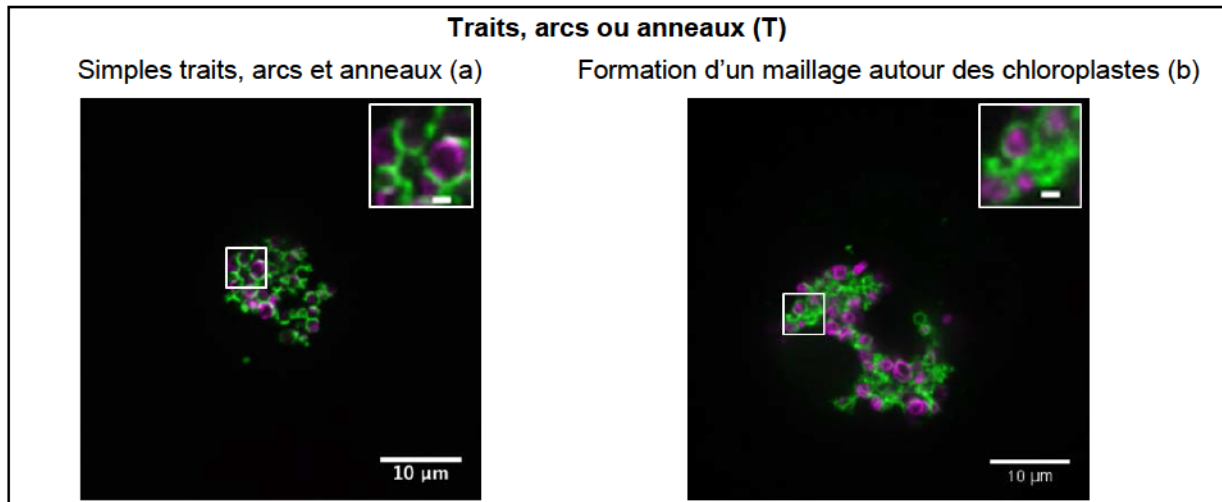


Figure 2. 1 – Illustration des différentes classes de distribution du signal l'EGFP-140K.
 Observation de protoplastes *d'A. thaliana* transfectés avec le pΩ-EGFP-140K. Images de microscopie confocale à spinning disk, au grossissement 100X, sur un plan de l'épaisseur des cellules. Les barres d'échelles représentent 10 µm sur les grandes images et 1 µm pour les images de détail. Le signal EGFP est coloré en vert, ceux de la chlorophylle et de la NirFP, en magenta.

1.1 Description des classes de distribution du signal EGFP à partir des observations avec des cellules exprimant l'EGFP-140K

L'observation des cellules exprimant l'EGFP-140K en microscopie confocale révèle une localisation des signaux EGFP distribuée à proximité des chloroplastes. Toutefois, cette distribution présente des différences dans l'organisation spatiale du signal fluorescent. Les images acquises avec les cellules transfectées par le p Ω -EGFP-140K ont été examinées afin de trouver des critères permettant de distinguer, de manière aussi fiable que possible, les différences dans l'organisation spatiale du signal fluorescent. De cette manière, cinq classes de distribution du signal GFP ont été définies. Ces classes sont illustrées par la Figure 2. 1 et détaillées ci-après.

1.1.1 Traits, arcs et anneaux d'EGFP, à la périphérie des chloroplastes (T)

Le signal de l'EGFP est observé essentiellement sous forme de traits ou arcs, qui peuvent être assemblés en anneaux autour des chloroplastes (Figure 2. 1 a) et parfois, sous la forme d'un maillage d'EGFP entre les chloroplastes, donnant l'impression d'un réseau enchevêtré (Figure 2. 1 b).

1.1.2 Traits d'EGFP en présence de quelques structures ponctuées regroupées (RSPt+)

Le signal de l'EGFP est observé majoritairement sous forme de traits ou arcs et en présence de quelques structures ponctuées regroupées (Figure 2. 1 c). De rares structures ponctuées, non adressées aux chloroplastes, peuvent également être présentes dans le cytoplasme.

1.1.3 Signal d'EGFP sous forme de structures ponctuées regroupées en présence de quelques traits (RSPt-)

Cette classe comprend majoritairement des structures ponctuées, localisées généralement à proximité des chloroplastes, mais également des regroupements de ces structures entre les chloroplastes, à la périphérie desquels le signal fluorescent forme également quelques tirets ou arcs (Figure 2. 1 d).

1.1.4 Regroupement de structures ponctuées d'EGFP (RSP)

Le signal de l'EGFP forme des structures ponctuées qui sont regroupées en amas de taille importante, généralement entre plusieurs chloroplastes. Des structures ponctuées isolées peuvent parfois être présentes dans le cytoplasme (Figure 2. 1 e).

1.1.5 Les structures ponctuées (SP)

Le signal EGFP est détecté sous forme de structures ponctuées. Généralement une structure est associée à un chloroplaste (Figure 2. 1 f). Quelques structures ponctuées seules sont occasionnellement retrouvées dans le cytoplasme. Lors des observations au microscope, nous avons également noté que ces structures ponctuées isolées dans le cytoplasme sont parfois mobiles, soit selon une trajectoire rectiligne rapide, soit en mouvements aléatoires.

L'examen d'un grand nombre de cellules a mis en évidence que ces classes n'ont pas la même fréquence selon les expériences de transfections de plasmides. Nous avons donc entrepris de comptabiliser les effectifs de chaque classe sur des expériences de transfections réalisées dans des conditions comparables. Afin de compléter les résultats obtenus avec l'EGFP-140K, ce travail a également été effectué avec des cellules transfectées par le p Ω -EGFP-98K.

1.2 Comparaison des classes de distribution des signaux fluorescents de l'EGFP-140K et l'EGFP-98K

Après avoir défini les différentes classes de distribution du signal fluorescent de l'EGFP-140K, nous avons voulu savoir si ces mêmes classes pouvaient être détectées avec l'EGFP-98K. L'acquisition d'un grand nombre d'images (portant sur plus de 400 cellules) en microscopie confocale de protoplastes d'*A. thaliana* transfectés avec le p Ω -EGFP-98K, a permis l'observation des cinq classes présentes avec l'EGFP-140K, sans aucune autre organisation spatiale du signal EGFP fusionné à la protéine 98K.

Les analyses des images de microscopie ont également rendu possible le calcul des proportions de chaque classe pour les cellules exprimant l'EGFP-140K ou l'EGFP-98K (Figure 2. 2). Avec les graphiques à secteurs, nous constatons que les proportions des cinq classes sont similaires, entre les protéines EGFP-140K et EGFP-98K exprimées au sein des populations de cellules.

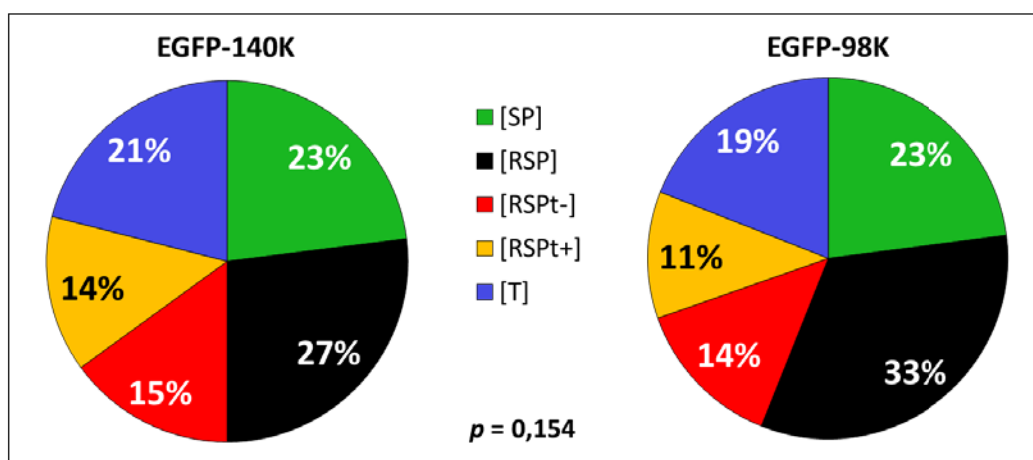


Figure 2. 2 – Comparaison des proportions des classes de distribution du signal de fluorescence de l'EGFP-140K ou l'EGFP-98K.

Les valeurs correspondent aux proportions (%) calculées pour chaque catégorie : SP, structures ponctuéées ; RSP, structures ponctuéées regroupées ; RSPt-, structures ponctuéées en présence de quelques traits ; RSPt+, traits en présence de quelques structures ponctuéées ; T, traits, arcs et anneaux à la périphérie des chloroplastes. Effectifs totaux pour l'EGFP-140K : 1352, pour l'EGFP-98K : 405. p indique le résultat du test de χ^2 réalisé avec les effectifs des deux protéines exprimées en protoplastes d'*A. thaliana*.

L'analyse statistique des effectifs de chaque classe a été réalisée avec un test de χ^2 . Nous proposons l'hypothèse H_0 selon laquelle, pour chacune des classes, les proportions obtenues avec une protéine sont indépendantes de celles obtenues avec l'autre protéine. Ainsi, si la valeur calculée de p est supérieure à 0,05, alors les différences observées dans les proportions des classes entre les deux protéines sont simplement liées à l'échantillonnage et ne sont donc pas statistiquement différentes l'une de l'autre. En revanche, si la valeur de p est inférieure à 0,05, H_0 est rejetée, signifiant que les proportions obtenues entre les deux protéines sont statistiquement différentes l'une de l'autre.

Le résultat p du test de χ^2 effectué ici donne la valeur de 0,154. Cette valeur nous permet d'affirmer que les répartitions des effectifs de chaque classe au sein des deux populations de cellules exprimant l'EGFP-140K ou l'EGFP-98K ne sont pas statistiquement différentes.

Ces résultats nous autorisent à conclure que la distribution, à proximité des chloroplastes du signal EGFP fusionné à la protéine 140K ou à la protéine 98K, est semblable pour les deux protéines de fusion.

Nous pouvons donc en déduire que l'hélicase n'a aucun rôle dans l'adressage du domaine 98K de la protéine 140K.

L'ensemble de ce travail réalisé sur des populations de cellules observées à 48 h p.t. a permis de définir cinq classes de distribution du signal EGFP fusionné à la protéine 140K ou 98K. Compte-tenu de cette grande hétérogénéité des patterns de distribution à 48 h p.t., nous nous sommes demandé si ces différentes classes n'étaient pas les conséquences d'une évolution cinétique de l'adressage au cours du temps et/ou du taux d'accumulation de la protéine dans les cellules.

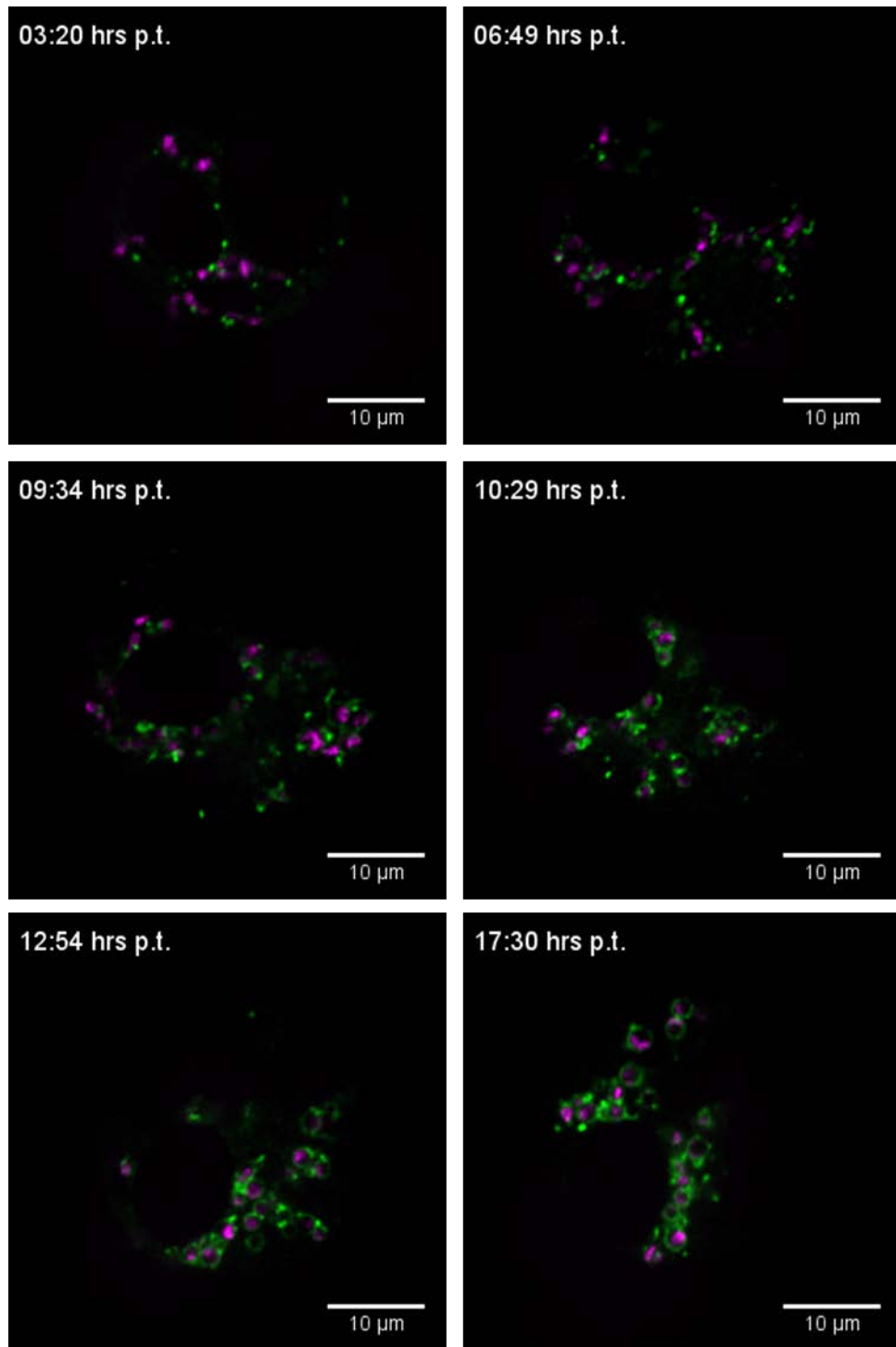


Figure 2. 3 – Observations en time-lapse d’une cellule exprimant l’EGFP-140K.

Images en microscopie confocale à spinning disk d’une cellule, suivie au cours du temps, exprimant l’EGFP-140K et la NirFP. Les temps post-transfection sont précisés en haut à gauche de chaque image. Les acquisitions sont réalisées avec un objectif 100X et les barres d’échelle représentent 10 µm. Les images présentées sont prises sur un plan de la cellule. Le signal de la GFP est coloré en vert et ceux de la chlorophylle et de la NirFP, en magenta.

2 Evolution temporelle de la distribution du signal de fluorescence, dans les cellules exprimant la protéine de fusion

Afin de visualiser le processus d'adressage et de déterminer s'il résulte d'une évolution de la localisation de la protéine, nous avons choisi de réaliser des time-lapses pendant plusieurs heures, en suivant des cellules individuelles. Ces expériences ont été effectuées en microscopie confocale à spinning disk, sur des cellules transfectées par le plasmide p Ω -EGFP-140K. Pour s'assurer de l'adressage aux chloroplastes, nous avons co-transfecté les cellules avec le vecteur p Ω -NirFP, le fluorochrome NirFP étant mûré rapidement et restant stable dans le temps (Shcherbo et al., 2010). Les cellules ont été choisies en fonction des signaux fluorescents EGFP et NirFP dont les intensités devaient être suffisamment élevées pour supporter des acquisitions sur plusieurs heures. Les paramètres d'excitation des signaux fluorescents étaient déterminés avant le lancement des acquisitions en time-lapse et conservés à l'identique pendant toute la durée des expériences. Ces conditions expérimentales, à l'échelle de la cellule, permettent donc à la fois de suivre l'évolution temporelle de la distribution du signal EGFP et de mesurer les intensités des signaux de fluorescence tout au long des acquisitions.

2.1 Evolution de la distribution du signal de l'EGFP-140K en time-lapse

A 48 h p.t., nous avons observé cinq classes de distribution du signal de l'EGFP. Afin de rechercher si ces cinq classes sont détectables dès l'apparition du signal fluorescent, ou si elles dérivent les unes des autres, nous avons suivi l'organisation de la distribution du signal de fluorescence fusionné à la protéine 140K, depuis l'apparition du signal de l'EGFP jusqu'à 17 h p.t. Le signal EGFP est visible à partir de 3 h p.t. sous forme de structures ponctuelles plus ou moins mobiles, et en partie déjà localisées à la périphérie des chloroplastes.

Les structures ponctuelles se regroupent progressivement, soit directement à proximité des chloroplastes alors qu'une structure est déjà présente, soit dans le cytoplasme avant de converger vers les chloroplastes (Figure 2. 3, 03:20 hrs p.t.). Ces regroupements augmentent en taille et l'intensité de leur fluorescence semble croître au cours du temps (Figure 2. 3, 06:49 hrs et 09:34 hrs p.t.).

Puis, ils évoluent à la périphérie des chloroplastes, en traits ou arcs qui, par la suite, peuvent former des anneaux autour des chloroplastes (Figure 2. 3, 10:29 hrs p.t.) et restent dans cette configuration jusqu'à la fin du suivi (Figure 2. 3, 17:30 hrs p.t.).

L'analyse des acquisitions en time-lapse nous permet donc de retrouver les cinq classes de distribution du signal EGFP. Nous remarquons que leur ordre d'apparition est dépendant du temps écoulé depuis la transfection. Ainsi, la classe SP est la première détectée, évoluant vers les classes RSP, puis RSPt-, RSPt+ et enfin T, la dernière et la seule présente jusqu'au terme de l'observation de la cellule de la Figure 2. 3. Toutefois, nous avons remarqué que nous ne retrouvions pas toujours cette évolution de la distribution en cinq classes. En effet, pour certaines, la répartition du signal EGFP semble « bloquée » dans une classe. Il ressort de ces observations que les cinq classes évolueraient des unes vers les autres et correspondraient à des étapes successives de l'adressage aux chloroplastes des protéines 140K/98K fusionnées à l'EGFP.

De plus, ces expériences de time-lapse ont également permis de suggérer une intensification du marquage fluorescent au cours du temps. Par conséquent, nous proposons que le processus d'adressage corresponde à une accumulation de la protéine fusionnée à l'EGFP, à proximité des chloroplastes, propre à chaque cellule.

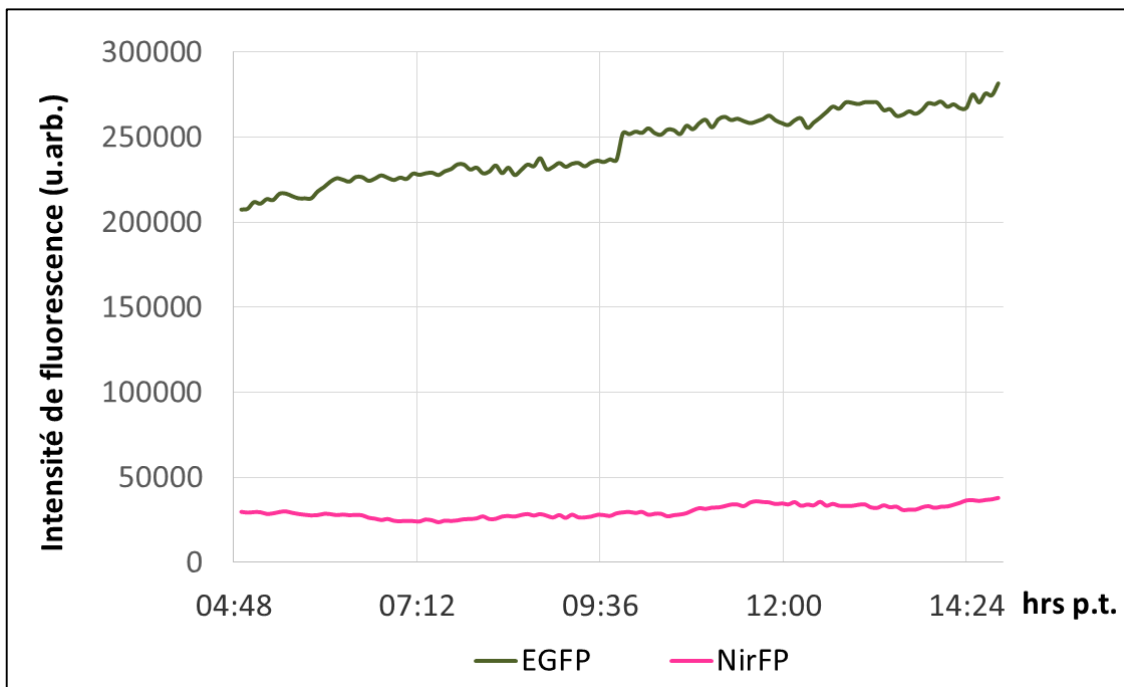


Figure 2. 4 – Quantification temporelle des intensités des signaux de fluorescence de la cellule de la Figure 2. 3.

Les intensités des signaux fluorescents EGFP et NirFP sont rapportées par unité de volume (μm^3) en fonction du temps p.t. Elles ont été mesurées pour la cellule présentée en Figure 2. 3 sur les images issues de l'acquisition entre 04:48 et 14:24 heures p.t.

2.2 Intensification de la fluorescence de la protéine EGFP-140K au cours du temps

Le suivi temporel de l'évolution de la distribution du signal EGFP au sein des cellules a permis de suggérer une intensification de la fluorescence. Afin de déterminer si la succession des différentes classes de distribution du signal EGFP peut être liée à un taux d'accumulation de la protéine fusionnée au sein de la cellule, des mesures globales d'intensités de fluorescences émises par la cellule ont été réalisées avec l'utilisation conjointe des logiciels Fiji et Imaris, en collaboration avec Vincent CONTREMOULINS (plateforme ImagoSeine). Fiji a permis l'assemblage de l'ensemble des fichiers issus de l'acquisition temporelle ainsi que le traitement des images, de sorte à enlever un maximum de bruit de fond. Imaris a été employé pour analyser séparément les signaux acquis dans des canaux différents.

Un graphique élaboré à partir des données issues de ces analyses (Figure 2. 4) retrace l'évolution des signaux de fluorescence au cours du time-lapse réalisé avec la cellule présentée en Figure 2. 3. Nous constatons que l'intensité du signal de la NirFP ne varie quasiment pas pendant l'acquisition. En revanche, l'intensité du signal de l'EGFP augmente au cours du temps, comme nous l'avions supposé lors de l'observation des images illustrant l'évolution de la distribution du signal fluorescent à la périphérie des chloroplastes. Ces quantifications de l'intensité de fluorescence dans une cellule ont été réalisées pour seize cellules, issues de trois expériences indépendantes. Nous en concluons que la protéine fusionnée à l'EGFP s'accumule au cours du temps dans les cellules, ce qui est corrélé avec la constatation de l'évolution de la distribution du signal de l'EGFP en différentes classes.

Les observations de l'évolution du signal de fluorescence de l'EGFP-140K ainsi que la quantification de son intensité permettent de proposer que les cinq classes identifiées précédemment (cf. 1 et 2.1) sont dépendantes de l'accumulation de la protéine, dans la cellule, au cours du temps. Ainsi, la première classe visible est la classe SP qui pourrait refléter une faible accumulation de la protéine EGFP-140K, à l'inverse de la classe T, dernière à être détectée. Il est donc envisageable qu'une certaine quantité de protéine soit requise pour permettre l'évolution de sa distribution depuis la classe SP vers la classe T.

Si les expériences de time-lapse en cellules individuelles ont favorisé la mise en évidence des évolutions de la distribution du signal EGFP et de son intensité au cours du temps, nous avons voulu valider l'hypothèse de l'accumulation de la protéine à l'échelle de la population de cellules transfectées. Par conséquent, nous avons recherché des éventuelles variations de la quantité de protéine exprimée, au sein de la population entière.

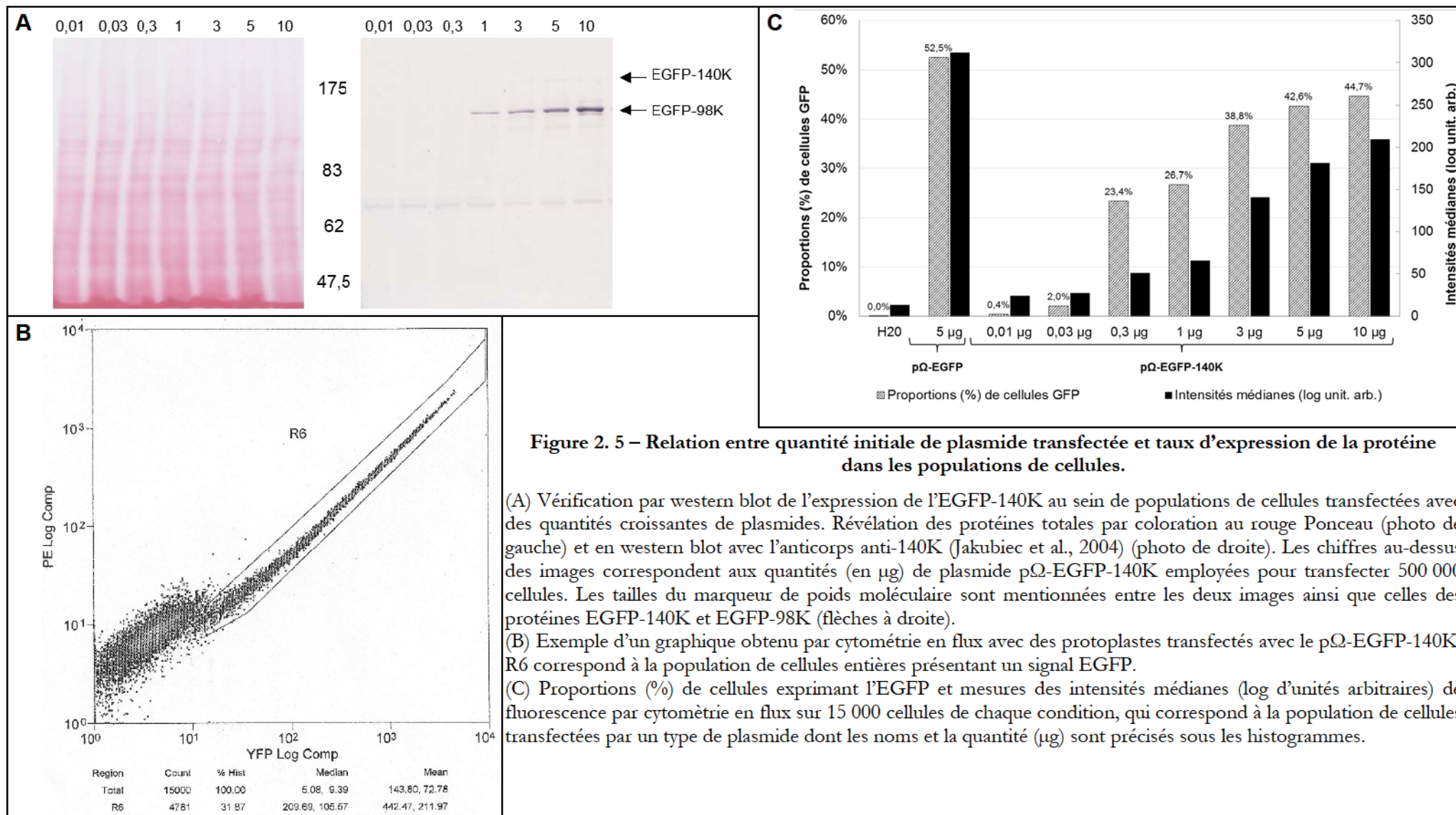


Figure 2. 5 – Relation entre quantité initiale de plasmide transférée et taux d'expression de la protéine dans les populations de cellules.

(A) Vérification par western blot de l'expression de l'EGFP-140K au sein de populations de cellules transfectées avec des quantités croissantes de plasmides. Révélation des protéines totales par coloration au rouge Ponceau (photo de gauche) et en western blot avec l'anticorps anti-140K (Jakubiec et al., 2004) (photo de droite). Les chiffres au-dessus des images correspondent aux quantités (en µg) de plasmide pΩ-EGFP-140K employées pour transférer 500 000 cellules. Les tailles du marqueur de poids moléculaire sont mentionnées entre les deux images ainsi que celles des protéines EGFP-140K et EGFP-98K (flèches à droite).

(B) Exemple d'un graphique obtenu par cytométrie en flux avec des protoplastes transfectés avec le pΩ-EGFP-140K. R6 correspond à la population de cellules entières présentant un signal EGFP.

(C) Proportions (%) de cellules exprimant l'EGFP et mesures des intensités médianes (log d'unités arbitraires) de fluorescence par cytométrie en flux sur 15 000 cellules de chaque condition, qui correspond à la population de cellules transfectées par un type de plasmide dont les noms et la quantité (µg) sont précisés sous les histogrammes.

3 Le taux d'expression de la protéine EGFP-140K est responsable des classes de distribution du signal fluorescent.

Les expériences de time-lapse en cellules individuelles ont révélé une évolution de la distribution du signal EGFP dans les cellules exprimant l'EGFP-140K. Nous avons également vu que cette évolution est liée à une augmentation de l'intensité du signal fluorescent, reflétant une accumulation de la protéine exprimée par la cellule. Les contraintes expérimentales liées au time-lapse ne permettent pas le suivi d'un grand nombre de cellules. Afin de déterminer si les cinq classes de distribution de signal fluorescent étaient liées au taux d'accumulation de la protéine, nous avons transfecté des quantités variables de plasmides en protoplastes d'*A. thaliana*. Ainsi, au sein d'une série, chaque condition consistait à transfecter 500 000 cellules par le plasmide pΩ-EGFP-140K dont les quantités étaient échelonnées entre 10 ng et 10 µg. A 48 heures p.t., pour chaque condition, les intensités des signaux de fluorescence ont été mesurées par cytométrie en flux et permettent l'estimation du taux d'expression de la protéine EGFP-140K. Enfin, pour chaque condition, les proportions des différentes classes de distribution de signal fluorescent ont été quantifiées, de façon à déterminer si leur répartition différait en fonction du taux d'expression de la protéine.

3.1 Effet de la quantité de plasmide pΩ-EGFP-140K sur le taux d'expression de la protéine EGFP-140K

Les cellules ont été transfectées avec des quantités variables de plasmide et l'expression de la protéine correspondante a été vérifiée par western blot (Figure 2. 5A), ce qui a permis de s'assurer que l'intensité des bandes est corrélée avec l'augmentation des quantités de plasmide employées pour les transfections. Les cellules ont alors été analysées par cytométrie en flux (Figure 2. 5B et C), afin de mesurer la proportion de cellules exprimant un signal EGFP et l'intensité du signal fluorescent EGFP, pour chaque quantité de plasmide transfectée. L'amplitude des mesures des intensités sur 15 000 cellules (exprimées en log d'unités arbitraires) est très étendue. Pour obtenir des intensités représentatives de la population de cellules exprimant l'EGFP dans chaque condition, nous avons donc choisi de tenir compte exclusivement de l'intensité médiane (Figure 2. 5B).

Les résultats issus du western blot vont dans le même sens que ceux obtenus par cytométrie en flux puisque nous observons que l'augmentation de la quantité de plasmide employée pour chaque condition est corrélée à la proportion de cellules exprimant l'EGFP. L'analyse en cytométrie permet également de remarquer que les intensités médianes du signal fluorescent suivent l'augmentation de la quantité de plasmide employée pour les transfections des cellules. Avec ces expériences de variations de quantités de plasmides, nous sommes donc parvenus à mettre en évidence une corrélation entre les augmentations de l'intensité médiane de l'EGFP et celles de la quantité de protéine exprimée.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si les taux de protéines exprimées par les cellules pouvaient avoir un effet sur la distribution du signal de l'EGFP, comme nous l'avions suggéré à l'issue de l'analyse des expériences de time-lapse.

3.2 Corrélation entre le taux d'accumulation de l'EGFP-140K et la distribution du signal dans les cellules transfectées

Le taux d'accumulation de la protéine EGFP-140K étant corrélé à la quantité de plasmide p Ω -EGFP-140K employée pour transfecter des cellules, nous avons décidé arbitrairement de sept intervalles d'intensités médianes (X) de la fluorescence de l'EGFP : « $X < 25$ », « $25 < X < 34$ », « $34 < X < 45$ », « $45 < X < 65$ », « $65 < X < 130$ », « $130 < X < 200$ » et « $X > 200$ ». Nous avons ensuite recherché l'incidence du taux d'accumulation - reflété par l'intensité médiane du signal EGFP - sur le pattern de distribution de la protéine dans les cellules. Ainsi, pour chaque quantité de plasmides transfectée, l'intensité du signal EGFP des cellules a été mesurée par cytométrie en flux, permettant de classer la médiane mesurée dans l'un des sept intervalles de médianes d'intensité de fluorescence. Pour chaque population, un certain nombre de cellules ont été observées en microscopie confocale à spinning disk, menant à l'acquisition d'images pour 5 à 42 cellules, sur huit expériences indépendantes. Les analyses des images de microscopie ont permis de quantifier les proportions des classes de distribution du signal EGFP (SP, RSP, RSP $_{t-}$, RSP $_{t+}$ et T) pour la protéine EGFP-140K (Figure 2. 6) et ce, pour chaque intervalle de médianes d'intensité de fluorescence.

A

		Classes de distribution du signal EGFP				
		SP	RSP	RSPt-	RSPt+	T
Intensités médianes (X)	X < 25	58%	42%	0%	0%	0%
	25 < X < 34	51%	33%	16%	0%	0%
	34 < X < 45	44%	37%	16%	3%	0%
	45 < X < 65	23%	40%	21%	11%	4%
	65 < X < 130	23%	25%	18%	13%	21%
	130 < X < 200	14%	23%	13%	19%	31%
	X > 200	10%	14%	9%	19%	48%

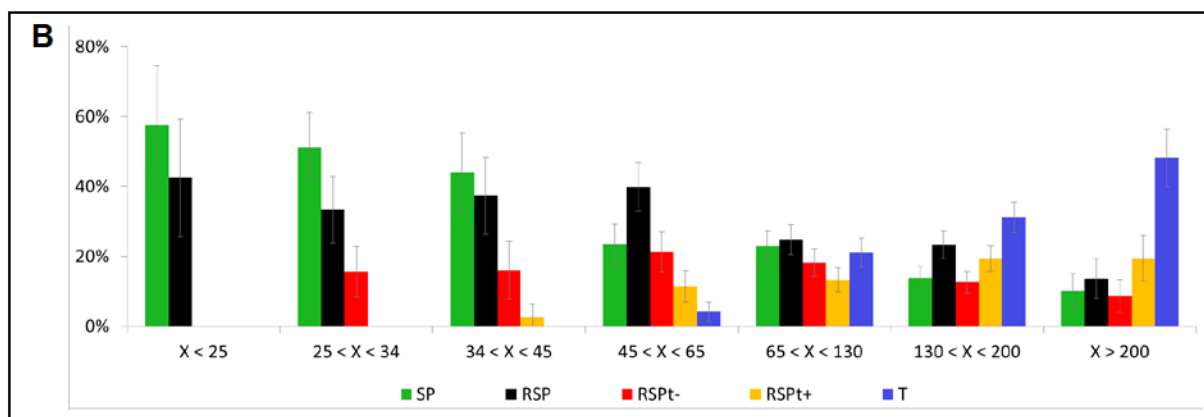


Figure 2. 6 – Proportions des 5 classes de distribution du signal EGFP pour chacun des 7 intervalles de médianes d'intensité de la fluorescence.

Les valeurs de ces proportions sont détaillées dans le tableau (A) et représentées sous forme d'histogrammes (B). Les valeurs des médianes sont exprimées en log d'unités arbitraires.

Pour les médianes d'intensités de l'EGFP inférieures à 25 unités, nous constatons que les seules classes présentes sont SP (58 % des cellules) et RSP (42 % des cellules) (en vert et noir, respectivement sur la Figure 2. 6B).

Lorsque les médianes sont comprises entre 25 et 34 unités, les classes SP (51 %) et RSP (33 %) sont largement présentes et nous détectons également la présence de la classe RSPt- dans 16 % des cellules (en rouge sur la Figure 2. 6B).

Pour des médianes comprises entre 34 et 45 unités, outre les classes SP (44 %), RSP (37 %) et RSPt- (16 %), nous observons 3 % des cellules appartenant à la classe RSPt+ (en jaune sur la Figure 2. 6B).

Les populations de cellules dont les médianes sont comprises entre 45 et 65 unités, contiennent les cinq classes de distribution de signal. La classe RSP est majoritaire (40 % des cellules), tandis que la classe T est représentée dans 4 % des cellules (en bleu sur la Figure 2. 6B).

Nous observons également que les proportions de la classe SP sont plus faibles que pour les intervalles de médianes d'intensités précédents (23 %) alors que les proportions des classes RSPt- et RSPt+ sont augmentées (21 % et 11 %, respectivement).

Pour les trois intervalles de médianes d'intensités supérieures, « $65 < X < 130$ », « $130 < X < 200$ » et « $X > 200$ », les cinq classes de distribution de signal sont présentes. Au fur et à mesure de l'augmentation des intensités de l'EGFP, les proportions des classes SP, RSP et RSPt- diminuent tandis que celles des classes RSPt+ et T croissent.

Ces résultats démontrent donc que le taux de protéine EGFP-140K exprimée influence la distribution du signal fluorescent dans la cellule. Les classes présentes dès les faibles intensités, SP et RSP, voient leurs proportions diminuer au profit de celles des classes RSPt-, puis RSPt+. Enfin, lorsque la fluorescence s'intensifie, la classe T apparaît. Le taux d'expression de la protéine de fusion EGFP-140K peut donc être corrélé avec sa distribution dans les cellules.

Ces résultats obtenus en population de cellules à 48 h p.t. nous permettent également de mieux comprendre ce qui a été observé en time-lapse à l'échelle d'une cellule. Ainsi, au début du time-lapse, la protéine EGFP-140K est faiblement exprimée et la distribution du signal fluorescent correspond à la classe SP. Puis, la protéine s'accumule progressivement dans la cellule et sa distribution évolue donc des classes RSP à RSPt-, puis RSPt+ et enfin T. L'accumulation de la protéine au cours du temps est responsable du passage d'une classe à une autre, reflétant vraisemblablement les étapes successives du processus d'adressage.

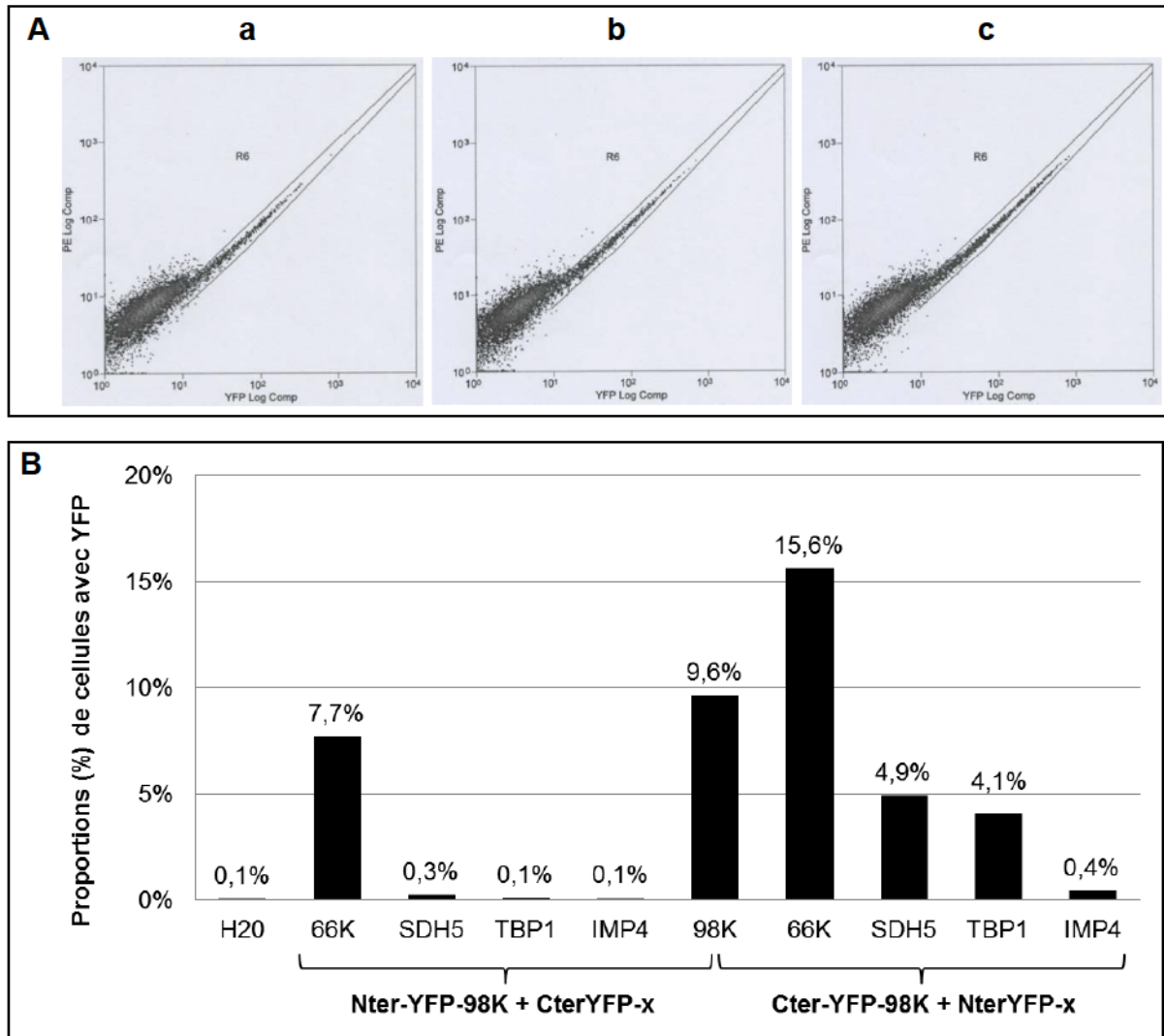


Figure 2. 7 – Tests de BiFC entre la protéine 98K et différentes protéines testées.

(A) Données de cytométrie en flux, d'une expérience présentant la population des cellules (R6) exprimant du signal YFP en fonction de son intensité, incluse dans la population totale des cellules transfectées. Co-transfections des cellules avec les vecteurs pCter-YFP-98K et pNter-YFP-66K (a), pCter-YFP-98K et pNter-YFP-98K (b) et pNter-YFP-98K et pCter-YFP-66K (c).

(B) Histogrammes des proportions (%) de cellules exprimant du signal YFP en fonction des différentes conditions de BiFC. Les protéines testées (x) pour leur interaction avec la 98K sont la polymérase du TYMV (66K), la succinate déshydrogénase 5 (SDH5), la tata-binding protein 1 (TBP1), l'IMP4 et la 98K.

4 Capacité de dimérisation de la protéine 98K sauvage

L'observation de la formation d'arcs, tirets ou anneaux de la protéine EGFP-140K à la périphérie des chloroplastes nous a conduits à suggérer que cette protéine pourrait s'organiser en oligomères. Les protéines en interaction et ancrées dans la membrane, pourraient ainsi être responsables du regroupement des chloroplastes. Cette répartition en arcs, tirets ou anneaux est également remarquée avec la protéine 98K. Nous avons cherché à déterminer si la protéine 98K est capable de dimériser, grâce à la technique de BiFC, en co-transfectant les plasmides pNt-YFP-98K et pCt-YFP-98K en protoplastes d'*A. thaliana*. Comme témoins négatifs de l'interaction, nous avons employé trois protéines cellulaires : la succinate déshydrogénase 5 (SDH5), la tata-binding protein 1 (TBP1) et la petite protéine ribonucléaire U3 (IMP4). Comme témoins positifs de l'interaction, nous avons utilisé la polymérase virale (66K), connue pour interagir avec le domaine protéase de la 98K (Jakubiec et al., 2004) (cf. chapitre 1). Pour toutes les conditions d'interaction testées, les intensités du signal de la YFP ont été mesurées en cytométrie en flux. Les cellules transfectées avec de l'eau ont permis de déterminer le bruit de fond du signal détecté dans le canal de la YFP. Un signal YFP significatif a été mis en évidence dans les cellules co-transfectées avec les vecteurs pCterYFP-98K et pNter-YFP-66K (a) et les vecteurs pNterYFP-98K et pCterYFP-66K (c) (Figure 2. 7A), ainsi que celles co-transfectées avec les constructions pCterYFP-98K et pNterYFP-98K (b). Ces profils démontrent donc que la protéine 98K peut non seulement interagir avec la protéine 66K, mais qu'elle est également capable de dimériser. Par ailleurs, les analyses en cytométrie en flux nous permettent de déterminer les proportions de cellules exprimant le signal YFP. Nous pouvons ainsi observer que la protéine 98K est capable de dimériser dans 9,6 % des cellules co-transfectées (Figure 2. 7B). Ces résultats permettent donc d'affirmer que la protéine 98K est capable de dimériser.

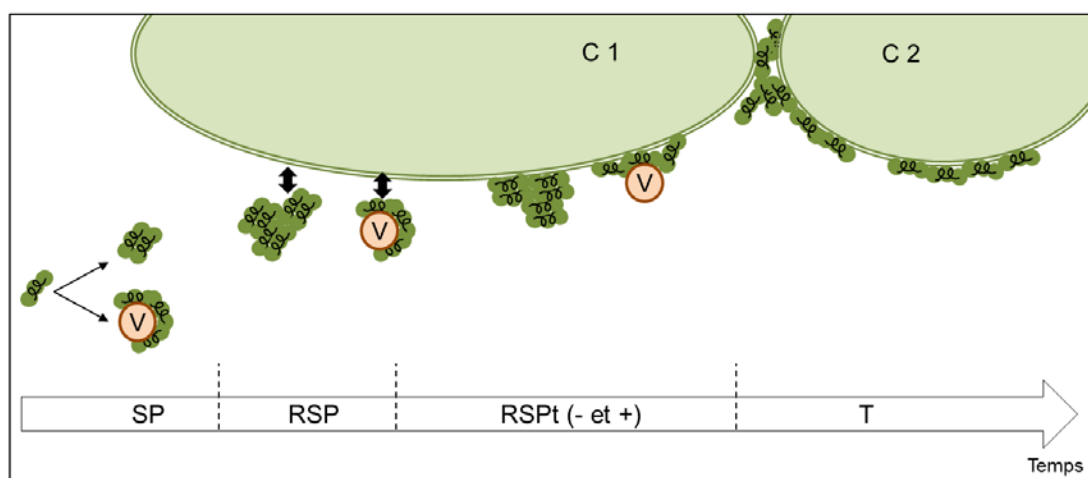


Figure 2. 8 – Modèle hypothétique du processus d’adressage des protéines 140K/98K.

Les protéines nouvellement synthétisées pourraient s’oligomériser, soit seules, soit en interaction avec la membrane d’une vésicule (V), d’abord en impliquant peu de partenaires (SP). Les oligomères pourraient s’agrèger (RSP) lors de leur trajet vers les chloroplastes où ils pourraient s’associer, en quantités variables (RSPT (- et +)). Les protéines associées à la membrane d’une vésicule auraient plus d’affinité pour la membrane de l’enveloppe externe des chloroplastes, à laquelle elles s’ancreraient. L’ancrage des protéines oligomérisées serait responsable de la formation de tirets, arcs ou anneaux, au niveau de la membrane externe des chloroplastes (T) et entre eux. Les pointillés indiquent des séparations arbitraires entre les différentes classes de localisation subcellulaire. C1 et C2, indiquent deux chloroplastes distincts.

5 Discussion du chapitre

5.1 Le taux d'accumulation et l'oligomérisation de la protéine EGFP-140K sont responsables de l'évolution temporelle de la distribution du signal fluorescent

L'observation de différents patterns de distribution du signal de l'EGFP-140K a conduit à la définition de cinq classes de distribution de la fluorescence. Les transfections de quantités croissantes de plasmide ont révélé l'importance du taux d'accumulation de la protéine pour son profil de distribution subcellulaire. L'analyse et l'interprétation du profil d'adressage d'une protéine nécessite donc de s'assurer au préalable de son taux d'expression.

Le suivi, pendant plusieurs heures, de la distribution de la fluorescence associée à la protéine 140K dès sa détection, a permis de visualiser en temps réel l'adressage du signal aux chloroplastes. Nous avons démontré une évolution temporelle et quantitative de la protéine 140K pendant l'adressage. Par ailleurs, nous avons pu montrer que les protéines 140K/98K peuvent interagir entre elles.

En outre, nous proposons de relier les observations de microscopie et l'oligomérisation (Figure 2.8). En effet, une fois la protéine 140K synthétisée, elle se retrouve dans le cytoplasme, soit libre, soit associée à une vésicule membranaire, et interagirait avec une autre protéine 140K libre ou déjà associée à une autre protéine 140K. De plus, l'ARN étant parcouru par plusieurs ribosomes, les différentes protéines en cours de traduction pourraient interagir dès ce stade. Ces interactions entre protéines formeraient des complexes, dont les tailles seraient dépendantes du nombre de molécules impliquées et correspondraient aux classes SP et RSP. Ces complexes se déplaceraient dans le cytoplasme rendant ainsi possible les rencontres avec des chloroplastes auxquels ils s'arrimeraient au niveau de la membrane externe de leur enveloppe. Selon la quantité associée aux membranes, nous détecterions la classe RSP⁻ ou RSP⁺. L'ancrage des protéines oligomérisées et/ou le clivage de l'hélicase auraient pour conséquence une réorganisation des protéines, alors responsable des structurations en tirets, arcs ou anneaux définissant la classe T, à la périphérie des chloroplastes.

Nous pouvons également proposer que les interactions entre protéines 140K/98K les stabilisent dans cette configuration, pendant l'adressage aux chloroplastes, ou même lorsqu'elles se situent à leur périphérie. L'oligomérisation des protéines 140K/98K pourrait également permettre le regroupement des chloroplastes auxquels les protéines seraient déjà associées. Ces interactions auraient pour conséquence la formation d'une zone dans la cellule où tous les partenaires viraux seraient regroupés, augmentant l'efficacité de la réplication virale.

L'identification des classes de distribution du signal EGFP nous a conduits à proposer un adressage en étapes. Cependant, nous ne savons pas si elles sont continues ou si elles correspondent à des seuils de quantités de protéines à atteindre, puis à franchir, pour in fine se distribuer en arcs, tirets ou anneaux

5.2 Interactions entre protéines 140K/98K et/ou avec des partenaires viraux et cellulaires

5.2.1 Limitations de la technique du BiFC pour attester des interactions entre partenaires protéiques

Le principe du BiFC repose sur l'assemblage de deux parties de la YFP, chacune étant fusionnée à une protéine. La détection d'un signal YFP en BiFC signifie donc que l'interaction a lieu entre deux protéines. Dans le cas des tests avec la protéine 98K, nous en avons déduit qu'elle dimérise. Or, nous ne pouvons pas exclure que les interactions impliquent plus que deux partenaires. Ainsi, nous préférons employer le terme d'oligomérisation.

Cependant, l'assemblage des deux parties de la YFP, lors du BiFC, provoque la stabilisation des protéines en interaction, alors même que ces interactions peuvent être simplement transitoires. Afin d'en visualiser leur dynamique, nous pourrions envisager de réaliser des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) avec la protéine 98K.

Enfin, pour tester l'oligomérisation de la protéine 98K, nous pourrions également réaliser des co-immunoprécipitations.

5.2.2 Quelle partie de la protéine 98K est impliquée dans l'oligomérisation ?

Nous avons démontré que les protéines 140K/98K interagissent entre elles et proposé que ces interactions interviennent lors du processus d'adressage.

Toutefois, le domaine protéique impliqué reste à déterminer. Nous pourrions alors réaliser de nouveaux tests de BiFC avec les parties de la protéine 140K résultant des différentes délétions, déjà employées au cours du chapitre 1. Toutefois, seule l'obtention d'un cristal permettra de représenter la structure tridimensionnelle de la protéine, ce qui aidera à la compréhension de l'agencement des protéines au cours de l'adressage, lorsqu'elles sont seules ou en interactions.

5.2.3 Implications éventuelles de l'hélicase et de la protéine 66K dans la dimérisation et/ou l'adressage de la protéine 140K aux chloroplastes

Les différentes classes de distribution du signal fluorescent définies avec la protéine de fusion EGFP-140K ont également été retrouvées avec la protéine EGFP-98K et leurs proportions ne diffèrent pas significativement entre les deux protéines. La présence de l'hélicase ne semble donc pas interférer avec le processus d'adressage. De plus, les tests de dimérisation de la protéine 98K ont été réalisés en BiFC, donc en absence d'hélicase. Cependant, nous ne savons pas si la présence de l'hélicase est requise pour aider à la dimérisation de la protéine 98K, soit en tant que protéine déjà clivée du précurseur 140K, soit en tant que domaine de la protéine 140K.

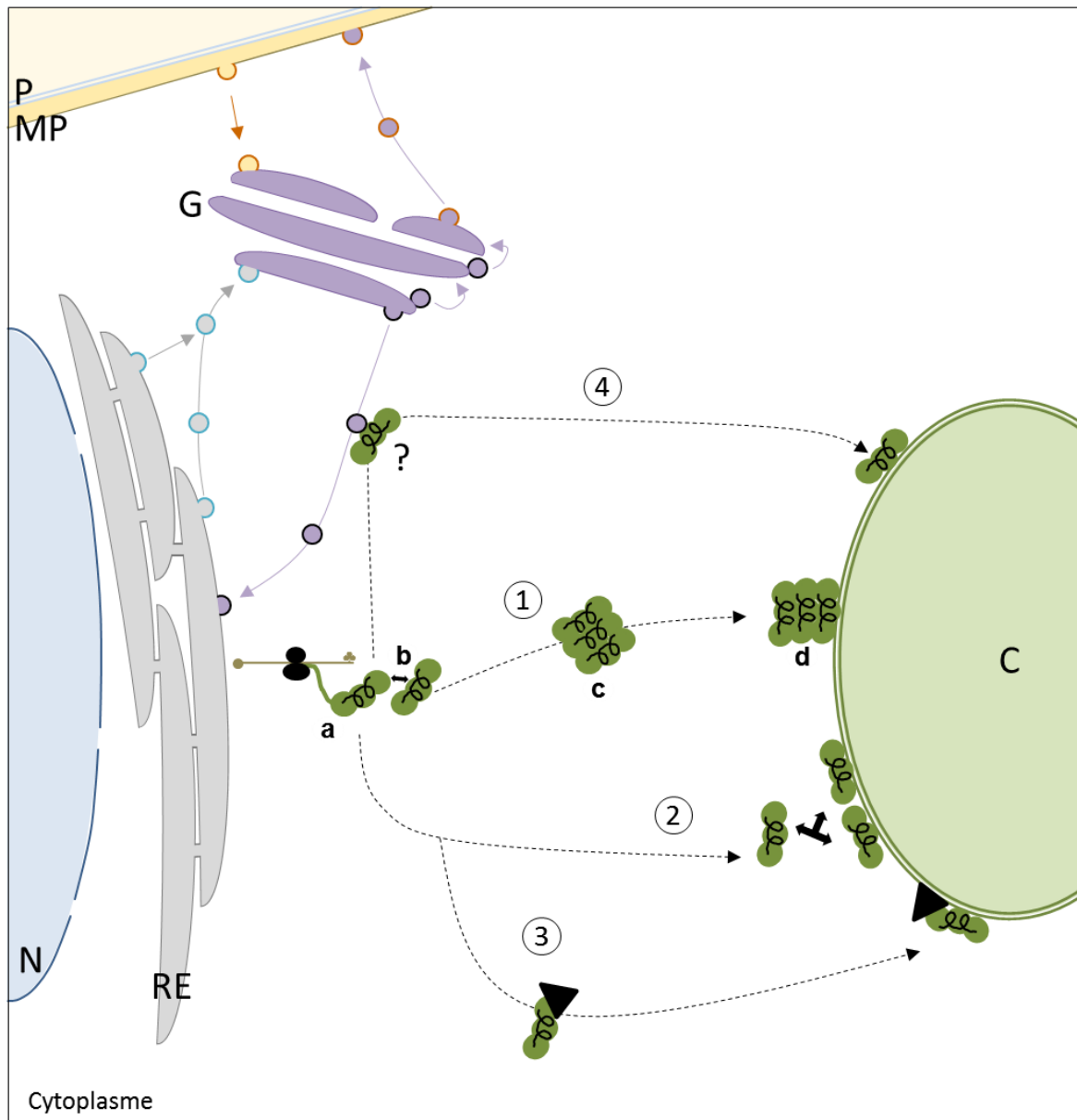


Figure 2. 9 – Différentes modalités potentielles d’adressage de la protéine 140K au chloroplaste.

La protéine 140K produite à partir de l’ARN viral pourrait être adressée au chloroplaste selon quatre modalités. (1) En cours de traduction (a), la protéine 140K pourrait interagir avec d’autre(s) protéine(s) 140K (b) pour former des oligomères (c) qui seraient ensuite en interaction avec l’enveloppe du chloroplaste (d). Il est également possible que la protéine 140K soit adressée directement (2) au chloroplaste via son DAC et interagisse avec ses semblables déjà adressées, formant des anneaux, arcs ou tirets. Par ailleurs, il est envisageable que l’adressage soit réalisé indirectement en utilisant une ou des protéine(s) cellulaire(s) (triangle noir, 3) avec laquelle la protéine 140K serait capable d’interagir et qui l’adresserai(en)t au chloroplaste, ou bien, la protéine 140K interagirait avec des vésicules de l’hôte (par exemple de type COP, 4) qu’elle détournerait pour être finalement adressée au chloroplaste. C, chloroplaste ; G ; appareil de Golgi ; MP, membrane plasmique ; N, noyau ; P, paroi ; RE, réticulum endoplasmique.

Comme évoqué dans la discussion du chapitre 1, nous ignorons si l'hélicase interagit avec la protéine 98K à l'issue du clivage.

La protéine 66K est adressée aux chloroplastes par son interaction avec le domaine protéase des protéines 140K (Jakubiec et al., 2004) et 98K (cf. chapitre 1), mais nous ignorons si cette interaction peut avoir un effet sur leur dimérisation. En effet, l'interaction de la protéine 66K avec les protéines 140K/98K pourrait induire un changement de leur conformation et/ou masquer des sites requis pour leur dimérisation. Il faudrait donc pouvoir effectuer des tests de BiFC avec les protéines, soit 140K présentant les mutations empêchant son clivage (Jakubiec et al., 2007), soit 98K, présentant les fusions appropriées avec la YFP, en absence et en présence de la protéine 66K, exprimée indépendamment. La comparaison des résultats permettra de conclure quant à l'influence ou non de la 66K sur la dimérisation des protéines 140K et 98K.

5.2.4 Des facteurs cellulaires sont-ils impliqués dans le processus d'adressage ?

Lors des observations en microscopie, nous avons pu constater que les structures ponctuées, plus ou moins regroupées, se déplacent dans la cellule. Les trajectoires de ces déplacements semblent occasionnellement aléatoires, mais peuvent également être rectilignes, traversant parfois diamétralement la cellule, en seulement quelques secondes. Outre une diffusion passive de la protéine (2, Figure 2. 9) qui pourrait correspondre aux déplacements aléatoires dans la cellule, les trajectoires rectilignes pourraient être réalisées en suivant le cytosquelette, impliquant des moteurs moléculaires (3, Figure 2. 9), tels que les myosines de la classe XI chez les plantes. En effet, leur vitesse de déplacement est l'une des plus rapides chez les eucaryotes et correspond à $7 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ chez *Arabidopsis* (Henn and Sadot, 2014). Cette hypothèse de déplacement sur le réseau d'actine peut être appuyée par le fait que les chloroplastes sont des organites mobiles qui se déplacent également par le réseau d'actine (Oikawa et al., 2003, 2008). Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions employer la latrunculin B (Lat B) qui bloque la polymérisation des microfilaments d'actine. Des expérimentations similaires ont par ailleurs été réalisées avec la protéine 6K du *Turnip mosaic virus* ou du *Tobacco etch virus* (Cotton et al., 2009; Cui et al., 2010; Wei and Wang, 2008; Wei et al., 2010).

Les drogues engendrant des effets indésirables, il est également envisageable d'employer des mutants dominants négatifs des différentes myosines connues afin d'observer l'effet de cette inhibition sur l'adressage des protéines 140K/98K aux chloroplastes, comme illustré avec le cas du TMV (Amari et al., 2014).

Nous pourrions aussi envisager de marquer les filaments d'actine en co-transfectant les cellules avec un vecteur codant la mTalin, ou le domaine de la fimbrine liant l'actine fusionnée à un fluorophore et un vecteur exprimant les protéines 140K ou 98K fusionnées à un autre fluorophore compatible. Il faudrait alors rechercher, en microscopie confocale, une éventuelle co-localisation des marquages des deux protéines signifiant que la protéine virale transite, ou non, via les micro-filaments d'actine (Cotton et al., 2009; Wei and Wang, 2008).

Les déplacements rectilignes dans la cellule pourraient provenir de l'association des protéines avec des vésicules membranaires (4, Figure 2. 9), qui seraient susceptibles d'aider à la formation des oligomères. Cette hypothèse rejoint celle présentée avec la Figure 2. 8. Elle est d'ailleurs étayée dans la littérature par l'exemple de l'association de la protéine 6K du TEV à des vésicules COPI ou COPII pour réaliser l'adressage des complexes de réplication aux chloroplastes (Wei and Wang, 2008).

L'ensemble de ce travail réalisé avec la protéine EGFP-140K sauvage a permis de définir les différentes distributions de signal de fluorescence qui lui est associé, et de mettre en évidence les relations entre les taux d'accumulation de la protéine et la distribution du signal. Cette étude avec la protéine sauvage constitue un prérequis pour la suite de l'analyse de la protéine 140K, dans ses différentes versions mutées, qui sont présentées le chapitre 3.

Chapitre 3

**Mutagenèses des hélices A et B et identification de résidus
impliqués dans l'adressage des protéines 140K/98K**

Comme démontré au cours du chapitre 1, la protéine virale 140K est responsable de l'adressage des complexes de réplication aux chloroplastes grâce à la présence de son Domaine d'Adressage aux Chloroplastes (DAC). Celui-ci est constitué de deux hélices amphipathiques, nécessaires pour adresser la protéine entière aux chloroplastes. Dans le chapitre 1, la mutagenèse des deux hélices amphipathiques s'est focalisée sur leur caractère hydrophobe. Afin d'identifier une éventuelle contribution à l'adressage d'autres résidus de ces hélices, nous avons choisi d'en substituer certains. Dans les cellules, la distribution des protéines mutantes obtenues a d'abord été analysée, ce qui a permis de sélectionner celles se comportant de manière significativement différente de la protéine sauvage. Puis, nous avons introduit les mutations correspondantes dans la séquence virale dans le but d'en examiner l'effet sur la réplication. Enfin, nous avons cherché à relier le processus d'oligomérisation des protéines mutantes sélectionnées avec celui de l'adressage, afin d'expliquer les divergences remarquées dans l'efficacité de la réplication virale.

Lors de cette étude, un point critique a consisté à déterminer les profils de distribution de signal fluorescent des protéines mutantes *en tenant compte du taux d'accumulation des protéines dans les cellules*. Il est essentiel pour la localisation subcellulaire des protéines, comme décrit dans le chapitre 2.

1 Sélection des résidus à substituer

Nous avons vu que le DAC est constitué des hélices amphipathiques A et B et que leur propriété amphipathique est indispensable à l'adressage aux membranes. Les différentes représentations des hélices A et B par HeliQuest et Pymol ont permis la sélection des acides aminés potentiellement impliqués dans l'adressage des protéines 140K/98K, autres que les isoleucine et leucine retrouvées dans les faces hydrophobes des hélices. Cette première partie détaille les choix des résidus à muter.

1.1 Altération de la propriété amphipathique des hélices A et B

Les hélices A et B étant amphipathiques, nous avons entrepris d'analyser l'implication de cette propriété pour l'adressage et la réplication virale. Ainsi, nous avons choisi de muter les résidus tantôt dans les faces hydrophobes, tantôt dans les faces hydrophiles.

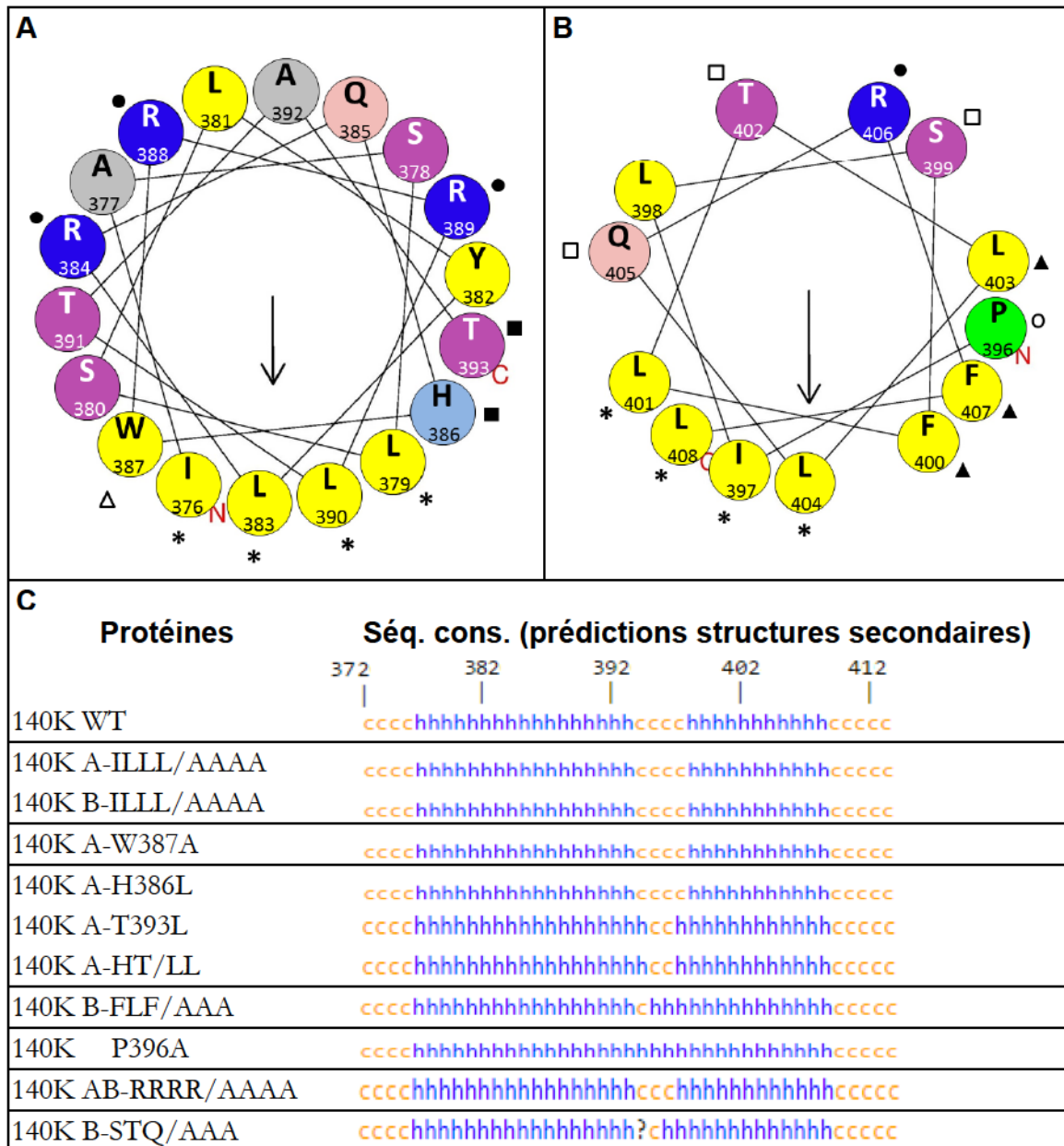


Figure 3. 1 – Représentation par HeliQuest des hélices A et B du DAC positionnant les résidus mutés et prédictions de structures secondaires consensus des différentes protéines 140K.

(A et B) Représentations d’après HeliQuest des hélices A, en présence de la thréonine 393 en C-terminal (A) et B, en présence de la proline 396 en N-terminal (B). Les résidus substitués sont désignés par différents symboles (*, Δ, ■, ▲, ●, □, ○), les résidus associés à des symboles identiques sont ceux mutés ensemble dans la séquence protéique. (C) Prédictions de structures secondaires consensus pour les séquences correspondant aux hélices A et B de la protéine sauvage et des différentes protéines mutantes.

1.1.1 Modification des faces hydrophobes

Afin de tester la contribution des faces hydrophobes des hélices A ou B, nous avons choisi soit de les supprimer complètement, soit de diminuer leur hydrophobicité moyenne, ou encore d'agrandir leur taille.

1.1.1.1 Suppression complète de la face hydrophobe des hélices A ou B

Comme présenté dans le chapitre 1, les acides aminés constituant les faces hydrophobes des hélices A ou B (*, Figure 3. 1A et B) ont été substitués en alanine, abolissant la propriété amphipathique de ces hélices. Les séquences secondaires consensus prédites des hélices A et B mutantes (Figure 3. 1C) présentent des conformations en hélices alpha identiques entre la protéine sauvage et les différentes versions mutées. Nous avons montré au cours du chapitre 1 que les protéines mutantes, affectées dans une seule de leurs hélices du DAC, EGFP-140K-A-ILLL/AAAA et EGFP-140K-B-ILLL/AAAA sont toujours adressées aux chloroplastes. Toutefois, après la mise en évidence des différences de distributions du signal de l'EGFP, nous avons cherché à définir l'adressage de ces protéines mutantes et à voir l'incidence de ces substitutions sur la réplication virale.

1.1.1.2 Diminution de l'hydrophobicité moyenne de la face hydrophobe de l'hélice A : substitution du tryptophane 387 en alanine

Le tryptophane est un résidu hydrophobe, aromatique et apolaire, souvent impliqué dans l'association aux membranes intracellulaires des protéines membranaires (Yau et al., 1998).

Pour les protéines 140K/98K, le tryptophane 387 de l'hélice A est situé à une extrémité de la face hydrophobe de l'hélice (Δ, Figure 3. 1A). Son cycle aromatique pourrait être inséré dans la bicouche lipidique plus profondément que les chaînes latérales de l'isoleucine et des leucine de la face hydrophobe. Ce tryptophane pourrait donc être un stabilisateur de l'hélice A au niveau de la membrane. Nous avons donc décidé de substituer le tryptophane 387 en alanine dans les protéines 140K/98K, donnant la protéine mutante 140K-A-W387A. L'hydrophobicité moyenne calculée par HeliQuest pour la protéine mutante est de 0,434 et donc inférieure à la valeur de 0,558 pour la protéine sauvage. Les prédictions de structure secondaire (Figure 3. 1C) indiquent que les hélices A et B sont identiques à celles de la prédiction pour la protéine sauvage. La substitution du tryptophane 387 en alanine ne changerait donc pas la structuration de la protéine en hélice alpha.

1.1.1.3 Agrandissement de la face hydrophobe de l'hélice A : substitution de l'histidine 386 et de la thréonine 393 en leucine

Dans l'hélice A, la leucine 379 et la tyrosine 382 sont situées de part et d'autre de l'histidine 386 et de la thréonine 393 (■, Figure 3. 1A). Or, l'histidine est un acide aminé hydrophile et polaire. Elle possède un noyau imidazole neutre à pH 7, mais qui peut facilement échanger des protons, lui conférant une propriété légèrement basique. La thréonine est un résidu polaire neutre avec un groupement alcool pouvant être ciblé par des modifications post-traductionnelles. L'emplacement de ces résidus dans l'hélice interrompt donc la face hydrophobe au niveau de la leucine 379. Afin de voir une éventuelle incidence de l'agrandissement de la face hydrophobe sur l'adressage aux chloroplastes, nous avons substitué l'histidine et la thréonine en leucine dans les protéines 140K/98K, soit indépendamment, soit simultanément. Nous avons ainsi obtenu trois protéines mutantes appelées 140K-A-H386L, 140K-A-T393L et 140K-A-HT/LL. L'agrandissement de la face hydrophobe correspond à l'augmentation de l'hydrophobicité moyenne. Pour les trois protéines mutantes, HeliQuest calcule une hydrophobicité moyenne de 0,629 pour 140K-A-H386L, 0,622 pour 140K-A-T393L et 0,709 pour 140K-A-HT/LL. Elles sont donc toutes supérieures à l'hydrophobicité moyenne de la protéine sauvage (0,558). Les prédictions de structures secondaires avec ces protéines indiquent des structurations en hélices alpha semblables à celles la protéine sauvage (Figure 3. 1C).

Cependant, nous ne savons pas si le résidu thréonine 393 est impliqué dans l'hélice car, d'après les consensus des prédictions de structures, il serait plutôt prédit comme « coil ». Lorsque ce résidu est changé en leucine, les hélices A et B sont prédites avec un résidu supplémentaire.

1.1.1.4 Réduction de la face hydrophobe de l'hélice B

La représentation de l'hélice B par HeliQuest permet d'observer que la face hydrophobe implique, outre les résidus ILLL déjà décrits précédemment, les phénylalanine 400 et 407 et la leucine 403 (▲, Figure 3. 1B), résidus hydrophobes et apolaires. Les phénylalanine, comme le tryptophane, sont aromatiques et, de par leur emplacement au début et à la fin de l'hélice B, ils pourraient contribuer à stabiliser l'hélice amphipathique dans les membranes. Afin de tester l'implication de ces trois résidus dans l'adressage des protéines 140K/98K, nous les avons substitués en alanine. La protéine contenant ces trois substitutions est appelée 140K-B-FLF/AAA. Les prédictions de structures secondaires indiquent une conformation en hélices alpha semblable à celle de la protéine sauvage (Figure 3. 1C), à la différence près que l'hélice B est plus longue en N-terminal avec la séquence de la protéine mutante.

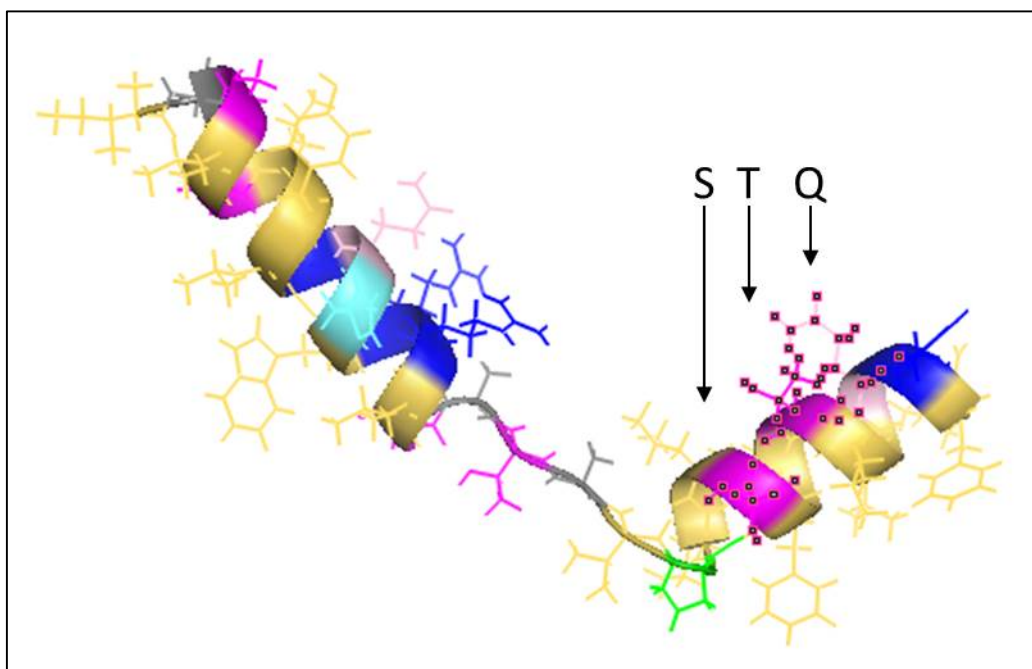


Figure 3. 2 – Représentation PyMol avec indication des résidus STQ.

Les atomes des résidus S399, T402 et Q405 (flèches) sont sélectionnés par des carrés roses, permettant de visualiser l'alignement des résidus dans l'espace.

1.1.2 Modification des faces hydrophiles des hélices A et B

Afin d'analyser l'implication des résidus constituant les faces hydrophiles des hélices A et B, nous avons recherché l'effet des substitutions des charges positives ou des résidus polaires sur l'adressage des protéines 140K/98K mutantes et la réplication virale.

1.1.2.1 Abolition des charges pour les deux hélices

Les faces hydrophiles des hélices A et B contiennent des acides aminés chargés : les arginine 384, 388, 389 ou 406. L'arginine est un acide aminé polaire, hydrophile et basique, ce qui lui permet des liaisons ioniques avec les charges électriques négatives d'autres acides aminés, ou avec les têtes des lipides de la bicouche membranaire. Les charges positives des arginine des hélices A et B (●, Figure 3. 1A et B) ont été supprimées par les substitutions en alanine dans la protéine 140K-AB-RRRR/AAAA. La présence des hélices A et B est attestée par les prédictions de structures secondaires, l'hélice B étant alors allongée d'un résidu en N-terminal (Figure 3. 1C).

1.1.2.2 Suppression des résidus polaires de l'hélice B

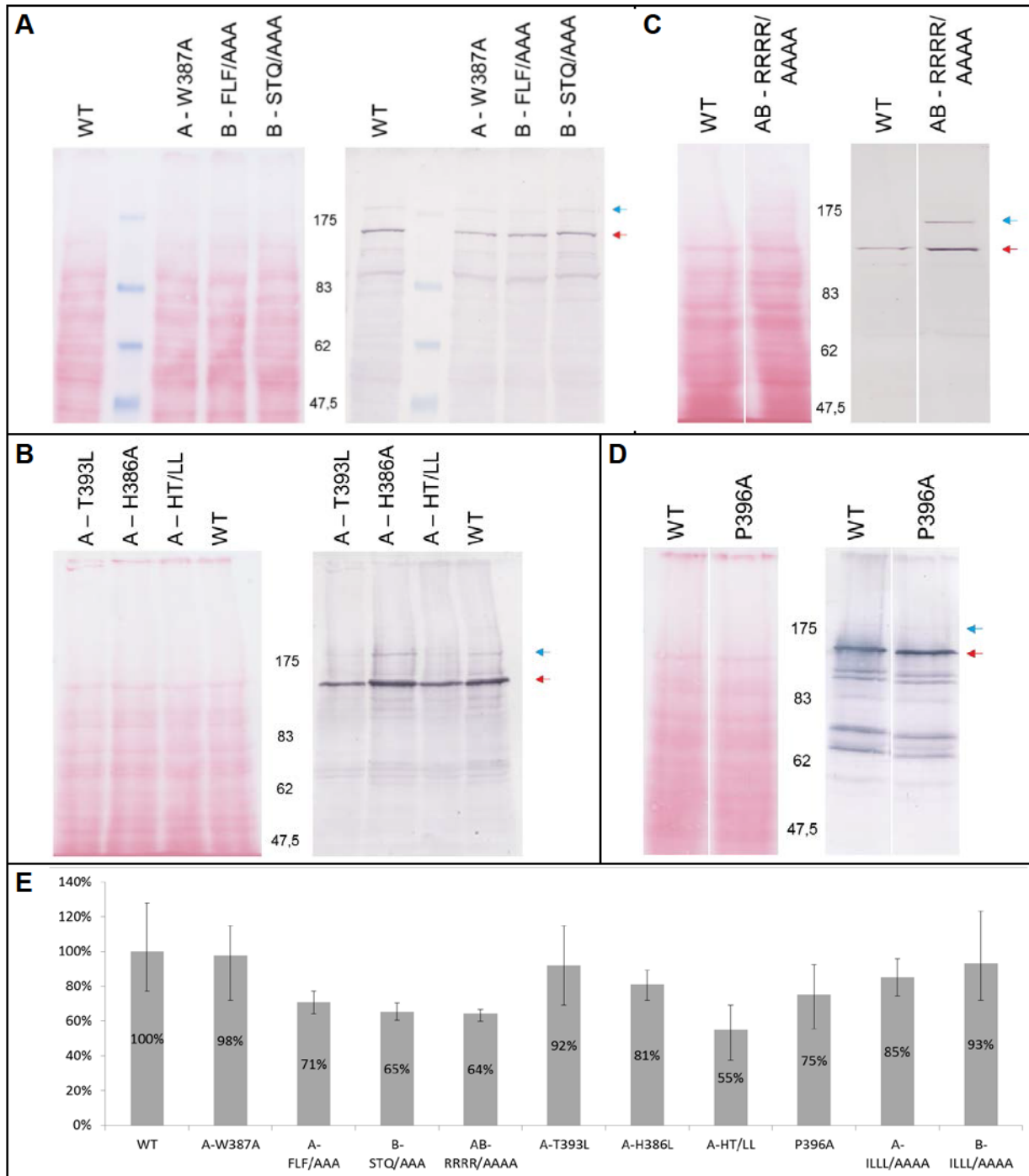
Outre l'arginine 406, la face polaire de l'hélice B est constituée par les résidus sérine 399, thréonine 402 et glutamine 405 (□, Figure 3. 3B). La sérine et la thréonine sont des acides aminés polaires neutres et possèdent un groupement alcool qui peut être ciblé pour des modifications post-traductionnelles. De plus, il a été démontré que les résidus sérine et thréonine des faces hydrophiles des hélices amphipathiques peuvent être impliqués dans la reconnaissance des courbures de membranes permettant ensuite l'adsorption de l'hélice à leur surface (Drin et al., 2007). La glutamine est neutre, hydrophobe mais faiblement polaire grâce à son groupement amide qui forme des liaisons hydrogènes. La représentation PyMol illustre l'alignement dans l'espace de ces trois résidus (Figure 3. 2). Nous avons substitué ces résidus polaires en résidus alanine, apolaires, au sein de la protéine 140K-B-STQ/AAA. D'après les prédictions de structure secondaire (Figure 3. 1C), les substitutions en alanine permettent la conformation en hélices alpha A et B, tout en induisant un agrandissement de l'hélice B.

1.2 Altération de la structuration en deux hélices A et B

La proline ne peut pas former de liaisons hydrogènes et sa conformation induit un coude dans la structure secondaire de la séquence peptidique. C'est la raison pour laquelle nous avons proposé que la proline 396 (●, Figure 3. 1B) soit à l'origine de la séparation des hélices alpha A et B du DAC des protéines 140K/98K. Afin d'appréhender l'implication de ce résidu proline dans l'adressage de la protéine aux chloroplastes, nous l'avons substitué en alanine, donnant la protéine 140K-P396A.

Ainsi, les hélices A et B de cette protéine mutante ne forment plus qu'une seule grande hélice, comme le montrent les prédictions de structures secondaires (Figure 3. 1C).

Ces substitutions ponctuelles, au sein des hélices A et B, ont été réalisées par mutagenèse dirigée du vecteurs pΩ-EGFP-140K. Puis, ces vecteurs ont été transfectés en protoplastes d'*A. thaliana*, permettant ensuite l'analyse des protéines mutantes par western blot et cytométrie de flux, et l'observation de leur localisation subcellulaire en microscopie confocale.



2 Taux d'expression et profils de distribution des différentes protéines mutantes fusionnées à l'EGFP

La séquence nucléotidique codant la protéine EGFP-140K a été modifiée par mutagenèse dirigée afin que les résidus choisis dans la séquence protéique puissent y être substitués en alanine ou en leucine. De cette manière, les vecteurs codant chacun pour une protéine EGFP-140K mutante ont été produits et transfectés en protoplastes d'*A. thaliana*. Comme démontré au cours du chapitre 2, il est impératif d'obtenir des taux d'expression de protéines comparables. Par conséquent, pour chaque protéine mutante fusionnée à l'EGFP, nous avons vérifié son expression en western blot, quantifié son taux d'expression par cytométrie en flux et observé la distribution de son signal fluorescent dans les cellules en microscopie confocale à spinning disk. Les données obtenues avec ces protéines mutantes ont ainsi pu être comparées à celles de la protéine sauvage, présentées au cours du chapitre 2.

2.1 Expression des différentes protéines EGFP-140K mutantes

Les protoplastes d'*A. thaliana* ont été transfectés avec des quantités identiques de plasmides codant pour les différentes protéines mutantes. Une fraction de cellules a été récoltée et les protéines mutantes ont été détectées par western blots pour attester de leur expression (Figure 3. 3 A à D). Nous avons pu observer que la protéine 98K est exprimée par toutes les constructions, signifiant que les mutations n'empêchent pas le clivage de la protéine 140K. Ensuite, les intensités de signal EGFP correspondant à ces protéines ont été mesurées par cytométrie en flux dans une autre fraction des cellules, lors de plusieurs expériences indépendantes. Les moyennes des différentes valeurs obtenues ont été comparées à celles de la protéine sauvage (Figure 3. 3E). Les protéines avec une seule hélice mutée du DAC, EGFP-140K-**A**-ILLL/AAAA et EGFP-140K-**B**-ILLL/AAAA, ont déjà été analysées au cours du chapitre 1. Toutefois, leurs taux d'intensités moyennes n'avaient pas encore été estimés par rapport ceux de la protéine sauvage. Nous constatons que certaines protéines mutantes s'expriment à des intensités proches de celles de la protéine sauvage, tandis que d'autres ont des intensités plus faibles (Figure 3. 3E). Nous en déduisons donc que certaines substitutions dans les faces hydrophobes des hélices A et B affectent le taux d'accumulation de la protéine.

Toutefois, comme observé dans le chapitre 2, le taux d'accumulation des protéines peut influencer leur localisation subcellulaire. Il était donc impératif de mesurer les intensités médianes de la fluorescence associée aux protéines mutantes avant de déterminer leur distribution subcellulaire par microscopie confocale à spinning disk. Ainsi, les proportions des différentes classes obtenues avec les protéines mutantes sont comparées à celles des classes de la protéine sauvage présentant une médiane d'intensité de même catégorie.

2.2 Variations dans les proportions des classes de distribution du signal fluorescent des protéines EGFP-140K mutantes

A la différence des protéines mutantes cytoplasmiques EGFP-140K-AB-LPLP et EGFP-140K-AB-ILLL/AAAA dont nous avons déjà parlé au cours du chapitre 1, nous observons en microscopie confocale que des cellules exprimant les autres protéines mutantes fusionnées à l'EGFP ont leur signal fluorescent localisé à proximité des chloroplastes. Nous retrouvons les cinq classes de distribution définies avec la protéine sauvage : SP, RSP, RSP_t⁻, RSP_t⁺ et T. Toutefois, nous avons constaté que certaines classes n'étaient pas retrouvées à la même fréquence selon les protéines mutantes, aussi nous avons cherché à quantifier les proportions de ces différentes classes pour chacune des protéines mutantes.

Afin de comparer les proportions des classes de distribution du signal EGFP des protéines mutantes avec la protéine sauvage, il est impératif de travailler avec les cellules présentant les mêmes catégories de médianes d'intensités que celles obtenues lors des transfections avec la protéine sauvage. Malgré une augmentation des quantités de plasmide codant les protéines mutantes pour transfecter les cellules, nous n'atteignons pas systématiquement la catégorie « $X > 200$ unités d'intensités de fluorescence ».

Nous avons donc choisi de travailler avec les deux catégories de médianes d'intensités inférieures, à savoir, « $65 < X < 130$ » et « $130 < X < 200$ ». Les populations de cellules présentant des intensités comprises dans ces catégories ont donc été observées en microscopie confocale à spinning disk. Les résultats obtenus sur plusieurs transfections ont ensuite pu être rassemblés pour une même catégorie de médiane d'intensités. Selon cette méthode, 36 à 125 cellules ont été analysées pour ces deux catégories et pour chaque protéine EGFP-140K mutante. Les proportions de chacune de leurs classes ont alors pu être calculées, représentées sous forme d'histogrammes et comparées à ceux de la protéine EGFP-140K sauvage.

Protéines	65 < X < 130		130 < X < 200	
	Proportions des classes	Khi ²	Proportions des classes	Khi ²
140K WT		avec n = 376		avec n = 440
140K AB-RRRR/AAAA		<i>p</i> = 0,17 avec n = 125		<i>p</i> = 0,33 avec n = 46
140K A-H386L		<i>p</i> = 0,50 avec n = 77		<i>p</i> = 0,44 avec n = 118
140K B-FLF/AAA		<i>p</i> = 0,05 avec n = 37		<i>p</i> = 0,06 avec n = 50
140K A-ILL/AAAA		<i>p</i> = 0,14 avec n = 40		<i>p</i> = 0,52 avec n = 47

Tableau 3. 1 – Histogrammes des proportions des classes pour les protéines de fusion 140K sauvage et mutantes avec des $p \geq 0,05$, pour les deux catégories « 65 < X < 130 » et « 130 < X < 200 ».

Proportions des classes de la répartition du signal GFP pour les protéines 140K sauvage et mutantes. La classe SP est représentée en vert, RSP en noir, RSPt- en rouge, RSPt+ en jaune et T en bleu. Les valeurs calculées (*p*) des tests de Khi² sont indiquées en noir quand H₀ ne peut pas être rejetée, et en rouge dans le cas contraire.

De plus, pour comparer de manière significative les proportions issues des analyses de la protéine sauvage et d'une protéine mutante, des tests statistiques de Khi^2 ont été réalisés, pour chaque catégorie, selon la même procédure que celle employée dans le chapitre 2. L'hypothèse H_0 testée est que, pour chaque classe, les proportions obtenues avec une protéine mutante sont indépendantes de celles de la protéine sauvage. Lorsque $p > 0,05$, les différences de proportions des classes obtenues avec la protéine mutante sont simplement liées à l'échantillonnage et ne sont donc pas statistiquement éloignées de celles de la protéine sauvage. A l'inverse, si $p < 0,05$, nous en concluons que les proportions des classes de la protéine mutante sont statistiquement différentes de celles de la protéine sauvage. En fonction des résultats des tests de Khi^2 , les protéines mutantes ont été classées en quatre groupes.

2.2.1 Groupe vérifiant H_0 pour « $65 < X < 130$ » et « $130 < X < 200$ »

Les profils des histogrammes des protéines EGFP-140K-AB-RRRR/AAAA et EGFP-140K-A-H386L, pour les deux catégories, sont semblables à ceux obtenus avec la protéine sauvage, les valeurs de p sont supérieures à 0,05. Ces deux protéines mutantes n'ont donc pas une distribution subcellulaire statistiquement différente de celle la protéine sauvage.

Pour les protéines EGFP-140K-B-FLF/AAA et EGFP-140K-A-ILLL/AAAA, et pour la catégorie « $65 < X < 130$ », les valeurs de p pour ces deux protéines mutantes sont proches, voire égales à 0,05. Les valeurs de p n'étant pas inférieures à 0,05, nous concluons que ces protéines mutantes ne sont pas significativement différentes de la protéine sauvage. Toutefois, nous observons que les profils de leurs histogrammes n'ont pas les mêmes distributions que ceux de la protéine sauvage. Par conséquent, il est possible que les effectifs observés soient insuffisants pour les tests de Khi^2 et nous conduisent à en déduire, à tort, que ces deux protéines mutantes ne sont pas statistiquement différentes de la protéine sauvage alors qu'elles le sont potentiellement.

L'ensemble de ces tests de Khi^2 , pour les protéines EGFP-140K-AB-RRRR/AAAA, EGFP-140K-A-H386L, EGFP-140K-B-FLF/AAA et EGFP-140K-A-ILLL/AAAA, nous ont permis d'affirmer que les résidus substitués - arginine 384, 388, 389 et 406, phénylalanine 400 et 407, leucine 379, 390, 383 et 403, isoleucine 376 et histidine 386 - ne sont pas essentiels pour l'adressage aux chloroplastes. Les analyses de ces quatre protéines mutantes n'ont donc pas été poursuivies.

Protéines	65 < X < 130		130 < X < 200	
	Proportions des classes	Khi ²	Proportions des classes	Khi ²
140K WT		avec n = 376		avec n = 440
140K A-T393L		<i>p</i> = 0,13 avec n = 36		<i>p</i> = 0,02 avec n = 77
140K A-HT/LL		<i>p</i> = 0,50 avec n = 71		<i>p</i> = 8,18E ⁻⁴ avec n = 54
140K B-ILL/AAAA		<i>p</i> = 0,01 avec n = 82		<i>p</i> = 0,16 avec n = 82
140K A-W387A		<i>p</i> = 0,01 avec n = 41		<i>p</i> = 0,87 avec n = 56

Tableau 3. 2 – Histogrammes des proportions des classes pour les protéines de fusion 140K sauvage et mutantes, avec des $p < 0,05$ soit pour la catégorie « 65 < X < 130 », soit pour la catégorie « 130 < X < 200 ».

Proportions des classes de la répartition du signal GFP pour les protéines 140K sauvage et mutantes. La classe SP est représentée en vert, RSP en noir, RSP⁻ en rouge, RSP⁺ en jaune et T en bleu. Les valeurs calculées (p) des tests de Khi² sont indiquées en noir quand H_0 ne peut pas être rejetée et en rouge dans le cas contraire.

2.2.2 Groupe vérifiant H_0 seulement pour « $65 < X < 130$ »

Les résultats obtenus avec les tests de Khi^2 pour les protéines mutantes EGFP-140K-A-T393L et EGFP-140K-A-HT/LL (Tableau 3. 2) indiquent que les écarts des proportions pour la catégorie « $65 < X < 130$ » ne sont pas significativement différents de la protéine sauvage, contrairement à ceux de la catégorie « $130 < X < 200$ ». Les protéines mutantes EGFP-140K-A-T393L et EGFP-140K-A-HT/LL sont donc adressées et accumulées comme la protéine sauvage pour des taux d'accumulation peu élevés, ce qui n'est plus le cas lorsque ces taux augmentent.

De plus, les histogrammes de la catégorie « $130 < X < 200$ » sont en accord avec les résultats des tests de Khi^2 . En effet, les classes RSP⁻ et RSP⁺ sont davantage observées avec les protéines mutantes qu'avec la protéine sauvage, tandis que les classes SP, RSP et T sont moins fréquentes pour les protéines mutantes.

Compte tenu de l'absence d'effet de la mutation H386L, nous nous sommes focalisés ultérieurement uniquement sur la protéine mutante EGFP-140K-A-T393L.

2.2.3 Groupe vérifiant H_0 seulement pour « $130 < X < 200$ »

Les résultats des tests de Khi^2 avec les protéines mutantes EGFP-140K-A-W387A et EGFP-140K-B-ILLL/AAAA indiquent des valeurs de $p < 0,05$ pour la catégorie « $65 < X < 130$ » puis supérieures à 0,05 pour la catégorie « $130 < X < 200$ ». L'adressage de ces protéines mutantes est donc significativement différent pour la première catégorie. En revanche, les proportions des classes de la deuxième catégorie sont statistiquement non différentes de celles de la protéine sauvage. Nous remarquons que les profils des histogrammes reflètent les résultats obtenus avec les tests de Khi^2 : pour la protéine mutante EGFP-140K-A-W387A, les classes RSP et RSP⁺ sont davantage observées qu'avec la protéine sauvage, tandis que celles des classes SP, RSP⁻ et T sont retrouvées en proportions moindres que pour la protéine sauvage. Quant à la protéine mutante EGFP-140K-B-ILLL/AAAA, seule la classe RSP⁺ a des proportions équivalentes à celles de la protéine sauvage. En revanche, ses classes SP et T sont davantage observées que celles de la protéine sauvage, à l'inverse de ses classes RSP et RSP⁻.

Nous concluons que les protéines mutantes de ce groupe sont affectées dans l'adressage aux membranes pour des taux d'accumulation faibles, mais ces processus sont restaurés pour des taux d'accumulation plus élevés.

L'abolition de la propriété amphipathique de l'hélice B empêche donc le déroulement correct de l'adressage de la protéine entière, et elle est donc nécessaire pour la localisation appropriée de la protéine 140K à la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes.

	65 < X < 130		130 < X < 200	
Protéines	Proportions des classes	Khi ²	Proportions des classes	Khi ²
140K WT		avec n = 376		avec n = 440
140K P396A		<i>p</i> = 7,62E⁻⁸ avec n = 36		<i>p</i> = 2,29E⁻¹⁵ avec n = 80
140K B-STQ/AAA		<i>p</i> = 2,78E⁻⁹ avec n = 72		

Tableau 3. 3 – Histogrammes des proportions des classes pour les protéines de fusion 140K sauvage et mutantes avec des $p < 0,05$, soit pour les deux catégories « 65 < X < 130 » et « 130 < X < 200 », soit pour la seule catégorie « 65 < X < 130 ».

Proportions des classes de la répartition du signal GFP pour les protéines 140K sauvage et mutantes. La classe SP est représentée en vert, RSP en noir, RSPt- en rouge, RSPt+ en jaune et T en bleu. Les valeurs calculées (p) des tests de Khi² sont indiquées en noir quand H₀ ne peut pas être rejetée et en rouge dans le cas inverse.

2.2.4 Groupe rejetant H_0 pour « $65 < X < 130$ » et pour « $130 < X < 200$ »

Avec la protéine EGFP-140K-P396A, les valeurs de p obtenues avec les tests de χ^2 sont très inférieures à 0,05 pour les deux catégories testées (Tableau 3. 3). L'adressage de cette protéine mutante est donc significativement affecté. Les résultats obtenus avec les tests de χ^2 sont reflétés par les profils des histogrammes, puisqu'en comparaison avec la protéine sauvage, nous observons que les classes SP et T sont beaucoup moins représentées, tandis que la classe RSP est majoritaire.

Nous concluons que cette protéine mutante EGFP-140K-P396A a un comportement statistiquement différent de celui de la protéine sauvage. La substitution en alanine de la proline 396, qui permet la conformation des hélices A et B en une seule grande hélice alpha, affecte donc la localisation aux chloroplastes de la protéine.

Il est probable que les résidus de la protéine EGFP-140K-P396A ne soient pas correctement agencés les uns par rapport aux autres, puisque la contrainte imposée par le coude de la proline dans la séquence peptidique de la protéine sauvage ne subsiste plus dans la séquence peptidique de cette protéine mutante. Il est également possible que les résidus ne soient pas organisés de la même manière par rapport à la bicouche lipidique, empêchant l'association des faces hydrophobes avec les lipides membranaires. Dans ce cas, la propriété amphipathique ne pourrait plus servir correctement pour l'interaction de la protéine avec les membranes.

En ce qui concerne la protéine EGFP-140K-B-STQ/AAA (Tableau 3. 3), elle n'a pas pu être observée dans la catégorie « $130 < X < 200$ », malgré trois transfections indépendantes avec une augmentation des quantités de plasmides. Pour la catégorie « $65 < X < 130$ » testée par χ^2 , la valeur de p est très inférieure à 0,05, signifiant que le comportement de la protéine mutante est statistiquement différent de celui de la protéine sauvage. Par ailleurs, les profils de l'histogramme ne ressemblent pas à ceux de la protéine sauvage : pour la protéine mutante, les classes SP et T sont moins fréquemment observées, tandis que la classe RSP est largement majoritaire. Nous constatons également que l'histogramme de la catégorie « $65 < X < 130$ » de la protéine EGFP-140K-B-STQ/AAA ressemble à ceux des protéines EGFP-140K-P396A (Tableau 3. 3) et EGFP-140K-A-W387A (Tableau 3. 2). Nous ne pouvons donc pas classer la protéine mutante EGFP-140K-B-STQ/AAA dans l'une des quatre catégories décrites. Néanmoins, nous pouvons en déduire que cette protéine a un adressage statistiquement différent de celui de la protéine sauvage et que l'absence de résidus polaires dans l'hélice B affecte donc la localisation aux chloroplastes de la protéine 140K mutante. Il est possible que les substitutions en alanine empêchent les interactions hydrophiles avec des facteurs cellulaires et affectent, éventuellement, l'orientation appropriée de l'hélice B au niveau de la membrane externe de l'enveloppe des chloroplastes.

L'étude réalisée sur les protéines EGFP-140K mutantes a permis de mettre en évidence que leurs taux d'expression sont souvent plus faibles que ceux de la protéine EGFP-140K sauvage. Nous avons donc analysé la distribution de leur signal GFP associé, en tenant compte des catégories des médianes d'intensité, pour les comparer à la protéine EGFP-140K sauvage ayant un taux d'expression analogue. Ces analyses, associées aux tests statistiques, ont permis de regrouper les protéines mutantes selon qu'elles se comportent, ou non, de manière significativement différente par rapport à la protéine sauvage. Parmi celles se comportant statistiquement différemment de la protéine sauvage, à savoir EGFP-140K-A-T393L, EGFP-140K-B-ILLL/AAAA, EGFP-140K-A-W387A, EGFP-140K-P396A et EGFP-140K-B-STQ/AAA, nous avons pu observer une altération de leur comportement pour l'une (« $65 < X < 130$ ») et/ou l'autre (« $130 < X < 200$ ») catégorie. Ce résultat est en adéquation avec l'hypothèse proposant que l'adressage soit réalisé en différentes étapes en fonction de la quantité de protéine exprimée.

Après identification des substitutions affectant l'adressage des protéines 140K/98K, nous avons ensuite testé l'incidence de ces mutations sur la capacité à dimériser des protéines mutantes.

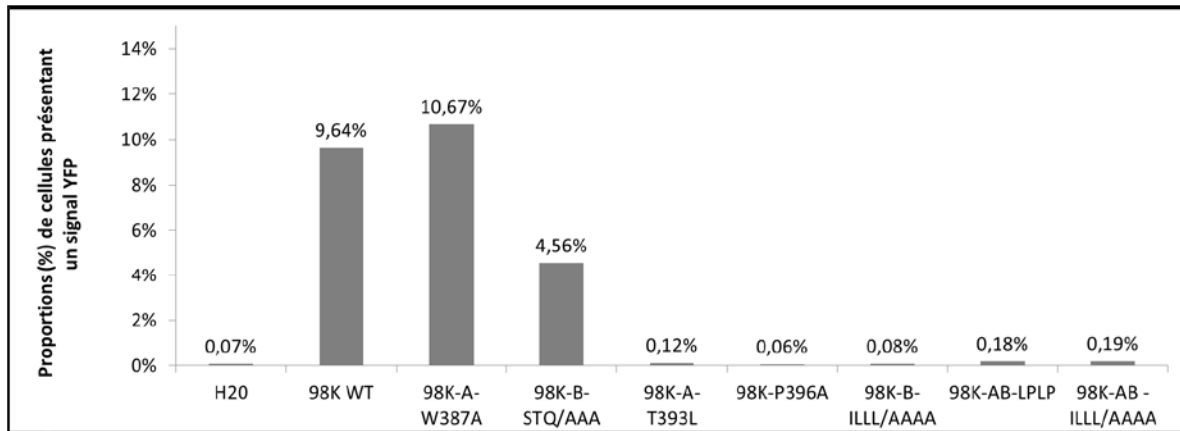


Figure 3. 4 – Proportions (%) des cellules présentant un signal YFP en BiFC alors qu’elles expriment les différentes protéines 98K sauvage et mutantes.

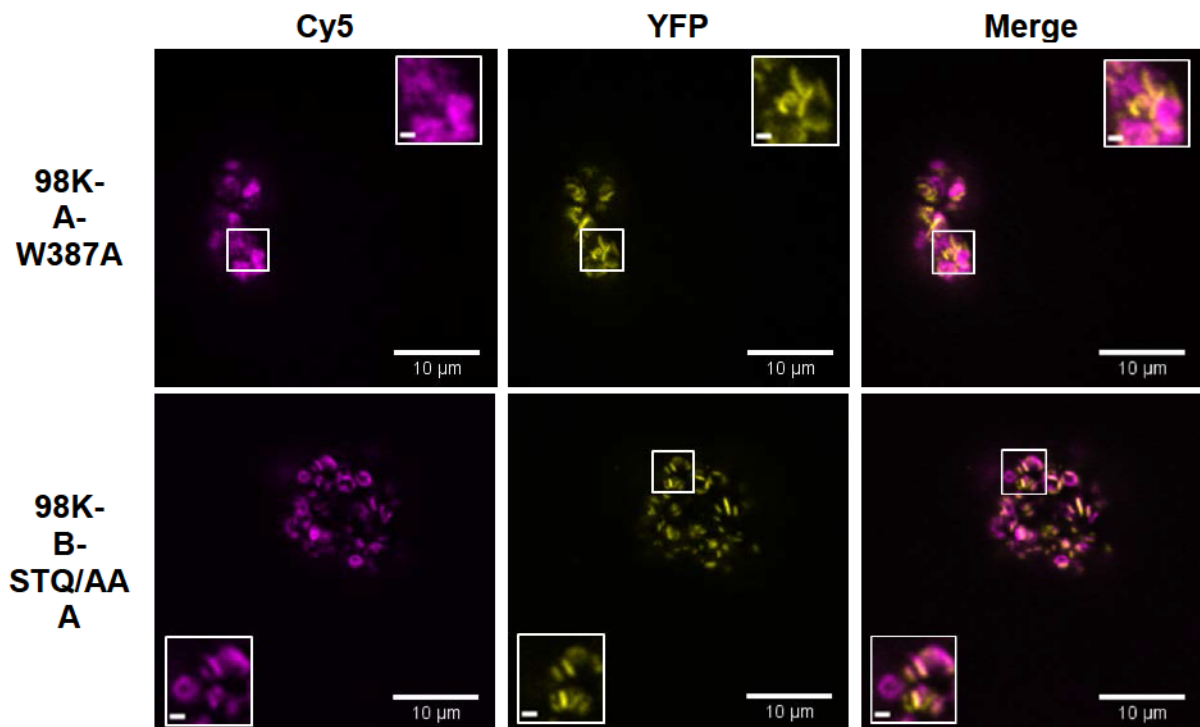


Figure 3. 5 – Images de BiFC des protéines mutantes pouvant dimériser.

Images de microscopie confocale à spinning disk des co-transfections des vecteurs pNter-YFP et pCter-YFP des protéines 98K mutantes. Les signaux de la chlorophylle et de la NirFP (Cy5) sont colorés en magenta sur la superposition des signaux et le signal YFP, en jaune. Les images ont été prises à l’objectif 100X et les barres d’échelle représentent 10 µm sur les images principales et 1 µm sur les agrandissements.

3 Dimérisation des protéines 98K mutantes

En plus des deux protéines mutantes cytoplasmiques 140K-AB-LPLP et 140K-AB-ILLL/AAAA décrites au cours du chapitre 1, nous avons identifié cinq protéines mutantes se comportant statistiquement différemment de la protéine sauvage. Afin de déceler un éventuel défaut d'interaction entre protéines 98K mutantes, nous avons testé en BiFC la dimérisation de ces sept protéines. Leurs séquences codantes ont donc été sous-clonées dans des vecteurs pNter-YFP-98K et pCter-YFP-98K qui ont ensuite été co-transfectés en protoplastes d'*A. thaliana*. Les cellules co-transfectées ont été analysées par cytométrie en flux pour détecter la présence d'un éventuel signal YFP, puis observées en microscopie confocale à spinning disk (Figure 3. 4).

Il apparaît que la capacité à dimériser de la protéine 98K-A-W387A est conservée, tandis qu'elle est affectée soit partiellement, soit totalement, pour les autres protéines mutantes.

3.1 Seules certaines protéines mutantes conservent leur capacité à dimériser

Lors des expériences de BiFC, les cellules exprimant les protéines mutantes 98K-A-W387A et 98K-B-STQ/AAA, fusionnées aux parties N- ou C-terminales de la YFP, présentent un signal YFP (Figure 3. 4), signifiant que ces protéines sont capables de dimériser. Les images de microscopie confocale à spinning disk présentent un signal YFP significatif, localisé à la périphérie des chloroplastes (Figure 3. 5). Ces protéines 98K mutantes sont donc capables de dimériser, ainsi la substitution du résidu tryptophane 387 en alanine permettrait toujours la dimérisation de la protéine mutante. En revanche, la mutation B STQ/AAA affecte partiellement la dimérisation de la protéine mutante. En effet, la proportion de cellules transfectées avec la protéine mutante présentant un signal YFP est réduite par rapport à celle des cellules transfectées avec la protéine sauvage, ces résidus sont donc potentiellement impliqués dans le processus de dimérisation.

La différence significative d'adressage de ces deux protéines mutantes, comparé à celui de la protéine sauvage, ne peut pas être expliquée par une absence de dimérisation.

3.2 Absence de dimérisation pour les autres protéines mutantes

Les cellules exprimant les protéines mutantes 98K-A-T393L, 98K-P396A, 98K-B-ILLL/AAAA, 98K-AB-LPLP et 98K-AB-ILLL/AAAA ne présentent pas de signal YFP détectable en cytométrie en flux (Figure 3. 4), signifiant que ces protéines ne sont plus capables de dimériser. Ces mutations de la protéine 98K empêchent donc sa dimérisation.

Nous avons vu, au cours du chapitre 1, que les protéines mutantes 98K-AB-LPLP et 98K-AB-ILLL/AAAA sont localisées dans le cytoplasme, dans lequel elles sont capables d'interagir avec la polymérase virale. Les expériences de BiFC avec ces protéines mutantes cytoplasmiques nous ont également permis de tester leur capacité à dimériser, sans adressage aux membranes. Or, ces protéines 98K cytoplasmiques ne sont plus aptes à interagir avec elles-mêmes. Toutefois, nous ne pouvons pas déterminer si cette absence d'interaction est liée au défaut d'adressage, ou inversement, ou encore si ces deux processus sont indépendants l'un de l'autre. Nous en déduisons cependant que la structure et la propriété amphipathique des hélices A et B sont requises pour la dimérisation des protéines 98K.

Néanmoins, les autres protéines mutantes ne pouvant plus dimériser, à savoir 98K-A-T393L, 98K-P396A et 98K-B-ILLL/AAAA, elles sont en revanche toujours capables d'être adressées aux chloroplastes, bien que différemment de la protéine sauvage. Pour ces protéines mutantes, la différence d'adressage pourrait être expliquée par leur absence d'oligomérisation. Dans ce cas, les processus d'adressage et d'oligomérisation seraient dépendants l'un de l'autre.

A l'issue de ces tests de dimérisation, nous ignorons si elle est indispensable pour un adressage approprié de la protéine. Afin de tester si ces processus d'oligomérisation et d'adressage sont dépendants l'un de l'autre, il faudrait rechercher si les protéines non affectées dans l'adressage (i.e. celles qui ont été exclues à l'issue des tests de K_{hi}^2), pourraient l'être dans l'oligomérisation.

Toutefois, les résultats obtenus nous permettent de conclure que le DAC est également impliqué dans l'oligomérisation des protéines 140K/98K.

Enfin, nous avons cherché un éventuel effet des différentes mutations affectant significativement l'adressage sur la réplication virale. Nous les avons donc introduites dans le génome viral.

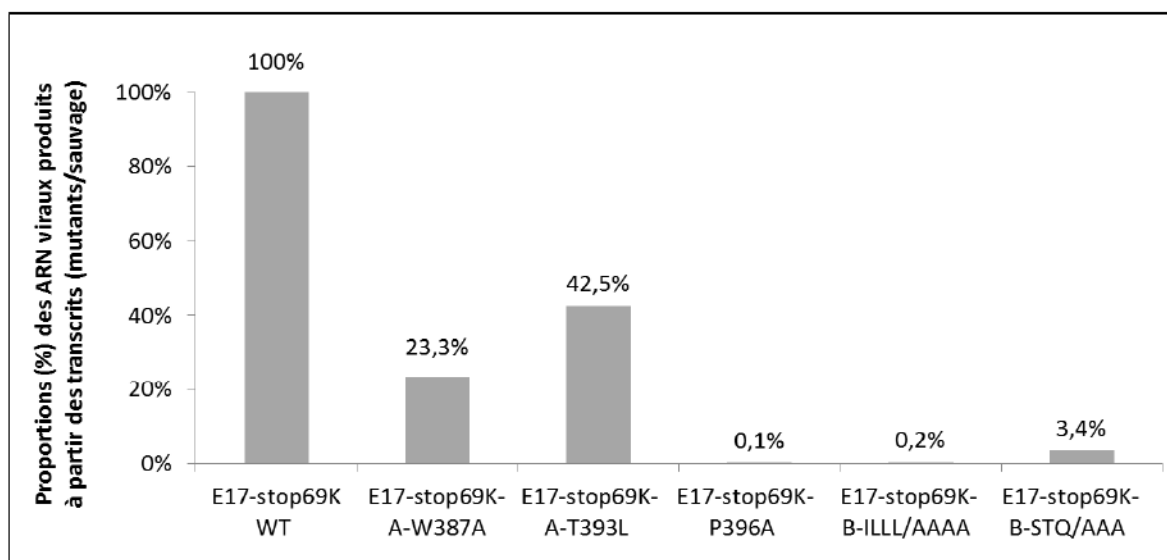


Figure 3. 6 – Proportion (%) de répliation des transcrits contenant les mutations ponctuelles dans la 98K, comparés à ceux sans mutation dans la 98K (WT).

		Adressage		Dimérisation	Réplication virale (/protéine sauvage)
		« 65 < X < 130 »	« 130 < X < 200 »		
Hélice A	H386L	+	+	n.d.	n.d.
	W387A	-	+	++	+
	T393L	+	-	-	++
	HT/LL	+	-	n.d.	n.d.
	ILL/AAAA	+	+	n.d.	n.d.
Hélice B	STQ/AAA	-	n.d.	+	+/-
	ILL/AAAA	-	+	-	-
	FLF/AAA	+/-	+/-	n.d.	n.d.
Hélices A et B	RRRR/AAAA	+	+	n.d.	n.d.
	LPLP	-	-	-	-
	ILL/AAAA	-	-	-	-
Entre les hélices	P396A	-	-	-	-

Tableau 3. 4 – Récapitulatif des résultats d'adressage, de dimérisation et de répliation virale des différentes protéines mutantes.

Pour l'adressage, « + » signifie que les tests de χ^2 ne rejettent pas H_0 , donc que $p > 0,05$, contrairement à « - ». Le « +/- » signifie que les valeurs de p sont supérieures à 0,05, tout en étant très proches, voire égales.

Pour la dimérisation, « ++ » correspond à une proportion de cellules, exprimant un signal YFP, équivalente à la protéine sauvage ; « + » à une proportion diminuée de moitié par rapport à celle de la protéine sauvage et « - » à une absence de dimérisation.

Pour la répliation virale, « ++ » signifie que les transcrits mutants peuvent se réplier à plus de 40 % par rapport aux transcrits mutants, « + » entre 20 et 40 %, « +/- » entre 1 et 20 % et « - » lorsqu'ils ne se réplient pas.

Les tests n'ayant pas été réalisés sont indiqués par « n.d. » (non déterminés).

4 Infectivité des ARN viraux contenant les mutations affectant significativement l'adressage de la protéine 140K

Afin de tester l'efficacité de la réplication des ARN viraux contenant les différentes substitutions dans la protéine 98K, les séquences codant ces mutations dans la 98K ont été sous-clonées dans des vecteurs E17-stop69K (Prod'homme et al., 2003), comme présenté dans le chapitre 1.

A partir de ces différents vecteurs, des transcrits *in vitro* ont été produits, puis transfectés dans des protoplastes d'*A. thaliana*. Les cellules transfectées ont été récoltées à 48 h p.t., leurs ARN totaux extraits permettant ensuite la quantification des ARN viraux par RT-qPCR. Les résultats ont permis de calculer les proportions de la réplication virale des transcrits, et de les comparer entre les transcrits mutés et sauvages (Figure 3. 6).

Nous observons que les substitutions dans la face hydrophobe de l'hélice A, W387A et T393L, affectent partiellement l'efficacité de la réplication virale (respectivement 23,3 % et 42,5 %).

Nous notons également que la modification de conformation de la protéine, générée par la substitution entre les hélices A et B de la proline 396 en alanine, abolit la réplication virale (0,1 %). La présence du coude normalement induit par la proline est donc cruciale, alors même que les résidus impliqués dans les hélices A et B sont inchangés.

Enfin, nous constatons que l'altération de la propriété amphipathique de l'hélice B par les substitutions en alanine, soit des résidus de sa face hydrophobe (B-ILLL/AAAA), soit des résidus polaires de sa face hydrophile (B-STQ/AAA), réduisent drastiquement l'efficacité de la réplication virale (devenant respectivement 0,2 % et 3,4 %).

Toutes ces substitutions, contrairement à celles présentées au cours du chapitre 1, n'induisent pas une localisation cytoplasmique des protéines EGFP-140K mutantes, qui sont adressées aux chloroplastes (Tableau 3. 4).

Toutefois, leurs comportements lors de l'adressage étant statistiquement différents de celui de la protéine sauvage, nous avons proposé que leur oligomérisation soit affectée et soit ainsi responsable des défauts d'adressage. Par conséquent, les altérations de d'oligomérisation pourraient affecter l'efficacité de la réplication virale.

Les résultats obtenus avec les protéines présentant les mutations B-ILLL/AAAA et P396A sont en adéquation avec cette proposition.

En revanche, nous constatons que les diminutions de la réplication virale, observées avec les protéines mutantes 140K-A-W387A et 140K-B-STQ/AAA, ne sont probablement pas liées à un défaut de dimérisation des protéines 98K, concernant la protéine mutée A-W387A. Enfin, la protéine A-T393L n'est plus capable de dimériser bien qu'elle permette la réplication virale.

Nous concluons de l'ensemble de ces résultats que, contrairement à son adressage, l'oligomérisation des protéines 140K/98K n'est donc pas nécessaire pour la réplication virale.

5 Discussion du chapitre

Le DAC de la protéine virale 140K, constitué de deux hélices amphipathiques A et B, est nécessaire et suffisant pour son adressage aux chloroplastes. Cette propriété amphipathique faisant intervenir à la fois les résidus constituant les faces hydrophobes, ainsi que ceux constituant les faces hydrophiles des hélices, nous avons cherché à comprendre quelle pouvait être leur implication dans l'adressage aux chloroplastes. Nous nous sommes également intéressés au résidu proline présent entre les hélices A et B du DAC, afin d'appréhender son rôle dans l'adressage. Nous discutons également de l'importance de l'adressage, de l'oligomérisation et de l'ancrage des protéines 140K/98K pour la réplication virale.

5.1 Les étapes de l'adressage pourraient correspondre à des seuils d'accumulation de protéines

Nous avons démontré précédemment la nécessité de la présence des hélices A et B du DAC pour l'adressage, ainsi que l'importance de leur propriété amphipathique, en supprimant simultanément leur face hydrophobe. Afin de mieux comprendre l'implication des résidus de ces hélices dans l'adressage, nous en avons sélectionné certains à substituer. Sur la base des observations de la distribution des protéines mutantes fusionnées à l'EGFP, nous avons remarqué des comportements significativement différents de ceux la protéine sauvage.

5.1.1 Les défauts d'adressage dus aux faces hydrophobes réduite ou enlevée peuvent être compensés par l'augmentation de la quantité de protéine

Au cours du chapitre 1, nous avons démontré, pour l'adressage, la redondance des hélices A et B, en substituant en alanine les résidus isoleucine et leucine de leur face hydrophobe.

Les analyses plus détaillées de ce chapitre 3, sur la distribution du signal fluorescent des protéines mutantes, ont mis en évidence, pour de faibles quantités de la protéine 140K-B-ILLL/AAAA, un défaut d'adressage compensé par son accumulation, mais qui empêche la réplication des transcrits.

Les représentations par HeliQuest ont permis de voir que la face hydrophobe de l'hélice A contient également le tryptophane 387 à l'une de ses extrémités. Sa substitution en alanine induit la réduction de la face hydrophobe de l'hélice A, provoquant un défaut d'adressage pour des faibles quantités de protéine, restauré avec son accumulation et qui permet une réplication des transcrits mutants à efficacité réduite.

Donc, le résidu tryptophane du DAC des protéines 140K/98K du TYMV ne jouerait pas un rôle aussi important que ceux d'autres virus à ARN(+), impliqués dans des processus d'interaction, soit avec les membranes, soit avec d'autres protéines. Ainsi, dans le cas du SFV, la protéine Nsp1 est ancrée à la membrane des endosomes ou lysosomes via une hélice amphipathique contenant un tryptophane. Ce résidu changé en alanine abolit sa capacité à interagir avec la membrane (Lampio et al., 2000). Dans le cas de l'hélice amphipathique AH2 de la protéine NS4B de l'HCV, des substitutions en alanine des résidus aromatiques, dont des tryptophane, empêchent l'association de la protéine avec les membranes du RE (Gouttenoire et al., 2009b, 2010). En ce qui concerne le TuMV, sa protéine 6K₂ induit la formation de vésicules transportant l'ARN viral entre les cellules (Jiang et al., 2015). Les auteurs ont montré que le domaine N-terminal de 6K₂ interagit avec la protéine Sec24a, permettant ainsi son association aux membranes et le transport des vésicules hors de la cellule, et donc que la substitution en alanine du tryptophane de ce domaine N-terminal abolit le mouvement intercellulaire du virus.

De manière surprenante, les données des tests de K_{hi}^2 de la protéine 140K-A-ILLL/AAAA n'ont pas permis de conclure à un adressage significativement différent par rapport à celui de la protéine sauvage, bien que les profils des histogrammes ne se ressemblent pas. Il en va de même pour la protéine mutante 140K-B-FLF/AAA. Il est probable que les effectifs observés avec ces protéines mutantes dans l'hélice A ou B soient suffisants pour effectuer les calculs statistiques, mais qu'ils ne soient finalement pas assez importants pour détecter une différence significative avec la protéine sauvage. Cela nous aurait conduits à écarter, à tort, 140K-A-ILLL/AAAA et 140K-B-FLF/AAA des analyses de dimérisation et de réplication.

5.1.2 L'augmentation de la face hydrophobe provoque un défaut d'adressage lors de l'accumulation de la protéine

Sur la base des représentations d'HeliQuest, nous avons constaté que l'histidine 386 et la thréonine 393 interrompent la face hydrophobe de l'hélice A. Les substitutions en leucine de ces deux résidus agrandissent cette face hydrophobe et permettent l'adressage pour des quantités faibles de protéine. En revanche, son accumulation révèle un défaut de l'adressage de la protéine mutante, dont la proportion de la répartition correspondant à la classe T est diminuée par rapport à celle de la protéine sauvage ; celles correspondant aux classes RSPt- et RSPt+ sont fortement augmentées.

Ainsi, les défauts d'adressage induits par la réduction de la face hydrophobe sont compensables par l'accumulation des protéines, contrairement à ceux provoqués par son agrandissement.

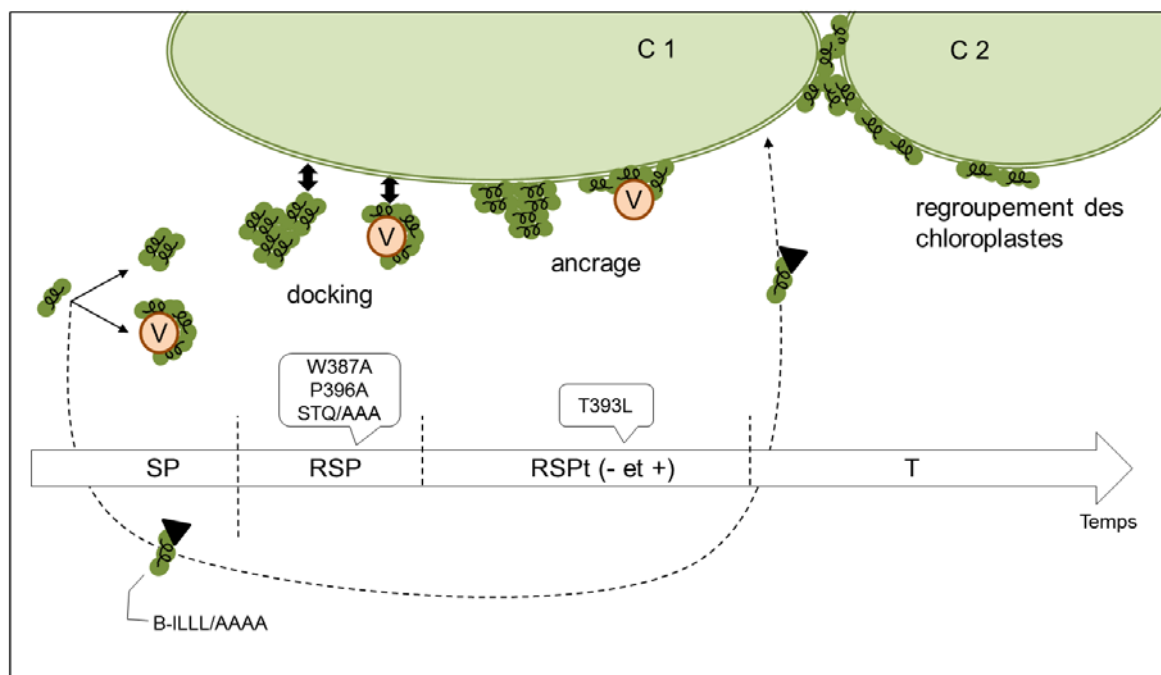


Figure 3. 7 – Proposition d’une corrélation entre les classes observées et les étapes du processus d’adressage.

Les protéines 140K/98K nouvellement synthétisées peuvent être soit indépendantes dans le cytoplasme et oligomériser, soit associées à la membrane d’une vésicule (V), seules ou à plusieurs. Ces formes de protéine en transit atteignent l’enveloppe du chloroplaste, s’y associent (docking) et s’y ancrent, provoquant par la suite le regroupement des chloroplastes. Les bulles précisent les étapes bloquantes des protéines mutantes (désignées avec les noms de leurs mutations).

Nous envisageons également que l’adressage soit réalisé par une voie alternative : la protéine (ici, la protéine mutante B-ILLI/AAAA), recruterait un facteur cellulaire (triangle noir) qui serait responsable, dans la cellule, du trafic de la protéine jusqu’au chloroplaste.

L'ensemble de ces constatations nous permettent de proposer que l'adressage soit réalisé en étapes correspondant à des paliers de quantités de protéines (Figure 3. 7).

Ainsi, pour la protéine 140K-A-W387A, la mutation induirait préférentiellement l'oligomérisation de la protéine, reflétée par l'observation des cellules majoritairement dans la classe RSP. La protéine mutante serait affectée pour son ancrage à de faibles quantités de protéines, ce qui serait compensé par son accumulation. Toutefois, nous ignorons comment l'augmentation de la quantité serait responsable de la restauration de l'adressage approprié.

Nous proposons que la protéine 140K-A-T393L, mutée pour agrandir la face hydrophobe de l'hélice A, reste associée préférentiellement avec une membrane intermédiaire, correspondant éventuellement à celle d'une vésicule qui serait détournée par la protéine pour son adressage aux chloroplastes. En effet, l'hydrophobicité de la protéine mutante serait devenue trop importante, la « bloquant » à l'étape précédant son association avec l'enveloppe du chloroplaste.

Concernant la protéine 140K-B-ILLI/AAAA, nous observons les cellules principalement dans les classes SP et T. Puisque les classes intermédiaires sont peu observées et que la protéine ne dimérise pas, nous proposons qu'elle s'associe avec des facteurs cellulaires qui la conduiraient directement à l'enveloppe des chloroplastes, où elle s'accumulerait grâce à l'ancrage de l'hélice A.

5.2 Importance de la conformation pour l'adressage et pour la réplication virale

Bien que les hélices A et B soient présentes et que leurs faces hydrophobes soient maintenues, nous avons pu observer, en substituant la proline, que la formation d'une seule grande hélice AB, ou que la suppression de certains résidus de la face hydrophile affectent drastiquement l'adressage et la réplication virale.

5.2.1 Nécessité de la proline entre les hélices A et B

Le travail réalisé avec la protéine mutante portant la substitution de la proline 396 en alanine, a mis en évidence la présence indispensable de cette proline pour la localisation appropriée aux chloroplastes de la protéine entière et subséquemment pour la réplication virale. Cette protéine mutante 140K-P396A a donc permis de montrer que la structure secondaire locale est cruciale pour les processus d'adressage de la protéine entière et de réplication virale. Il a également été rapporté récemment que la structure secondaire du coude, formé par une proline et un tryptophane au sein du domaine désordonné de la protéine NS5A de l'HCV, est essentiel pour la réplication virale (Dujardin et al., 2015).

Ainsi, nous proposons que la présence du coude, induit par la proline 396 entre les hélices A et B, permet d'imposer une certaine conformation des hélices, probablement l'une par rapport à l'autre, pour l'oligomérisation, et/ou par rapport aux membranes externes de l'enveloppe des chloroplastes.

5.2.2 Contribution à l'adressage des résidus chargés

Parmi les résidus des faces hydrophiles, se trouvent les résidus chargés arginine et les résidus polaires sérine, thréonine et glutamine. Nous avons pu observer que le changement des quatre résidus arginine des hélices A et B pour 140K-AB-RRRR/AAAA n'avaient pas eu d'effet sur l'adressage de la protéine. En revanche, les substitutions des résidus STQ a drastiquement affecté l'adressage. En effet, la protéine est distribuée selon un pattern correspondant majoritairement à la classe RSP. L'absence d'adressage approprié de cette protéine mutante expliquerait la diminution drastique de la réplication virale.

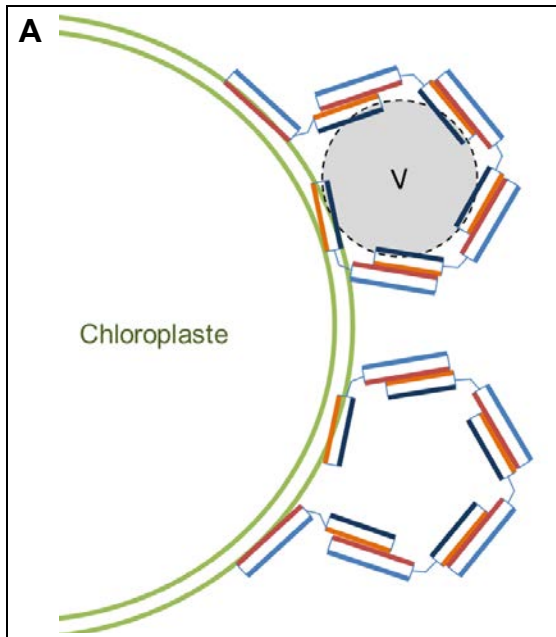
Les résidus STQ, de par leurs propriétés, pourraient être responsables d'un changement de conformation de la protéine, qui favoriserait l'association de la protéine à l'enveloppe des chloroplastes. En effet, ils pourraient interagir avec une protéine cellulaire, qui, de plus, faciliterait son adressage, et/ou être la cible de modifications post-traductionnelles.

De manière générale, nous ne pouvons pas exclure que les différentes mutations introduites puissent favoriser l'association des protéines avec les facteurs cellulaires, empêchant leurs oligomérisations ou leurs ancrages.

De plus, nous avons démontré que les hélices A et B du DAC sont redondantes pour l'adressage. Ainsi, pour compléter les analyses des effets engendrés par des mutations introduites dans une hélice, il faudrait également étudier les protéines dont l'autre hélice est déjà altérée dans sa structure ou pour son caractère amphipathique. La comparaison des résultats permettrait de mieux comprendre l'implication de chacune des hélices dans l'adressage, l'ancrage et l'oligomérisation de la protéine 140K du TYMV.

Figure 3. 8 – Schématisation des possibilités d'oligomérisations des protéines 140K/98K.

Les protéines 140K/98K sont symbolisées par leurs hélices A et B du DAC. L'hélice A est représentée par le rectangle aux bords rouge et bleu clair, l'hélice B le rectangle aux bords orange et bleu foncé. Les couleurs bleues symbolisent les faces hydrophiles et les couleurs rouge et orange, les faces hydrophobes des hélices. Le coude induit par la proline est symbolisé par la liaison coudée entre les hélices A et B.

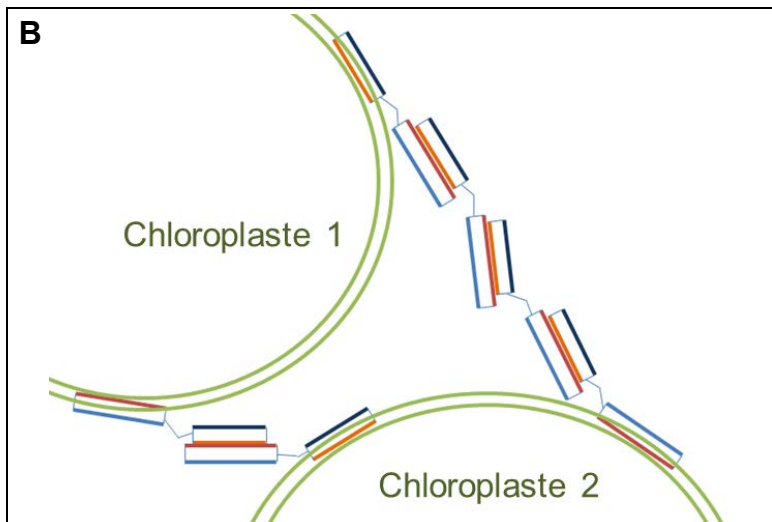


(A) Oligomérisation à la surface d'un chloroplaste.

Les associations entre protéines 140K/ 98K liées aux chloroplastes pourraient représenter les structures ponctuées associées aux chloroplastes.

Nous pouvons proposer qu'une vésicule de l'hôte (V) serve de support des protéines 140K/98K à la fois pour leur adressage jusqu'aux chloroplastes, et pour leur oligomérisation.

Il est également envisageable que les oligomères de protéine interagissent directement avec la membrane externe des chloroplastes. L'affinité pour la membrane serait plus importante, dissociant partiellement l'oligomérisation de la protéine.



(B) Dimérisation et oligomérisation impliquant deux chloroplastes.

Ces oligomérisations ayant lieu entre deux chloroplastes, nous proposons qu'elles soient à l'origine des arcs, traits et anneaux visibles en fluorescence entre les chloroplastes et qu'elles provoquent leur regroupement.

5.3 L'oligomérisation des protéines 98K

Certaines protéines mutantes ont perdu leur capacité à dimériser. Nous proposons que l'oligomérisation ne soit pas nécessaire pour la réplication virale et qu'elle implique les hélices A et B du DAC.

5.3.1 L'oligomérisation est dispensable pour la réplication virale

Certaines mutations des protéines 140K empêchent leur dimérisation bien qu'elles puissent être localisées au voisinage des chloroplastes. Parmi celles-ci, seule la mutation T393L permet une réplication virale, même si son efficacité est réduite. Ce résultat permet de conclure que la réplication virale ne nécessite pas l'oligomérisation préalable de la protéine 140K.

5.3.2 L'oligomérisation impliquerait les faces hydrophobes des hélices A et B du DAC

Suite à la découverte de l'oligomérisation de la protéine 98K, nous nous sommes demandés quelle partie de la protéine était impliquée dans ce processus. Les tests de dimérisation avec les protéines cytoplasmiques présentées dans le chapitre 1, ont révélé que leur oligomérisation n'est pas effective. Or, il a été démontré que l'hélice amphipathique AH2 de la protéine NS4B est requise pour son oligomérisation et contribue à la mise en place du réseau membranaire nécessaire à la réplication virale de l'HCV (Gouttenoire et al., 2009b, 2010). Comme dans cet exemple, il est donc envisageable que le DAC des protéines 140K/98K soit responsable de leur association aux membranes et de leur oligomérisation.

Les autres protéines mutantes testées dans ce chapitre nous conduisent à proposer que les dimérisations sont réalisées par les interactions entre l'hélice A d'une protéine et l'hélice B de sa partenaire. En effet, l'agrandissement de la face hydrophobe de l'hélice A de la protéine mutante T393L ne permet pas sa dimérisation alors que l'hélice B est inchangée, signifiant que soit sa dimérisation n'implique pas l'hélice B, soit elle requiert l'hélice A. Dans le cas de la protéine 140K-B-IILL/AAAA, son hélice A est intacte tandis que son hélice B a perdu sa face hydrophobe : la protéine ne dimérise plus. Donc la dimérisation n'a pas lieu entre deux hélices A mais elle nécessite peut-être l'hélice B. Le fait que la protéine 140K-B-STQ/AAA soit toujours capable de dimériser, alors que seule la propriété hydrophile de l'hélice B est affectée, nous permet de proposer que les faces hydrophobes de l'hélice A d'une protéine et de l'hélice B de sa partenaire soient en interaction (Figure 3. 8).

5.4 Les mutations introduites affectent-elles l'ancrage ?

Au cours de ce chapitre, nous avons pu constater que toutes les protéines EGFP-140K mutantes sont adressées aux chloroplastes. En revanche, certaines mutations peuvent affecter partiellement, ou totalement, l'oligomérisation des protéines 140K/98K, la distribution de la protéine dans la cellule et subséquemment la réplication virale. Si les défauts d'oligomérisation des protéines 140K/98K ne permettent pas d'expliquer ses différences de localisation, nous pouvons proposer que l'ancrage de ces mutants en soit responsable. Ainsi, l'adressage à l'enveloppe des chloroplastes serait nécessaire pour l'ancrage qui, lui, serait suffisant pour la réplication virale. En effet, l'insertion des hélices dans les membranes maintiendrait les protéines associées aux chloroplastes, permettant l'ancrage de l'ensemble du complexe de réplication et donc la réalisation de la réplication virale.

Afin de tester cette hypothèse, il faudrait, dans un premier temps, rechercher si les protéines mutantes sont associées aux membranes, en effectuant des tests de fractionnements subcellulaires ou de flottaisons de membranes. Dans le cas où ces protéines seraient effectivement retrouvées associées aux membranes chloroplastiques, il pourrait être envisagé de tester la solubilisation de ces protéines afin d'observer une éventuelle différence de comportements des protéines mutantes et sauvages, pouvant expliquer ces variations d'efficacité de la réplication virale.

Conclusions et Perspectives

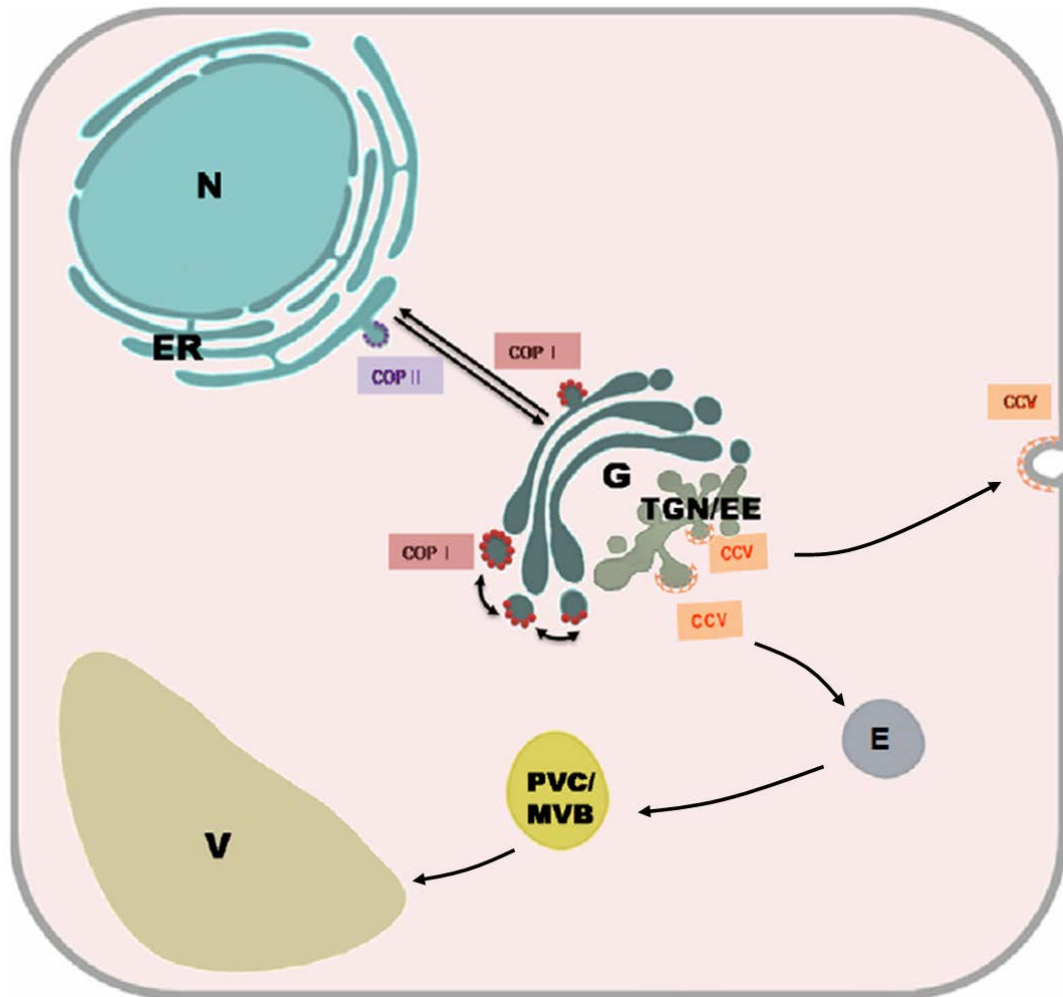


Figure C. 1 – Schématisation de la voie de sécrétion en cellule végétale.

Les vésicules COPII assurent le transport antérograde entre le RE et le *cis*-Golgi. Les vésicules COPI transitent entre les citernes du Golgi (*cis-médiane*, *médiane-trans*) et permettent également le transport rétrograde depuis les citernes du Golgi vers le RE. Les vésicules à clathrine (CCV) bourgeonnent depuis le trans-Golgi network (TGN) vers le compartiment pré-vacuolaire multi-vésiculaire (PVC/MVB), éventuellement via des endosomes (E), ou vers la membrane plasmique.

L'adressage de la protéine 140K aux chloroplastes est réalisé grâce aux hélices amphipathiques de son DAC, en étapes successives qui pourraient impliquer l'oligomérisation de la protéine. Toutefois, l'hôte joue vraisemblablement un rôle clé lors du processus de l'adressage.

1 Comment la cellule hôte pourrait-elle être impliquée dans l'adressage de la protéine 140/98K ?

La caractérisation de l'adressage de la protéine EGFP-140K a mis en évidence un processus complexe, pouvant être réalisé en plusieurs étapes, et corrélé au taux d'accumulation de la protéine.

Comme rapporté dans l'introduction, il existe de nombreux exemples pour lesquels une protéine virale interagit avec une protéine de l'hôte lors de l'infection (Hagiwara et al., 2003; van der Heijden and Bol, 2002; Hyodo et al., 2014; Nagy et al., 2012; Nishikiori et al., 2006; Wei et al., 2013). Par conséquent, nous avons proposé que l'adressage de la protéine 140K aux chloroplastes fasse intervenir des facteurs cellulaires, qui pourraient reconnaître l'un de ses domaines et la prendre en charge (3, Figure 2. 9). De plus, certains des virus à ARN(+) détournent notamment la voie de sécrétion et le réseau de microfilaments de l'hôte, au profit de la réplication virale. Ces virus infectent tant les animaux, comme le PV (Belov et al., 2007), que les végétaux, comme le TEV (Schaad et al., 1997), le TuMV (Wei and Wang, 2008; Wei et al., 2010) ou encore le *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) (Hyodo et al., 2013). Les voies intracellulaires utilisées par la protéine 140K du TYMV pour atteindre les chloroplastes restent encore inconnues, mais plusieurs pistes peuvent être envisagées. Certaines ont été abordées et les résultats préliminaires obtenus sont présentés ci-après.

1.1 Recherche d'une colocalisation avec la voie de sécrétion

Chez les végétaux, les protéines cellulaires sécrétées ou adressées à la membrane plasmique empruntent le système endomembranaire (Figure C. 1). Le réticulum endoplasmique (RE) est réparti dans l'ensemble de la cellule, en association étroite avec le réseau de microfilaments d'actine et avec l'appareil de Golgi, constitué d'une multitude de structures regroupant les citernes *cis*, *median* et *trans* (Boevink et al., 1998). Les vésicules COPII assurent le transport antérograde entre le RE et le Golgi. Les vésicules COPI assurent le transport rétrograde entre les citernes du Golgi et vers le RE. Les vésicules à clathrine bourgeonnent du Golgi vers les compartiments pré-vacuolaires multivésiculaires (PVC/MVB), les endosomes ou la membrane plasmique (revus dans Kirchhausen (2000), Hwang and Robinson (2009) et Patarroyo et al. (2013)).

Puisque les protéines 6K du TEV (Schaad et al., 1997) et TuMV (Wei and Wang, 2008; Wei et al., 2010) sont impliquées dans la formation de vésicules à partir du RE pour permettre l'adressage des complexes de réplication à la membrane des chloroplastes, il est envisageable que la protéine 140K du TYMV emprunte également la voie de sécrétion pour être localisée aux chloroplastes, avec les complexes de réplication.

Afin de rechercher une éventuelle colocalisation de la protéine 140K avec le RE ou le Golgi, nous avons employé des marqueurs de ces compartiments, fusionnés au fluorochrome mCherry, qui ont été co-exprimés avec la protéine EGFP-140K. Comme attendu (Boevink et al., 1998), le marquage du RE (Figure C. 2) forme d'un réseau filamenteux et celui de l'appareil de Golgi a un aspect ponctué (Figure C. 2), dont les structures sont de taille homogène et se déplacent avec un mouvement de « stop-and-go » le long des microfilaments dans les cellules (Nebenführ et al., 1999).

Les observations des cellules co-exprimant un marquage du RE ou du Golgi avec la protéine 140K ont été réalisées depuis 5 h p.t. jusqu'à 24 h p.t. et n'ont pas permis de mettre en évidence une colocalisation de la protéine virale avec le RE ou les structures ponctuéées mobiles du Golgi.

Ces résultats signifient que, soit la protéine 140K ne colocalise pas avec le RE ou le Golgi aux temps observés, soit elle colocalise transitoirement mais les limitations techniques nous empêchent de la voir.

En parallèle des expériences de microscopie, nous avons également employé la bréfeldine A (BFA), antibiotique connu pour perturber les systèmes endomembranaires en affectant la formation des vésicules de type COPI (Satiat-Jeunemaitre et al., 1996a, 1996b). Malheureusement, l'application de la drogue en protoplastes d'*A. thaliana* issus de culture en suspension est rapportée comme étant sans effet pour ce système (Robinson et al., 2008).

Une autre piste d'étude des voies de trafic intracellulaires serait l'emploi des cellules d'*A. thaliana* présentant des mutations « dominantes-négatives », défectueuses pour certaines protéines des voies du système endomembranaire, comme réalisé avec les protéines Arf1 ou Sar1 dans le cas du TEV (Wei and Wang, 2008). Enfin, tel qu'expérimenté pour la protéine p27 du RCNMV (Hyodo et al., 2013), il pourrait également être envisagé de rechercher une interaction entre la protéine virale et les protéines impliquées dans la voie de sécrétion, comme Arf1 ou Sar1.

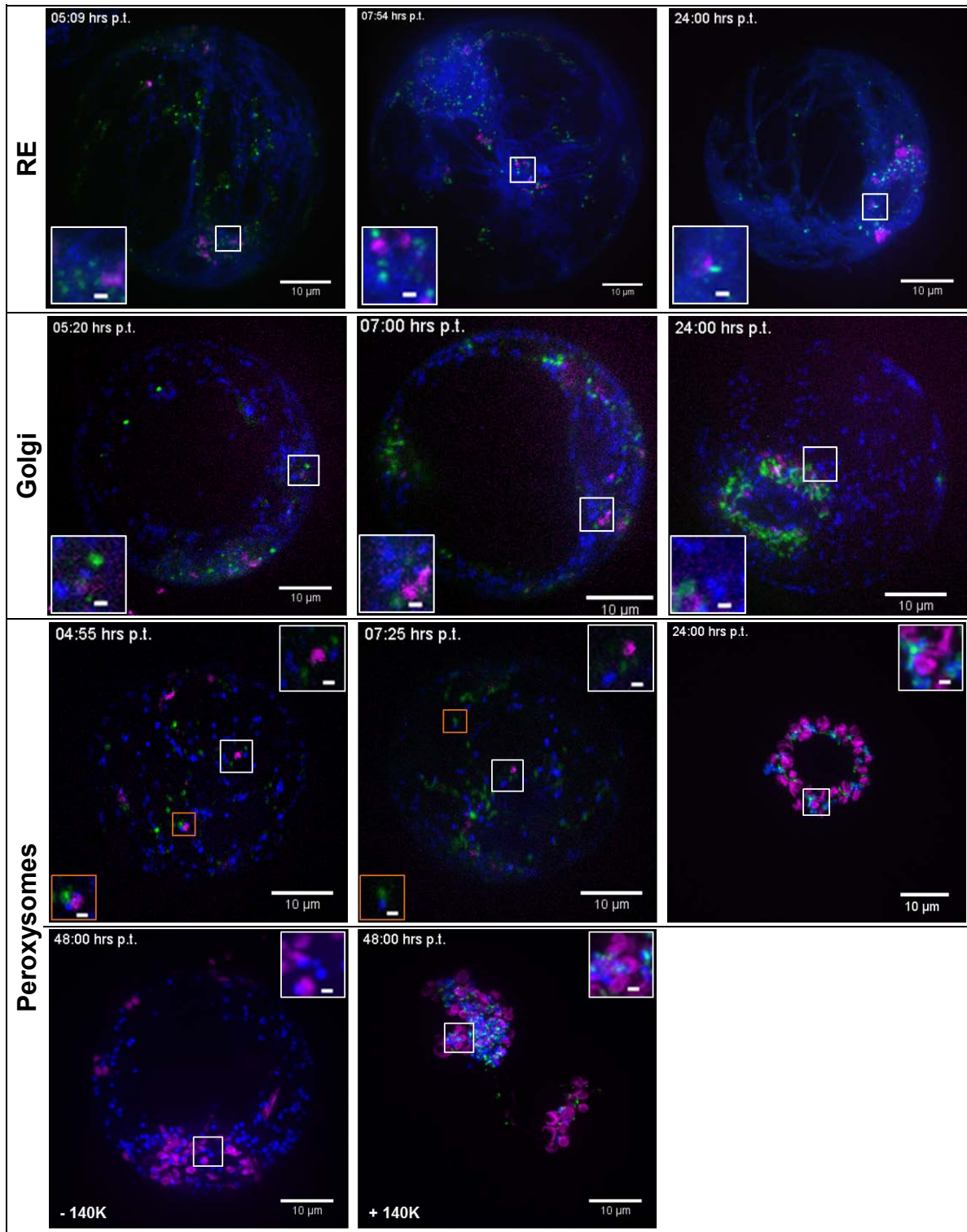


Figure C. 2 – Recherche de colocalisation de la protéine 140K avec des marqueurs du RE, du Golgi et des peroxysomes à différents temps post-transfection.

Le marquage du RE (mCherry-HDEL), celui du Golgi (mCherry- TmMan1) et celui des peroxysomes (mCherry-SKL) sont colorés en bleu, l'EGFP-140K en vert, les chloroplastes et la NirFP en magenta. Les images à 48 h p.t., avec le marquage des peroxysomes, ont été prises avec des cellules sans l'EGFP-140K (-140K, image de gauche) ou la co-exprimant (+140K, image de droite).

L'ensemble des images correspondent à des projections de la totalité des plans pris dans l'épaisseur des cellules. Les acquisitions ont été réalisées au grossissement 100X en microscopie confocale à spinning disk. Les barres d'échelle représentent 10 μm pour les grandes images et 1 μm pour les images de détails.

1.2 La protéine adressée perturbe le fonctionnement de la cellule hôte

Les peroxysomes étant en interaction étroite avec les chloroplastes et ressemblant à des structures ponctuées en microscopie à épifluorescence (revus dans Hu (2007); Hu et al. (2012)), nous proposons que la protéine 140K interagisse également avec les peroxysomes pour être adressée aux chloroplastes. Par ailleurs, d'autres virus à ARN(+), les *Tombusvirus* CNV, TBSV et CymRSV se répliquent à la membrane des peroxysomes. Ces organites sont impliqués dans différents processus cellulaires incluant la β -oxydation des acides gras, la photo-respiration, le stockage et la dégradation des ROS, la biosynthèse des hormones de plantes, l'acide jasmonique et l'auxine (Mano and Nishimura, 2005). Ces différents processus nécessitent des interactions entre les peroxysomes et les mitochondries ou les chloroplastes.

Afin de visualiser une éventuelle co-localisation de la protéine 140K avec les peroxysomes, leur séquence d'adressage SKL a été fusionnée en C-terminal de la mCherry, et exprimée avec l'EGFP-140K en protoplastes d'*A. thaliana*. Les cellules co-transfectées ont été observées à intervalles réguliers partir de 3 h p.t. jusqu'à 48 h p.t., au microscope confocal à spinning disk. Aux temps précoces post-transfection (04h55 à 07h25, Figure C. 2) l'EGFP-140K est parfois localisée à proximité des peroxysomes (cadres oranges avec agrandissement en bas à gauche des images à 04h55 et 07h25, Figure C. 2), comme elle peut ne pas y être associée (cadres blancs avec agrandissements en haut à droite à 04h55 et 07h25, Figure C. 2). En revanche, aux temps plus tardifs, nous observons que l'EGFP-140K est à la fois localisée à la périphérie des chloroplastes mais également à proximité des peroxysomes (24 h p.t. et 48 h p.t., Figure C. 2). Par ailleurs, nous notons que très souvent un peroxysome marqué présente un signal GFP à son voisinage. De plus, les peroxysomes se retrouvent très majoritairement relocalisés à proximité des chloroplastes en présence de 140K, ce qui n'est pas le cas en son absence (image de gauche de la Figure C. 2).

Donc l'adressage de la protéine 140K aux chloroplastes aux temps précoces p.t. ne fait pas intervenir les peroxysomes, qui seraient plutôt détournés alors que la protéine est déjà majoritairement adressée aux chloroplastes. Nous ignorons si la protéine 140K présente un motif d'interaction avec les peroxysomes ou si elle interagit avec un facteur cellulaire, lui-même interagissant directement ou indirectement avec les peroxysomes.

Le RE, le Golgi et les organites sont associés au réseau de microfilaments d'actine et nous avons proposé précédemment que la protéine 140K soit en interaction avec une protéine transitant via ce réseau, voire directement avec un moteur moléculaire. Ainsi, l'oligomérisation de la protéine 140K provoquerait une modification du trafic intracellulaire à l'origine du rapprochement des organites.

Ce regroupement des chloroplastes et des peroxysomes, à proximité des complexes de réplication, pourrait permettre au virus de concentrer les facteurs de l'hôte dont il dépend pour sa réplication.

Toutefois, il a été rapporté que les peroxysomes sont également impliqués dans le déclenchement des mécanismes de défense de l'hôte (Reumann et al., 2007). L'association de la protéine 140K avec les peroxysomes empêcherait peut-être la défense anti-virale de l'hôte. Il serait alors intéressant de rechercher si les produits des gènes, identifiés comme impliqués dans la défense antivirale déclenchée par les peroxysomes, sont synthétisés ou non en réponse à l'expression de la protéine 140K seule, ou lors de l'infection virale.

2 Les protéines 140K/98K sont-elles impliquées dans la formation des invaginations de l'enveloppe du chloroplaste ?

Les complexes de réplication du TYMV sont localisés au niveau des invaginations de l'enveloppe des chloroplastes via les protéines 140K/98K. Dans la littérature, plusieurs exemples indiquent que les protéines non-structurales sont impliquées dans la déformation des membranes observées pendant l'infection virale. Tel est le cas, notamment, de la protéine 1a du BMV, capable d'induire seule la formation des sphérules à la membrane du RE. Il a été proposé qu'elle forme un manteau à l'intérieur des sphérules participant ainsi à leur maintien (Schwartz et al., 2002). Cette protéine recrute également les protéines cellulaires réticulons, qui modèlent les membranes du RE, pour qu'elles contribuent à la formation des sphérules (Diaz et al., 2010). Parmi les protéines virales ciblant des organites cellulaires, la protéine p33 du TBSV peut induire seule la formation de vésicules dans le cytoplasme (McCartney et al., 2005). Mais, pour former les structures caractéristiques de l'infection au niveau des peroxysomes, la protéine p33 requiert l'association avec d'autres protéines virales, p33 et p92 (Panavas et al., 2005), et cellulaires de type ESCRT (Barajas et al., 2009). Par conséquent, il serait intéressant de rechercher l'implication des protéines 140K/98K dans la formation des invaginations à l'enveloppe des chloroplastes.

2.1 La formation des sphérules nécessite d'autres partenaires viraux et/ou cellulaires

Nous avons démontré que les protéines 140K/98K s'oligomérisent, grâce aux hélices alpha amphipathiques de leur DAC, spatialement séparées par la présence d'une proline, qui est essentielle pour l'adressage approprié des protéines, pour leur dimérisation et la réplication virale.

Nous proposons que le coude, induit par la proline, et l'oligomérisation de la protéine puissent être impliqués dans la formation de la courbure des membranes. Il est possible que les protéines 140K/98K soient associées à des lipides particuliers, par interactions directe ou indirecte via une protéine cellulaire, provoquant alors leur regroupement dans une zone de la membrane externe des chloroplastes et induisant la courbure des membranes.

Cependant, des observations préliminaires en microscopie électronique réalisées au laboratoire démontrent que la protéine 98K exprimée seule ne suffit pas à former des sphérules. Ces résultats permettent de conclure que les hélices du DAC de la protéine ne sont donc pas suffisantes pour induire les invaginations.

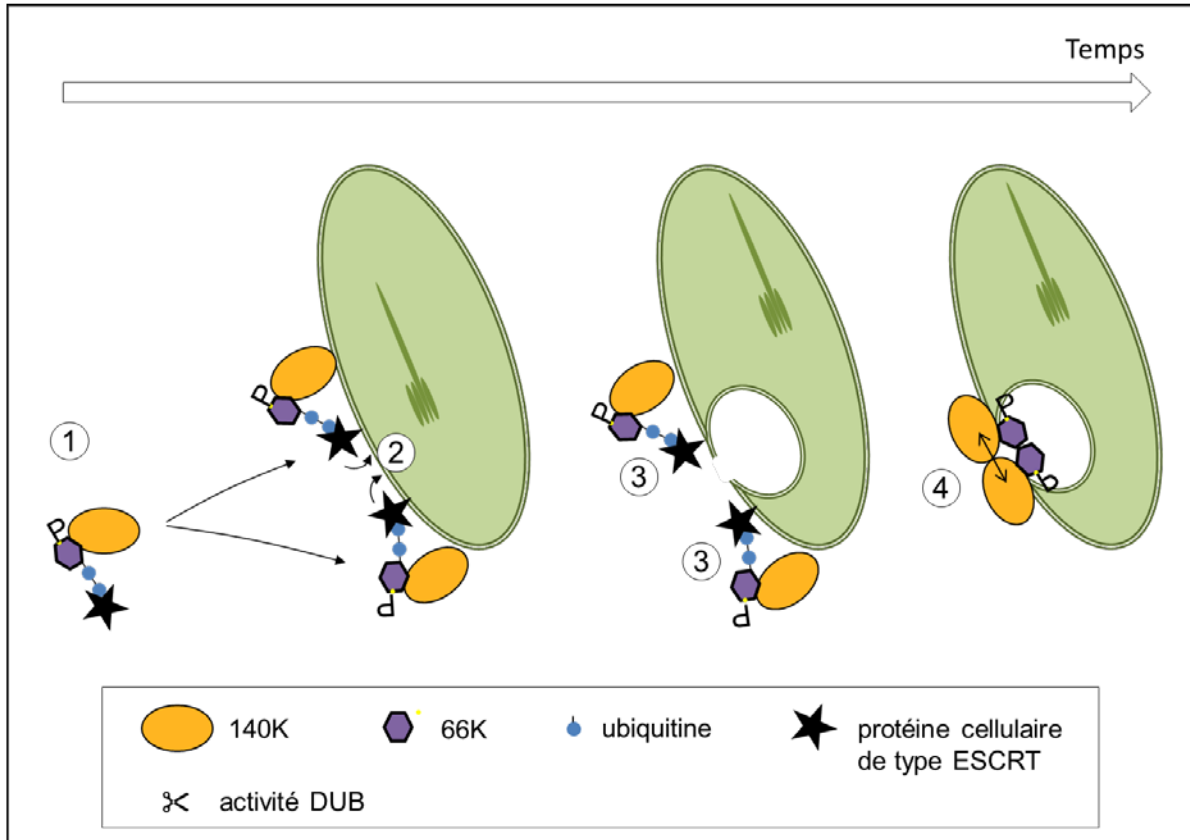


Figure C. 3 – Modèle de la formation de sphérule pour le TYMV.

La protéine 140K seule en interaction avec la protéine 66K phosphorylée et ubiquitylée (1) est adressée au chloroplaste. L'ubiquitine pourrait être reconnue par une protéine cellulaire de type ESCRT qui serait responsable de la formation des sphérules (2) au niveau de l'enveloppe des chloroplastes. L'activité DUB de la protéine 140K permettrait de décrocher les molécules d'ubiquitine et, par conséquent, la protéine cellulaire de type ESCRT (3). Les protéines 140K occuperaient alors la place des protéines ESCRT (4) et permettraient de maintenir la structure des sphérules, notamment en oligomérisant. D'après les résultats de Prod'homme et al. (2001), les protéines 66K semblent localisées dans les sphérules. De plus, nous avons vu au cours du chapitre 1 qu'elles ne sont pas accessibles aux traitements salins : elles pourraient donc être maintenues au niveau des cols des sphérules, orientées vers l'intérieur des sphérules, par leur interaction avec les protéines 140K.

Nous proposons alors que l'association de la protéine 98K avec les autres protéines impliquées dans le complexe de réplication, soit requise pour la déformation membranaire. Il faudrait tester la participation des autres protéines virales, 66K et hélicase, mais également rechercher si les protéines cellulaires pourraient être recrutées.

En effet, les invaginations de l'enveloppe des chloroplastes impliquent la courbure des deux membranes - interne et externe - au niveau du col des sphérules. Il est donc envisageable qu'une protéine de l'hôte, spécialisée dans la courbure des membranes, soit requise pour la formation de ces structures. Comme démontré dans le cas du TBSV, une protéine de type ESCRT pourrait être recrutée par le complexe de réplication, via l'ubiquitylation de la polymérase 66K (Barajas et al., 2009; Schmidt and Teis, 2012).

Nous pouvons alors proposer un modèle, schématisé par la (Figure C. 3) : parmi l'ensemble des protéines 66K, celles qui sont ubiquitylées seraient reconnues par une protéine impliquée dans les complexes ESCRT. Cette protéine cellulaire serait donc liée, via l'ubiquitine, aux protéines 66K, qui interagiraient ensuite avec les protéines 140K/98K, permettant leur adressage aux chloroplastes. Par leur association avec la protéine 66K, les protéines ESCRT seraient alors relocalisées à l'enveloppe du chloroplaste où elles seraient responsables de la formation des courbures. Puis, l'activité DUB de la protéase des protéines 140K/98K, en clivant les molécules d'ubiquitine de la protéine 66K, déclencherait la dissociation des complexes ESCRT. Les protéines 140K/98K occuperaient alors la place des protéines ESCRT et permettraient le maintien de la structure des vésicules.

2.2 La composition en lipides a-t-elle un rôle dans l'efficacité de l'infection virale ?

Les chloroplastes ont une composition en lipides qui leur est propre (Jouhet et al., 2007). Il est possible que les protéines 140K/98K interagissent préférentiellement avec certains types de lipides caractéristiques des chloroplastes, comme le laissent supposer nos résultats préliminaires d'interaction avec les liposomes ayant une composition similaire à celle de la membrane externe des chloroplastes. Si ces résultats étaient confirmés, le TYMV s'ajouterait dans les exemples de virus pour lesquels la réplication nécessite la présence de certains lipides, comme les glycérophospholipides pour le FHV (Wu et al., 1992), les acides gras insaturés pour le BMV (Lee et al., 2001) ou encore les stéroïdes pour le TBSV (Sharma et al., 2010).

Il est également envisageable que les protéines 140K/98K interagissent avec des protéines cellulaires impliquées dans la synthèse de lipides, comme c'est le cas lors des infections par le PV ou l'HCV, qui recrutent respectivement les protéines PI4PKIII β (Hsu et al., 2010) et PI4PKIII α (Reiss et al., 2011).

Pour comprendre quels partenaires pourraient être impliqués dans l'infection du TYMV et quelles voies métaboliques pourraient être altérées, des analyses globales sont actuellement en cours au laboratoire. Des résultats récents de transcriptomique avec des plantes transgéniques exprimant la protéine 98K, mettent en évidence une altération de l'expression de certains gènes impliqués dans les voies de trafic des lipides. L'interaction de la protéine 98K et d'une protéine de l'hôte liant les phosphoinositides a pu être validée en BiFC. Ainsi, la protéine 98K, en plus d'être l'élément clé de l'adressage des complexes de réplication aux chloroplastes, pourrait également interagir avec des facteurs cellulaires impliqués dans le modelage des membranes, la synthèse et le trafic des lipides, qui constitueraient alors le complexe de réplication du TYMV.

3 Conclusion

L'ensemble du travail réalisé pendant ma thèse était davantage orienté vers le virus, et plus particulièrement ses protéines 140K/98K, pour décrypter son mécanisme d'adressage aux chloroplastes. Si les résultats ont mis en évidence le rôle non négligeable de la protéine virale dans ce processus, les problématiques actuelles sont davantage tournées vers l'hôte. En effet, nous aimerions comprendre quelles voies cellulaires sont empruntées par les protéines 140K/98K pour leur adressage, quelles protéines cellulaires sont recrutées et font partie des complexes de réplication, quelle est l'importance des lipides dans la formation des invaginations, s'ils sont nécessaires à l'activité du complexe de réplication... autant de questions qui constituent les pistes de recherche de demain. Les données obtenues, comparées à celles découvertes avec d'autres virus, permettront de mieux comprendre les modes de fonctionnement des virus et apporteront des solutions pour lutter plus efficacement contre les pathogènes, dans les domaines environnementaux, de la santé et de l'agriculture.

Matériel et méthodes

1 Matériel

1.1 Matériel biologique

1.1.1 Matériel végétal

1.1.1.1 Les plantes utilisées

Les plantes hôtes du virus utilisées au laboratoire sont *Arabidopsis thaliana* et le chou chinois *Brassica pekinensis*.

1.1.1.1 Les cellules en culture

Une suspension cellulaire d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Col-0) est maintenue à 21°C en journée et 20°C la nuit, sous agitation (130 rpm) avec une alternance jour/nuit de 16 h/8 h. Elle est propagée tous les 7 jours par dilution au 1/6^{ème} dans du milieu A.

Milieu A Gamborg B5 3,2 g/L (Sigma), saccharose 30 g/L, ANA 1 µM, ajusté à pH 5,8 par KOH, stérilisé par autoclavage.

1.1.1.2 Maintenance du TYMV au laboratoire

Quelques feuilles, issues d'un chou infecté par le TYMV, sont broyées dans un mortier avec du tampon phosphate. Le broyat est appliqué directement sur les feuilles d'un nouveau plant à inoculer. L'inoculation se fait mécaniquement avec de la célite, un abrasif léger.

1.1.2 Vecteurs d'expression

1.1.2.1 Les vecteurs p

1.1.2.1.1 pΩ-EGFP-140K

Le vecteur d'expression transitoire en cellule végétale pΩ-EGFP-140K (Prod'homme et al., 2003) porte la région codant pour la polyprotéine 140K fusionnée en N-terminal avec l'EGFP (Figure M. 1A). Ce gène est sous contrôle du promoteur constitutif fort 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et de la séquence leader Ω du virus de la mosaïque du tabac qui permet d'augmenter le niveau de traduction de l'ORF qui lui est contigu. Le gène est suivi du terminateur de transcription 35S du CaMV.

Les versions mutées ponctuellement ont été créées par PCR avec ce vecteur pΩ-EGFP-140K comme matrice et des amorces dessinées spécialement. (Liste des amorces disponible en annexes)

1.1.2.1.2 p Ω -NirFP

Le vecteur p Ω -NirFP code pour la petite sous-unité de la RuBisCO fusionnée à la NirFP (Figure M. 1 - Schéma des plasmides p Ω -EGFP-140K (A) et p Ω NirFP (B). B). La NirFP ou *Entacmaea quadricolor* FP670 (eqFP670) est un fluorochrome dérivé de Katushka-9-5, fluorescent dans le rouge lointain (pic d'excitation à 605 nm et pic d'émission à 670 nm)(Shcherbo et al., 2010).

Ce vecteur est employé pour transférer des protoplastes d'*A. thaliana* qui sont ensuite observés en microscopie à fluorescence. La construction protéique codée par le p Ω -NirFP permet de visualiser les chloroplastes en fluorescence grâce à l'émission de fluorescence avec un filtre Cy5.

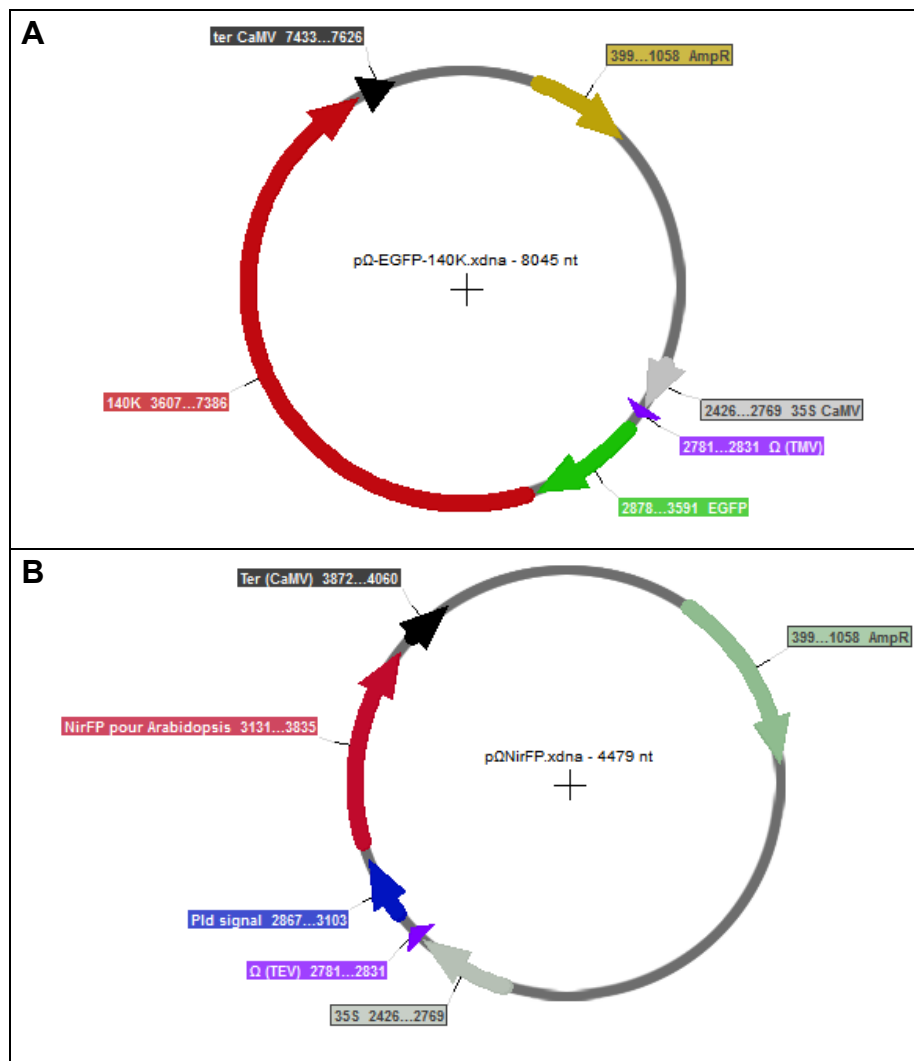


Figure M. 1 - Schéma des plasmides p Ω -EGFP-140K (A) et p Ω NirFP (B).

1.1.2.1.3 Vecteurs pour complémentation de fluorescence bi-moléculaire (BiFC)

Pour les expériences de BiFC, chaque protéine candidate est fusionnée en N-terminal à la partie N-terminale ou C-terminale de la YFP. La séquence codant l'EGFP du plasmide pΩ-EGFP-98K (ou pΩ-EGFP-66K) a été remplacée par la séquence codant soit la partie N-terminale de la YFP, soit la partie C-terminale de la YFP, à partir des plasmides pUGWO et pUGW2, respectivement (Nakagawa et al., 2007) pour créer les vecteurs pΩNtYFP-98K, pΩCtYFP-98K, pΩNtYFP-66K et pΩCtYFP-66K. Ces plasmides ont été réalisés par ShineGene Molecular Biotech, Inc.

Pour créer les vecteurs BiFC contenant les mutations introduites dans les pΩ-EGFP-140K, des sous-clonages des fragments comprenant les mutations ont été réalisés avec les vecteurs pΩ-NtYFP-98K et pΩ-CtYFP-98K. Détails en annexes

1.1.2.2 Les vecteurs contenant le cDNA complet du TYMV

1.1.2.2.1 Le plasmide E17

Le plasmide E17 (Drugeon and Jupin, 2002) contient le cDNA complet correspondant à l'ARN viral sous le contrôle du promoteur T7 (Boyer et al., 1993). Ce plasmide permet la transcription in vitro, de l'ARN viral.

Les mutations ponctuelles ont été introduites par sous-clonage (description en 2.4.2) des fragments de restriction dans le plasmide E17-stop69K (Prod'homme et al., 2003) (Figure M. 2).

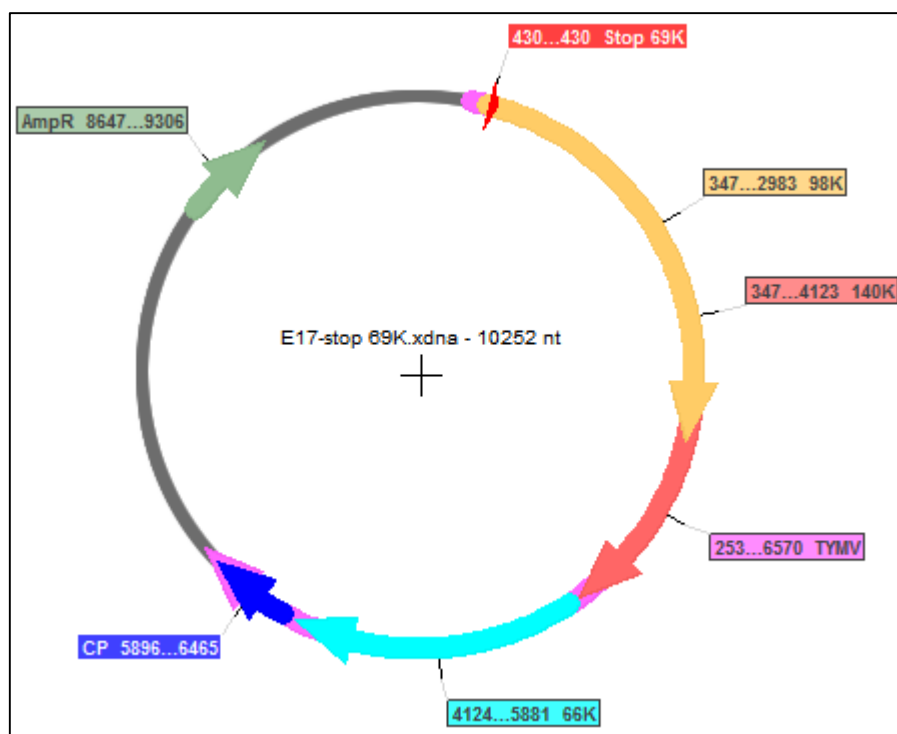


Figure M. 2 - Schémas du plasmide E17-stop69K.

1.1.3 Préparations de transcrits *in vitro* à partir de plasmides du TYMV sauvage ou muté ARN infectieux

Les transcrits viraux sont générés à partir des plasmides de type E17 (mentionnés en partie 1.1.2.2.1) dont 10 µg sont d'abord linéarisés avec 1 µl d'enzyme AgeI (NEB, 5 u/µl). 1,5 µg d'ADN linéarisé est ensuite employé avec le mMESSAGER mMACHINE® T7 Transcription kit Ambion™ qui permet la synthèse *in vitro* de transcrits, selon les recommandations du fournisseur. La qualité et l'estimation des quantités des ARN sont réalisées à partir de gel d'agarose.

1.1.4 Souches bactériennes : *Escherichia coli*

Les bactéries *E. coli* DH5α sont utilisées pour les amplifications de plasmides et les clonages. Les bactéries *E. coli* JM109 (Promega®) ont aussi été utilisées ponctuellement pour amplifier des plasmides et éviter les remaniements.

DH5α supE44 Δ*lac*U169 (Φ80*lac*ZΔM15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1
 JM109 *endA*1, *recA*1, *gyrA*96, *thi*, *hsdR*17 (*rk*−, *mk*+), *relA*1, supE44, Δ(*lac*-*proAB*),
 [F' *traD*36, *proAB*, *laqIq*ZΔM15]

1.2 Matériel de microscopie

1.2.1 Les microscopes utilisés

Les microscopes utilisés sont pilotés par le logiciel Metamorph® (Molecular Device).

1.2.1.1 Microscope à épifluorescence

Le microscope plein champ Zeiss est associé à statif Axio Observer Z.1, équipé pour des acquisitions en brightfield et contraste interférentiel de Nomarski (DIC). La platine est motorisée en XY et en Z pour des acquisitions multi-positions et mosaïque. Les observations sont réalisées à l'objectif 63X à immersion à l'huile avec une ouverture numérique de 1.4. Le microscope est couplé à une lampe mercure à arc HBO100 ainsi qu'à une caméra CCD (Zeiss) MRm. Visualiser les constructions fusionnées à l'EGFP ainsi que l'auto-fluorescence de la chlorophylle nécessite l'utilisation de différents blocs filtres ayant leurs propres caractéristiques (Tableau M 1).

Observations	Blocs filtres	Excitation	Emission	Miroir dichroïque
EGFP	GFP	475AF40	535AF45	505DRLP
Chlorophylle	Texas Red	560AF55	645AF75	595DRLP

Tableau M 1 : Blocs filtres du vidéo-microscope et leurs caractéristiques.

1.2.1.2 Microscope confocal à spinning disk

Le microscope inversé Leica DMI6000 est associé à une tête confocale Ultraview CSU22 (Yokogawa) où les miroirs dichroïques sont installés (simple, bi-bandes et quadri-bandes). Les observations sont réalisées à l'objectif 100X à immersion à l'huile avec une ouverture numérique de 1.4. L'illumination est réalisée par des lasers 405 nm, 491 nm, 561 nm et 635 nm La roue rapide de filtres à l'émission permet de voir les constructions fusionnées à l'EGFP ou à la mCherry ainsi que le rouge lointain pour l'auto-fluorescence de la chlorophylle ou la NirFP. Les différentes caractéristiques sont regroupées dans le Tableau M2.

Une caméra à haute sensibilité QuantEM 5125C (Photometrics) est couplée au microscope. Les acquisitions en Z sont réalisées à des intervalles de 1 µm sur l'épaisseur des cellules.

Observations	Excitation	Puissance	Filtres d'émission	Miroir dichroïque
EGFP	491 nm	50 mW	GFP	Simple ou quadri-bandes
Chlorophylle	635 nm	25 mW	Cy5	Quadri-bandes
mCherry	561 nm	50 mW	mRFP	Quadri-bandes

Tableau M2 : Caractéristiques d'émission et d'excitation du microscope confocal.

1.2.2 Supports d'observation

1.2.2.1 Entre lame et lamelle

100 à 500 µl de cellules sont laissées à sédimenter par gravité de 30 min à 1h, à température ambiante et à l'obscurité. 30 µl du culot sont déposés entre lame et lamelle. Le montage est immédiatement placé au microscope pour l'observation. Ce mode de préparation permet l'observation pendant une trentaine de minutes environ.

1.2.2.2 Boîtes à fond de verre

Entre 500 µl et 1 ml de cellules sont placés dans ce type de boîte (35 mm-high, IBIDI®) pour une observation de quelques minutes à 48 heures post-transfection.

1.2.2.3 Support en canaux

Pour une observation et conservation des protoplastes sur plusieurs heures, 42 μ l de cellules sont placées dans une lamelle à canaux (μ -Slide VI, IBIDI®). Le fond est traité avec du plastique IBIDI® qui permet les échanges gazeux et qui est compatible avec les prises d'images en fluorescence aux microscopes. Les canaux sont fermés hermétiquement par des bouchons, limitant le mouvement des cellules en suspension.

1.2.3 Traitements des images de microscopie

Les images acquises avec les différents microscopes sont sous le format généré par le logiciel Metamorph®. Elles sont ensuite traitées sous d'autres logiciels comme Fiji pour les traitements de routine et Imaris (Bitplane, version 8.1) pour des analyses plus poussées des images obtenues.

1.2.4 Comparaison des données de microscopie par test statistique

Les différents phénotypes observés en microscopie confocale ont été quantifiés. Ces données ont été comparées par test statistique de $\text{K}\chi^2$ (Pearson, 1922).

Les tests statistiques ont été réalisés, pour chaque catégorie, entre les proportions issues des analyses d'une protéine (souvent la protéine 140K sauvage) et d'une protéine à comparer (souvent une protéine mutante). L'hypothèse H_0 testée est que les proportions de chaque classe obtenues avec la protéine à comparer (mutante) sont indépendantes des proportions de chaque classe obtenues avec la protéine (sauvage). Ainsi, les différences observées dans les proportions des classes obtenues avec la protéine à comparer sont simplement liées à l'échantillonnage et donc ne sont pas statistiquement différentes de celles obtenues avec la protéine sauvage.

Les valeurs des proportions à comparer sont regroupées pour former le tableau des valeurs observées. À partir de ce tableau est calculé le tableau des valeurs théoriques, correspondant à l'hypothèse d'indépendance H_0 . Le seuil de risque α est fixé à 5 % et correspond à la valeur de risque que nous acceptons de prendre en rejetant l'hypothèse H_0 à tort. Nous utilisons la formule du logiciel Excel « TEST.KHI2 » qui calcule un risque α' , compris entre 0 et 1. Cet α' est ensuite comparé au α fixé, soit 0,05, pour un nombre de degré de liberté donné (ddl). Le nombre de ddl est calculé en fonction du nombre de modalités de la première variable, soit les différentes classes analysées, auquel est retranché 1, multiplié par le nombre de modalités de la seconde variable, correspondant au nombre de versions de protéines testées, auquel est soustrait 1. Le nombre de ddl dans notre cas correspond très souvent à : (5 classes-1) fois (2 versions de protéines-1), donc 4.

Donc plus α' calculé par Excel est proche de 1, plus nous sommes confiant en concluant que les proportions obtenues avec la protéine mutante sont bien indépendantes de celles obtenues avec la protéine sauvage. Nous concluons alors que la protéine à comparer n'est pas différente de la protéine sauvage. A l'inverse, si α' calculé par Excel est inférieure à 0,05 et tend vers 0, nous rejetons l'hypothèse H_0 d'indépendance des deux variables et nous considérons que les proportions obtenues avec la protéine mutante sont différentes de celles obtenues avec la protéine sauvage. Nous concluons alors que la protéine à comparer est différente de la protéine sauvage.

1.3 Autres logiciels employés

1.3.1 Séquences d'acides nucléiques

Les logiciels Serial Cloner (2-6-1), Snapgene viewer 1.5.3 et DNA strider ont permis l'analyse des séquences d'ADN, la construction des séquences théoriques et la présentation des cartes des plasmides.

1.3.2 Logiciels de prédictions

1.3.2.1 Structures secondaires

Les prédictions de structures secondaires ont été réalisées avec NPS@ (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html), en utilisant le consensus des méthodes : DPM (Deléage and Roux, 1987), DSC (King and Sternberg, 1996), GOR4 (Garnier et al., 1996) HNNC (Guermeur and Gallinari, 1997), PREDATOR (Frishman and Argos, 1996), SIMPA96 (Levin et al., 1986) et SOPM (Geourjon and Deléage, 1994). Ces méthodes ont été sélectionnées, peuvent être utilisées à l'identique pour la protéine sauvage et pour les protéines mutantes car elles ne prennent pas en compte les alignements phylogénétiques. De plus, elles donnent les mêmes résultats entre la protéine 98K entière et pour sa séquence comprise entre les acides aminés 372 et 413 soumise seule.

1.3.2.2 Modifications post-traductionnelles

Nous avons testé la possibilité des protéines 140K et 98K à être palmitoylées avec le logiciel CSS-Palm 4.0 (<http://csspalm.biocuckoo.org/down.php>) (Ren et al., 2008) en utilisant les paramètres par défaut. Nous avons recherché des sites de myristoylation dans les protéines 140K et 98K avec les prédicteurs NMT (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>) (Bologna et al., 2004) et Myristoylator (http://www.expasy.org/proteomics/post-translational_modification) (Eisenhaber et al., 2003; Maurer-Stroh et al., 2002), en utilisant les paramètres par défaut.

1.3.2.3 Domaines transmembranaires

Pour savoir si les protéines 140K et 98K présentent des domaines transmembranaires, nous avons employé le serveur, ANNIE et ses paramètres par défaut (Ooi et al., 2009) (<http://annie.bii.a-star.edu.sg/annie/home.do>).

2 Méthodes de biologie moléculaire

2.1 Préparations d'acides nucléiques

2.1.1 Extractions d'ADN à partir des cultures bactériennes, par lyse alcaline

Le criblage des clones bactériens implique une extraction rapide d'ADN à partir de 2 ml de cultures de bactéries. Environ 1 ml de ces cultures sont centrifugés 5 min, à 6 000 rpm à température ambiante. Les culots sont resuspendus dans 100 µl de tampon 1 à température ambiante, puis lysés dans 200 µl de tampon 2 et les réactions sont neutralisées avec 150 µl de tampon 3. Les tubes sont centrifugés 5 minutes, à 13 500 rpm et à température ambiante. 500 µl d'éthanol absolu sont ajoutés aux surnageants et les tubes sont placés à -20°C, 20 minutes. Les tubes sont centrifugés 10 minutes, à 13 500 rpm et à température ambiante, et les culots sont lavés dans 250 µl d'éthanol 70%. Les tubes sont centrifugés 10 minutes, à 13 500 rpm et à température ambiante, et les culots sont laissés à sécher avant d'être repris dans 30 à 100 µl d'eau.

Tampon 1 Tris (pH8) 25 mM, EDTA (pH8) 10 mM

Tampon 2 NaOH 0,2 M, SDS 1%

Tampon 3 KOAc 3M, Acide acétique 11,5 %

Pour le séquençage, la transfection des plasmides en protoplastes ou encore pour la préparation des quantités importantes de plasmides, un kit commercial de préparation d'ADN est employé. Le principe est basé sur la lyse alcaline mais incorpore une fixation des acides nucléiques sur une résine de silice. En fonction de la quantité de culture bactérienne à lyser, les colonnes sont de taille adaptée (Tableau M3). Le protocole employé suit les recommandations du fournisseur.

Volume de culture de bactéries	Kit employé
10 ml	Nucleospin® – Macherey-Nagel
de 75 à 150 ml	Nucleobond® PC 100 – Macherey-Nagel
de 150 à 400 ml	Nucleobond® PC 500 – Macherey-Nagel

Tableau M3 : Récapitulatif des kits employés en fonction de la quantité de culture de bactéries

2.1.2 Extraction d'ARN à partir de protoplastes transfectés

Les culots correspondant à 500 µl de cellules transfectées sont dissouts dans 1 ml de TriReagent (Molecular Research Center, TR118) puis vortexé 1 min et laissé à température ambiante 5 min. Puis, 200 µL de chloroforme : alcool Isoamylique (24 :1) est ajouté dans les tubes, vortexé 1 min et laissé à température ambiante 10 min. Les tubes sont centrifugés 15 min à 4°C 12000 g.

La phase aqueuse est ensuite mélangée volume à volume à l'isopropanol et l'ARN est laissée précipiter à température ambiante 5 min, puis est récupérée par centrifugation 15 min à 4°C 18 000g. Le culot est lavé par de l'éthanol 75% et centrifugé 5 min à 4°C 18 000g. Le culot est séché puis repris dans 20 à 30 µl l'eau ultra-pure « RNase/DNase-free » (Gibco®).

Les ARN sont dosés au Nanodrop et leur qualité est vérifiée sur un gel d'agarose. Les tubes d'ARN sont stockés à -80°C.

2.2 Quantification d'acides nucléiques

2.2.1 Quantification rapide

En routine, la quantification d'acides nucléiques est soit mesurée au nanodrop ND Spectrophotometer qui permet des mesures à 230, 260 et 280 nm, soit estimée sur gel d'agarose.

2.2.2 Quantification des ARN viraux

De manière occasionnelle, nous avons employé la RT-qPCR.

Les ARN totaux sont d'abord traités par la DNase I (Biolabs, M0303S) : 500 ng d'ARN totaux sont traités, dans un volume total de 5 µl, pendant 30 min, à 37°C, par la DNase I. L'inactivation de l'enzyme est réalisée en ajoutant 0,5 µl d'EDTA (5 mM) et en portant les tubes 10 min à 65°C. Ces ARN sont placés 5 minutes à 65°C en présence d'amorces aléatoires (100 µM, Fermentas) et de dNTP (5 mM). La RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Thermo scientifique, #EP0733), son tampon (1X) ainsi que 10 unités de Ribolock RNase Inhibitor (Thermo scientifique, #E00382) sont ajoutés aux échantillons qui sont ensuite incubés 10 min à 25°C, puis 30 min à 50°C et enfin 5 min à 85°C. Les tubes contenant les cDNA sont stockés à -20°C.

Le mélange réactionnel de qPCR contient 1,33 ng des cDNA, les amorces PDF2-5 et SAND-2 (permettant la quantification de deux gènes de référence, (Lilly et al., 2010)), les amorces spécifiques de l'ARN viral, ainsi que la solution EvaGreen® (5X HOT Pol EvaGreen qPCR® Mix Plus (ROX), Euromedex) dans un volume total de 10 µl. Le thermocycleur qPCR LC480 (Roche) permet la réalisation de la qPCR dont le programme est détaillé dans le Tableau M4 :

Etapes	Températures	Durée	Répétition
Dénaturation initiale	95°C	5 min	
Hybridation	60°C	15 sec	40 cycles
Elongation	72°C	30 sec	
Dénaturation	95°C	15 sec	
Elongation finale	72°C	1 min	

Tableau M4 : Programme de qPCR employés avec le thermocycleur qPCR LC480 (Roche).

L'appareil mesure la fluorescence de l'EvaGreen® à la fin de l'étape d'élongation car ce colorant devient fluorescent lorsqu'il est intercalé dans l'ADN double brin.

Les données recueillies pendant la qPCR permettent de délimiter le cycle seuil ou « Ct » pour « Cycle threshold » à savoir, le cycle de la PCR à partir duquel la fluorescence dépasse le bruit de fond. L'amplification du gène recherché est ensuite normalisée par rapport aux amplifications des deux gènes de référence.

2.3 Mutagenèse dirigée

2.3.1 Dessin des amorces spécifiques

Des amorces spécifiques sont dessinées à l'aide des logiciels DNA strider et Amplify 3X. Ces amorces servent à changer ponctuellement quelques nucléotides d'un plasmide. Les changements de nucléotides introduisent la mutation souhaitée, non silencieuse, dans la séquence des acides aminés et une mutation silencieuse créant ou supprimant un site de restriction enzymatique pour faciliter le criblage des clones recherchés.

2.3.2 Réactions de PCR

Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume de 50 µl, en présence de 500 µM de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), 0,5 µM de chaque couple d'amorces, 200 ng de matrice ADN, 1X de tampon Pfu et 5 unités de Pfu ultra (Agilent), laquelle est ajoutée après 4 minutes de dénaturation à 95°C. S'en suit 1 minute de dénaturation et 20 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à 50°C et 2 minutes d'élongation par kb à 68°C. L'extension finale des brins d'ADN est obtenue par incubation 10 minutes à 72°C.

La liste de l'ensemble des oligonucléotides utilisés se trouve en annexes.

2.3.3 Vérification et préparation du produit PCR

La vérification de la présence d'une amplification au cours de la PCR est réalisée en déposant 5 µl du produit PCR sur un gel d'agarose (pourcentage du gel est fonction de la taille du fragment attendu), TBE X1 et en présence de BET (0,5 µg/ml). La migration se fait à 100V pendant 20-30 minutes. Le gel est ensuite illuminé sous lumière ultra-violette.

Lors de sa multiplication dans la bactérie, l'ADN plasmidique se présente sous forme méthylée au niveau des adénines. Par opposition, les copies ADN issues de la PCR ne sont pas méthylées. Il est donc possible d'éliminer le plasmide matrice non muté en effectuant une digestion de 10 µl du produit PCR par 1 µl de l'endonucléase DpnI (Finnzyme, 10 u/µl), ceci avant de transformer les bactéries avec l'ADN issu de la mutagenèse. En effet, cette enzyme ciblant les séquences 5'-Gm6ATC-3' est spécifique de l'ADN hémiméthylé et méthylé et ne digère donc que l'ADN matriciel, non-muté.

2.4 Clonages

2.4.1 Par digestions enzymatiques

Les fragments d'intérêts sont clivés par digestions enzymatiques (1 h, à 37°C, 5 à 10 unités par enzyme) à partir de plasmides donneurs. Les mêmes enzymes sont employées pour digérer le plasmide receveur. Les noms des enzymes sont précisés en annexes avec la liste des constructions.

Pour éviter que les plasmides receveurs ne se referment sur eux-mêmes, la SAP (USB®, 10 unités, 1 h à 37°C) ou la CIP (Biolabs, 10 unités, 30 min à 37°C et 30 min à 55°C) sont employées afin de déphosphoryler les extrémités 5' générées par les enzymes de restriction.

Une fois les profils de digestion vérifiés sur gels d'agarose, les enzymes de digestion et de déphosphorylation sont inactivées par incubation 1 à 15 minutes à 85°C ou par purification des fragments. Dans ce cas, un kit de purification sur gel d'agarose (Macherey-Nagel®) est utilisé selon les instructions du fournisseur.

La ligature des fragments d'intérêt dans les plasmides receveurs est réalisée avec un ratio molaire de 1:1 à 5:1 par la T4 DNA ligase (Thermo Scientific®, 1 unité par réaction) dans un volume de 20 µl, 20 minutes et à température ambiante.

10 µl du produit de ligature est employé pour transformer un aliquot de 100 µl de bactéries compétentes à $>10^6$ cfu/µg.

2.4.2 Par méthode GIBSON (Gibson et al., 2009)

Les fragments d'ADN à assembler sont amplifiés par PCR haute-fidélité par la Polymerase Phusion (Thermo F530S, 1 unité par réaction) avec le tampon GC (Thermo F519) et avec des amorces permettant le recouvrement entre les extrémités des fragments sur au moins 25 pb. La dénaturation initiale est à 98°C (30 sec, pour la dénaturation initiale, puis 10 sec pour la dénaturation de chaque cycle), l'hybridation est dépendante du T_m des amorces (30 sec), l'élongation est réalisée à 72°C (30 sec par kb par cycle et 10 minutes pour l'élongation finale).

Les produits PCR sont déposés sur gels d'agarose pour la vérification et le prélèvement de la bande d'intérêt. Les fragments sont ensuite purifiés par un kit d'extraction sur gel d'agarose, selon les instructions du fournisseur (NucleoSpin® Gel and PCR clean-up).

Au préalable, sont préparés 300 µl de mix AMM, qui comprennent l'Isothermal Reaction Buffer (IRB, concentré 5 fois, contenant 0,5 mg/µl de PEG 8000, des dNTPs à 100 mM et du NAD à 50 mM), la 5'-exonucléase T5 (NEB, 5 unités), l'ADN-polymérase Phusion (Thermo, F530S, 10 unités), la Taq DNA-ligase (NEB, M0208S, 1600 unités), en présence de $MgCl_2$ (50 mM) et de DTT (100 mM). Ce mix est ensuite aliquoté par 15 µl et stocké à -20°C.

Un mélange équimolaire des fragments à assembler est ajouté à un aliquot de mix AMM et l'ensemble est placé pendant 1 h à 50°C. La 5'-exonucléase est inactivée à 50°C en quelques minutes et n'élimine ainsi que quelques nucléotides en 5' des fragments d'ADN. Les régions de recouvrement des extrémités des fragments s'hybrident, l'ADN-polymérase complète les brins d'ADN et l'ADN-ligase assure la ligature des fragments.

5 µl du produit du Gibson est employé pour transformer un aliquot de 50 µl de bactéries compétentes à $>10^6$ cfu/µg.

Cette technique a été employée pour générer les plasmides E17-stop69K avec les différents mutants (Figure M. 3). La liste de l'ensemble des plasmides cités se trouve en annexes.

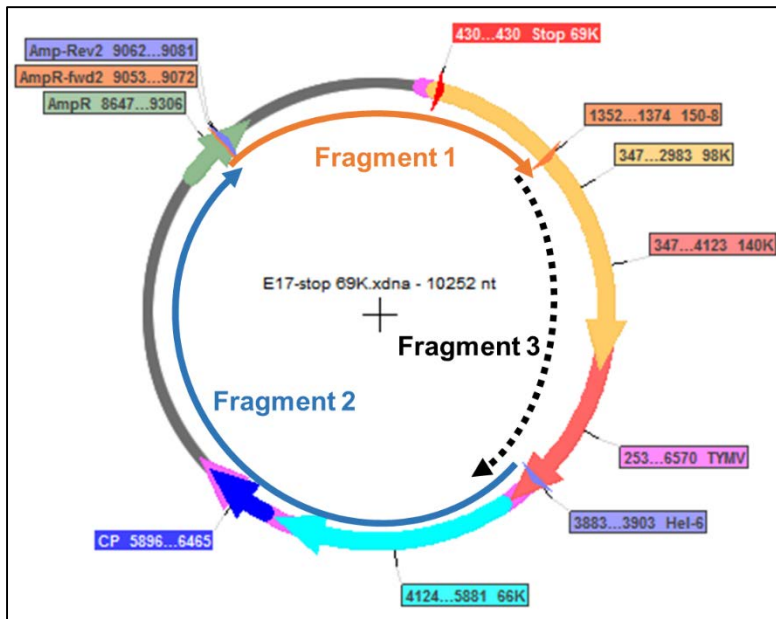


Figure M. 3 - Positionnement des fragments amplifiés par PCR pour les clonages GIBSON

Le fragment 1 (flèche orange) est amplifié entre les amorces AmpR-fwd2 et 150-8.

Le fragment 2 (flèche bleue) est amplifié entre les amorces Hel-6 et AmpR-Rev2

Le fragment 3 (flèche en pointillés noirs) est amplifié entre les amorces 150-20 et Hel-5, à partir d'un plasmide pΩ-EGFP-140K possédant une mutation.

2.5 Transformations bactériennes

2.5.1.1 Préparation de bactéries DH5α électro-compétentes

Une colonie de bactéries DH5α isolée sur boîte LB est ensemencée dans 2,5 ml de milieu LB et incubée sous agitation une nuit à 37°C. Cette pré-culture est diluée d'un facteur 100 dans 250 ml de milieu LB puis placée sous agitation à 37°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une $DO_{600\text{ nm}}$ comprise entre 0,5 et 0,8. La croissance est arrêtée par agitation de la culture dans la glace puis la culture reste dans la glace pendant une heure. S'en suit une centrifugation à 4000 rpm, 4°C, pendant 10 min. Les culots sont repris dans 15 ml d'eau glacée. Le lavage est recommencé trois fois. Après la troisième centrifugation, le culot est repris dans 15 ml de glycérol 10% stérile glacé avant d'être une dernière fois centrifugé. Le culot est repris dans 1 à 1,25 ml de glycérol 10% stérile glacé et les bactéries sont aliquotées par 50 µl et stockées à -80°C.

2.5.1.2 Transformation par électroporation

Après avoir été décongelées dans la glace, 50 à 100 µl de bactéries compétentes sont mises en présence d'environ 10 ng d'ADN à transformer, placées en cuve d'électroporation et maintenues dans la glace jusqu'au moment de l'électroporation (25 µF, 200 Ω et 2,5 kVolts). Un ml de LB est immédiatement ajouté aux bactéries qui sont placées à 37°C sous agitation pendant 30 minutes avant d'être étalées sur milieu solide LB (milieu LB + bacto-agar 15g/l) contenant l'antibiotique approprié et incubées une nuit à 37°C.

2.5.1.3 Préparation de bactéries thermo-compétentes

Une colonie de bactéries DH5 α isolée sur boîte LB est ensemencée dans 10 ml de milieu LB et incubée sous agitation une nuit à 37°C. Cette préculture est diluée d'un facteur 100 dans 100 ml de milieu LB puis placée sous agitation à 37°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO_{600 nm} de 0,4. La croissance est arrêtée par agitation de la culture dans la glace, suivie d'une centrifugation (10 min, 4000 g, 4°C). Le culot est repris dans 10 ml de tampon I, centrifugé de nouveau (5min, 1500 g, 4°C) puis repris dans 10 ml de tampon I. La suspension bactérienne est laissée 1h dans la glace suivie d'une dernière centrifugation (5 min, 1500 g, 4°C). Le culot est repris dans 10 ml de tampon II, aliquoté par 50 μ l et stocké à -80°C.

Tampon I KCl 100 mM, MnCl₂ 45 mM, CaCl₂ 10 mM, HAcOCl₃ 3 mM, KMes 10 mM, pH 6,3 via KOH, stérilisé par filtration sur 0,2 μ m.

Tampon II MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glycérol 15 % (v/v), pH 6,8 via NaOH, stérilisé par filtration sur 0,2 μ m.

2.5.1.4 Transformation par choc thermique

Après avoir été décongelées dans la glace, 50 à 100 μ l de bactéries compétentes sont incubées 30 minutes dans la glace avec 10 à 50 ng d'ADN à transformer. Un choc thermique à 42°C de 2 minutes est réalisé et la suspension supplémentée de 950 μ l de LB est incubée 30 minutes à 37°C. Les bactéries sont ensuite étalées sur milieu solide LB (milieu LB + bacto-- agar 15g/l) contenant l'antibiotique approprié et incubées une nuit à 37°C.

2.6 Vérification des séquences d'ADN

2.6.1 Par digestions enzymatiques

Une première indication de la validité des plasmides obtenue peut être vérifiée par digestion enzymatique dont le profil obtenu est vérifié sur gel d'agarose.

2.6.2 Par séquençage

Le séquençage assuré par MWG-Eurofins selon la méthode de Sanger.

Les chromatogrammes des séquences sont vérifiés grâce au logiciel 4 peaks (version 1.7.2).

Les séquences nucléotidiques sont analysées à l'aide de Serial Cloner (version 2-6-1)

3 Protocoles relatifs aux expériences réalisées dans les systèmes végétaux

3.1 Préparation et transfection de protoplastes d'*A. thaliana*

3.1.1 Préparation des protoplastes

Le protocole suivi est celui de (Camborde et al., 2007) et est réalisé à partir des cellules en culture (suspension cellulaire).

3.1.2 Transfections des protoplastes

La transfection des protoplastes suit le protocole de (Camborde et al., 2007) et est réalisé avec des quantités de plasmides variant de 5 ng à 15 µg de plasmides.

3.2 Vérification, quantification et analyse des transfactions

3.2.1 Quantification des transfactions en protoplastes

3.2.1.1 Estimation du pourcentage de cellules transfectées

A 48 h p.t., l'estimation du pourcentage de cellules transfectées est systématiquement réalisée à partir d'un échantillon de protoplastes transfectés par 10 µg du pΩ-EGFP-140K. Pour cela, 100 à 500 µl de cellules sont laissées sédimenter par gravité, entre 10 et 30 minutes, et 30 µl du culot sont placés entre lame et lamelle puis observés avec le microscope de plein champ à l'objectif à immersion à huile 63X. L'efficacité de transfection correspond au rapport du nombre de cellules ayant un signal GFP sur le nombre de cellules totales.

3.2.1.2 Analyse par cytométrie en flux

400 µl à 1 ml de cellules transfectées par un plasmide codant une protéine fusionnée à un fluorochrome (GFP ou YFP, voir 1.1.2.1) sont sédimentées par gravité pendant 1 h puis 40 µl du culot sont dilués dans 400 µl PBS 1X avant leur passage dans le cytomètre, l'analyseur CyAn ADP 9C (Dako Cytomation). 10 000 à 20 000 cellules sont comptabilisées pour chaque échantillon. Les longueurs d'ondes d'excitation des lasers et d'émission étaient respectivement de 488 nm et 575 ± 25 nm. Un minimum de 10 000 cellules ont été analysées après exclusion des débris cellulaires dans la fenêtre de données puis sont compensées par le signal détecté avec l'autofluorescence de la chlorophylle et représentées par un graphique présentant la population de cellule (PE Log Comp) en fonction de l'intensité du signal fluorescent (GFP/YFP Log Comp). Les résultats nous permettent de connaître le pourcentage de cellules fluorescentes de chaque condition ainsi que la médiane et la moyenne de l'intensité de fluorescence mesurée au sein de la population de cellules.

Le pourcentage de fluorescence permet d'en déduire le pourcentage de la transfection par plasmides codant une protéine fusionnée à la GFP.

Dans le cas de tests de BiFC, le pourcentage de fluorescence permet d'en déduire la proportion de cellules dans laquelle a lieu l'interaction entre les protéines fusionnées aux parties N-ou C-terminales de la YFP.

3.2.2 Récoltes des protoplastes

3.2.2.1 Pour analyse en western blot

400 µl à 1 ml de protoplastes transfectés sont placés en tubes Eppendorf 1,5 ml puis centrifugés (3 min, 80 g, RT, sans frein). Le culot est resuspendu dans 400 µl de PBS 1X contenant des inhibiteurs de protéases (Complete™ Protease Inhibitor cocktail, Roche) et de nouveau centrifugé (3 min, 80 g, RT, sans frein).

Le volume des culots est mesuré afin d'ajouter ½ volume de tampon de Laemmli 3X (LX3) en conséquence. Les tubes sont chauffés 10 min à 100°C puis centrifugés à 13 500 rpm 5 min et enfin stockés à -20°C.

Tampon de Laemmli 3X Tris-HCl pH 6,8 150 mM, βmercaptoéthanol 2 M, SDS 8 %, glycérol 30 % (v/v), bleu de bromophénol (pointe de spatule)

3.2.2.2 Pour l'extraction des ARN totaux

L'équivalent d'une demie transfection (donc environ 500 µl) est prélevée avec des cônes stériles et RNase free puis placée dans des tubes Eppendorf 1,5 ml, également stériles et RNase free. Les tubes sont centrifugés (3 min, 80 g, RT, sans frein), et les fractions surnageantes sont jetées. Les tubes sont ensuite plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

4 Méthodes de Biochimie

4.1 Electrophorèse en conditions dénaturantes

Les extraits protéiques sont déposés en proportions comparables (2 à 20 µl) sur gel de polyacrylamide (8 à 12 % selon la taille des protéines d'intérêt) et analysées par migration électrophorétique en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), selon la technique de (Laemmli, 1970).

A cette étape, il est possible soit de poursuivre par une immunodétection, soit de colorer le gel au bleu de Coomassie (Instant Blue®, Expedeon ; 15 min à RT et sous agitation) afin de colorer l'ensemble des protéines présentes.

4.2 Immunodétection par western blot

4.2.1 Transfert semis-sec

Les protéines séparées sur gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham™ Protran™ 0,2 µm NC, GE Healthcare) par électro-transfert semi-sec pendant 1 h à 100 mA/10 cm² de membrane.

Les protéines totales sont visualisées après coloration au Rouge Ponceau (3 min, RT) de la membrane, suivie d'une coloration à l'eau (3 min, RT).

La membrane est ensuite incubée en présence d'anticorps.

Tampon de transfert Tris-Base 25 mM, glycine 192 mM, éthanol 20 %

Rouge Ponceau Ponceau S 1 g/L, acide acétique 5 %

4.2.2 Hybridation des anticorps

4.2.2.1 Les anticorps primaires

La membrane est saturée avec une solution de PBS-Tween et lait (5 %). La membrane est ensuite incubée (16h, 4°C, avec agitation) en présence de l'antisérum spécifique de la protéine étudiée, dilué comme indiqué dans le Tableau M5 dans la solution PBS-Tween et lait (5 %).

Antigène ciblé	Nom de l'anticorps	Animal d'origine de l'anticorps	Dilution de l'anticorps utilisée	Fournisseur ou référence
YFP, (E)GFP	anti-GFP	lapin	1/4 000 ^e	Abcam
région PRR	anti-boucle (4282)	lapin	1/2 000 ^e au 1/8 000 ^e	Jakubiec et al. (2004)
domaine Protéase de la 98K	anti-PRO (5456)	lapin	1/2 000 ^e au 1/8 000 ^e	Chenon et al. (2012)
66K du TYMV	anti-66K	lapin	1/2 000 ^e	Prod'homme et al. (2001)

Tableau M5 : Résumé des anticorps primaires utilisés pour les Western blots.

Tampon PBS-Tween PBS 1X, Tween 20 0,05%

4.2.2.2 Les anticorps secondaires

Après trois lavages (15 min, RT) de la membrane dans une solution de PBS-Tween 0,05 %, cette même membrane est incubée (1h, RT) avec l'antisérum secondaire spécifique de l'antisérum primaire couplé à la phosphatase alcaline ou à la HRP, dilué comme indiqué dans le Tableau M5 dans la solution PBS-Tween et lait (5 %).

Antigène ciblé	Nom de l'anticorps	Animal d'origine de l'anticorps	Dilution de l'anticorps utilisée	Fournisseur
anticorps de lapin	anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline	chèvre	1/30 000 ^e	Sigma
anticorps de lapin	anti-lapin couplé à la HRP	chèvre	1/6 000 ^e	Sigma

Tableau M6 : Résumé des anticorps secondaires utilisés pour les Western blots.

4.2.3 Révélation

4.2.3.1 Révélation par addition de substrats de la phosphatase alcaline

Les substrats employés sont soit le BCIP (Uptima, 10904F, 25 mg/ml dilué par du DMF 100%) révélé par sa réaction avec le NBT (Uptima, 143457, 50 mg/ml dilué par du DMF 70 %), soit le Naphthol AS-MX-TR phosphate (Sigma, N-8518, 3- Hydroxy-2-naphthoic acid 2,4-dimethylanilide phosphate, 0,4 mg/ml dilué dans H₂O) révélé par le Fast Red TR (Sigma, F-5146, 4-Chloro-2-methylbenzenediazonium, 1 mg/ml dilué dans Tris 0,2 M)

4.2.3.2 Révélation par addition de substrats de la peroxydase

L'activité de la HRP catalysant son substrat ECL (ECL SuperSignal[®] West femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientifique, incubation v/v des solutions du kit et 5 min à RT) qui est détectée par de système d'acquisition LAS 3000, FujiFilm, Life Science.

4.3 Fractionnements subcellulaires

A 24 h p.t., les transfections de protoplastes sont poolées, centrifugées (3 min, 80 g, RT, sans frein) et resuspendues dans 1 ml de tampon E en présence d'inhibiteurs de protéases. Les protoplastes sont lysés par 20 passages de la suspension dans l'aiguille d'une seringue (23 Gauge, 0,6x25 mm) (Prod'homme et al., 2001).

Le fractionnement subcellulaire est obtenu par centrifugation différentielle selon la méthode décrite par (Niesbach-Klöggen et al., 1990). Une première centrifugation (1000 g, 10 min, 4°C) permet de sédimenter les noyaux, les chloroplastes et les granules d'amidon qui forment le culot P1. Celui-ci est repris dans un volume de tampon E identique à celui du surnageant et supplémenté en conséquence de tampon de LX3. Le surnageant S1 est centrifugé (30 000 g, 30 min, 4°C) ce qui permet de récupérer le réticulum endoplasmique rugueux, les corps golgiens, les peroxysomes, les débris chloroplastiques et les mitochondries qui forment le culot P30. Celui-ci est repris dans un volume de tampon E identique à celui du surnageant et supplémenté en conséquence de tampon de LX3.

A chaque étape, 50 µl de chaque fraction soluble sont gardés et additionnés en conséquence de tampon LX3. La fraction S30 est également supplémentée en conséquence de tampon LX3. Les tubes sont chauffés (10 min, 100°C) puis centrifugés (13 500 rpm, 5 min) et stockés à -20°C.

Tampon E Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, saccharose 400 mM, glycérol 10 % (v/v), βmercaptoéthanol 10 mM.

4.4 Tests de solubilisation de protéines membranaires

Les transfections des protoplastes d'*A. thaliana* d'un même type sont regroupées dans un même tube puis sédimentées par centrifugation (3 min, à 80 g, sans frein, RT). Les cellules sont resuspendues en ajoutant du tampon de broyage à raison de 100 µl/transfection. Après une nouvelle centrifugation 3 min, à 80 g et sans frein, le culot de cellules est lysé par 3 cycles de congélation dans l'azote liquide suivie d'une décongélation dans la glace comprenant également une étape de 20 passages en seringue avec une aiguille (23 Gauge, 0,6x25 mm). La lyse est suivie de 2 centrifugations (10 min, 200g, à 4°C) pour éliminer les débris. Le surnageant est récupéré puis déposé sur un coussin de tampon D1X équivalent à ½ volume de surnageant. Les échantillons sont ensuite centrifugés (30 min, 20 000 g, 4°C). Le surnageant est récupéré et additionné en conséquence de tampon de LX3. Le culot est repris dans du tampon D1,25X à raison de 50 µl/transfection.

48 µl de membranes sont incubées avec 12 µl de produit à tester concentré 5 fois (H₂O, NaCl 5M, NaOH 1M, Na₂CO₃ 1M, lubrol W1 2,5 %) puis placées pendant 1h à 4°C, sur roue agitante.

Les échantillons traités sont centrifugés (30 min, 100 000 g, 4°C) dans un rotor TLA 100 (Beckman-Coulter). Les fractions solubles sont récupérées, mesurées et additionnées en conséquence de LX3. Les culots de membranes sont repris, dans les mêmes volumes que les fractions solubles correspondants, dans du tampon D1X et additionnés en conséquence de tampon LX3.

Les échantillons sont chauffés (10 min, 100°C) puis centrifugés (13 500 rpm, 5 min) et enfin stockés à -20°C. Ils sont par la suite analysés par Western blot (4.2).

Tampon de broyage Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, MgCl₂ 15 mM, EDTA 1 mM, glycérol 8,7 % (v/v), βmercaptoéthanol 0,1 % (v/v) et inhibiteurs de protéases.

Tampon D1X Tris-HCl (pH 7,5) 25 mM, MgCl₂ 7.5 mM, EDTA 0,5 mM, glycérol 20 % (v/v), DTT 2 mM et inhibiteurs de protéases.

4.5 Détermination de la structure secondaire du peptide par dichroïsme circulaire (CD)

Le peptide hAB, RSPIASLSLYLRQHWRRLLTATAVPILSFLTLLQRFLPLR (39 résidus) a été synthétisé par ProteoGenix. Il est solubilisé dans le tampon phosphate (Na₃PO₄ 10 mM, pH 7,5, glycérol 10 %, NaCl 150 mM) ou en tri-fluoroéthanol (TFE) 100%.

Le principe du dichroïsme circulaire repose sur la capacité d'une molécule possédant un chromophore (par exemple, la fonction amide de la liaison peptidique) à proximité d'un atome chiral (comme le carbone alpha d'un acide aminé), d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement à gauche et celle polarisée circulairement à droite. La différence d'absorption de la lumière polarisée circulairement à gauche de celle polarisée circulairement à droite donne une ellipse. L'angle θ de cette ellipse, exprimé en millidegrés (mdeg), est appelé ellipticité. En tenant compte de la concentration du peptide, du nombre de liaison peptidiques et de la longueur du trajet optique est définie l'ellipticité molaire moyenne par résidu (ou Mean Residue molar Ellipticity (MRE)) qui s'exprime en deg.cm².dmol⁻¹.

Pour les protéines ou peptides, les mesures de CD sont réalisées dans l'UV lointain (180-260 nm) correspondant à la zone d'absorption de la fonction amide de la liaison peptidique. Ces mesures donnent des informations sur les structures secondaires des molécules en solution qui ont un spectre caractéristique (Figure M. 4) :

- des hélices α : le spectre présente deux minima négatifs à 208 et 222 nm et un pic très intense à 190 nm,
- des feuillets β : le spectre présente un minimum à 200 nm et un pic positif à 195 nm,
- ou des structures aléatoires (random coil) : spectre avec un minimum à 200 nm et une bande à 220 nm qui peut être légèrement négative ou positive.

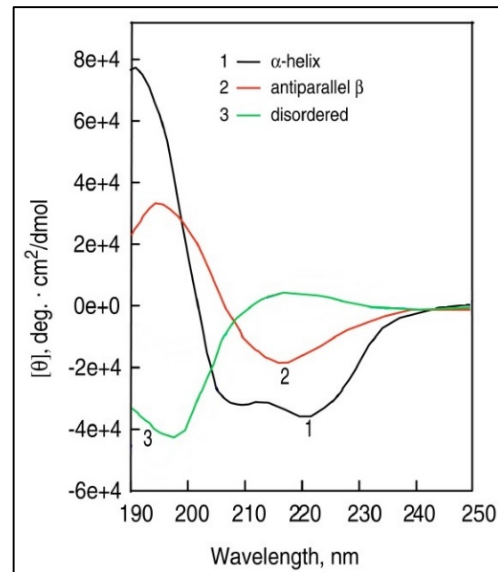


Figure M. 4 - Spectres de dichroïsme circulaire avec la poly-L-lysine.

La poly-L-lysine à pH 11,1 se conforme en hélices α (1, noir) et en feuillets β antiparallèles (2, rouge), tandis qu'à pH 5,7 elle adopte une conformation étendue (3, vert). Figure adaptée de Greenfield (2006).

Pour l'analyse du peptide AB, nous avons utilisé un spectromètre Jasco J-815 avec des cuves en quartz dont le trajet optique est de 0,05 cm. Les mesures ont été réalisées à 25°C. Chaque spectre correspond à la moyenne de 5 acquisitions enregistrées de 200 à 260 nm avec un pas de 0,2 nm. Tous les spectres ont été corrigés de l'absorbance non spécifique des tampons et solvants en soustrayant chaque spectre CD à celui obtenu en absence de peptide.

Annexes

1. Plasmides créés par PCR (mutagenèse dirigée)

1. Liste des plasmides

Hélice(s) touchée(s)	Nom des vecteurs obtenus	Vecteurs (matrice)	Mutations introduites	Noms des amorces sens	Noms des amorces anti-sens
A	pLMD2-7-6	pSDI12	AL383PL390P	h3-L383PL390P-top	h3-L383PL390P-bottom
	pLMG6	pLMD2-7-6	A L383PL390P- L401PL404P B	h4 L401P L404P top	h4 L401P L404P bottom
	pLMAD1	pΩ-EGFP-140K	A L383A	h3-L383A-Hind3-top	h3-L383A-Hind3-bot
	pLMAE25	pLMAD1	A IL/AA	h3-IL-AA-Sac2-top	h3-IL-AA-Sac2-bot
	pLMAG7	pLMAE25	A L392A	h3-L392A-Pst1-top	h3-L392A-Pst1-bot
	pLMZ7	pΩ-EGFP-140K	A R389A	A R389A-Sac1-top	A R389A-Sac1-bot
	pSDH91	pΩ-EGFP-140K	A W387A	h3-W387A-top	h3-W387A-bottom
	pLMAH10	pΩ-EGFP-140K	A T393L	h3-T393L-Nhe1-top	h3-T393L-Nhe1bot
	pLMAI27	pΩ-EGFP-140K	A H386L	h3-H386L-Pvu2-top	h3-H386L-Pvu2-bot
	pLMAK8	pLMAH10	A HT-LL	h3-H386L-Pvu2-top	h3-H386L-Pvu2-bot
	pLMAA1	pLMZ7	A RRR/AAA	A RRR/AAA-Hinc2-top	A RRR/AAA-Hinc2-bot
A et B	pLMAB6	pLMAA1	A-B RRRR/AAAA	A-L392A-Pst1-pΩ-EGFP-140K-top	A-L392A-Pst1-pΩ-EGFP-140K-bot
	pLMV1	pLMB1-2	: A L383A-B ILLL/AAAA	A-L383A-top	A-L383A-bottom
	pLMW1	pLMV1	A IL/AA-B ILLL/AAAA	A-IL/AA-Sac2-top	A-IL/AA-Sac2-bottom
	pLMY1	pLMW1	A ILLL/AAAA-B ILLL/AAAA	A-L392A-Pst1-top	A-L392A-Pst1-bot
B	pLMA5-1	pΩ-EGFP-140K	B FLF/AAA	140-h4-FLF/AAA-top	140-h4-FLF/AAA-bottom
	pLMB1-2	pΩ-EGFP-140K	B ILLL/AAAA	h4 ILLL/AAAA top	h4 ILLL/AAAA bottom
	pLMC2-9-5	pΩ-EGFP-140K	BL401PL404P	h4 L401P L404P top	h4 L401P L404P bottom
	pLMAC2	pΩ-EGFP-140K	B R406A	A-L392A-Pst1-pΩ-EGFP-140K-top	A-L392A-Pst1-pΩ-EGFP-140K-bot
	pLMB4	pΩ-EGFP-140K	B S399A, T402A, Q405A	h4-STQ/AAA-fwd	h4-STQ/AAA-rev

2. Listes des amorces

1. Dans l'hélice A

Noms des amorces	Séquences (5'-3')
h3-L383P-top	CCCTAAGCCTTTACCCGCGGCAACATTGGCGCCGTC
h3-L383P-bottom	GGCGCCAATGTTGCCGCGGGTAAAGGCTTAGGGAGG
h3-W387A-top	CCTTTACCTGAGGCAGCATGCGCGCCGTCTTACCGCCAC
h3-W387A-bottom	GCGGTAAGACGGCGCGCATGCTGCCTCAGGTAAAGGCTTAG
h3-L383PL390P-top	GGCAACATTGGCGTCGACCTACCGCCACCGCCGTTCC
h3-L383PL390P-bottom	GGCGGTGGCGGTAGGTCGACGCCAATGTTGCCGCGGG
h3-L383A-Hind3-top	ATCGCCTCCCTAAGCTTGTACGCGAGGCAACATTGGCGCCGTCT
h3-L383A-Hind3-bot	GCGCCAATGTTGCCTCGCGTACAAGCTTAGGGAGGCGATTGG
h3-IL-AA-Sac2-top	GTTCTTCAGAGCCCCGCGGCATCCGCAAGCTTGTACGCGAGGCAA
h3-IL-AA-Sac2-bot	CGCGTACAAGCTTGCGGATGCCGCGGGGCTCTGAAGAACGTGGT
h3-L392A-Pst1-top	CATTGGCGCCGTGCTACCGCCACTGCAGTTCCTGCCCTAAGCTTCGCAACCC
h3-L392A-Pst1-bot	GCTTAGGGCAGGAAGTGCAGTGGCGGTAGCACGGCGCCAATGTTGCCT
h3 R389A-Sac1-top	GAGGCAACATTGGCGAGCTCTTACCGCCACCGC
h3 R389A-Sac1-bot	GGTGGCGGTAAGAGCTCGCCAATGTTGCCTCAGGTAAAGGCTTAGGG
h3 RRR/AAA-Hinc2-top	AAGCCTTTACCTGGCGCAACATTGGGCAGCGTTAACCGCCACCGCCGTTCTATC
h3 RRR/AAA-Hinc2-bot	ACGGCGGTGGCGGTTAACGCTGCCCAATGTTGCGCCAGGTAAAGGCTTAGGG
h3-L392A-Pst1-pAJB2-top	CATTGGCGCCGTGCTACCGCCACTGCAGTTCCTATCCTCTC
h3-L392A-Pst1-pAJB2-bot	AGAGGATAGGAAGTGCAGTGGCGGTAGCACGGCGCCAATGTTGCCT
h3-T393L-Nhe1-top	GCGCCGTCTTACCGCGCTAGCCGTTCTATCCTC
h3-T393L-Nhe1-bot	GATAGGAACGGCTAGCGCGGTAAGACGGCGCCAATGT
h3-H386L-Pvu2-top	CCTTTACCTGAGGCAGCTGTGGCGCCGTCTTAC
h3-H386L-Pvu2-bot	AAGACGGCGCCACAGCTGCCTCAGGTAAAGGCTTAGGG

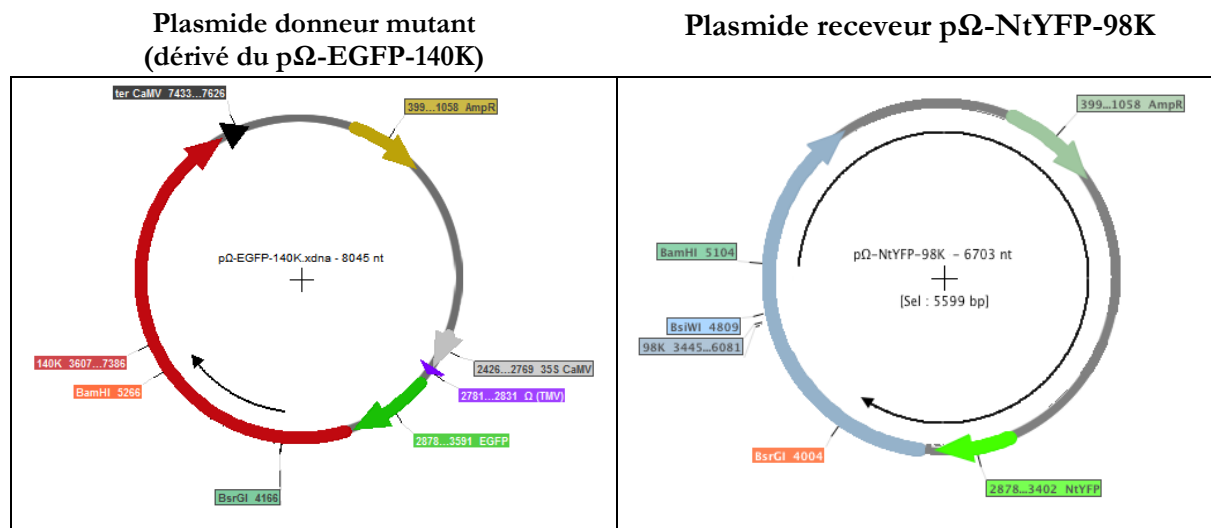
2. Dans l'hélice B

Noms des amorces	Séquences (5'-3')
h4-L401P-top	ACCGCCGTTCTATCTTAAGCTTCCCAACCCTCCTGCAGCGCTTC
h4-L401P-bottom	CGCTGCAGGAGGGTTGGGAAGCTTAAGATAGGAACGGCGGTGGC
140K-L401PL404P-top	CTATCCTCTCCTTCCCAACCCTCCCGCAGCGCTTCCTTCCATT
140K-L401PL404P-bottom	GAAGGAAGCGCTGCGGGAGGGTTGGGAAGGAGAGGATAGGAAC
140-h4-FLF/AAA-top	TCCTATCCTCTCCGCCCTAACCGCCCTGCAACGCGCCCTTCCATTGCCTATACCTC
140-h4-FLF/AAA-bottom	AGGCAATGGAAGGGCGCGTTGCAGGGCGGTTAGGGCGGAGAGGATAGGAACGGCGG
140-h4-ILLL/AAAA-top	CACCGCCGTTCTGCCCTAAGCTTCGCAACCCTCGCGCAGCGCTTCGCTCCATTGCCTATACCTCTAGC
140-h4-ILLL/AAAA-bottom	TATAGGCAATGGAGCGAAGCGCTGCGCGAGGGTTGCGAAGCTTAGGGCAGGAACGGCGGTGGCGG
h4 R406A-Hind3-top	CTAACCCCTCCTGCAAGCTTTCCTTCCATTGCCTATACCTCTA
h4 R406A-Hind3-bot	AGGCAATGGAAGGAAAGCTTGCAGGAGGGTTAGGA
h4-STQ/AAA-fwd	CTATCCTCGCCTTCTAGCCCTCCTGGCGCGCTTCCTTCCA
h4-STQ/AAA-rev	AGGAAGCGCGCCAGGAGGGCTAGGAAGGCGAGGATAGGAACGGC

2. Plasmides créés par digestions enzymatiques

1. Clonages pour les tests BiFC

1. Clonage dans le pΩ-Nt-YFP-98K



La séquence mutée est encadrée par les sites de restriction : BsrGI (site unique.) et BamHI (site unique).

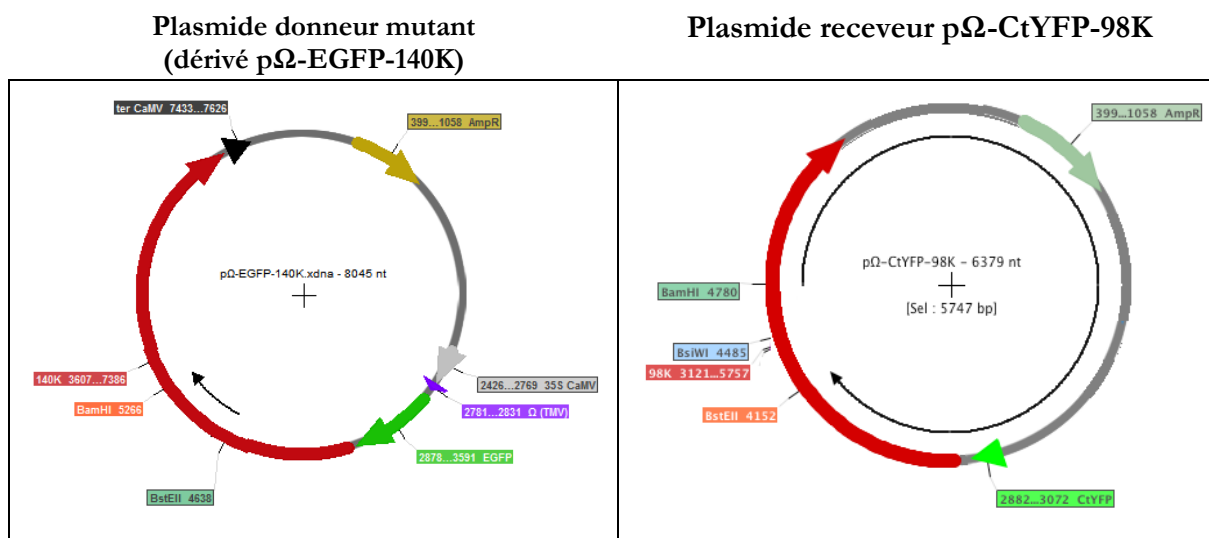
Le plasmide receveur pΩ-NtYFP-98K possède ces mêmes sites. Afin d'éliminer les fragments qui ne nous intéressent pas, les plasmides seront en plus digérés :

- pour les plasmides donneurs : par BglI qui clive 2 fois en 864 et 7787.
- pour les plasmides receveurs : par BsiWI qui clive une fois (en 4809).

De cette manière ont été créés cinq plasmides pΩ-Nt-YFP-98K + « mutation » :

Nom	Mutation (plasmide d'origine)
pLMAU7	AB-LPLP (pLMG6)
pLMAW5	AB ILLL/AAAA (pLMY1)
pLMBI2	A-T393L (pLMAH10)
pLMBK6	P396A (pLMAX1)
pLMBL3	B-ILLL/AAAA (pLMB1-2)
pLMBM5	A-W387A (pSDH91)
pLMBX15	B-STQ/AAA (pLMBA4)

2. Clonage dans le pΩ-Ct-YFP-98K



La séquence mutée est encadrée par les sites de restriction : BamHI (site unique) et BstEII (site unique)

Le plasmide receveur pΩ-CtYFP-98K possède ces mêmes sites. Afin d'éliminer les fragments qui ne nous intéressent pas, les plasmides seront en plus digérés :

- pour les plasmides donneurs : par BglI qui clive 2 fois en 864 et 7786.
- pour les plasmides receveurs : par BsiWI qui clive une fois (en 4485).

De cette manière ont été créés cinq plasmides pΩ-Ct-YFP-98K + « mutation » :

Nom	Mutation (plasmide d'origine)
pLMBS6	AB-LPLP (pLMG6)
pLMBT3	AB ILLL/AAAA (pLMY1)
pLMBO2	A-T393L (pLMAH10)
pLMBP4	P396A (pLMAX1)
pLMBQ5	B-ILLL/AAAA (pLMB1-2)
pLMBR2	A-W387A (pSDH91)
pLMBY17	B-STQ/AAA (pLMBA4)

2. Clonage dans E17-stop69K par digestion enzymatique

Le fragment d'intérêt est issu des vecteurs pΩ-EGFP-140K(mutant) entre les sites BsrGI[4166] / BamHI[5266]. Le plasmide receveur est digéré par ces mêmes enzymes (BamHI[2006]/ BsrGI[906]).

Plusieurs plasmides ont été ainsi créés :

Nom	Mutation (plasmide d'origine)
pLMAS31	AB ILLL/AAAA (pLMY1)
pLMAY1	AB-LPLP (pLMG6)
pLMBU9	B-STQ/AAA (pLMBA4)

3. Clonages pour les marqueurs des compartiments

Les marqueurs des compartiments ont été prélevés des plasmides « CD3-n° », acquis via le TAIR, et créés par Nelson et al. (2007). Les séquences correspondantes ont été introduites dans des vecteurs plus petits, permettant une expression en protoplastes d'*A. thaliana* :

Nom du vecteur obtenu	Nom du vecteur donneur	Nom du vecteur receveur	Digestions par :	
pLMQ2	CD3-959 (=ER-mCherry)	pΩSac-Nco-	SpeI	HindIII
pLMR1	CD3-967 (=Golgi-mCherry)	pΩ-adapt-GFP	EgII	HindIII
pLMT2	CD3-983 (=mCherry-px)	pUC118	HindII	SacI

3. Plasmides créés par clonage Gibson

Ces clonages ont été réalisés pour insérer des fragments de vecteurs issus de pΩ-EGFP-140K et contenant les mutations ponctuelles dans le vecteur E17-stop69K.

Nom	Mutation (plasmide d'origine)
pLMBC9	E17-stop69K + mutation T393L (provenant de pLMAH10)
pLMBE11	E17-stop69K + mutation P396A (provenant de pLMAX1)
pLMBG5	E17-stop69K + mutation B-ILLL/AAAA (provenant de pLMB1-2)

Les amorces utilisées pour amplifier les fragments sont :

Vecteur (matrice)	Fragment n°	Amorce	Séquence (5'→3')
E17-stop69K	1	AmpR-fwd2	GGCAACAATTAATAGACTGG
		150-8	TCGTGGTCCGGTTTGGAGGAGTG
	2	Hel-6	CAACTACACCAAGTGGCTCTC
		AmpR-rev2	CGCCTCCATCCAGTCTATTA
pΩ-EGFP-140K(mutant)	3	150-20	TCACCTATACCAGAGCAGTCCGC
		Hel-5	CATGGCGGAAGAGCCGTTGGTTC

Bibliographie

- Abas, L., and Luschnig, C. (2010). Maximum yields of microsomal-type membranes from small amounts of plant material without requiring ultracentrifugation. *Anal. Biochem.* *401*, 217–227.
- Ahola, T., and Karlin, D.G. (2015). Sequence analysis reveals a conserved extension in the capping enzyme of the alphavirus supergroup, and a homologous domain in nodaviruses. *Biol. Direct* *10*, 16.
- Ahola, T., Lampio, A., Auvinen, P., and Kääriäinen, L. (1999). Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J.* *18*, 3164–3172.
- Ahola, T., Kujala, P., Tuittila, M., Blom, T., Laakkonen, P., Hinkkanen, A., and Auvinen, P. (2000). Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection. *J. Virol.* *74*, 6725–6733.
- Alberts B, Johnson A, and Lewis J, (2002). *Molecular Biology of the Cell.* (Garland Science).
- Aldridge, C., Cain, P., and Robinson, C. (2009). Protein transport in organelles: Protein transport into and across the thylakoid membrane. *FEBS J.* *276*, 1177–1186.
- Amari, K., Di Donato, M., Dolja, V.V., and Heinlein, M. (2014). Myosins VIII and XI Play Distinct Roles in Reproduction and Transport of Tobacco Mosaic Virus. *PLoS Pathog* *10*, e1004448.
- Astier, S., Albouy, J., Lecoq, H., and Maury, Y. (2001). *Principes de virologie végétale: génome, pouvoir pathogène, écologie des virus* (Editions Quae).
- Bamunusinghe, D., Hemenway, C.L., Nelson, R.S., Sanderfoot, A.A., Ye, C.M., Silva, M.A.T., Payton, M., and Verchot-Lubicz, J. (2009). Analysis of potato virus X replicase and TGBp3 subcellular locations. *Virology* *393*, 272–285.
- Barajas, D., Jiang, Y., and Nagy, P.D. (2009). A Unique Role for the Host ESCRT Proteins in Replication of Tomato bushy stunt virus. *PLoS Pathog.* *5*.
- Barends, S., Bink, H.H.J., van den Worm, S.H.E., Pleij, C.W.A., and Kraal, B. (2003). Entrapping Ribosomes for Viral Translation: tRNA Mimicry as a Molecular Trojan Horse. *Cell* *112*, 123–129.
- Belov, G.A., and van Kuppeveld, F.J. (2012). (+)RNA viruses rewire cellular pathways to build replication organelles. *Curr. Opin. Virol.* *2*, 740–747.
- Belov, G.A., Altan-Bonnet, N., Kovtunovych, G., Jackson, C.L., Lippincott-Schwartz, J., and Ehrenfeld, E. (2007). Hijacking Components of the Cellular Secretory Pathway for Replication of Poliovirus RNA. *J. Virol.* *81*, 558–567.
- Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S.S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C. (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network†. *Plant J.* *15*, 441–447.

- Bologna, G., Yvon, C., Duvaud, S., and Veuthey, A.-L. (2004). N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *PROTEOMICS* 4, 1626–1632.
- den Boon, J.A., Diaz, A., and Ahlquist, P. (2010). Cytoplasmic Viral Replication Complexes. *Cell Host Microbe* 8, 77–85.
- Boyer, J.-C., Drugeon, G., Séron, K., Morch-Devignes, M.-D., Agnès, F., and Haenni, A.-L. (1993). In vitro transcripts of turnip yellow mosaic virus encompassing a long 3' extension or produced from a full-length cDNA clone harbouring a 2 kb-long PCR-amplified segment are infectious. *Res. Virol.* 144, 339–348.
- Bozarth, C.S., Weiland, J.J., and Dreher, T.W. (1992). Expression of ORF-69 of turnip yellow mosaic virus is necessary for viral spread in plants. *Virology* 187, 124–130.
- Bransom, K.L., and Dreher, T.W. (1994). Identification of the Essential Cysteine and Histidine Residues of the Turnip Yellow Mosaic Virus Protease. *Virology* 198, 148–154.
- Bransom, K.L., Weiland, J.J., and Dreher, T.W. (1991). Proteolytic maturation of the 206-kDa nonstructural protein encoded by turnip yellow mosaic virus RNA. *Virology* 184, 351–358.
- Bransom, K.L., Weiland, J.J., Tsai, C.-H., and Dreher, T.W. (1995). Coding density of the turnip yellow mosaic virus genome: Roles of the overlapping coat protein and p206-readthrough coding regions. *Virology* 206, 403–412.
- Bransom, K.L., Wallace, S.E., and Dreher, T.W. (1996). Identification of the Cleavage Site Recognized by the Turnip Yellow Mosaic Virus Protease. *Virology* 217, 404–406.
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wölk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). An Amino-terminal Amphipathic α -Helix Mediates Membrane Association of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J. Biol. Chem.* 277, 8130–8139.
- Burgyan, J., Rubino, L., and Russo, M. (1996). The 5'-terminal region of a tombusvirus genome determines the origin of multivesicular bodies. *J. Gen. Virol.* 77, 1967–1974.
- Camborde, L., Tournier, V., Noizet, M., and Jupin, I. (2007). A Turnip yellow mosaic virus infection system in Arabidopsis suspension cell culture. *FEBS Lett.* 581, 337–341.
- Camborde, L., Planchais, S., Tournier, V., Jakubiec, A., Drugeon, G., Lacassagne, E., Pflieger, S., Chenon, M., and Jupin, I. (2010). The Ubiquitin-Proteasome System Regulates the Accumulation of Turnip yellow mosaic virus RNA-Dependent RNA Polymerase during Viral Infection. *Plant Cell* 22, 3142–3152.
- Canady, M.A., Larson, S.B., Day, J., and McPherson, A. (1996). Crystal structure of turnip yellow mosaic virus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3, 771–781.

- Carette, J.E., Stuiver, M., Van Lent, J., Wellink, J., and Van Kammen, A. (2000). Cowpea Mosaic Virus Infection Induces a Massive Proliferation of Endoplasmic Reticulum but Not Golgi Membranes and Is Dependent on De Novo Membrane Synthesis. *J. Virol.* *74*, 6556–6563.
- Chen, J., and Ahlquist, P. (2000). Brome Mosaic Virus Polymerase-Like Protein 2a Is Directed to the Endoplasmic Reticulum by Helicase-Like Viral Protein 1a. *J. Virol.* *74*, 4310–4318.
- Chenon, M., Camborde, L., Cheminant, S., and Jupin, I. (2012). A viral deubiquitylating enzyme targets viral RNA-dependent RNA polymerase and affects viral infectivity. *EMBO J.* *31*, 741–753.
- Chigri, F., Hörmann, F., Stamp, A., Stammers, D.K., Bölter, B., Soll, J., and Vothknecht, U.C. (2006). Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 16051–16056.
- Cho, T.-J., and Dreher, T.W. (2006). Encapsidation of genomic but not subgenomic Turnip yellow mosaic virus RNA by coat protein provided in trans. *Virology* *356*, 126–135.
- Choi, Y.G., and Rao, A.L.N. (2000). Molecular Studies on Bromovirus Capsid Protein: VII. Selective Packaging of BMV RNA4 by Specific N-Terminal Arginine Residues. *Virology* *275*, 207–217.
- Cottam, E.M., Maier, H.J., Manifava, M., Vaux, L.C., Chandra-Schoenfelder, P., Gerner, W., Britton, P., Ktistakis, N.T., and Wileman, T. (2011). Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy* *7*, 1335–1347.
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., Wang, A., and Laliberté, J.-F. (2009). Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *J. Virol.* *83*, 10460–10471.
- Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R.V., Sun, G., and Wang, A. (2010). The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* *397*, 56–63.
- D. Baltimore (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* *35*, 235–241.
- Deiman, B.A.L.M., Séron, K., Jaspars, E.M.J., and Pleij, C.W.A. (1997). Efficient transcription obtained by a new procedure of the tRNA-like structure of turnip yellow mosaic virus by a template-dependent and specific viral RNA polymerase. *J. Virol. Methods* *64*, 181–195.
- Deiman, B.A.L.M., Koenen, A.K., Verlaan, P.W.G., and Pleij, C.W.A. (1998). Minimal Template Requirements for Initiation of Minus-Strand Synthesis In Vitro by the RNA-Dependent RNA Polymerase of Turnip Yellow Mosaic Virus. *J. Virol.* *72*, 3965–3972.

- Deléage, G., and Roux, B. (1987). An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.* *1*, 289–294.
- Diaz, A., and Ahlquist, P. (2012). Role of host reticulon proteins in rearranging membranes for positive-strand RNA virus replication. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 519–524.
- Diaz, A., Wang, X., and Ahlquist, P. (2010). Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 16291–16296.
- Dreher, T.W. (2004). Turnip yellow mosaic virus: transfer RNA mimicry, chloroplasts and a C-rich genome. *Mol. Plant Pathol.* *5*, 367–375.
- Dreher, T.W. (2009). Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Res.* *139*, 217–229.
- Drin, G., Casella, J.-F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T.U., and Antony, B. (2007). A general amphipathic α -helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 138–146.
- Dugeon, 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. *J. Gen. Virol.* *83*, 3187–3197.
- Dubuisson, J., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol.* *12*, 517–523.
- Dufresne, P.J., Thivierge, K., Cotton, S., Beauchemin, C., Ide, C., Ubalijoro, E., Laliberté, J.-F., and Fortin, M.G. (2008). Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology* *374*, 217–227.
- Dujardin, M., Madan, V., Montserret, R., Ahuja, P., Huvent, I., Launay, H., Leroy, A., Bartschlager, R., Penin, F., Lippens, G., et al. (2015). A Proline-Tryptophan Turn in the Intrinsically Disordered Domain 2 of NS5A Protein Is Essential for Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Biol. Chem.* *290*, 19104–19120.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J. Virol.* *76*, 5974–5984.
- Eisenhaber, F., Eisenhaber, B., Kubina, W., Maurer-Stroh, S., Neuberger, G., Schneider, G., and Wildpaner, M. (2003). Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: big-II, NMT and PTS1. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3631–3634.

- Elazar, M., Cheong, K.H., Liu, P., Greenberg, H.B., Rice, C.M., and Glenn, J.S. (2003). Amphipathic Helix-Dependent Localization of NS5A Mediates Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* *77*, 6055–6061.
- Elazar, M., Liu, P., Rice, C.M., and Glenn, J.S. (2004). An N-Terminal Amphipathic Helix in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates Membrane Association, Correct Localization of Replication Complex Proteins, and HCV RNA Replication. *J. Virol.* *78*, 11393–11400.
- Frishman, D., and Argos, P. (1996). Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* *9*, 133–142.
- Gargouri, R., Joshi, R.L., Bol, J.F., Astier-Manifacier, S., and Haenni, A.-L. (1989). Mechanism of synthesis of turnip yellow mosaic virus coat protein subgenomic RNA in vivo. *Virology* *171*, 386–393.
- Garnier, J., Gibrat, J.-F., and Robson, B. (1996). [32] GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. B.-M. in *Enzymology*, ed. (Academic Press), pp. 540–553.
- Garnier, M., Mamoun, R., and Bove, J.M. (1980). TYMV RNA replication in Vivo: Replicative intermediate is mainly single stranded. *Virology* *104*, 357–374.
- Garnier, M., Candresse, T., and Bove, J.M. (1986). Immunocytochemical localization of TYMV-coded structural and nonstructural proteins by the protein A-gold technique. *Virology* *151*, 100–109.
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., and Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics* *24*, 2101–2102.
- Geourjon, C., and Deléage, G. (1994). SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng.* *7*, 157–164.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* *6*, 343–345.
- Giegé, R., Florentz, C., and Dreher, T. (1993). The TYMV tRNA-like structure. *Biochimie* *75*, 569–582.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., and Blinov, V.M. (1989). Two related super-families of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* *17*, 4713–4730.
- Gouttenoire, J., Castet, V., Montserret, R., Arora, N., Raussens, V., Ruyschaert, J.-M., Diesis, E., Blum, H.E., Penin, F., and Moradpour, D. (2009a). Identification of a Novel Determinant for

- Membrane Association in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *J. Virol.* *83*, 6257–6268.
- Gouttenoire, J., Montserret, R., Kennel, A., Penin, F., and Moradpour, D. (2009b). An Amphipathic α -Helix at the C Terminus of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Mediates Membrane Association. *J. Virol.* *83*, 11378–11384.
- Gouttenoire, J., Roingeard, P., Penin, F., and Moradpour, D. (2010). Amphipathic α -Helix AH2 Is a Major Determinant for the Oligomerization of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. *J. Virol.* *84*, 12529–12537.
- Gouttenoire, J., Montserret, R., Paul, D., Castillo, R., Meister, S., Bartenschlager, R., Penin, F., and Moradpour, D. (2014). Aminoterminal amphipathic α -helix AH1 of hepatitis C virus non-structural protein 4B possesses a dual role in RNA replication and virus production. *PLoS Pathog.* *10*, e1004501.
- Grangeon, R., Agbeci, M., Chen, J., Grondin, G., Zheng, H., and Laliberté, J.-F. (2012). Impact on the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus of Turnip Mosaic Virus Infection. *J. Virol.* *86*, 9255–9265.
- Greenfield, N.J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* *1*, 2876–2890.
- Guermeur, Y., and Gallinari, P. (1997). Combinaison de Classifieurs Statistiques, Application à la Prédiction de la Structure Secondaire des Protéines = Statistical Classifier Combination, Application to Protein Secondary Structure Prediction.
- Hagiwara, Y., Komoda, K., Yamanaka, T., Tamai, A., Meshi, T., Funada, R., Tsuchiya, T., Naito, S., and Ishikawa, M. (2003). Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J.* *22*, 344–353.
- Han, S., and Sanfaçon, H. (2003). Tomato Ringspot Virus Proteins Containing the Nucleoside Triphosphate Binding Domain Are Transmembrane Proteins That Associate with the Endoplasmic Reticulum and Cofractionate with Replication Complexes. *J. Virol.* *77*, 523–534.
- Hayes, R.J., and Buck, K.W. (1990). Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* *63*, 363–368.
- Heaton, N.S., and Randall, G. (2011). Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends Microbiol.* *19*, 368–375.
- Heijden, M.W.V.D., Carette, J.E., Reinhoud, P.J., Haegi, A., and Bol, J.F. (2001). Alfalfa Mosaic Virus Replicase Proteins P1 and P2 Interact and Colocalize at the Vacuolar Membrane. *J. Virol.* *75*, 1879–1887.

- van der Heijden, M.W., and Bol, J.F. (2002). Composition of alphavirus-like replication complexes: involvement of virus and host encoded proteins. *Arch. Virol.* *147*, 875–898.
- Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S., Pickard, B.G., Casper, S.J., Epel, B.L., and Beachy, R.N. (1998). Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* *10*, 1107–1120.
- Henn, A., and Sadot, E. (2014). The unique enzymatic and mechanistic properties of plant myosins. *Curr. Opin. Plant Biol.* *22*, 65–70.
- Héricourt, F., Blanc, S., Redeker, V., and Jupin, I. (2000). Evidence for phosphorylation and ubiquitinylation of the turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase domain expressed in a baculovirus–insect cell system.
- Hsu, N.-Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.-H., Takvorian, P.M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., et al. (2010). Viral Reorganization of the Secretory Pathway Generates Distinct Organelles for RNA Replication. *Cell* *141*, 799–811.
- Hu, J. (2007). Plant Peroxisome Multiplication: Highly Regulated and Still Enigmatic. *J. Integr. Plant Biol.* *49*, 1112–1118.
- 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. *Mol. Cell* *9*, 789–798.
- Hu, J., Baker, A., Bartel, B., Linka, N., Mullen, R.T., Reumann, S., and Zolman, B.K. (2012). Plant Peroxisomes: Biogenesis and Function. *Plant Cell Online* *24*, 2279–2303.
- Hu, R.-H., Lin, M.-C., Hsu, Y.-H., and Meng, M. (2011). Mutational effects of the consensus aromatic residues in the mRNA capping domain of Bamboo mosaic virus on GTP methylation and virus accumulation. *Virology* *411*, 15–24.
- Huang, Y.-L., Han, Y.-T., Chang, Y.-T., Hsu, Y.-H., and Meng, M. (2004). Critical Residues for GTP Methylation and Formation of the Covalent m⁷GMP-Enzyme Intermediate in the Capping Enzyme Domain of Bamboo Mosaic Virus. *J. Virol.* *78*, 1271–1280.
- Hügler, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Kräusslich, H.-G., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2001). The Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Is an Integral Endoplasmic Reticulum Membrane Protein. *Virology* *284*, 70–81.
- Hwang, I., and Robinson, D.G. (2009). Transport vesicle formation in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* *12*, 660–669.

- Hyodo, K., Mine, A., Taniguchi, T., Kaido, M., Mise, K., Taniguchi, H., and Okuno, T. (2013). ADP Ribosylation Factor 1 Plays an Essential Role in the Replication of a Plant RNA Virus. *J. Virol.* *87*, 163–176.
- Hyodo, K., Kaido, M., and Okuno, T. (2014). Host and viral RNA-binding proteins involved in membrane targeting, replication and intercellular movement of plant RNA virus genomes. *Front. Plant Sci.* *5*.
- Ibrahim, A., Hutchens, H.M., Howard Berg, R., and Sue Loesch-Fries, L. (2012). Alfalfa mosaic virus replicase proteins, P1 and P2, localize to the tonoplast in the presence of virus RNA. *Virology* *433*, 449–461.
- Ishikawa, M., Naito, S., and Ohno, T. (1993). Effects of the tom1 mutation of *Arabidopsis thaliana* on the multiplication of tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. *J. Virol.* *67*, 5328–5338.
- Jakubiec, A., Notaise, J., Tournier, V., Héricourt, F., Block, M.A., Drugeon, G., Aelst, L. van, and Jupin, I. (2004a). Assembly of Turnip Yellow Mosaic Virus Replication Complexes: Interaction between the Proteinase and Polymerase Domains of the Replication Proteins. *J. Virol.* *78*, 7945–7957.
- Jakubiec, A., Notaise, J., Tournier, V., Héricourt, F., Block, M.A., Drugeon, G., Aelst, L. van, and Jupin, I. (2004b). Assembly of Turnip Yellow Mosaic Virus Replication Complexes: Interaction between the Proteinase and Polymerase Domains of the Replication Proteins. *J. Virol.* *78*, 7945–7957.
- Jakubiec, A., Tournier, V., Drugeon, G., Pflieger, S., Camborde, L., Vinh, J., Héricourt, F., Redeker, V., and Jupin, I. (2006). Phosphorylation of Viral RNA-dependent RNA Polymerase and Its Role in Replication of a Plus-strand RNA Virus. *J. Biol. Chem.* *281*, 21236–21249.
- Jakubiec, A., Drugeon, G., Camborde, L., and Jupin, I. (2007). Proteolytic Processing of Turnip Yellow Mosaic Virus Replication Proteins and Functional Impact on Infectivity. *J. Virol.* *81*, 11402–11412.
- Jiang, J., Patarroyo, C., Cabanillas, D.G., Zheng, H., and Laliberté, J.-F. (2015). The Vesicle-Forming 6K2 Protein of Turnip Mosaic Virus Interacts with the COPII Coatomer Sec24a for Viral Systemic Infection. *J. Virol.* *89*, 6695–6710.
- Jonczyk, M., Pathak, K.B., Sharma, M., and Nagy, P.D. (2007). Exploiting alternative subcellular location for replication: Tombusvirus replication switches to the endoplasmic reticulum in the absence of peroxisomes. *Virology* *362*, 320–330.
- Jouhet, J., Maréchal, E., and Block, M.A. (2007). Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog. Lipid Res.* *46*, 37–55.

- Kadare, G., Rozanov, M., and Haenni, A.-L. (1995). Expression of the turnip yellow mosaic virus proteinase in *Escherichia coli* and determination of the cleavage site within the 206 kDa protein. *J. Gen. Virol.* *76*, 2853–2857.
- Kadaré, G., David, C., and Haenni, A.L. (1996). ATPase, GTPase, and RNA binding activities associated with the 206-kilodalton protein of turnip yellow mosaic virus. *J. Virol.* *70*, 8169–8174.
- Kamer, G., and Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* *12*, 7269–7282.
- King, R.D., and Sternberg, M.J. (1996). Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *5*, 2298–2310.
- Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 187–198.
- Kirkegaard, K., Taylor, M.P., and Jackson, W.T. (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 301–314.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H.E. van den, Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M., and Snijder, E.J. (2008). SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. *PLoS Biol* *6*, e226.
- Koonin, E.V., Dolja, V.V., and Morris, D.T.J. (1993). Evolution and Taxonomy of Positive-Strand RNA Viruses: Implications of Comparative Analysis of Amino Acid Sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *28*, 375–430.
- Kopek, B.G., Perkins, G., Miller, D.J., Ellisman, M.H., and Ahlquist, P. (2007). Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol.* *5*, e220.
- Kopek, B.G., Settles, E.W., Friesen, P.D., and Ahlquist, P. (2010). Nodavirus-Induced Membrane Rearrangement in Replication Complex Assembly Requires Replicase Protein A, RNA Templates, and Polymerase Activity. *J. Virol.* *84*, 12492–12503.
- Kujala, P., Ikäheimonen, A., Ehsani, N., Vihinen, H., Auvinen, P., and Kääriäinen, L. (2001). Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *J. Virol.* *75*, 3873–3884.
- Laemmlı, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- Lampio, A., Kilpeläinen, I., Pesonen, S., Karhi, K., Auvinen, P., Somerharju, P., and Kääriäinen, L. (2000). Membrane Binding Mechanism of an RNA Virus-capping Enzyme. *J. Biol. Chem.* *275*, 37853–37859.

- Lee, W.-M., Ishikawa, M., and Ahlquist, P. (2001). Mutation of Host $\Delta 9$ Fatty Acid Desaturase Inhibits Brome Mosaic Virus RNA Replication between Template Recognition and RNA Synthesis. *J. Virol.* *75*, 2097–2106.
- Léonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M.G., and Laliberté, 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. *J. Gen. Virol.* *85*, 1055–1063.
- Levin, J.M., Robson, B., and Garnier, J. (1986). An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett.* *205*, 303–308.
- Lilly, S.T., Drummond, R.S.M., Pearson, M.N., and MacDiarmid, R.M. (2010). Identification and Validation of Reference Genes for Normalization of Transcripts from Virus-Infected *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *24*, 294–304.
- Lins, L., and Brasseur, R. (2008). Tilted peptides: a structural motif involved in protein membrane insertion? *J. Pept. Sci.* *14*, 416–422.
- Lins, L., Decaffmeyer, M., Thomas, A., and Brasseur, R. (2008). Relationships between the orientation and the structural properties of peptides and their membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1778*, 1537–1544.
- Liu, L., Westler, W.M., den Boon, J.A., Wang, X., Diaz, A., Steinberg, H.A., and Ahlquist, P. (2009). An Amphipathic α -Helix Controls Multiple Roles of Brome Mosaic Virus Protein 1a in RNA Replication Complex Assembly and Function. *PLoS Pathog* *5*, e1000351.
- Luo, P., and Baldwin, R.L. (1997). Mechanism of Helix Induction by Trifluoroethanol: A Framework for Extrapolating the Helix-Forming Properties of Peptides from Trifluoroethanol/Water Mixtures Back to Water. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 8413–8421.
- Lwoff, A. (1957). The Concept of Virus. *J. Gen. Microbiol.* *17*, 239–253.
- Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Jones, M.K., and Westaway, E.G. (1998). Subcellular Localization and Some Biochemical Properties of the Flavivirus Kunjin Nonstructural Proteins NS2A and NS4A. *Virology* *245*, 203–215.
- Mackenzie, J.M., Jones, M.K., and Westaway, E.G. (1999). Markers for trans-Golgi Membranes and the Intermediate Compartment Localize to Induced Membranes with Distinct Replication Functions in Flavivirus-Infected Cells. *J. Virol.* *73*, 9555–9567.
- Mano, S., and Nishimura, M. (2005). Plant Peroxisomes. In *Vitamins & Hormones*, Gerald Litwack, ed. (Academic Press), pp. 111–154.
- Marsh, L.E., Huntley, C.C., Pogue, G.P., Connell, J.P., and Hall, T.C. (1991). Regulation of (+):(-)-strand asymmetry in replication of brome mosaic virus RNA. *Virology* *182*, 76–83.

- Martire, G., Viola, A., Iodice, L., Lotti, L.V., Gradini, R., and Bonatti, S. (2001). Hepatitis C Virus Structural Proteins Reside in the Endoplasmic Reticulum as Well as in the Intermediate Compartment/cis-Golgi Complex Region of Stably Transfected Cells. *Virology* 280, 176–182.
- Matthews, R.E.F. (1973). Induction of Disease by Viruses, with Special Reference to Turnip Yellow Mosaic Virus. *Annu. Rev. Phytopathol.* 11, 147–168.
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., and Eisenhaber, F. (2002). N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence1. *J. Mol. Biol.* 317, 541–557.
- McCartney, A.W., Greenwood, J.S., Fabian, M.R., White, K.A., and Mullen, R.T. (2005). Localization of the Tomato Bushy Stunt Virus Replication Protein p33 Reveals a Peroxisome-to-Endoplasmic Reticulum Sorting Pathway. *Plant Cell Online* 17, 3513–3531.
- van der Meer, Y., van Tol, H., Krijnse Locker, J., and Snijder, E.J. (1998). ORF1a-Encoded Replicase Subunits Are Involved in the Membrane Association of the Arterivirus Replication Complex. *J. Virol.* 72, 6689–6698.
- Miller, D.J., and Ahlquist, P. (2002). Flock House Virus RNA Polymerase Is a Transmembrane Protein with Amino-Terminal Sequences Sufficient for Mitochondrial Localization and Membrane Insertion. *J. Virol.* 76, 9856–9867.
- Miller, D.J., Schwartz, M.D., and Ahlquist, P. (2001). Flock House Virus RNA Replicates on Outer Mitochondrial Membranes in *Drosophila* Cells. *J. Virol.* 75, 11664–11676.
- Miller, D.J., Schwartz, M.D., Dye, B.T., and Ahlquist, P. (2003). Engineered Retargeting of Viral RNA Replication Complexes to an Alternative Intracellular Membrane. *J. Virol.* 77, 12193–12202.
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., and Bartenschlager, R. (2007). The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner. *J. Biol. Chem.* 282, 8873–8882.
- Morch, M.D., Boyer, J.C., and Haenni, A.L. (1988). Overlapping open reading frames revealed by complete nucleotide sequencing of turnip yellow mosaic virus genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* 16, 6157–6173.
- Morch, M.D., Drugeon, G., Szafranski, P., and Haenni, A.L. (1989). Proteolytic origin of the 150-kilodalton protein encoded by turnip yellow mosaic virus genomic RNA. *J. Virol.* 63, 5153–5158.
- Mottola, G., Cardinali, G., Ceccacci, A., Trozzi, C., Bartholomew, L., Torrìsi, M.R., Pedrazzini, E., Bonatti, S., and Migliaccio, G. (2002). Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins Are Localized in a Modified Endoplasmic Reticulum of Cells Expressing Viral Subgenomic Replicons. *Virology* 293, 31–43.

- Nagy, P.D., Barajas, D., and Pogany, J. (2012). Host factors with regulatory roles in tombusvirus replication. *Curr. Opin. Virol.* 2, 691–698.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 34–41.
- Navarro, B., Russo, M., Pantaleo, V., and Rubino, L. (2006). Cytological analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells supporting cymbidium ringspot virus defective interfering RNA replication. *J. Gen. Virol.* 87, 705–714.
- Nebenführ, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., and Staehelin, L.A. (1999). Stop-and-Go Movements of Plant Golgi Stacks Are Mediated by the Acto-Myosin System. *Plant Physiol.* 121, 1127–1141.
- Nelson, J.W., and Kallenbach, N.R. (1986). Stabilization of the ribonuclease S-peptide α -helix by trifluoroethanol. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 1, 211–217.
- Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J.* 51, 1126–1136.
- Netherton, C.L., and Wileman, T. (2011). Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr. Opin. Virol.* 1, 381–387.
- Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E., and Wileman, T. (2007). A Guide to Viral Inclusions, Membrane Rearrangements, Factories, and Viroplasm Produced During Virus Replication. In *Advances in Virus Research*, A.J.S. and F.A.M. Karl Maramorosch, ed. (Academic Press), pp. 101–182.
- Niesbach-Klöggen, U., Guilley, H., Jonard, G., and Richards, K. (1990). Immunodetection in Vivo of beet necrotic yellow vein virus-encoded proteins. *Virology* 178, 52–61.
- Nilsson, I., and von Heijne, G. (1998). Breaking the camel's back: proline-induced turns in a model transmembrane helix. *J. Mol. Biol.* 284, 1185–1189.
- Nishikiori, M., Dohi, K., Mori, M., Meshi, T., Naito, S., and Ishikawa, M. (2006). Membrane-Bound Tomato Mosaic Virus Replication Proteins Participate in RNA Synthesis and Are Associated with Host Proteins in a Pattern Distinct from Those That Are Not Membrane Bound. *J. Virol.* 80, 8459–8468.
- Oikawa, K., Kasahara, M., Kiyosue, T., Kagawa, T., Suetsugu, N., Takahashi, F., Kanegae, T., Niwa, Y., Kadota, A., and Wada, M. (2003). CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING1 Is Essential for Proper Chloroplast Positioning. *Plant Cell* 15, 2805–2815.

- Oikawa, K., Yamasato, A., Kong, S.-G., Kasahara, M., Nakai, M., Takahashi, F., Ogura, Y., Kagawa, T., and Wada, M. (2008). Chloroplast Outer Envelope Protein CHUP1 Is Essential for Chloroplast Anchorage to the Plasma Membrane and Chloroplast Movement. *Plant Physiol.* *148*, 829–842.
- Ooi, H.S., Kwo, C.Y., Wildpaner, M., Sirota, F.L., Eisenhaber, B., Maurer-Stroh, S., Wong, W.C., Schleiffer, A., Eisenhaber, F., and Schneider, G. (2009). ANNIE: integrated de novo protein sequence annotation. *Nucleic Acids Res.* *37*, W435–W440.
- Panavas, T., Hawkins, C.M., Panaviene, Z., and Nagy, P.D. (2005). The role of the p33:p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of Cucumber necrosis tobravirus. *Virology* *338*, 81–95.
- Parmryd, I., Shipton, C.A., Swiezewska, E., Dallner, G., and Andersson, B. (1997). Chloroplastic prenylated proteins. *FEBS Lett.* *414*, 527–531.
- Patarroyo, C., Laliberté, J.-F., and Zheng, H. (2013). Hijack it, change it: how do plant viruses utilize the host secretory pathway for efficient viral replication and spread? *Plant-Microbe Interact.* *3*, 308.
- Pearson, K. (1922). I. On the χ^2 test of Goodness of Fit. *Biometrika* *14*, 186–191.
- Perez, L., Guinea, R., and Carrasco, L. (1991). Synthesis of Semliki Forest virus RNA requires continuous lipid synthesis. *Virology* *183*, 74–82.
- Pleij, C.W., Neeleman, A., van Vloten-Doting, L., and Bosch, L. (1976). Translation of turnip yellow mosaic virus RNA in vitro: a closed and an open coat protein cistron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 4437–4441.
- Prod'homme, D., Le Panse, S., Drugeon, G., and Jupin, I. (2001). Detection and Subcellular Localization of the Turnip Yellow Mosaic Virus 66K Replication Protein in Infected Cells. *Virology* *281*, 88–101.
- Prod'homme, D., Jakubiec, A., Tournier, V., Drugeon, G., and Jupin, I. (2003). Targeting of the Turnip Yellow Mosaic Virus 66K Replication Protein to the Chloroplast Envelope Is Mediated by the 140K Protein. *J. Virol.* *77*, 9124–9135.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M.-S., et al. (2011). Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* *9*, 32–45.
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., and Yao, X. (2008). CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng. Des. Sel.* *21*, 639–644.

- Restrepo-Hartwig, M.A., and Ahlquist, P. (1996). Brome mosaic virus helicase- and polymerase-like proteins colocalize on the endoplasmic reticulum at sites of viral RNA synthesis. *J. Virol.* *70*, 8908–8916.
- Reumann, S., Babujee, L., Ma, C., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G.E., Rasche, N., Lüder, F., Weckwerth, W., and Jahn, O. (2007). Proteome Analysis of Arabidopsis Leaf Peroxisomes Reveals Novel Targeting Peptides, Metabolic Pathways, and Defense Mechanisms. *Plant Cell* *19*, 3170–3193.
- Richter, S., Geldner, N., Schrader, J., Wolters, H., Stierhof, Y.-D., Rios, G., Koncz, C., Robinson, D.G., and Jürgens, G. (2007). Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature* *448*, 488–492.
- Ritzenthaler, C., Laporte, C., Gaire, F., Dunoyer, P., Schmitt, C., Duval, S., Piéquet, A., Loudes, A.M., Rohfritsch, O., Stussi-Garaud, C., et al. (2002). Grapevine Fanleaf Virus Replication Occurs on Endoplasmic Reticulum-Derived Membranes. *J. Virol.* *76*, 8808–8819.
- Robinson, D.G., Langhans, M., Saint-Jore-Dupas, C., and Hawes, C. (2008). BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends Plant Sci.* *13*, 405–408.
- Rochon, D., Singh, B., Reade, R., Theilmann, J., Ghoshal, K., Alam, S.B., and Maghodia, A. (2014). The p33 auxiliary replicase protein of Cucumber necrosis virus targets peroxisomes and infection induces de novo peroxisome formation from the endoplasmic reticulum. *Virology* *452–453*, 133–142.
- Rossig, C., Reinbothe, C., Gray, J., Valdes, O., Wettstein, D. von, and Reinbothe, S. (2013). Three proteins mediate import of transit sequence-less precursors into the inner envelope of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 19962–19967.
- Rozañov, M.N., Koonin, E.V., and Gorbalenya, A.E. (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the “Sindbis-like” supergroup of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* *73*, 2129–2134.
- Rozañov, M.N., Drugeon, G., and Haenni, A.-L. (1995). Papain-like proteinase of turnip yellow mosaic virus: a prototype of a new viral proteinase group. *Arch. Virol.* *140*, 273–288.
- Running, M.P. (2014). The role of lipid post-translational modification in plant developmental processes. *Plant Cell Biol.* *5*, 50.
- Sanfacon, H. (2013). Investigating the role of viral integral membrane proteins in promoting the assembly of nepovirus and comovirus replication factories. *Front. Plant Sci.* *3*.
- Satiat-Jeunemaitre, B., Steele, C., and Hawes, C. (1996a). Golgi-membrane dynamics are cytoskeleton dependent: A study on Golgi stack movement induced by brefeldin A. *Protoplasma* *191*, 21–33.

- Satiat-Jeunemaitre, B., Cole, L., Bourett, T., Howard, R., and Hawes, C. (1996b). Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? *J. Microsc.* *181*, 162–177.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E., and Carrington, J.C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* *16*, 4049–4059.
- Schlegel, A., Giddings, T.H., Ladinsky, M.S., and Kirkegaard, K. (1996). Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J. Virol.* *70*, 6576–6588.
- Schleiff, E., and Klösgen, R.B. (2001). Without a little help from “my” friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1541*, 22–33.
- Schmidt, O., and Teis, D. (2012). The ESCRT machinery. *Curr. Biol.* *22*, R116–R120.
- Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., den Boon, J., and Ahlquist, P. (2002). A Positive-Strand RNA Virus Replication Complex Parallels Form and Function of Retrovirus Capsids. *Mol. Cell* *9*, 505–514.
- Schwartz, M., Chen, J., Lee, W.-M., Janda, M., and Ahlquist, P. (2004). Alternate, Virus-Induced Membrane Rearrangements Support Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 11263–11268.
- Sharma, M., Sasvari, Z., and Nagy, P.D. (2010). Inhibition of Sterol Biosynthesis Reduces Tombusvirus Replication in Yeast and Plants. *J. Virol.* *84*, 2270–2281.
- Shcherbo, D., Shemiakina, I.I., Ryabova, A.V., Luker, K.E., Schmidt, B.T., Souslova, E.A., Gorodnicheva, T.V., Strukova, L., Shidlovskiy, K.M., Britanova, O.V., et al. (2010). Near-infrared fluorescent proteins. *Nat. Methods* *7*, 827–829.
- Singh, R.N., and Dreher, T.W. (1997). Turnip Yellow Mosaic Virus RNA-Dependent RNA Polymerase: Initiation of Minus Strand Synthesis in Vitro. *Virology* *233*, 430–439.
- Skuzeski, J.M., Bozarth, C.S., and Dreher, T.W. (1996). The turnip yellow mosaic virus tRNA-like structure cannot be replaced by generic tRNA-like elements or by heterologous 3' untranslated regions known to enhance mRNA expression and stability. *J. Virol.* *70*, 2107–2115.
- Spuul, P., Salonen, A., Merits, A., Jokitalo, E., Kääriäinen, L., and Ahola, T. (2007). Role of the Amphipathic Peptide of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP1 in Membrane Association and Virus Replication. *J. Virol.* *81*, 872–883.
- Stael, S., Bayer, R.G., Mehlmer, N., and Teige, M. (2011). Protein N-acylation overrides differing targeting signals. *FEBS Lett.* *585*, 517–522.

- Stengel, A., Soll, J., and Bölder, B. (2007). Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. *Biol. Chem.* *388*, 765–772.
- Stern, O., Hung, Y.-F., Valdau, O., Yaffe, Y., Harris, E., Hoffmann, S., Willbold, D., and Sklan, E.H. (2013). An N-Terminal Amphipathic Helix in Dengue Virus Nonstructural Protein 4A Mediates Oligomerization and Is Essential for Replication. *J. Virol.* *87*, 4080–4085.
- Stertz, S., Reichelt, M., Spiegel, M., Kuri, T., Martínez-Sobrido, L., García-Sastre, A., Weber, F., and Kochs, G. (2007). The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* *361*, 304–315.
- Suhy, D.A., Giddings, T.H., and Kirkegaard, K. (2000). Remodeling the Endoplasmic Reticulum by Poliovirus Infection and by Individual Viral Proteins: an Autophagy-Like Origin for Virus-Induced Vesicles. *J. Virol.* *74*, 8953–8965.
- Sullivan, M.L., and Ahlquist, P. (1999). A Brome Mosaic Virus Intergenic RNA3 Replication Signal Functions with Viral Replication Protein 1a To Dramatically Stabilize RNA In Vivo. *J. Virol.* *73*, 2622–2632.
- Tang, W.-F., Yang, S.-Y., Wu, B.-W., Jheng, J.-R., Chen, Y.-L., Shih, C.-H., Lin, K.-H., Lai, H.-C., Tang, P., and Horng, J.-T. (2007). Reticulon 3 Binds the 2C Protein of Enterovirus 71 and Is Required for Viral Replication. *J. Biol. Chem.* *282*, 5888–5898.
- Teterina, N.L., Gorbalenya, A.E., Egger, D., Bienz, K., Rinaudo, M.S., and Ehrenfeld, E. (2006). Testing the modularity of the N-terminal amphipathic helix conserved in picornavirus 2C proteins and hepatitis C NS5A protein. *Virology* *344*, 453–467.
- Thomas, P.D., and Dill, K.A. (1993). Local and nonlocal interactions in globular proteins and mechanisms of alcohol denaturation. *Protein Sci.* *2*, 2050–2065.
- Towner, J.S., Ho, T.V., and Semler, B.L. (1996). Determinants of Membrane Association for Poliovirus Protein 3AB. *J. Biol. Chem.* *271*, 26810–26818.
- Verchot, J. (2011). Wrapping membranes around plant virus infection. *Curr. Opin. Virol.* *1*, 388–395.
- Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 206–220.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., et al. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* *40*, 428–438.
- Wang, R.Y.-L., Stork, J., and Nagy, P.D. (2009). A Key Role for Heat Shock Protein 70 in the Localization and Insertion of Tombusvirus Replication Proteins to Intracellular Membranes. *J. Virol.* *83*, 3276–3287.

- Weber-Lotfi, F., Dietrich, A., Russo, M., and Rubino, L. (2002). Mitochondrial Targeting and Membrane Anchoring of a Viral Replicase in Plant and Yeast Cells. *J. Virol.* *76*, 10485–10496.
- 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. *J. Virol.* *82*, 12252–12264.
- Wei, T., Huang, T.-S., McNeil, J., Laliberté, J.-F., Hong, J., Nelson, R.S., and Wang, A. (2010). Sequential Recruitment of the Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts for Plant Potyvirus Replication. *J. Virol.* *84*, 799–809.
- Wei, T., Zhang, C., Hou, X., Sanfaçon, H., and Wang, A. (2013a). The SNARE Protein Syp71 Is Essential for Turnip Mosaic Virus Infection by Mediating Fusion of Virus-Induced Vesicles with Chloroplasts. *PLoS Pathog* *9*, e1003378.
- Wei, T., Zhang, C., Hou, X., Sanfaçon, H., and Wang, A. (2013b). The SNARE Protein Syp71 Is Essential for Turnip Mosaic Virus Infection by Mediating Fusion of Virus-Induced Vesicles with Chloroplasts. *PLoS Pathog* *9*, e1003378.
- Weiland, J.J., and Dreher, T.W. (1989). Infectious TYMV RNA from cloned cDNA: effects in vitro and in vivo of point substitutions in the initiation codons of two extensively overlapping ORFs. *Nucleic Acids Res.* *17*, 4675–4687.
- Weiland, J.J., and Dreher, T.W. (1993). Cis-preferential replication of the turnip yellow mosaic virus RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 6095–6099.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe* *5*, 365–375.
- Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M., and Seelig, J. (1999). Thermodynamics of the α -helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment: implications for the peptide-membrane binding equilibrium. *J. Mol. Biol.* *294*, 785–794.
- Wu, M.-J., Ke, P.-Y., Hsu, J.T.-A., Yeh, C.-T., and Horng, J.-T. (2014). Reticulon 3 interacts with NS4B of the hepatitis C virus and negatively regulates viral replication by disrupting NS4B self-interaction. *Cell. Microbiol.* *16*, 1603–1618.
- Wu, S.X., Ahlquist, P., and Kaesberg, P. (1992). Active complete in vitro replication of nodavirus RNA requires glycerophospholipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 11136–11140.
- Yamamura, Y., and Scholthof, H.B. (2005). Tomato bushy stunt virus: a resilient model system to study virus–plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* *6*, 491–502.

- Yau, W.-M., Wimley, W.C., Gawrisch, K., and White, S.H. (1998). The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces. *Biochemistry (Mosc.)* *37*, 14713–14718.
- Ye, J., Wang, C., Sumpter, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Gale, M. (2003). Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15865–15870.
- Yot, P., Pinck, M., Haenni, A.-L., Duranton, H.M., and Chapeville, F. (1970). Valine-Specific tRNA-like Structure in Turnip Yellow Mosaic Virus RNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *67*, 1345–1352.
- Yu, G.-Y., Lee, K.-J., Gao, L., and Lai, M.M.C. (2006). Palmitoylation and Polymerization of Hepatitis C Virus NS4B Protein. *J. Virol.* *80*, 6013–6023.
- Zhang, G., and Sanfaçon, H. (2006). Characterization of Membrane Association Domains within the Tomato Ringspot Nepovirus X2 Protein, an Endoplasmic Reticulum-Targeted Polytopic Membrane Protein. *J. Virol.* *80*, 10847–10857.
- Zhang, S.C., Zhang, G., Yang, L., Chisholm, J., and Sanfaçon, H. (2005). Evidence that Insertion of Tomato Ringspot Nepovirus NTB-VPg Protein in Endoplasmic Reticulum Membranes Is Directed by Two Domains: a C-Terminal Transmembrane Helix and an N-Terminal Amphipathic Helix. *J. Virol.* *79*, 11752–11765.

Titre : Caractérisation de la protéine 140K impliquée dans l'adressage aux chloroplastes du virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV)

Mots clés : Virus à ARN de polarité positive, complexe de réplication, localisation subcellulaire, hélice alpha amphipathique, microscopie confocale

Résumé : Le virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV) possède un génome monopartite constitué d'ARN de polarité positive codant pour trois protéines, dont seule la polyprotéine 206K est indispensable à la réplication virale.

Elle subit une maturation protéolytique, générant les protéines 140K et 66K, localisées au niveau de l'enveloppe des chloroplastes, siège de la réplication virale.

Adressée aux chloroplastes, la protéine 140K y recrute la 66K et se comporte comme une protéine intégrale membranaire.

Le domaine d'adressage aux chloroplastes (DAC) de la protéine 140K a été défini grâce à la transfection et à des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* par différentes constructions codant

pour des versions délétées de la protéine fusionnées à l'EGFP, et à leur observation en microscopie confocale.

Le DAC comprend deux hélices alpha amphipathiques dont la présence a été attestée par dichroïsme circulaire. Leur nécessité pour la localisation aux chloroplastes, l'association aux membranes et la réplication virale, a été étudiée.

Différents patterns de distribution subcellulaire de la protéine 140K ont été observés. Ils sont corrélés au taux d'expression de la protéine.

Sa dimérisation a également été démontrée.

L'implication d'autres résidus du DAC dans la localisation subcellulaire, la dimérisation et la réplication virale, a également été recherchée.

Title : Characterization of the 140K protein involved in targeting to the chloroplasts of the *Turnip Yellow mosaic virus* (TYMV) replication complexes.

Keywords : Positive strand RNA virus, replication complex, subcellular localization, amphipathic alpha helix, confocal microscopy

Abstract: Turnip yellow mosaic virus (TYMV) is a positive single-stranded RNA virus. Among the three ORFs encoded by the TYMV genome, 206K is the only protein required for viral replication.

It is cleaved into 140K and 66K, which are both present at the chloroplast envelope membrane, where viral replication takes place.

The 140K protein is targeted to chloroplasts, where it recruits 66K, and behaves as an integral membrane protein.

The chloroplast targeting domain (DAC) of the 140K protein was defined using *Arabidopsis thaliana* protoplasts transfected by various constructs encoding deleted versions of 140K

fused to EGFP and subsequent confocal microscopy.

The DAC comprises two amphipathic alpha helices, as confirmed by circular dichroism. Their involvement in chloroplast localisation and membrane association has been assessed, as well as their contribution to viral replication.

We observed different subcellular distribution patterns of 140K protein, which correlate with the expression level of the protein.

Its capability to dimerize has also been demonstrated.

The involvement of other DAC residues in subcellular localisation, dimerization and viral replication has been studied.