



HAL
open science

Rôle d'un suppresseur endogène de RNAi dans le développement de la plante et ses interactions avec les pathogènes

Hayat Sehki

► **To cite this version:**

Hayat Sehki. Rôle d'un suppresseur endogène de RNAi dans le développement de la plante et ses interactions avec les pathogènes. Biologie végétale. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASB034 . tel-03551869

HAL Id: tel-03551869

<https://theses.hal.science/tel-03551869>

Submitted on 2 Feb 2022

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.

Rôle d'un suppresseur endogène de RNAi dans le développement de la plante et ses interactions avec les pathogènes

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°567, Sciences du végétal : du gène à l'écosystème (SEVE)
Spécialité de doctorat : Biologie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech,
Institut Jean-Pierre Bourgin, 78000, Versailles, France
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Versailles,

le 16 Décembre 2020,

par Hayat SEHKI

Composition du Jury

Martin CRESPI

Directeur de Recherche, CNRS

Président

Julio SAEZ-VASQUEZ

Directeur de Recherche, CNRS

Rapporteur & Examineur

Olivier VOINNET

Professeur, ETH Zurich

Rapporteur & Examineur

Cécile BOUSQUET-ANTONELLI

Directrice de Recherche, CNRS

Examinatrice

Stéphanie PFLIEGER

Maîtresse de conférence HDR,
Université de Paris

Examinatrice

Hervé VAUCHERET

Directeur de Recherche, INRAE

Directeur de thèse

Remerciements

Il est évident que ces trois années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans toutes les personnes qui m'ont aidée et encouragée tout au long de cette aventure. Je tiens à tous vous remercier chaleureusement, et si je ne peux pas tous vous citer tant vous êtes nombreux, soyez certains que je pense fort à vous !

En premier, je remercie tout particulièrement mon chef Hervé Vaucheret. Je me sens tellement chanceuse d'avoir pu bénéficier de tes conseils, de ton savoir et de ton expérience. J'ai beaucoup appris à tes côtés, tu es un modèle pour moi et j'espère un jour pouvoir ressembler au formidable scientifique que tu es. Même si cette dernière année, marquée par la pandémie, a été difficile pour nous tous, j'ai toujours pu compter sur ton soutien. Un grand merci Hervé !!

Je tiens aussi à remercier tous les membres présents ou de passage de notre équipe. Merci Chouaib pour ton soutien, ton humour et tes conseils au quotidien. J'ai toujours été impressionnée par ton esprit brillant qui en ferait (presque) oublier ton désordre et je suis heureuse de pouvoir te compter parmi mes amis. Merci Agnès, ma voisine de bureau râleuse au grand cœur, pour ton soutien, ta présence, et aussi pour la passion des crevettes. Merci Taline pour tes conseils et ton esprit révolutionnaire qui fait du bien au moral (et à la recherche). Merci Nathalie et Ivan (vous formez un duo dans mon esprit, à qui la faute) pour votre bonne humeur et toutes ces discussions sans queue ni tête qui ont égayées mes journées. Merci Filipe pour ta gentillesse et pour les cours particuliers d'analyse de méthylome, promis je vais travailler ça !

Ensuite, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de cette thèse. Merci aux membres de mes comités de thèse pour vos critiques et vos conseils : Christine Lelandais, Moussa Benhamed, Thomas Blein, Lionel Navaro et Damien Garcia. Merci à Boris Collet pour les analyses de germination, à Alain Lecureuil pour l'aide au NIRS et à Elodie Gilbault de la plateforme Phénoscope. Merci à tous les membres de l'IJPB pour vos questions pertinentes pendant mes présentations ainsi qu'aux membres de l'équipe de la laverie et aux serristes qui nous facilitent la vie au quotidien. Merci également aux membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail : Cécile Bousquet-Antonelli, Martin Crespi, Stéphanie Pflieger, Julio Saez-Vasquez et Olivier Voinnet.

Evidemment, merci à toutes mes compagnes et tous mes compagnons de galère : Mathilde, Ambre, Houda, Coco, Titi, Richard, Clément, Andana,... On a bien rigolé ensemble et je vous souhaite à tous beaucoup de réussite, de bonheur et d'amour ! J'en oublie sûrement mais je suis

sûre que vous me pardonneriez. Merci aussi à la team Doc' en Herbe pour tous ces moments partagés ensemble et à tous les doctorants de l'IJPB !

Bien évidemment, merci de tout cœur à ma famille. Merci à mes parents, Naïma et Bruno, pour les valeurs que vous m'avez inculquées, elles m'ont permis de passer outre toutes les difficultés qui se sont dressées devant moi et de ne jamais baisser les bras. Merci aussi à mes trois sœurs, Dounia, Houria et Sanâa, pour votre soutien sans faille, vous êtes les meilleures !!

Enfin, un grand merci à mon copain, Pierre. Je ne vais pas trop m'épancher sinon tu vas trop faire le malin, mais saches que je suis très heureuse de t'avoir à mes côtés et d'avoir pu partager cette expérience avec toi.

Résumé

Le Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS) est un mécanisme dirigé contre les acides nucléiques invasifs endogènes (transposons) et exogènes (pathogènes, transgènes). Dans le cas des virus, le PTGS peut s'attaquer aux ARNs double-brin (dsRNAs) intermédiaires de la réplication virale et aux ARNs simple-brin viraux, mais il est souvent inhibé par des protéines virales appelées Viral Suppressor of RNAi (VSR). Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, une enzyme appelée RNase THREE-LIKE 1 (RTL1) est induite en réponse à l'infection virale et détruit les dsRNAs de manière non sélective. Cette enzyme devrait assurer à la plante une seconde ligne de défense en clivant les dsRNAs viraux, mais les VSR qui inhibent le PTGS inhibent généralement RTL1, indiquant que les virus ont mis en place des outils capables de combattre simultanément ces deux mécanismes de défense. Toutefois, un virus, le *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), est incapable d'inhiber RTL1 et semble même tirer profit de RTL1 pour réussir à infecter *A. thaliana* (Shamandi et al., 2015).

Au cours de cette thèse, nous avons approfondi l'étude de l'interaction *Arabidopsis*-TYMV. Nous avons montré que le TYMV est incapable d'inhiber l'exécution du PTGS, mais est toutefois capable d'inhiber l'étape d'amplification du PTGS. Cette action est due à la protéine virale P69, et nous avons montré que P69 est retrouvée dans des corpuscules cytoplasmiques appelés siRNA-bodies qui sont le siège de l'amplification du PTGS. Par ailleurs, nous avons généré des mutants *rtl1* et montré que l'absence de RTL1 retarde l'infection par le TYMV et augmente la quantité de siRNAs dirigés contre le virus, tandis que la surexpression de *RTL1* favorise l'infection et inhibe la production des siRNAs anti-viraux. Nous avons observé que RTL1 était retrouvée dans les siRNA-bodies, et nous avons montré que RTL1 était capable de détruire non seulement les dsRNAs mais également les siRNAs. Ces résultats indiquent donc que le TYMV réussit à infecter *A. thaliana* en : i) se répliquant dans des invaginations de la membrane chloroplastique (Prod'homme et al., 2003) qui mettent vraisemblablement les dsRNAs intermédiaires de la réplication à l'abri du PTGS et de RTL1, ii) en induisant l'expression de *RTL1* qui s'attaque aux dsRNAs et siRNAs induits par le PTGS dans les siRNA-bodies en réponse à l'infection, et iii) en exprimant la protéine P69 qui complète l'action de RTL1 en inhibant l'amplification du PTGS résiduel.

Malgré un effet neutre ou négatif pour la plante vis-à-vis des virus, *RTL1* est conservé dans toutes les accessions d'*Arabidopsis*, et l'étude du ratio des mutations synonymes et non synonymes dans les gènes *RTL1* de 42 Eucotylédones suggère que *RTL1* subit une pression de

sélection de conservation, suggérant un rôle essentiel. Chez *A. thaliana*, *RTL1* est exprimé faiblement dans la racine, les tissus en sénescence, et au cours du développement de la graine. Le phénotypage des plantes sauvages et des mutants *rtl1* n'a pas révélé de différences morphologiques notables, mais nous avons observé que le poids des graines était supérieur chez les mutants *rtl1*. Par ailleurs, nous avons observé une sénescence accrue chez le mutant *rtl1*, en particulier dans l'accession *Ler*. Cette différence entre *Ler* et *Col* nous a poussé à examiner si *RTL1* pouvait contribuer à la variabilité naturelle du PTGS des transgènes entre les accessions *Ler* (PTGS peu efficace) et *Col* (PTGS très efficace). Nous avons observé que la mutation *rtl1* n'affectait pas sensiblement l'efficacité du PTGS chez *Col* mais augmentait celle de *Ler* au niveau de *Col*, ce qui pourrait s'expliquer par une plus forte expression de *RTL1* chez *Ler* que chez *Col*. L'effet de l'absence de *RTL1* devra donc être précisé en condition normale et en condition d'infection en privilégiant *Ler* plutôt que *Col*.

Abstract

Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS) is a defense mechanism that targets invading nucleic acids of endogenous (transposons) or exogenous (pathogens, transgenes) origins. During virus infection, PTGS theoretically targets double-stranded (ds)RNA intermediates of viral replication and viral single-stranded RNAs; however, most viruses encode proteins, referred to as viral suppressor of RNAi (VSR), which inhibit PTGS. In the model plant *Arabidopsis thaliana*, an enzyme referred to as RNase THREE-LIKE 1 (*RTL1*) is induced in response to viral infection and cleaves dsRNAs in a non-specific manner. This enzyme should provide a second line of defense by cleaving viral dsRNAs, but VSR that inhibit PTGS generally inhibit *RTL1*, indicating that viruses had put in place tools that simultaneously counteract these two defense mechanisms. Nevertheless, at least one virus, *Turnip yellow mosaic virus* (*TYMV*), is not able to inhibit *RTL1* and in fact seems to take advantage of *RTL1* to successfully infect *A. thaliana* (Shamandi et al., 2015).

In this thesis, we deepened the study of *Arabidopsis*-*TYMV* interaction. We show that *TYMV* is not able to inhibit PTGS execution but is able to inhibit PTGS amplification. This effect is due to the viral protein P69, and we show that P69 localizes in cytoplasmic foci called siRNA-bodies, where PTGS amplification takes place. Furthermore, using in house-generated *rtl1* mutants, we show that the lack of *RTL1* delays *TYMV* infection and promotes the production

of siRNAs directed against the virus, whereas *RTL1* overexpression enhances viral symptoms and suppresses the production of anti-viral siRNAs. We show that RTL1 is found in siRNA-bodies, and we show that RTL1 attacks not only dsRNAs but also siRNAs. These results indicate that, TYMV successfully infect *A. thaliana* by : i) replicating in chloroplast membrane invaginations (Prod'homme et al., 2003), which likely shelter dsRNAs intermediates of replication from PTGS and RTL1, ii) inducing *RTL1* expression, which promotes the destruction of dsRNAs and siRNAs produced by PTGS in siRNA-bodies in response to TYMV infection, and iii) expressing the P69 protein to inhibit residual PTGS amplification.

Despite a neutral or detrimental effect on plant anti-viral PTGS, *RTL1* is conserved in all Arabidopsis accessions, and the study of synonymous and non-synonymous substitutions ratios in *RTL1* genes from 42 dicotyledonous plant reveals that *RTL1* is under the control of a conservative selection, suggesting an essential role. In *A. thaliana*, *RTL1* is weakly expressed in roots, in senescent tissues and during seed development. Phenotyping wild-type plants and *rtl1* mutants did not revealed any significant morphological differences, but we observed that seeds weight is enhanced in *rtl1* mutants. Moreover, we observed an increased senescence in *rtl1* mutants, in particular in the *Ler* accession. This difference between *Ler* and Col prompted us to determine if RTL1 could participate in the natural variability of transgene PTGS efficiency between *Ler* (weak PTGS) and Col (strong PTGS). We observed that *rtl1* mutations have no significant effect on PTGS efficiency in Col, but enhances PTGS efficiency in *Ler*, up to the level of Col, which could be explained by a strongest *RTL1* expression in *Ler* compared to Col. These results indicate that the effect of RTL1 impairment should be further examined in normal and infectious contexts by focusing on *Ler* rather than Col.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----|
| Remerciements | 1 |
| Résumé | 3 |
| Abstract | 4 |
| TABLE DES MATIERES..... | 7 |
| INTRODUCTION..... | 11 |
| I] Historique | 13 |
| 1) TGS <i>versus</i> PTGS | 20 |
| 2) PTGS et défense anti-virale..... | 25 |
| II] Mécanismes du RNA silencing chez les plantes | 33 |
| 1) Les voies de production des dsRNAs | 34 |
| 2) Le RNA Quality Control | 35 |
| 3) Diversité des petits RNAs et voies de biosynthèse..... | 39 |
| 4) Rôle biologique des petits RNAs endogènes..... | 49 |
| III] Le RNA silencing contre les acides nucléiques exogènes invasifs..... | 55 |
| 1) Les transgènes | 55 |
| 2) Les virus..... | 57 |
| IV] Objectifs de la thèse..... | 60 |
| RESULTATS | 63 |
| I] Pourquoi certains virus inhibent-ils RTL1 ?..... | 67 |
| 1) Analyse du rôle de RTL1 dans l'infection par le TuMV..... | 67 |
| 2) Rôle de RTL1 dans l'infection par un TuMV délété de son VSR..... | 69 |
| II] Pourquoi certains virus n'inhibent-ils pas RTL1 et comment réussissent-ils leur infection ? | 77 |
| 1) Caractérisation du PTGS anti-viral limitant la prolifération du TYMV..... | 79 |
| 2) Caractérisation de l'effet du TYMV sur le PTGS transgénique..... | 83 |
| 3) Caractérisation du VSR du TYMV | 91 |
| 4) Rôle de RTL1 dans l'infection par le TYMV | 105 |
| 5) Rôle de RTL1 dans l'infection par d'autres virus conduisant à des symptômes faibles chez Arabidopsis..... | 119 |
| III] Pourquoi <i>RTL1</i> est-il maintenu dans le génome d'Arabidopsis ? | 123 |
| 1) Phénotypage parties aériennes des mutants <i>rtl1</i> | 123 |
| 2) Analyse de la sénescence chez les mutants <i>rtl1</i> | 131 |
| 3) Analyse des graines des mutants <i>rtl1</i> | 131 |
| 4) Phénotypage des racines des mutants <i>rtl1</i> | 143 |
| 5) Effet de la mutation <i>rtl1</i> chez les accessions <i>Ler</i> et <i>Ws</i> | 145 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 155 |
| I] Existe-t-il une relation entre l'effet des VSR sur le PTGS et leur effet sur RTL1 ?..... | 157 |

| | |
|---|-----|
| II] Pourquoi certains virus inhibent-ils RTL1 ? | 161 |
| III] Pourquoi certains virus n'inhibent-ils pas RTL1, et comment réussissent-ils leur infection ? . | 165 |
| 1) AGO1, AGO2 et DCL4 participent au PTGS anti-TYMV | 166 |
| 2) P69 cible l'étape d'amplification RDR-dépendante du S-PTGS..... | 168 |
| 3) RTL1 favorise l'infection par le TYMV | 173 |
| 4) Le rôle de RTL1 dans l'interaction Arabidopsis-TYMV est-il généralisable ? | 177 |
| IV] Pourquoi <i>RTL1</i> est-il maintenu dans le génome d'Arabidopsis ?..... | 179 |
| 1) RTL1 ne semble pas impliquée dans le développement de la plante | 179 |
| 2) La dérégulation de <i>RTL1</i> affecte le poids des graines | 180 |
| 3) L'absence de RTL1 ne semble pas affecter le développement de la racine | 182 |
| 4) Le rôle de RTL1 diffère dans différentes accessions d' <i>A. thaliana</i> | 183 |
| V] Conclusion | 189 |
| MATERIEL ET METHODES | 191 |
| I] Matériel biologique..... | 193 |
| 1) Description des lignées..... | 193 |
| 2) Génération du mutant <i>rtl1</i> par CRISPR..... | 194 |
| 3) Semis et condition de culture | 196 |
| II] Transformation stable, transformation transitoire et infection virale | 198 |
| 1) Clonage Gateway | 198 |
| 2) Transformation stable..... | 198 |
| 3) Transformation transitoire de feuilles de tabac | 199 |
| 4) Transformation transitoire de plantules d' <i>A. thaliana</i> | 200 |
| 5) Virus et inoculation | 200 |
| III] Micro-greffes et induction d'infection virale..... | 202 |
| 1) Micro-greffe | 202 |
| 2) Induction d'infection virale | 202 |
| IV] Analyses Moléculaires..... | 204 |
| 1) Extraction d'ADN | 204 |
| 2) Purification de plasmides | 204 |
| 3) Quantification de l'activité GUS | 205 |
| 4) Extraction d'ARNs | 205 |
| 5) Northern blot HMW et LMW | 206 |
| 6) RT-qPCR..... | 207 |
| V] Phénotypage et analyse par microscopie confocale | 208 |
| 1) Phénotypage des rosettes..... | 208 |
| 2) Analyse de la sénescence | 208 |
| 3) Phénotypage des racines..... | 208 |

| | |
|---|-----|
| 4) Test de germination | 209 |
| 5) Analyse de la composition des graines..... | 209 |
| 6) Microscopie confocale | 209 |
| ANNEXES | 211 |
| I] Figures supplémentaires | 212 |
| II] Tableau des primers..... | 217 |
| III] Abréviations couramment utilisées | 219 |
| IV] Table des figures..... | 220 |
| V] Table des tableaux..... | 222 |
| VI] Références..... | 223 |

INTRODUCTION

I] Historique

Au milieu du 20^{ème} siècle, l'embryologiste anglais Conrad Waddington remet en cause le dogme de causalité direct entre le génotype et le phénotype d'un individu et introduit pour la première fois le terme « épigénétique ». Jusqu'alors, deux théories du développement embryonnaire s'opposent : d'un côté la théorie de la préformation, où l'ensemble des structures d'un organisme adulte préexistent dans l'embryon, et d'un autre la théorie de l'épigenèse, où l'ensemble des structures d'un organisme adulte résultent de divisions et multiplications de structures simples de l'embryon (Laubinger et al., 2008; Waddington, 2012; Waddington, 1942; Deans and Maggert, 2015). Waddington suggère que ces deux théories sont en fait complémentaires et les applique au domaine de la génétique. L'épigénétique désigne alors l'étude de l'influence des gènes et des composants cytoplasmiques sur la plasticité du phénotype d'un individu. Sa définition est affinée en 1958 par le biologiste américain David Nanney afin de distinguer les mécanismes génétiques « classiques » d'expression, de maintien et réplication du génome d'une part, des mécanismes de régulations d'expression de gènes spécifiques d'autre part, pouvant se maintenir au travers des divisions cellulaires (Nanney, 1958; Deans and Maggert, 2015).

Par la suite, la définition de l'épigénétique est amenée à évoluer à nouveau, notamment grâce à l'apparition de nouvelles techniques dans le domaine de la génétique, dont la première modification génétique volontaire de bactérie *Escherichia Coli* par l'équipe de Paul Berg en 1972 (Nemes et al., 2014) et le perfectionnement de cette technique de clonage avec l'utilisation d'un vecteur l'année suivante par Hervé Boyer et Stanley Cohen (Cohen et al., 1973). En 1974, Annie Chang et Stanley Cohen réussissent à exprimer différents gènes de *Staphylococcus aureus* chez des bactéries *E. Coli* par micro-injection d'ADN (Chang and Cohen, 1974) et les années suivantes les premiers Eucaryotes, dont des cellules de levure et de souris, sont également génétiquement modifiés (Jaenisch and Mintz, 1974; Hinnen et al., 1978; Copeland et al., 1979; Gordon et al., 1980). Enfin, avec la découverte du mécanisme d'intégration de gènes dans le génome des plantes par le plasmide *Ti* de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Van Larebeke et al., 1975; Watson et al., 1975; Chilton et al., 1977; de Framond et al., 1983), les premiers plants de tabac transgéniques résistants à un antibiotique sont générés en 1983 (Otten et al., 1981; Bevan et al., 1992; Fraley et al., 1983; Barton et al., 1983; Herrera-Estrella et al., 1992). Cependant, l'expression du transgène n'est pas systématique et des études

contemporaines observent une corrélation entre la méthylation de sa séquence et l'absence de son expression (Hepburn et al., 1983; Amasino et al., 1984; van Slogteren et al., 1984). Par ailleurs, Barton et al observent qu'une des tumeurs de tabac obtenues après transformation par une agrobactérie portant le plasmide *Ti* entier additionné du gène *NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE (NPT)-II* conférant la résistance à la kanamycine est capable de régénérer un plant de tabac de phénotype normal. L'observation que les descendants de cette plante sont sensibles à la kanamycine permettra plus tard à Marjori Matzke de conclure que c'est le silencing de tous les gènes portés par le T-DNA du plasmide *Ti d'A. tumefaciens* (gènes oncogènes et transgène *NPT-II*) qui a permis la régénération d'une plante intacte (Marjori Matzke, communication personnelle à Hervé Vaucheret).

A la fin des années 80, la transformation des plantes est devenue routinière et plusieurs équipes constatent également que l'insertion des transgènes ne conduit pas systématiquement à leur expression ou à la production de protéines transgéniques. Les équipes de Marjori Matzke (Matzke et al., 1989), Peter Meyer (Linne et al., 1990) et Michel Caboche (Vaucheret et al., 1990) décrivent les premiers cas où l'expression du transgène est inhibée par ce qui sera ultérieurement qualifié de Transcriptional Gene Silencing (TGS). Les équipes de Richard Jorgensen (Bologna et al., 2018), Joseph Mol (van der Krol et al., 1990) et David Grierson (Smith et al., 1990) décrivent les premiers cas où l'ARN messenger (mRNA) transgénique est dégradé par ce qui sera ultérieurement défini comme du Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS). De nombreux autres exemples suivront dans les années qui suivent et nous retracerons dans cette partie historique la caractérisation de ces mécanismes.

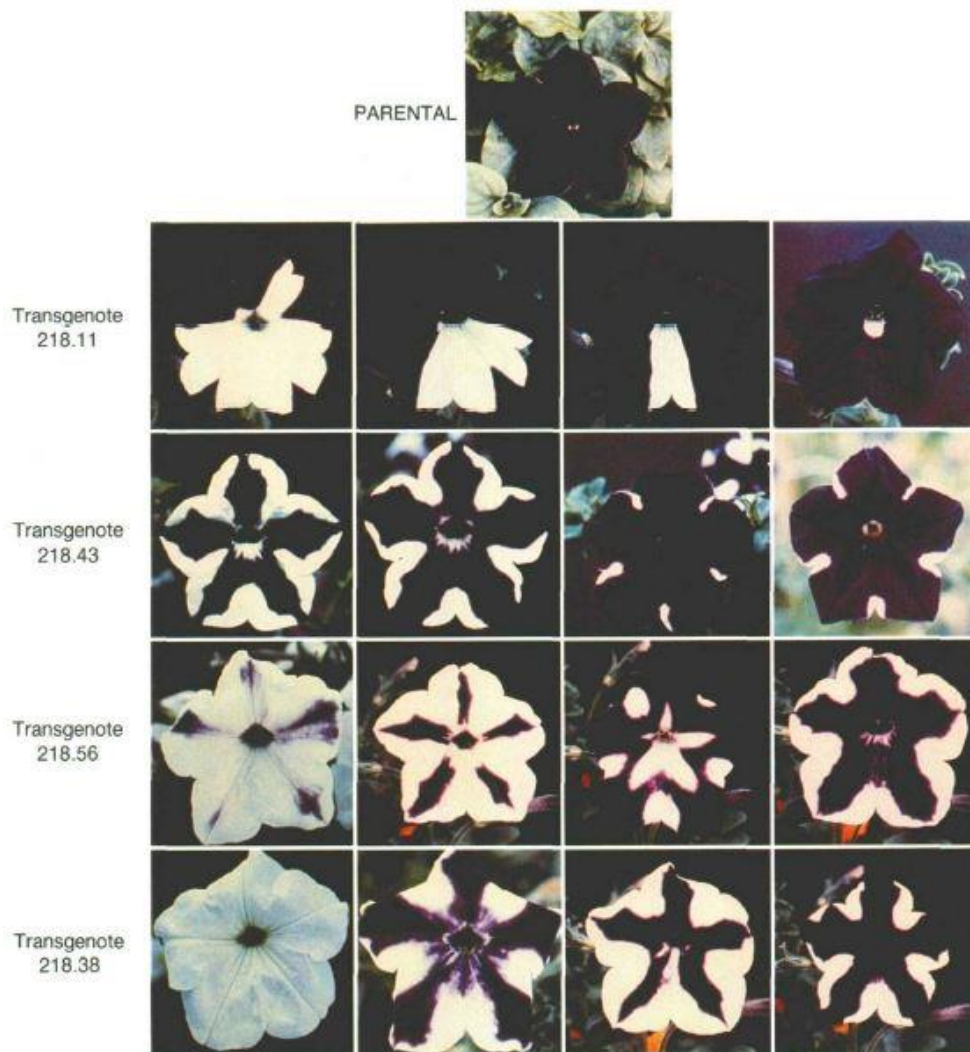


Figure 1 : Première observation du silencing induit par un transgène

Figure issue de l'article Napoli et al., 1990. Des pétunias de la variété V26 sont transformés avec un transgène *35S:CHS*. La descendance des plantes transformées (« transgenote ») présente de multiples combinaisons de couleurs par rapport à la lignée parentale. 4 profils sont présentés : 218.11 « wedge », 218.43 « star-like », 218.56 et 218.38 « dancer-like ».



Figure 2 : Phénotype des pétunias Red Star

Image libre de droit. Van der Krol et al suggèrent en 1990 une corrélation entre le phénotype des pétunias transgéniques *35S:CHS* et celui de la variété *Red Star*.

L'équipe de Richard Jorgensen souhaitait générer des plantes de pétunia aux pétales plus foncés. Ils supposaient que l'enzyme de la CHALCONE SYNTHASE (CHS), impliquée dans la synthèse des flavonoïdes, pouvait être limitante. Ils ont alors transformé différentes variétés de pétunias à l'aide d'agrobactéries porteuses d'un transgène constitué du gène *CHS* sous le contrôle du promoteur 35S du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (Bologna et al., 2018). Mais dans la descendance des plantes transformées, au lieu de pétunias aux fleurs de couleur plus foncée attendus, ils ont constaté avec surprise la présence de plantes aux fleurs blanches ou bariolées de blanc, en lien avec une forte diminution de l'accumulation des RNAs du gène endogène *CHS* dans les fleurs blanches par rapport aux plantes non-transformées (Napoli et al., 1990 ; **Figure 1**). Ce phénomène de RNA silencing d'un gène endogène induit par l'expression d'un transgène de séquence homologue est baptisé « co-suppression ». Il est de nature héritable et réversible. En raison de la découverte de l'influence négative de groupes méthyl sur l'activité des gènes animaux par Robin Holliday et Arthur Riggs en 1975 (Holliday and Pugh, 1975; Riggs, 1975), Napoli et al suggèrent dès lors une implication de la méthylation du gène *CHS* dans la co-suppression.

De leur côté, Van der Krol et al notent en plus que l'introduction d'une copie tronquée du gène *CHS* suffit à induire la co-suppression de l'expression du gène endogène *CHS* (van der Krol et al., 1990), et d'autres études complémentaires montrent que l'introduction d'une copie anti-sens du gène induit une co-suppression plus forte de l'expression du gène endogène (van der Krol et al., 1988; Jorgensen et al., 1996), suggérant alors une implication des RNAs. Elle est également plus forte lorsque les plantes sont transformées avec un transgène portant un promoteur fort ou lorsque le nombre de copie insérée du transgène augmente (Schubert et al., 2004). Par la suite, cette équipe montre que la dégradation des RNAs *CHS* est cytoplasmique car l'accumulation des RNAs *CHS* n'est pas affectée dans le noyau (Van Blokland et al., 1994). La co-suppression est donc un mécanisme séquence spécifique et post-transcriptionnel. Le phénomène est alors rebaptisé Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS).

Van der Krol et al soulignent que le phénotype de co-suppression des pétunias transformés avec le transgène 35S:*CHS* est similaire à celui des pétunias de la variété *Red Star*, dont les pétales sont bariolés de blanc (Van Der Krol et al., 1990 ; **Figure 2**). Ils suggèrent alors que les bases moléculaires du phénomène de co-suppression pourraient être un mécanisme affectant aussi les gènes endogènes dans certaines situations. En effet, des études ultérieures montreront que certaines variétés d'*Arabidopsis*, de muflier, et de soja présentant une élévation du nombre de

copies d'un gène suite à des remaniements génomiques montrent un silencing spécifique de ce gène et de ses homologues, alors que les variétés classiques sans remaniement expriment correctement ces gènes (Coen and Carpenter, 1988; Melquist, 2003; Clough et al., 2004; Tuteja et al., 2004; Della Vedova et al., 2005; Tuteja et al., 2009; Durand et al., 2012). De la même façon, la décoloration des fleurs de pétunia *Red Star* est liée à une dégradation séquence-spécifique des RNAs du gène *CHS* dans les zones blanches (Koseki et al., 2005), consécutive à une duplication d'un cluster de gènes *CHS* (Morita et al., 2012). On peut raisonnablement penser que ces réarrangements ne sont tolérés que parce qu'ils affectent des gènes non indispensables, suggérant que durant l'évolution les réarrangements touchant des gènes codant des protéines indispensables ont été contre-sélectionnés par ce mécanisme.

Chez les autres Eucaryotes, des phénomènes apparentés sont observés à la fin des années 80 (Nakayashiki, 2005; Kavi et al., 2005; Grishok, 2005; Aravin and Tuschl, 2005) :

- Chez le champignon *Neurospora crassa*, l'équipe de Selker montrent que l'introduction de copies surnuméraires du gène endogène de la *GLUTAMATE DESHYDROGENASE* conduit à une altération de la séquence par Repeat-Induced Point mutation (RIP) à une étape précédant la méiose avec une transition des cytosines en thymines, et la plupart du temps à l'inactivation de l'expression du transgène et à la méthylation de ses cytosines (Selker and Stevens, 1985; Selker and Garrett, 1988; Galagan and Selker, 2004). C'est également le cas lorsque plusieurs copies d'un gène exogène sont insérées chez *N. crassa* ou lorsqu'une unique copie est insérée à proximité d'une séquence endogène dupliquée (Foss et al., 1991). Dans des études ultérieures, ils observent également que les événements de duplication du génome conduisent au RIP et à la variabilité de l'expression de certains gènes endogènes dans différentes souches de *N. crassa* (Grayburn and Selker, 1989), et que plus les séquences dupliquées divergent plus elles tendent à induire le RIP (Singer et al., 1995). Enfin, ils observent que la déméthylation des séquences exogènes cibles du RIP permet la réactivation de l'expression du transgène chez *N. crassa* (Irelan and Selker, 1997).
- Chez le champignon *Ascobolus immersus*, les équipes de Faugeron et Rossignol observent aussi que l'introduction de multiples copies du gène de l'homoserine O-transacetylase *MET2* (Goyon et al., 1988) conduit à leur inactivation à une étape précédant la méiose (Faugeron et al., 1989), en particulier lorsque l'insertion est proche de séquences répétées, et est associée à la méthylation des cytosines des copies insérées (Goyon and Faugeron, 1989; Faugeron et al., 1990). Ces modifications étant

transmissibles et réversibles, et conduisant à la méthylation de séquences homologues *de novo* sans mutation de séquence comme dans le cadre du RIP, ce phénomène est baptisé Methylation Induced Premeotically (MIP) (Rhounim et al., 1992). Ces deux mécanismes sont dépendants de la présence de séquences répétées et il est alors suggéré qu'ils participent au maintien de l'intégrité du génome, notamment en limitant les réarrangements chromosomiques (Maloisel and Rossignol, 1998; Rossignol and Faugeron, 1994).

- Chez *N. crassa*, Romano et Macino montrent également que l'expression des gènes endogènes *ALBINO-1 (AL-1)* et *AL-3*, impliqués dans la biosynthèse des caroténoïdes, est réprimée chez les champignons transformés avec une séquence homologue (Romano and Macino, 1992). Ce phénomène semblable à la co-suppression des plantes est appelé « quelling » chez les champignons. Des résultats similaires sont obtenus la même année par l'introgession de multiples copies du gène de résistance à l'hygromycine d'*E. Coli HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE (HPT)* chez *N. crassa*, corrélée avec la méthylation des cytosines des transgènes et l'inactivation de son expression (Pandit and Russo, 1992). Mais contrairement au RIP et au MIP, lorsque les souches sujettes au quelling sont traitées avec de l'azacytidine (qui se substitue aux cytosines et inhibe leur méthylation), toutes ne réactivent pas l'expression du transgène *HPT* (Pandit and Russo, 1992). De plus, chez le mutant de DNA-méthyltransferase *dim-2* où la méthylation des cytosines des gènes endogènes est perdue, le quelling est maintenu (Cogoni et al., 1996). Cogoni et al montrent également que l'introgession du promoteur du gène *AL-1* n'est pas suffisante pour induire la répression de l'expression du gène endogène *AL-1* et que le quelling n'affecte pas la transcription du gène *AL-1*, suggérant alors que le quelling est un mécanisme de régulation post-transcriptionnel (Cogoni et al., 1996).
- Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, Lee et al montrent l'implication d'un RNA non-codant dans la régulation du gène *LIN-14*, essentiel au développement larvaire, via la production de RNAs de petites tailles complémentaires au gène *LIN-14* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). En 1995, Guo et Kemphues observent que l'injection chez *C. elegans* d'un RNA synthétique sens ou anti-sens correspondant au gène *PAR-1*, impliqué dans le développement et la polarité des cellules de l'embryon, conduit à la dégradation des mRNAs *PAR-1* endogènes et à une forte létalité chez le nématode (Guo and Kemphues, 1995). Ces résultats, similaires à la co-suppression des plantes et au quelling des champignons, appuient à nouveau l'implication des RNAs dans le silencing.

Un pas décisif est franchi en 1998 lorsque que Hamilton et al montrent que la transcription d'un ADN en Inverse Repeat (IR) de l'oxydase *ACO1* suffit à déclencher la co-suppression du gène endogène *ACO1* et du gène homologue *ACO2* chez la tomate (Hamilton et al., 1998), suggérant que le RNA double brin (dsRNA) joue un rôle important dans la co-suppression et qu'elle peut également agir en *trans*. Le mois suivant, des résultats similaires sont obtenus chez *C. elegans* où l'introduction de dsRNA purifié entraîne l'inhibition de l'accumulation des RNAs du gène endogène homologue de manière plus forte que l'injection d'un RNA simple brin (ssRNA) sens ou anti-sens (Fire et al., 1998; Montgomery et al., 1998). Ces derniers résultats permettront à Andrew Fire et Craig Mello d'obtenir le prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2006 pour la découverte des bases du mécanisme qu'ils baptisent RNA interference (RNAi), où un dsRNA induit la dégradation d'un mRNA de manière séquence spécifique. Par la suite, chez la mouche *Drosophila melanogaster*, la purification de petits RNAs de 21 à 23 nucléotides issus de l'injection d'un dsRNA démontrent le rôle majeur des dsRNAs dans la formation de petits RNAs, appelés short/small interfering RNAs (siRNAs), et leur rôle dans le clivage des mRNAs cibles de séquence homologue (Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000). Par la suite, l'implication de protéines à activité endonucléase capable de cliver les dsRNAs en petits RNAs est démontré chez la drosophile (Bernstein et al., 2001; Nykänen et al., 2001). En 2003, le projet ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) est lancé en complément du projet HUMAN GENOME de 1989 sur l'homme. Il appuie que l'ADN non-codant jusqu'alors qualifié de « junk DNA » participe en fait hautement à la régulation de l'expression des gènes endogènes (Pennisi, 2012).

1) TGS versus PTGS

L'analyse des nombreux cas de silencing chez les plantes permet de distinguer deux grands types de silencing : le Transcriptional Gene Silencing (TGS) et le Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS).

En 1989, Matzke et al retransforment des plants de tabac transgéniques portant le T-DNA I (constitué du gène de résistance à la kanamycine *NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE (NPT)-II* d'*E. Coli* et le gène *NOPALINE SYNTHASE (NOS)* d'*A. tumefasciens*, tous deux sous le contrôle du promoteur du gène *NOS* d'*A. tumefasciens*) par une agrobactérie portant le le T-

DNA II (constitué du gène de résistance à l'hygromycine *HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE (HPT)* d'*E. Coli* sous le contrôle du promoteur *35S* du CaMV et le gène *OCTOPINE SYNTHASE* d'*A. tumefasciens* sous le contrôle du promoteur *NOS*). A leur grande surprise, ils observent que parmi les doubles transformants sélectionnés sur hygromycine, certains sont devenus sensibles à la kanamycine. Chez ces plantes, les promoteurs *NOS* du T-DNA I sont méthylés, alors que les promoteurs *NOS* ne sont pas méthylés chez les plantes portant uniquement le T-DNA I qui sont résistantes à la kanamycine (Matzke et al., 1989). Par ailleurs, cet effet est réversible puisque la résistance à la kanamycine peut être récupérée après ségrégation du T-DNA II. La méthylation des promoteurs *NOS* est partiellement perdue chez ces plantes redevenues résistantes à la kanamycine. Ces résultats suggèrent que le T-DNA I est inactif en présence du T-DNA II et que le T-DNA II induit la méthylation en *trans* des promoteurs de séquences homologues du T-DNA I (Matzke et al., 1989). Quelques années plus tard, chez différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* portant un transgène inactif constitué du gène de résistance à la kanamycine *NPT-II* d'*E. Coli* sous le contrôle du promoteur du gène *NOS* d'*A. tumefasciens*, Kilby et al observent aussi une corrélation entre l'inactivation du transgène et le niveau méthylation du promoteur *NOS* (Kilby et al., 1992). Par ailleurs, après traitement à l'azacytidine, ces plantes sont à nouveau résistantes à la kanamycine, suggérant que la méthylation des cytosines du promoteur est impliquée dans le silencing des transgènes (Kilby et al., 1992). De plus, chez différentes lignées transgéniques de tabacs instables pour une insertion du gène de résistance à l'hygromycine *HPT* sous le contrôle du promoteur *35S*, Neuhuber et al observent une diminution de l'accumulation des mRNAs *HPT* nucléaires et une méthylation accrue du promoteur *35S* par rapport aux lignées de tabacs transgéniques stables (Neuhuber et al., 1994). L'insertion d'un second locus partiellement homologue pour le promoteur *35S* dans ces lignées augmente le silencing du transgène *35S:HPT* (Neuhuber et al., 1994). Ces résultats, similaires à ceux obtenus par Matzke et al, suggèrent que l'homologie de séquence au niveau du promoteur des transgènes induit un silencing transcriptionnel capable d'agir en *trans*.

Par la suite, une étude clef met en évidence que TGS et PTGS peuvent coexister dans la cellule, mais résultent de mécanismes distincts (Park et al., 1996). Pour le montrer, deux lignées transgéniques de tabacs précédemment caractérisées sont croisées : i) la lignée *H₂* porte plusieurs copies du gène bactérien *HPT* sous le contrôle du promoteur *35S* et du gène *OCS* d'*A. tumefasciens* sous le contrôle du promoteur du gène *NOS* d'*A. tumefasciens*. Ce dernier est hyperméthylé et potentiellement capable d'induire le silencing de transgènes portant le

promoteur *NOS* (Matzke et al., 1989, 1993, 1994) ; ii) la lignée 271 porte plusieurs copies du gène endogène de la *NITRITE REDUCTASE* (*NIR*) en anti-sens (*RIN*) sous le contrôle du promoteur 35S et le gène *NPT-II* d'*E. Coli* sous le contrôle du promoteur 19S du CaMV et est capable d'induire en *trans* le silencing de transgènes portant les promoteurs 35S ou 19S et du gène *NIR* endogène au niveau transcriptionnel (Vaucheret et al., 1992; Vaucheret, 1993, 1994; Elmayan and Vaucheret, 1996). Park et al observent que les croisements $H_2 \times 271$ sont sensibles à l'hygromycine et présentent un phénotype de chlorose caractéristique de l'absence de l'activité de la protéine NIR (Park et al., 1996). Cependant, l'accumulation nucléaire des mRNAs *NIR* endogènes n'est pas affectée alors que l'accumulation nucléaire des mRNAs *HPT* est perdue et le promoteur du transgène 35S:*HPT* est fortement méthylé (Park et al., 1996). A la suite d'une série de backcross de la F1 $H_2 \times 271$ avec un tabac sauvage et la ségrégation du transgène 35S:*RIN*, la méthylation des cytosines du promoteur 35S:*HPT* n'est que partiellement perdue et plus le niveau de méthylation résiduel est fort, plus l'expression du gène *HPT* est réduite, alors que dès le premier backcross le silencing du gène endogène *NIR* est levé (Park et al., 1996). Ils suggèrent alors que le transgène 35S:*HPT* subit un silencing transcriptionnel (TGS) héritable et dépendant de l'homologie de la séquence promotrice du transgène et du gène cible et en partie de la méthylation du promoteur, quand le transgène 35S:*RIN* subit un silencing post-transcriptionnel (PTGS) réversible et dépendant de l'homologie dans la séquence transcrite du transgène et du gène cible (Park et al 1996).

Une étude ultérieure démontre d'ailleurs que le silencing d'un transgène constitué du gène de résistance à la phosphinotricine *BAR* sous le contrôle de différentes versions du promoteur 35S mutées aux sites CG et CNG est toujours induit par le locus 271 (Diéguez et al., 1998). De plus, ils constatent une hyperméthylation des cytosines résiduelles du promoteur du transgène 35S:*BAR* en absence des sites CG et CNG, suggérant que la méthylation n'est pas nécessaire à la mise en place du TGS mais plutôt à son maintien (Diéguez et al., 1998). Par la suite, afin de tester si la transcription du promoteur suffit à induire la méthylation des promoteurs homologues et le silencing en *trans* des gènes en aval, des tabacs transgéniques stables portant le gène bactérien de résistance à la kanamycine *NPT-II* sous le contrôle du promoteur du gène bactérien *NOS* (construction *K* ; Jakowitsch et al., 1999) sont transformés avec une construction chimérique portant le promoteur 35S suivi du promoteur du gène *NOS* et du terminateur du gène *NOS* (construction *H* ; Mette et al., 1999). Chez une lignée de ces tabacs, ils observent une perte de résistance à la kanamycine corrélée à la méthylation du promoteur *NOS* de la construction *K* ainsi que la production d'un RNA aberrant sans polyadénylation en 3' issus de

la construction *H* (Mette, 1999). De plus, ils constatent chez cette lignée la présence de deux copies tronquées en IR de la construction *H* et, après un croisement avec la lignée 271 précédemment décrite capable d'induire en *trans* le silencing de transgène portant un promoteur 35S (Vaucheret et al., 1992; Vaucheret, 1993, 1994; Elmayan and Vaucheret, 1996), ils observent que la transcription de la construction *H* est inhibée et que le silencing de la construction *K* est levé (Mette, 1999). En cohérence avec les observations de Wassenegger et al., ces résultats suggèrent que les RNAs aberrants issus de la construction *H*, potentiellement capables d'adopter une structure en double brin, sont responsables de la méthylation du promoteur *NOS* de la construction *K* et de son silencing par TGS en *trans* (Mette, 1999). L'année suivante, Mette et al confirment cette hypothèse et montrent que les RNAs issus de l'IR du promoteur *NOS* ne sont pas sensibles à la dégradation par une enzyme RNase spécifique des RNAs simples brins, confirmant ainsi leur structure double brin (Mette et al., 2000).

En amont de l'étude clef de Park et al., 1996 qui distingue le TGS et le PTGS des transgènes chez le tabac, les travaux de Napoli et al et van der Krol et al mettaient en évidence le phénomène de co-suppression du gène endogène *CHS* induit par le transgène 35S:*CHS* chez des pétunias transgéniques (Bologna et al., 2018; van der Krol et al., 1990). Les RNAs endogènes *CHS* s'accumulent dans le noyau mais pas dans le cytoplasmes des plantes transformées, suggérant dès lors un mécanisme de silencing post-transcriptionnel (PTGS) (van der Krol et al., 1990). Des résultats similaires sont obtenus quelques années plus tard chez le pétunia, où l'introduction d'un transgène portant la partie 5' du gène de la *BETA-GLUCURONIDASE (UIDA)* d'*E. Coli* et la partie 3' du gène endogène *CHS* sous le contrôle du promoteur 35S conduit au silencing du transgène et du gène *CHS* endogène sans pour autant affecter l'accumulation des mRNAs *CHS* dans le noyau, suggérant que ce silencing résulte aussi d'un mécanisme post-transcriptionnel (Van Blokland et al., 1994). Afin de tester si cet effet est dû à la méthylation du promoteur du transgène, ils transforment les pétunias avec un transgène portant le gène *NPT-II* d'*E. Coli* et la partie transcrite du gène endogène *CHS* (Van Blokland et al., 1994). Ils observent alors que le PTGS du gène endogène *CHS* est toujours induit et semble lié à la présence de la séquence transcrite du gène *CHS* dans le transgène de manière indépendante de la méthylation du promoteur du transgène (Van Blokland et al., 1994). Des résultats similaires sont obtenus chez *Nicotiana tabacum*, où un transgène portant le gène *BETA-1,3-GLUCANASE (GNI)* de *Nicotiana plumbaginifolia* sous le contrôle du promoteur 35S est silencé chez les plantes homozygotes pour l'insertion mais pas chez les plantes

hétérozygotes pour l'insertion, alors que la transcription du transgène n'est pas affectée dans le noyau des plantes homozygotes et hétérozygotes (de Carvalho et al., 1992). Quelques années plus tard, ils notent aussi que l'expression du gène endogène *GNI* est réprimée (de Carvalho Niebel et al., 1995). Si l'hypothèse d'une interaction ADN-ADN dans la mise en place de ce silencing est considérée dans un premier temps, cet effet est également observé dans une autre étude chez des tabacs transgéniques homozygotes et hétérozygotes exprimant fortement un transgène *35S:UIDA*, suggérant que c'est le niveau de transcription du transgène qui est déterminant dans l'induction du PTGS (Elmayan and Vaucheret, 1996). Par ailleurs, une étude complémentaire montre que chez les tabacs *35S:GNI* silencés, des RNAs de taille supérieures ou inférieures au mRNA *GNI* s'accumulent : les premiers résultent d'une transcription aberrante du gène *GNI* et les seconds, issus de la partie 5' du mRNA et altérés en 3' ou issus de la partie 3' du mRNA et altérés en 5', résultent vraisemblablement du clivage du mRNA par une activité endonucléase suivi d'une dégradation par une activité exonucléase à partir du site de clivage (van Eldik et al., 1998). Des résultats similaires sont obtenus chez le pétunia dans le cadre du silencing induit par un transgène portant le gène *CHS* (Metzlaff et al., 1997). De plus, Metzlaff et al montrent *in vitro* qu'une partie 3' de la séquence codante du gène *CHS* est complémentaire à une partie de l'UTR en 3' et qu'elles peuvent s'apparier. Ils suggèrent alors que cette structure double brin pourrait être reconnue et induire la formation des RNAs aberrants (Metzlaff et al., 1997).

Comme le TGS qui peut agir en *trans* sur les gènes partageant les mêmes séquences promotrices, le PTGS peut agir en *trans* sur les gènes partageant les mêmes séquences transcrites. Ces deux mécanismes ne sont d'ailleurs pas exclusifs comme le montre l'exemple remarquable du locus *271* qui est capable de faire simultanément du TGS et du PTGS chez le tabac (Vaucheret et al., 1992; Vaucheret, 1993, 1994; Elmayan and Vaucheret, 1996). Une analyse ultérieure montrera d'ailleurs que des dsRNAs correspondants à l'ensemble des séquences promotrices et transcrites de ce locus sont produits (Mourrain et al., 2007). Par ailleurs, des analyses de délétions chez le tabac montrent que la taille de l'homologie nécessaire à la reconnaissance d'un gène cible *en trans* est inférieure à 30 nucléotides (-nt) mais que le degré d'homologie doit être élevé, suggérant que le silencing est un mécanisme de régulation de l'expression du génome hautement spécifique (Thierry and Vaucheret, 1996; Voinnet et al., 1998; Pélissier et al., 1999; Pélissier and Wassenegger, 2000).

A la même époque, l'équipe d'Hervé Vaucheret montre que les plantes faisant du PTGS produisent un signal mobile de silencing (Palauqui, 1997). Ils greffent des tabacs transgéniques exprimant correctement un transgène permettant de sur-exprimer le gène de la *NITRATE REDUCTASE 2 (NIA2)*, indispensable à l'assimilation du nitrate, sur des porte-greffes transgéniques portant le même transgène silencé par PTGS (Palauqui, 1997). Chez ces derniers, le transgène est silencé et induit le silencing des gènes endogènes *NIA1* et *NIA2*, conduisant à un phénotype de chlorose sur les feuilles. Or, ce phénotype est retrouvé après greffe chez les greffons où une suppression de l'accumulation des mRNAs *NIA2* est constatée, démontrant l'existence d'un signal responsable du silencing du gène *NIA2* capable de se propager de manière systémique du porte-greffe au greffon (Palauqui, 1997). Dans le même sens, Voinnet et Baulcombe observent que chez des tabacs transgéniques portant un transgène *35S:GFP* agroinfiltrés avec une construction dsRNA *GFP*, le silencing du transgène est transmis dans les feuilles systémiques (Voinnet and Baulcombe, 1997). Peu après, Hamilton et Baulcombe découvrent l'implication de RNAs de petites tailles dans des cas de silencing induits par un transgène ou par une infection virale chez la tomate, suggérant alors que ces petits RNAs constituent le signal du PTGS (Hamilton, 1999).

2) PTGS et défense anti-virale

Toujours au milieu des années 90, chez les plantes, le premier lien entre PTGS et résistance aux infections de virus est établi. En effet, différentes équipes ont observé chez le tabac que l'introduction d'une séquence d'origine virale chez la plante conduit à une forme de résistance à l'infection de virus de séquences homologues et qualifie ce phénomène de Pathogen-Derived Resistance (PDR) ou Homology-Dependant virus Resistance (HDR) (Sanford and Johnston, 1985; Abel et al., 1986; Nejidat, 1990; Baulcombe, 1994, 1996). En 1995, Mueller et al montrent que la HDR au *Potato virus X (PVX)* chez des tabacs transgéniques portant l'Open Reading Frame (ORF) de la *RNA-Dependant RNA POLYMERASE (RdRP)* du PVX sous le contrôle du promoteur *35S* est corrélée avec une faible expression du transgène, une forte homologie avec la souche de PVX utilisée pour l'infection et la capacité d'inactiver *in trans* un transgène *35S:PVX* exprimé de manière stable (Mueller et al., 1995). C'est également le cas pour des versions tronquées du transgène pour l'ORF *RdRP* ou délétées de leur codon Start, démontrant que la traduction du RNA *RdRP* n'est pas nécessaire à la mise en place de la HDR. De plus, l'accumulation nucléaire des RNAs du PVX est similaire entre les plantes capables

de HDR et les plantes sensibles au PVX (Mueller et al., 1995). Ils suggèrent alors que la HDR est un mécanisme post-transcriptionnel similaire au PTGS des transgènes (Mueller et al., 1995).

De manière étonnante, une autre équipe montre la même année que des tabacs transformés avec l'ORF de la *COAT PROTEIN (CP)* du *Tobacco mosaic virus (TMV)* sont hypersensibles à l'infection par le TMV, contrairement aux tabacs transformés avec une version mutée de la *CP* du TMV, suggérant que l'intégrité de la protéine virale codée peut affecter le silencing induit. Quelques années plus tard, il sera démontré que les virus peuvent produire des protéines capables d'inhiber le silencing appelées Viral Suppressor of RNA Silencing (VSR) (Anandalakshmi et al., 1998; Voinnet et al., 1999).

Par la suite, English et al montrent que des tabacs portant une construction *35S:UIDA* silencée sont résistants à l'infection d'une version du PVX portant le gène *UIDA*, contrairement aux tabacs *35S:UIDA* non silencés (English et al., 1996). Ils observent également ce résultat avec d'autres versions du PVX portant des séquences homologues à différentes lignées transgéniques de tabac et de tomate. Ils constatent que le silencing des tabacs *35S:UIDA* est post-transcriptionnel et corrélé avec une méthylation des cytosines en 3' du transgène *35S:UIDA*. Ils proposent alors un modèle où le silencing d'un transgène *35S:UIDA* peut être induit par la production de RNAs aberrants et affecter l'expression du *PVX-UIDA* en *trans* par homologie de séquence (English et al., 1996; Baulcombe and English, 1996). Dans une étude ultérieure, ils confirment ces résultats et montrent en plus que des tabacs transgéniques *35S:GUS* silencés résistants à l'infection du *PVX-UIDA* deviennent sensibles à l'infection du *PVX-UIDA* après un croisement à la lignée *271*, capable de silencer en *trans* les transgènes portant un promoteur *35S* (English et al., 1997). Cependant, chez les tabacs transgéniques silencés et non silencés croisés à *271*, l'expression du transgène *UIDA* est perdue. La transcription du transgène est donc nécessaire pour l'inactivation en *trans* des séquences homologues virales (English et al., 1997).

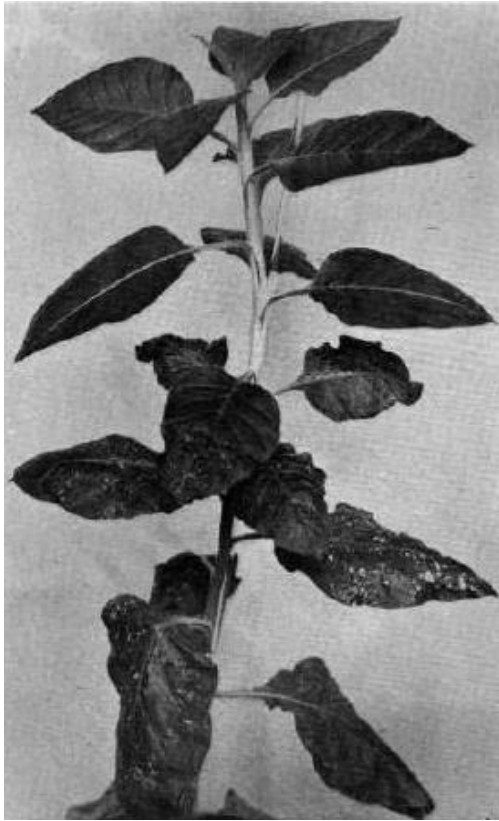


Figure 3 : Première mise en évidence du phénomène de recovery

Figure issue de l'article Wingard, 1928. Des plantes de *N. tabacum* turques sont photographiées 23 jours post-inoculation avec le TRSV

Ces résultats amènent Baulcombe à rappeler les travaux de Wingard mettant en évidence le phénomène de « recovery » en 1928. Sur des tabacs infectés par le nepovirus à RNA simple brin (ssRNA) *Tobacco ring spot virus* (TRSV), Wingard constate à l'époque que les symptômes infectieux observés sur les feuilles inoculées diminuent voire disparaissent sur les feuilles systémiques (Wingard, 1928 ; **Figure 3**). Ces dernières sont également résistantes à une seconde inoculation avec le TRSV. Toutefois, le virus reste présent dans la sève des feuilles systémiques puisqu'une infection de plants de tabac sains par la sève de plantes ayant subies le recovery permet d'induire des symptômes infectieux. Si l'état de l'art ne permet pas encore l'élucidation des mécanismes sous-jacents à ce phénomène, Wingard suggère déjà une immunité acquise contre l'infection par le TRSV dans les feuilles systémiques. Ce n'est que 67 ans plus tard, que Baulcombe et son équipe démontrent le lien

entre le recovery et le RNA silencing. Chez des plants de tabac *N. clevelandii* infectés par le nepovirus à ssRNA *Tomato black ring virus* (TBRV, souche W22), ils observent le recovery dans les feuilles systémiques, avec une disparition des symptômes infectieux observés dans les feuilles sous-jacentes (Ratcliff, 1997). Ils infectent alors ces feuilles systémiques avec une version modifiée du Potexvirus à ssRNA *Potato virus X* (PVX), portant une insertion du génome de la souche W22 (*PVX.W22*), et ils constatent une diminution de l'accumulation des RNAs du virus *PVX.W22*, contrairement aux feuilles systémiques inoculées avec le virus contrôle *PVX.GFP* portant une insertion *GFP*, ou avec le *PVX.W22* et le *PVX.GFP* seuls (Ratcliff, 1997). L'immunité acquise des feuilles systémiques est donc liée au ciblage du RNA viral et est similaire au silencing des transgènes. Dès lors, ils suggèrent que le recovery et le RNA silencing sont des mécanismes liés et des expériences complémentaires montrent que le PTGS est un mécanisme de défense général contre les infections virales (Ratcliff et al., 1999), ce qui sera définitivement prouvé en constatant que des mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients pour le PTGS sont hypersensibles à l'infection virale (Mourrain et al., 2000).

Par la suite, l'implication du PTGS dans la défense contre les virus est également montrée chez les animaux. Chez la drosophile, Li et al montrent que la protéine B2 du virus à ssRNA *Flock house virus* (FHV) est capable d'inhiber le silencing de tabacs transgéniques *35:GFP* instables, avec une plus forte accumulation des RNAs *GFP* et une plus faible accumulation de petits RNAs *GFP* par rapport aux plantes non-agroinfiltrées (Li, 2002). L'infection de cellules de drosophiles par le FHV induit également la production de petits RNAs issus de la séquence du FHV, corrélée avec une diminution de l'accumulation des RNAs viraux (Li, 2002). De plus, l'induction du RNAi du gène *ARGONAUTE* (*AGO*)- 2, impliqué dans le RNAi (Hammond, 2001), par l'introduction d'un dsRNA *AGO2* entraîne une plus forte accumulation des RNAs du FHV alors que l'introduction d'un dsRNA homologue à la séquence du FHV diminue l'accumulation des RNAs du FHV par rapport aux cellules sauvages infectées (Li, 2002). Enfin, une version mutée du FHV pour l'ORF *B2* n'est pas capable d'infecter les cellules hôtes sauvages alors que c'est le cas pour les cellules sujettes au RNAi d'*AGO2* (Li, 2002).

Ces résultats seront confirmés par la suite et Aliyari et al montrent que des dsRNAs sont produits à partir de la partie 5' du génome du FHV, clivés majoritairement par la protéine de type endoribonucléase DICER-2 (*DCR-2*) (Galiana-Arnoux et al., 2006; Aliyari et al., 2008). La protéine B2 du virus d'insectes et de mammifères à ssRNA *Nodamura virus* (NoV) est similaire à la protéine B2 du FHV et est aussi capable d'inhiber le RNAi des cellules humaines en se liant aux substrats et aux produits double brin des protéines DICER *in vivo* et *in vitro* (Sullivan and Ganem, 2005). Des résultats similaires sont obtenus la même année avec la protéine NON STRUCTURAL (NSs) du virus d'insectes et de mammifères à ssRNA négatif *La Crosse encephalitis virus* (Soldan et al., 2005) et nombreux autres VSR sont identifiés à cette période chez les virus de mammifères (Schütz and Sarnow, 2006). Mais ce n'est qu'en 2013 que l'implication du RNAi dans la défense anti-virale des mammifères est définitivement prouvée : chez des cellules de souris infectées avec l'*Encephalomyocarditis virus* (EMCV) ou le *Nodamura virus* (NoV), Maillard et al observent la formation de duplex de petits RNAs d'environ 22-nt comprenant comme chez les plantes une extrémité sortante de 2-nt en 3' et qui dérivent des supports double brin de la réplication virale (Maillard et al., 2013). Ils observent que ces petits RNAs sont majoritairement associés à la protéine ARGONAUTE (*AGO*) 1 et que leur production est inhibée chez le mutant pour l'endonucléase *dicer*. De plus, une version mutée du NoV dépourvue de son VSR B2 est capable de se répliquer fortement chez les cellules de souris mutées pour les 4 gènes *AGOs* par rapport aux cellules de souris *ago1/2/3/4* où

l'expression ectopique de *AGO2* est induite (Maillard et al., 2013). Ces résultats confortent la présence du RNAi anti-viral chez les mammifères.

Chez le nématode *C. elegans*, l'infection par le virus de mammifères à ssRNA négatif *Vesicular stomatitis virus* (VSV) est plus forte chez des cellules déficientes pour le RNAi et plus faible chez des cellules avec un RNAi plus fort (Wilkins et al., 2005). De plus, elle induit la production de petits RNAs d'environ 20-nt chez les cellules sauvages mais pas chez les cellules déficientes pour le RNAi (Wilkins et al., 2005). Des résultats similaires ont obtenus par Schott et al la même année et montrent que la protéine endoribonucléase DICER (DCR) - 1 joue un rôle important dans le RNAi dirigé contre le VSV (Schott et al., 2005). Une autre équipe montre que l'infection de *C. elegans* par le FHV induit la production de petits RNAs dont l'action dépend de la protéine RDE-1, homologue aux ARGONAUTES des plantes et vertébrés, et auxquels se lie *in vitro* le VSR B2 (Lu et al., 2005). Même si aucun virus naturel de nématodes n'ait été identifié à cette époque, ces résultats suggèrent l'implication du RNAi dans la défense des nématodes contre les infections virales.

Bien que le nombre d'acteurs du RNAi et leurs rôles varient entre les différents règnes du vivant, le RNAi semble être un mécanisme général de défense contre les infections et les acides nucléiques invasifs (Ding and Voinnet, 2007; Obbard et al., 2009). Aujourd'hui, le RNA silencing ou RNA interférence (RNAi) désigne d'une manière générale un mécanisme répressif affectant la transcription, l'accumulation et la traduction des RNAs et faisant intervenir des petits RNAs d'une taille comprise entre 20 et 30-nt (désignés sous le terme de siRNAs) produits à partir d'un RNA double brin (dsRNA). Il est conservé chez tous les Eucaryotes, à l'exception de certaines levures dont *Saccharomyces cerevisiae* (Drinnenberg et al., 2009). Chez les plantes, on continue à utiliser les termes de TGS et de PTGS pour distinguer facilement le niveau auquel le silencing agit. TGS et PTGS sont impliqués dans la régulation de nombreux processus développementaux, dans la réponse aux facteurs environnementaux et dans la défense des plantes contre les acides nucléiques invasifs endogènes ou exogènes (Meins et al., 2005; Sudan et al., 2018; Baulcombe and Dean, 2014; Elvira-Matelot et al., 2017).

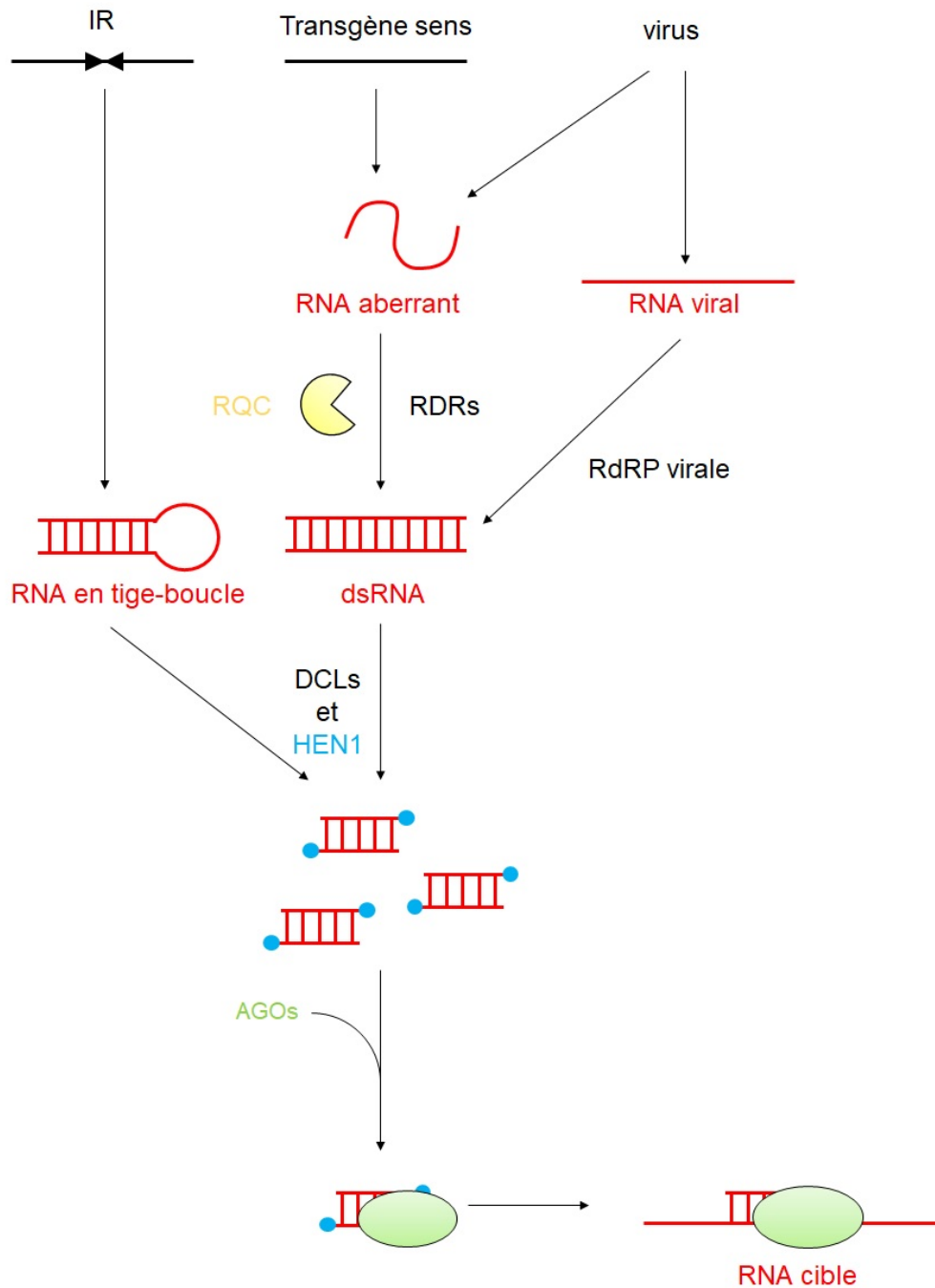


Figure 4 : Modèle simplifié du RNA silencing chez les plantes

De nombreux éléments peuvent induire le RNAi : par exemple, la présence de séquences en Inverse-Repeat (IR) sur l'ADN capables d'adopter des structures en tige-boucle sur les RNAs, des RNAs aberrants issus de transgène sens ou du génome viral non-pris en charge par le RNA Quality Control (RQC) transformés en dsRNAs par une RNA-dépendant RNA POLYMERASE (RDR), les dsRNAs issus de la réplication de virus produits par une RNA-dépendant RNA POLYMERASE (RdRP) virale. Après clivage par une protéine DICER-LIKE (DCL), un duplex de petits RNAs est produits. Il est méthylé en 3' par la protéine HUA ENANCER (HEN) 1 avant d'être pris en charge par une protéine ARGONAUTE (AGO) au sein du complexe RNA-Induced Silencing Complex (RISC) qui sélectionne le brin guide. Selon les acteurs impliqués, le complexe AGO/petit ARN cible une séquence homologue dans le noyau et entraîne le recrutement de facteurs impliqués dans la méthylation de l'ADN complémentaire (TGS) ou entraîner le ciblage du RNA complémentaire dans le cytoplasme et sa dégradation ou son inhibition traductionnelle (PTGS).

II] Mécanismes du RNA silencing chez les plantes

Sur le plan biochimique, TGS et PTGS partagent plusieurs points communs. Ils démarrent par la formation d'un RNA double brin (dsRNA) et son clivage en petits RNAs double brin de 20-30 nucléotides (-nt) par une enzyme RNase III de type DICER. Ces petits RNAs sont ensuite pris en charge par une protéine ARGONAUTE pour exécuter le silencing (Bologna and Voinnet, 2014 ; **Figure 4**).

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, il existe quatre enzymes appelées DICER-LIKE (DCL) 1, DCL2, DCL3 et DCL4 homologues aux DICERs des animaux, qui produisent respectivement des micro-RNAs (miRNAs) de 21-nt (DCL1) et des short interfering RNAs (siRNAs) de 21-nt (DCL4), 22-nt (DCL2) ou 24-nt (DCL3) dont nous détaillerons la biogenèse par la suite (Song and Rossi, 2017). Les duplex de miRNAs et siRNAs sont ensuite méthylés à leurs extrémités sortantes 3', signatures de l'action des DCLs, par la RNA methylase HUA ENHANCER (HEN1), ce qui les protège de l'uridylation et de la dégradation (Li et al., 2005). L'un des deux brins de ces duplex est sélectionné par l'une des 10 protéines de la famille ARGONAUTE (AGO) (Vaucheret, 2008). Les miRNAs, siRNAs endogènes et siRNAs dérivés de transgènes ou de virus de 21 et 22-nt s'associent aux protéines AGO1, AGO2, AGO5, AGO7 ou AGO10 (Mallory and Vaucheret, 2010; Carbonell and Carrington, 2015; Ma and Zhang, 2018). Les siRNAs endogènes ou dérivés de transgènes de 24-nt s'associent à AGO4, AGO6 et AGO9 (Mallory and Vaucheret, 2010; Ma and Zhang, 2018). Quant au rôle de AGO3 et AGO8, il est aujourd'hui encore mal connu. Les protéines AGOs possèdent un sillon dans lequel peuvent se glisser les longs RNAs complémentaires au petit RNA (Poulsen et al., 2013). Une fois le complexe AGO/petit RNA/long RNA formé, différents évènements de TGS et de PTGS peuvent se produire (Elvira-Matelot et al., 2017) :

- clivage du long RNA, catalysé par le domaine PIWI de la protéine AGO1, AGO2, AGO5 ou AGO7 (PTGS)
- blocage de la traduction du long RNA par AGO10 (PTGS)
- adressage d'AGO4, AGO6 ou AGO9 à l'ADN homologue au petit RNA pour guider sa méthylation et bloquer sa transcription par la POLYMERASE II (TGS)

- recrutement des RNA-dependant RNA POLYMERASE (RDRs) pour générer un nouveau dsRNA et produire des siRNAs dits secondaires (uniquement dans le cas de clivages générés par AGO1 associés à des siRNAs de 22-nt : (Garcia-Ruiz et al., 2010; Chen et al., 2010; Wang et al., 2011))

De l'origine du dsRNA et des facteurs du RNAi impliqués dans sa prise en charge dépendent la diversité des petits RNAs produits et leur action. Dans cette seconde partie, nous introduirons donc dans un premier temps les différentes voies de production des dsRNAs, puis nous décrirons les différents types de petits RNAs et les acteurs impliqués dans leur production. Enfin, nous décrirons les différents rôles biologiques des petits RNAs selon les acteurs qui les prennent en charge vis-à-vis des gènes endogènes et des acides nucléiques invasifs endogènes tel que les éléments transposables, mais également dans la réponse de la plante face aux acides nucléiques invasifs exogènes.

1) Les voies de production des dsRNAs

Les dsRNAs inducteurs de RNAi peuvent dériver du repliement d'un long RNA simple brin capable d'adopter une structure secondaire en tige boucle ou « hairpin ». C'est le cas des miRNAs produits à partir des gènes *MIR* et des endoIR-siRNAs (« inverse-repeats » IR endogènes) produits à partir de longues séquences répétée inversées du génome (Bologna and Voinnet, 2014 ; **Figure 4**). C'est également le cas lorsque des transgènes contiennent une séquence en IR intentionnellement construite dans le but de produire des siRNAs (Stam et al., 1998; Béclin et al., 2002; Smith et al., 2007). Dans ce cas, le PTGS induit est qualifié d'IR-PTGS.

Les dsRNAs peuvent également dériver de l'appariement de deux longs RNAs simple brin transcrits à partir de deux régions distinctes du génome ou à partir d'une région du génome portant deux gènes chevauchants en orientation inverse (Zhang et al., 2012 ; **Figure 4**). Les siRNAs produits à partir de ces dsRNAs sont appelés nat-siRNAs (pour « natural anti-sense » siRNAs). Lorsqu'un transgène produit volontairement un RNA anti-sense du mRNA d'un gène endogène ou d'un autre transgène on parle alors d'anti-sense-PTGS (ou AS-PTGS).

Enfin, les dsRNAs peuvent dériver de l'action d'une RNA-dependant RNA POLYMERASE (RDR) cellulaire sur certains types de RNAs (Bologna and Voinnet, 2014 ; **Figure 4**). Il en

existe 6 chez *Arabidopsis thaliana* (Wassenegger and Krczal, 2006), et si les protéines RDR3, RDR4 et RDR6 n'ont pas de fonction connues, l'implication des protéines RDR1, RDR2 et RDR6 dans de nombreux processus de régulation de l'expression des gènes endogènes et exogènes est caractérisée (Willmann et al., 2011; Prakash et al., 2017). Ainsi, les transcrits produits par la DNA-dépendant RNA POLYMERASE Pol IV sont immédiatement transformés en dsRNAs par RDR2 pour former de courts dsRNAs qui sont clivés en siRNAs de 24-nt par DCL3 dans le cadre du TGS (Xie et al., 2004; Lu et al., 2006; Matzke and Birchler, 2005; Kasschau et al., 2007; Elvira-matelot et al., 2017). D'autres RNAs, considérés comme aberrants, sont transformés en dsRNAs par RDR1 ou RDR6 et clivés en siRNAs de 21- et 22-nt par DCL4 et DCL2 (Luo and Chen, 2007; Voinnet, 2008; Willmann et al., 2011; Yoshikawa, 2013; Martínez de Alba et al., 2015). Dans cette catégorie, on trouve les RNAs issus du clivage de longs mRNAs par les complexes AGO1/miRNA ou AGO1/siRNA mettant en jeu des miRNAs et siRNAs de 22-nt, ou du complexe AGO7/miR390. Les bases de cette spécificité ne sont pas connues, mais ces associations et elles seules permettent la production de ce qu'on appelle les siRNAs secondaires (Chen et al., 2010; Garcia-Ruiz et al., 2010; Wang et al., 2011). Par ailleurs, RDR1 et RDR6 sont capables de transformer en dsRNAs les RNAs sans coiffe ou sans queue polyadénylée (polyA) ayant échappé à un processus appelé RNA Quality Control (RQC) qui ordinairement élimine les RNAs aberrants incapables d'être traduits normalement (Moreno et al., 2013; Martinez de Alba et al., 2015). C'est par exemple le cas des transgènes exprimés sous le contrôle d'un promoteur fort ainsi que des virus (Dalmay et al., 2000; Prakash et al., 2017; Garcia-Ruiz et al., 2010). On parlera alors de Sens-PTGS (ou S-PTGS).

2) Le RNA Quality Control

Le RNA Quality Control est un mécanisme de surveillance de la qualité des RNAs et de dégradation des RNAs aberrants, dangereux pour l'intégrité de la plante en cas de traduction en protéines aberrantes (Liu and Chen, 2016). Parmi les anomalies détectées par le RQC, on peut citer l'absence de coiffe en 5' ou de queue polyA en 3', la poly-uridylation en 3' mais aussi des anomalies plus subtiles comme la présence d'un codon Stop précoce (cible du nonsense-mediated decay, NMD), l'absence de codon Stop (cible du nonstop decay, NSD), ou encore la présence d'une séquence retardant la progression des ribosomes lors de la traduction (cible du no-go decay, NGD). La détection de RNAs aberrants entraîne une élimination de la coiffe en 5' et une déadénylation de la queue polyA en 3', suivies d'une dégradation de 5' vers 3' par les

exoribonucléases (XRN) et une dégradation de 3' vers 5' sous l'action de l'exosome (EXO) (Elvira-matelot et al, 2017).

Dans le cytoplasme, les enzymes nécessaires à la mise en place du RQC se trouvent dans les Processing (P)-bodies alors que le PTGS prend place dans les siRNA-bodies (Liu and Chen, 2016). Ces corpuscules sont distincts mais toujours adjacents (Martínez de Alba et al., 2015). Le RQC ne dégrade que les RNAs aberrants alors que le PTGS dégrade tous les RNAs complémentaires aux siRNAs, qu'ils soient aberrants ou non. C'est probablement pour cela que le PTGS n'est en général pas utilisé contre les gènes endogènes, au profit d'un RQC plus sélectif (Moreno et al., 2013). Cependant, les RNAs aberrants peuvent passer des P-bodies aux siRNA-bodies et activer le S-PTGS dans certaines conditions. Cela peut survenir lors d'une saturation du RQC par une trop grande quantité de RNA aberrants, par exemple lors d'une infection virale ou lorsqu'un locus transgénique est fortement transcrit. En effet, l'infection par certains virus induit également à la production de siRNAs à partir de milliers de mRNAs endogènes via RDR1 ou RDR6, suggérant que ces virus produisent des protéines qui inactivent le RQC (Cao et al., 2014). Une étude récente a d'ailleurs démontré l'inhibition de la formation du complexe d'élimination de la coiffe par la VIRAL GENOME-LINKED PROTEIN (VPg) ainsi que l'inhibition de l'activité l'exoribonucléase XRN4 par la protéine HC-Pro des Potyvirus (Li and Wang, 2018). De plus, les transgènes qui induisent le PTGS produisent une plus forte quantité de RNAs aberrants non coiffés que les transgènes non silencés (Parent et al., 2015b). Cela peut également survenir lorsque le RQC n'est plus fonctionnel. C'est ainsi que dans des mutants déficients en RQC, on voit apparaître des siRNAs à partir de milliers de mRNAs endogènes via RDR1 ou RDR6, responsables de la létalité ces mutants (Yu et al., 2015; Martínez de Alba et al., 2015; Zhang et al., 2015).

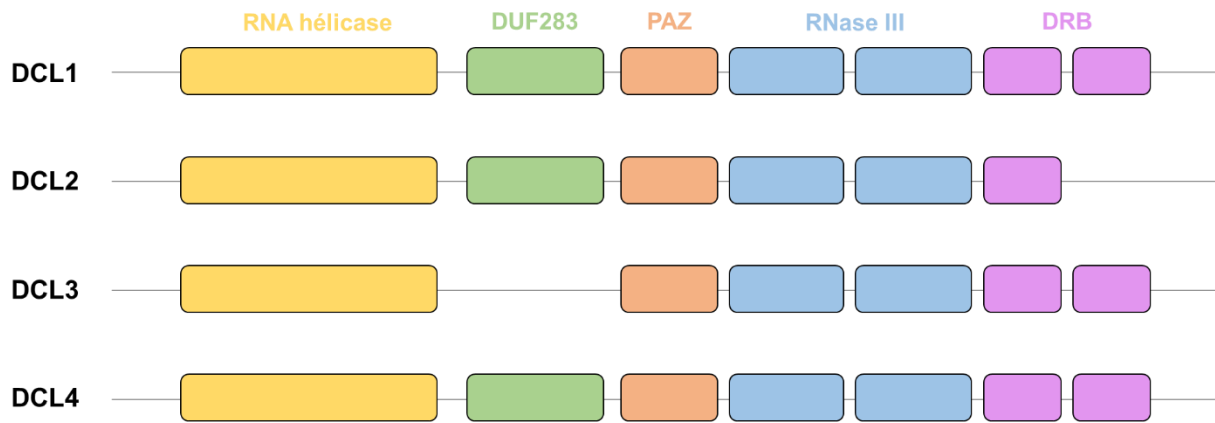


Figure 5 : Structure des protéines DICER-LIKE chez *Arabidopsis thaliana*

La légende est détaillée dans le texte à droite. Les protéines DCL1, DCL2 et DCL3 sont plus proches phylogénétiquement entre elles qu'avec la protéine DCL4. DCL1 et DCL4 sont constituées des mêmes domaines, quand il n'y a qu'un seul domaine de fixation aux dsRNAs (DRB) chez DCL2 et pas de domaine PAZ chez DCL3.

3) Diversité des petits RNAs et voies de biosynthèse

a) Les protéines DICER-LIKE

Les protéines DICER-LIKE (DCL) sont des endoribonucléases de type III principalement nucléaires spécifiques des dsRNAs (Laubinger et al., 2008). La première caractérisation *in vitro* de l'activité des DCLs chez la plante modèle *A. thaliana* est observée à partir de l'incubation d'extraits purifiés de cultures cellulaires et des inflorescences avec des dsRNAs de 400 paire de bases (pb), conduisant à la formation de duplex de petits RNAs 21 à 24-nt avec des extrémités sortantes de 2 à 3-nt en 3' (Qi et al., 2005), en cohérence avec des études précédentes chez le blé et le chou (Tang, 2003). Elles sont constituées de 6 domaines fonctionnels conservés chez les plantes, les procaryotes et les animaux (Liu et al., 2009; Mukherjee et al., 2013 ; **Figure 5**) :

- un domaine PAZ (Piwi Argonaute and Zwiille) qui fixe les extrémités 3' des précurseurs dsRNAs (MacRae, 2006)
- deux domaines de clivage RNase III liés au domaine PAZ par une hélice *alpha* et déterminants dans la taille du duplex généré (Lamontagne et al., 2001; MacRae, 2006). Ils sont composés d'un motif de 9 acides aminés hautement conservés chez les protéines RNase III (Zhang et al., 2004; Comella et al., 2008; Du et al., 2008).
- les domaines DExD/H (DEAD box et hélicase) impliqués dans le mouvement de la protéine DCL le long du dsRNA de manière ATP-dépendante et également impliqués dans la détermination de la taille du petit RNA (Jacobsen et al., 1999; Collins and Cheng, 2005; Liu et al., 2012).
- le domaine DUF283 qui pourrait jouer un rôle dans la fixation au dsRNA cible et le recrutement des co-facteurs aux DCLs (Dlakić, 2006; Qin et al., 2010).

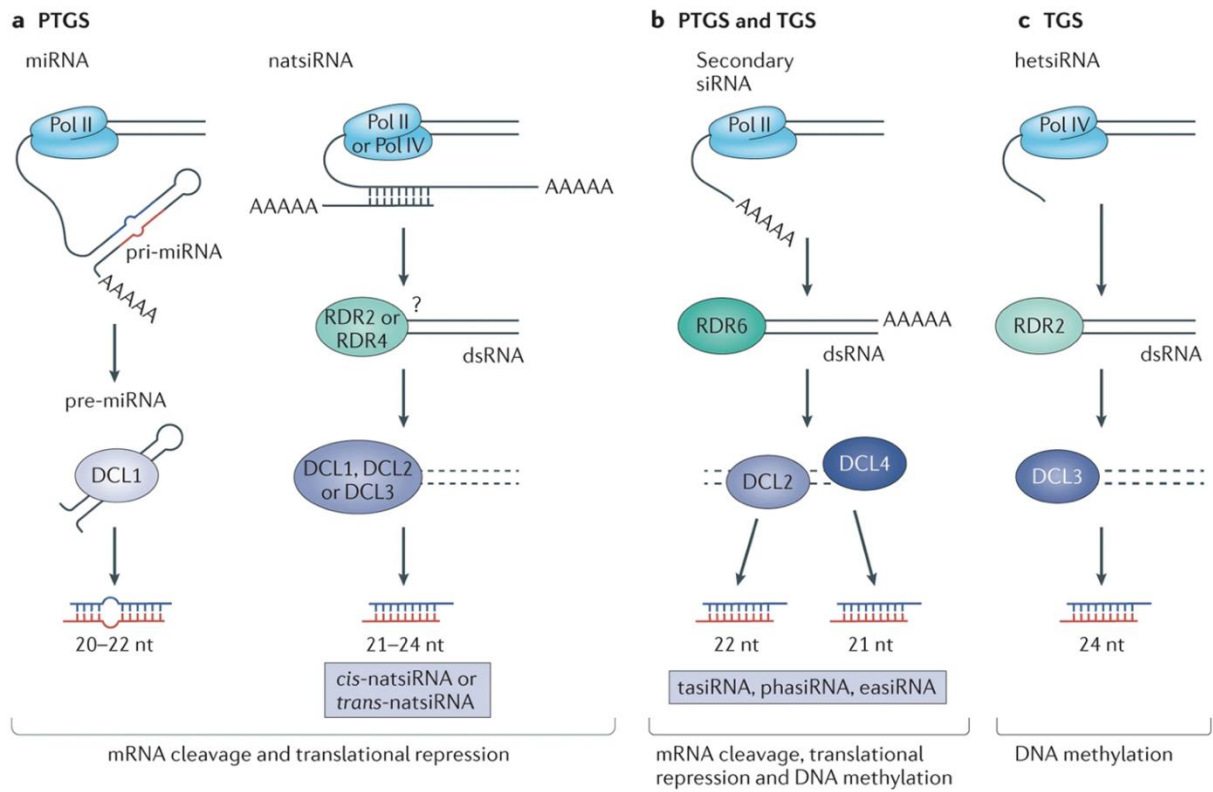
Le rôle des DCLs est donc critique dans la mise en place du RNAi par la production des duplex de petits RNAs à partir du substrat dsRNA. Ainsi, chez tous les Eucaryotes où le processus de RNAi a été observé, les DICER et DCL sont présentent (Mukherjee et al., 2013). Chez *A.thaliana*, on en dénombre 4 (Bologna and Voinnet, 2014):

- DCL1 est responsable de la production de la majorité des miRNAs de 21-nt impliqués principalement dans la régulation des gènes de développement (Jover-Gil et al., 2005). Ainsi un allèle nul *dcl1* est embryo-létal, soulignant l'importance de DCL1 dans le développement de la plante, mais il existe toutefois des allèles hypomorphes viables

dépourvus de la plupart des miRNAs (Vaucheret, 2004). DCL1 a une forte affinité pour les dsRNAs courts (structure en tige boucle) présentant des mismatches, ce qui est le cas des précurseurs des miRNAs (Yu et al., 2017b).

- DCL2 est responsable de la production de siRNAs de 22-nt dérivés des transgènes et des virus (Bouché et al., 2006; Parent et al., 2015a).
- DCL3 est responsable de la production de siRNAs de 24-nt impliqués dans la méthylation de l'ADN correspondant principalement aux régions hétérochromatiques du génome (Kasschau et al., 2007; Castel and Martienssen, 2013; Nagano et al., 2014).
- DCL4 est responsable de la production des ta-siRNAs à partir des RNAs endogènes ciblés par les miRNAs de 22-nt, et des siRNAs de 21-nt dérivés des transgènes, des virus (Gascioli et al., 2005; Xie et al., 2005; Bouché et al., 2006a; Nagano et al., 2014; Parent et al., 2015a).

La multiplicité des copies et les variations des domaines protéiques, notamment chez les Angiospermes, permet la spécialisation des DCLs dans différents processus, toutefois une redondance partielle peut être observée (Xie et al., 2004; Gascioli et al., 2005). Ainsi, la taille des duplex de petits RNAs produits par les DCLs peut varier en fonction des conditions et des DCLs actives. C'est le cas par exemple de DCL2 et DCL4 dont l'activité est partiellement redondante vis-à-vis des acides nucléiques exogènes, comme nous le verrons dans le chapitre traitant sur rôle du RNAi sur les acides nucléiques invasifs exogènes (Parent et al., 2015a).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 6 : Voie de biosynthèse des miRNAs et siRNAs endogènes chez Arabidopsis thaliana

Figure issus de la revue de Borges and Martienssen, 2016. La biosynthèse des différents petits RNAs présentés est décrites dans le texte.

b) Les différents types de petits RNAs

- Les micro-RNAs

Les miRNAs sont issus de l'action de DCL1 sur les longs RNAs non-codants transcrits par la RNA-dependant RNA POLYMERASE Pol II à partir des gènes *MIR* des régions intergéniques du génome (Lee et al., 2004; Voinnet, 2009 ; **Figure 6**). La présence d'IR dans la séquence du transcrit *MIR* conduit à la formation d'une structure en tige boucle ou « hairpin ». Ces précurseurs dsRNAs imparfaits, coiffés en 5' et polyadénylés en 3', sont appelés pri-miRNAs (AMBROS, 2003). Chez les plantes, ils sont clivés une première fois dans le noyau par DCL1 à la base de la structure en tige boucle pour former des pré-miRNAs puis maturés dans une seconde étape de clivage en 1 ou 2 duplex de petits RNAs par gène *MIR*, majoritairement de 21-nt, appelés miRNAs (Henderson et al., 2006; Kurihara and Watanabe, 2004). De nombreux facteurs cellulaires sont essentiels à la maturation des miRNAs dont la protéine de fixation aux dsRNAs HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1), la protéine de fixation aux RNAs DAWDLE (DDL), les protéines CAP-BINDING (CB) P20 et CBP80 et la protéine C2H2-zinc finger SERRATE (SE) (Voinnet, 2009).

Après la méthylation de leurs extrémités sortantes en 3' par la méthylase HEN1 (Yu et al., 2005; Li et al., 2005; Ren et al., 2012), ils sont transportés dans le cytoplasmes par l'exportine HASTY (HST) (Bollman, 2003). Un des deux brins du duplex, appelé brin guide, est pris en charge par une protéine AGO, principalement AGO1, au sein du complexe protéique RNA Induced Silencing Complex (RISC), et l'autre brin du duplex, appelé passager, est dégradé (Eamens et al., 2009; Manavella et al., 2012). L'interaction AGO1/miRNA/RNA entraîne le clivage et la dégradation du RNA cible complémentaire lorsque ce dernier est parfaitement complémentaire au miRNA (Voinnet, 2009). Dans certains cas, l'interaction AGO/miRNA/mRNA conduit à la répression traductionnelle, mais ce qui détermine le choix entre clivage et répression demeure mystérieux. Les miRNAs de 21-nt sont majoritairement impliqués dans la régulation des gènes développementaux (Jover-Gil et al., 2005; Baulcombe and Dean, 2014). Les miRNAs de 22-nt permettent la production de siRNAs secondaires (Yoshikawa, 2013 ; **Figure 6**) dont nous détaillerons la biogenèse par la suite.

Un autre type de miRNAs, les young miRNAs, sont quant à eux issus du clivage par DCL4 d'un précurseur plus long que pour les miRNAs classiques (Rajagopalan et al., 2006). Il semble

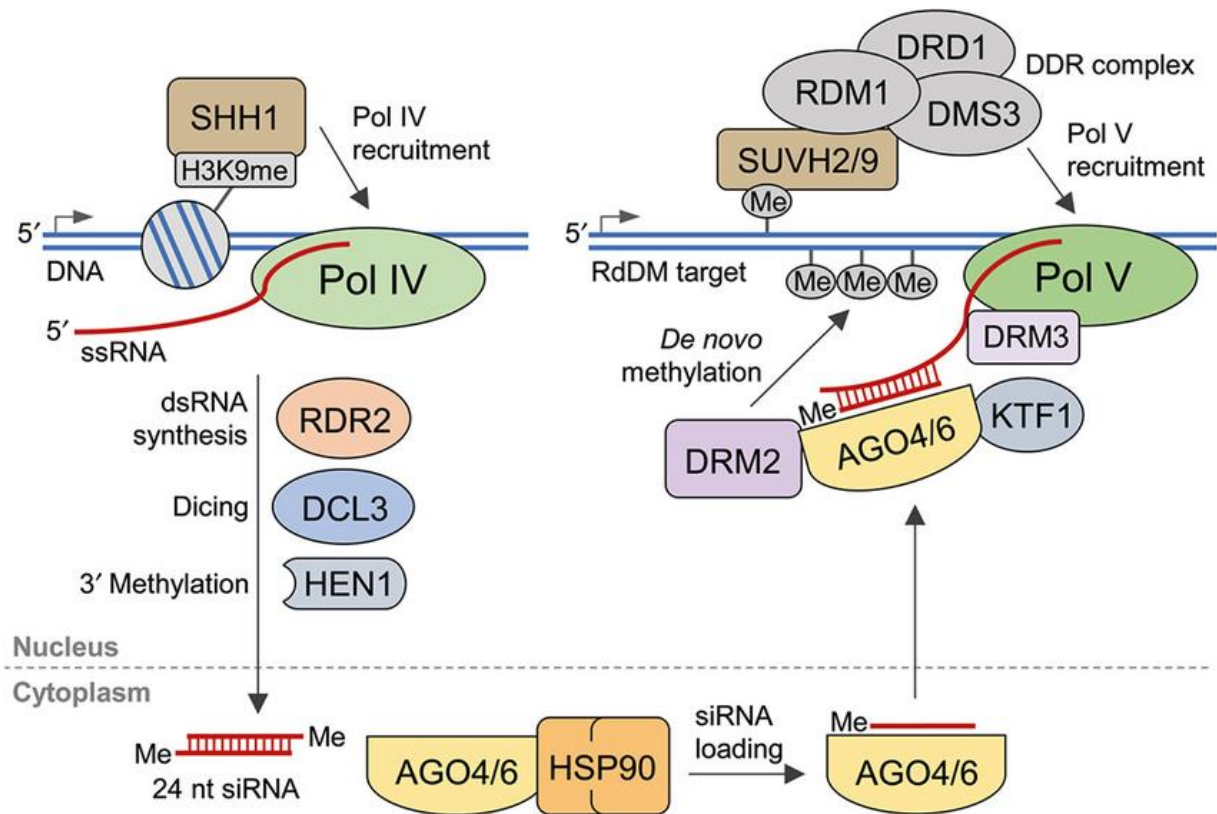


Figure 7 : Voie de la RdDM canonique chez *Arabidopsis thaliana*

Issus de la figure 5 de la revue de Gerbert and Rosenkranz, 2015. Les marques H3K9me sont reconnues par la protéine SHH1, entraînant le recrutement de Pol IV. Le transcrite simple brin produit est transformé par RDR2 en dsRNAs puis clivé en duplex de het-siRNAs de 24-nt par DCL3. Après la méthylation de leur extrémité sortante en 3' par HEN1, ils sont exportés dans le cytoplasme où ils sont pris en charge par AGO4 ou AGO6, assistées de la protéine HEAT STRESS PROTEIN (HSP) 90. Après sélection du brin guide, le complexe AGO/het-siRNA est importé dans le noyau. En parallèle sur le même locus, les marques de méthylation de l'ADN sont reconnues par la protéine au domaine SET and RING-associated (SRA) SUVH2 ou SUVH9 selon les *loci*. Elles recrutent le complexe DDR composé de la protéine de remodelage de la chromatine DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (DRD1), de la protéine de structuration du chromosome DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3 (DMS3) et la protéine RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (RDM1). En conséquence, Pol V est recrutée et, assistée par la protéine DRM3, produit un transcrite ciblé par le complexe AGO/het-siRNA. Cette interaction est stabilisée par la protéine KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1 (KTF1) et entraîne le recrutement de la protéine DRM2 qui méthyle le locus *de novo* et entraîne son inhibition transcriptionnelle.

que les gènes supports de la production des youngs miRNAs soient issus comme les gènes *MIR* d'évènements de duplication plus récents, donc n'ayant pas eu le temps de subir de nombreux évènements de divergence, et que la longueur de la partie double brin plus longue permette l'action de DCL4 mais pas de DCL1. Si leur rôle biologique n'est pas encore clair, une étude récente montre l'implication de deux young miRNAs dans la régulation de la réponse à la carence azotée chez *A. thaliana* (He et al., 2014).

Les précurseurs de certains miRNAs peuvent également être clivés par DCL3, donnant lieu des petits RNAs de 23 à 25-nt qui pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de leurs gènes cibles par méthylation (Chellappan et al., 2010; Wu et al., 2010).

- Les short interfering RNAs

Les siRNAs de 21-, 22- et 24-nt sont respectivement issus de l'action de DCL4, DCL2 et DCL3 sur de longs précurseurs parfaitement appariés en dsRNAs (Bologna and Voinnet, 2014). A la différence des précurseurs de miRNAs qui produisent généralement un seul duplex, un précurseur de siRNAs conduit à la formation de multiples duplex de siRNAs. Les siRNAs produits par DCL2, DCL3 et DCL4 ont une abondance et des fonctions différentes.

Les heterochromatic siRNAs

Les plus abondants sont les heterochromatic siRNAs (het-siRNAs) ou également appelés p4/p5-siRNAs et sont majoritairement impliqués dans la méthylation des séquences répétées centromériques et des éléments transposables (TE) du génome (Law and Jacobsen, 2010; Matzke et al., 2015 ; **Figure 6**). Chez les plantes, les méthylations (me) portées par les lysines des histones 3 (H3K9) sont reconnues par la protéine SAWADEE HOMEDOMAIN HOMOLOG 1 (SHH1) (Law et al., 2011 ; **Figure 7**) Cette interaction recrute la DNA-dependant RNA POLYMERASE Pol IV, responsable de la production de transcrit court à partir des TEs ou des séquences répétées (Law et al., 2011; Blevins et al., 2015). La protéine RDR2 transforme le transcrit en dsRNA, qui est ensuite clivé par DCL3 en duplex de 24-nt het-siRNAs (Henderson et al., 2006; Law et al., 2011; Blevins et al., 2015). Après leur méthylation en 3' par HEN1, ils sont exportés vers le cytoplasme où ils sont pris en charge majoritairement par AGO4 et de manière moindre AGO6 (Zheng et al., 2007; Wierzbicki et al., 2009; Matzke et al., 2015). Après sélection du brin guide, le complexe AGO/het-siRNAs, assisté de la protéine

KOW domain-containing TRANSCRIPTION FACTOR 1/RNA-directed DNA METHYLATION (KTF1/RDM3) (He et al., 2009), est à nouveau importé dans le noyau pour réprimer la transcription du transcrit produit par la DNA-dépendant RNA POLYMERASE Pol V, assistée par la protéine DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 3 (DRM3) (Zhong et al., 2015) et recrutée par le complexe DDR de reconnaissance de marque de méthylation de l'ADN, au même locus que le transcrit Pol IV d'origine (Law et al., 2010; Wierzbicki et al., 2008; Zhong et al., 2012; Liu et al., 2018). Ce mécanisme de TGS est appelé RNA-directed DNA Methylation (RdDM) canonique (**Figure 7**) et entraîne le recrutement de la protéine DRM2 qui méthyle *de novo* les cytosines du locus, principalement dans un contexte CHH où H peut être une Adénine, une Cytosine ou une Thymine (Zhong et al., 2014; Gebert and Rosenkranz, 2015). Le TGS est ensuite entretenu par la protéine METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) dans un contexte CG, par la protéine CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3) dans le contexte CHG après recrutement par la protéine de reconnaissance des marques H3K9me KRYPTONITE (KYP) et par la protéine CMT2 dans les contextes CHH, avec le support du facteur de remodelage de la chromatine DECREASE IN DNA METHYLATION 1 (DDM1) notamment pour les TEs longs (Elvira-Matelot et al., 2017).

D'autres acteurs peuvent intervenir dans certaines conditions dans la RdDM. Par exemple, une étude montre l'implication de transcrits Pol II issus de régions intergéniques dans le recrutement de Pol IV et Pol V et le TGS de ces régions (Zheng et al., 2009). On peut noter aussi l'implication de AGO9, qui s'exprime spécifiquement dans les fleurs, dans la RdDM dirigée contre les TEs dans l'ovule (Durán-Figueroa and Vielle-Calzada, 2010; Olmedo-Monfil et al., 2010). Les acteurs du PTGS peuvent également induire la RdDM. Pour certains dsRNAs plus longs, un pré-clivage par la RNase THREE-LIKE 2 est nécessaire en amont de l'action de DCL3 et dans certaines conditions une version nucléaire de DCL4 peut agir à la place de DCL3 (Elvira-Matelot et al., 2016; Pumplin et al., 2016). Des dsRNAs issus de l'action de RDR6 sur des produits de clivage du complexe AGO1/petit RNA peuvent être aussi pris en charge par DCL3 et induire la RdDM qu'on qualifie alors de non-canonique (Cuerda-Gil and Slotkin, 2016). De plus, des petits RNAs de 21-22nt secondaires issus du PTGS dirigé contre les TEs peuvent aussi être pris en charges par AGO6 et induire la RdDM (McCue et al., 2015).

Une nouvelle classe de siRNAs de 21 et 22-nt impliqués dans la méthylation de *loci* spécifiques a d'ailleurs été mise à jour il y a quelques années : les NEEDED FOR RDR2-INDEPENDANT DNA METHYLATION (NERD)-siRNAs. La biogenèse de leurs précurseurs implique RDR1

ou RDR6, clivés ensuite par DCL2 ou DCL4. Les duplex de NERD-siRNAs produits sont pris en charges par AGO2 et entraînent la méthylation des lysines 4 des histones 3 (H3K4) (Pontier et al., 2012). Contrairement aux het-siRNAs, leur production et leur action sont indépendantes de RDR2, DCL3, AGO4 et AGO6.

Ainsi PTGS et TGS peuvent être liés dans la régulation des acides nucléiques invasifs, et une étude récente montre même que la méthylation du corps des séquences géniques en 3' et sur leur partie centrale est induite par le PTGS de manière totalement indépendante des acteurs de la RdDM (Taochy et al., 2019).

Les trans-acting siRNAs

Les trans-acting siRNAs (ta-siRNAs) quant à eux sont des siRNAs secondaires dont la biogenèse nécessite l'intervention de miRNAs spécifiques (Yoshikawa, 2013 ; **Figure 6**). Les gènes non-codants *TAS* sont transcrits par la DNA-dépendant RNA POLYMERASE Pol II en pri-*TAS* dans le noyau, qui sont ensuite exportés vers le cytoplasme. De par la présence d'un ou deux sites de fixation aux miRNAs sur les RNAs *TAS*, ils sont clivés par des miRNAs spécifiques de 20 à 22-nt, pris en charges par AGO1 ou AGO7 dans le complexe RISC, respectivement en « one-hit » ou « two-hit » selon le gène *TAS*. (Axtell et al., 2006; Montgomery et al., 2008a, 2008b; Endo et al., 2013). Le fragment résultant est protégé de la dégradation par la protéine SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) (Yoshikawa et al., 2005; Elmayan et al., 2009) puis est transformé par RDR6 en dsRNA (Peragine, 2004; Hernandez-Pinzon et al., 2007; Rajeswaran and Pooggin, 2012). Après méthylation en 3' par HEN1, le long duplex résultant est clivé majoritairement par DCL4 et son co-facteur DOUBLE STRANDED RNA BINDING PROTEIN 4 (DRB4) en duplex de ta-siRNAs de 21-nt (Vazquez et al., 2004; Xie et al., 2005; Gascioli et al., 2005; Fukudome et al., 2011). Ces derniers sont pris en charge par AGO1, AGO2 ou AGO5 et clivent les transcrits complémentaires (Yoshikawa, 2013).

Il existe 8 *loci TAS* chez *Arabidopsis thaliana* : *TAS1a-c* et *TAS2* dont la biogenèse des ta-siRNAs nécessite le complexe AGO1/miR173 et qui régulent l'expression de gènes *PENTATRICOPEPTIDE REPEAT PROTEIN (PRP)*, les *TAS3a-c* ta-siRNAs qui nécessitent le complexe AGO7/miR390 et régulent l'expression des gènes *AUXINE RESPONSIVE FACTOR (ARF)* et les *TAS4* ta-siRNAs qui nécessitent le complexe AGO1/miR828 et régulent

l'expression des facteur de transcription *MYB (MYELOBLASTOSIS)* (Vazquez et al., 2004; Allen et al., 2005; Fahlgren et al., 2006; Rajagopalan et al., 2006). En conséquence, les mutants *rdr6* et *sgs3* affectés dans la production des ta-siRNAs présentent un phénotype d'enroulement des feuilles appelé « zippy » (Vazquez et al., 2004).

Il est important de noter que certains gènes codants pour des protéines NUCLEOTIDE-BINDING SITE-LEUCINE-RICHE REPEAT (NB-LRR) peuvent également entraîner la production de siRNAs secondaires de manière miRNAs dépendantes (Shivaprasad et al., 2012; Li et al., 2012). C'est par exemple le cas du gène *RESISTANT TO P. SYRINGAE 5 (RPS5)* dont l'expression est régulée de manière RDR6 et miR472 dépendante en condition d'infection bactérienne chez *A. thaliana* (Boccaro et al., 2014).

Les epigenetically active siRNAs

Un autre type siRNAs secondaires, les epigenetically active siRNAs (ea-siRNAs), nécessite également l'intervention de miRNAs pour leur production, de manière similaire à celle des ta-siRNAs (Sarazin and Voinnet, 2014; Borges and Martienssen, 2016 ; **Figure 6**). C'est le cas lorsque l'activation de la transcription de séquences TE dans le génome d'*A. thaliana* est induite par la mutation des gènes *DECREASE IN DNA METHYLATION 1 (DDM1)* et *DNA METHYLTRANSFERASE 1 (MET1)* et permet le ciblage de ces transcrits Pol II par de multiples miRNAs, entraînant pour certains la formation d'ea-siRNAs de 21 et 22-nt dans les inflorescences (Slotkin et al., 2009; Creasey et al., 2014). Leur production nécessite l'intervention de DCL4 et de son cofacteur DRB4 (McCue et al., 2012; Clavel et al., 2016), de manière redondante DCL2 ainsi que SGS3 et RDR6 (McCue et al., 2012; Nuthikattu et al., 2013). Elle entraîne la dégradation des RNAs de séquences homologues issus de TEs par PTGS et la méthylation des séquences des TEs via le complexe AGO6/ea-siRNAs, soulignant une possible implication dans la transition du PTGS vers le TGS des transposons (McCue et al., 2015; Borges and Martienssen, 2015). De plus, la ré-activation de transposons en condition de stress peut induire la production d'ea-siRNAs capables de cibler en *trans* les mRNAs endogènes sans complémentarité parfaite de séquence et influence alors l'expression du génome de la plante (McCue and Slotkin, 2012; McCue et al., 2013).

Les natural anti-sens-siRNAs

Les natural anti-sens-siRNAs (nat-siRNAs) résultent quant à eux du clivage d'un dsRNA formé en *trans* par l'appariement de séquences complémentaires entre deux transcrits Pol II de *loci* différents (*trans*-nat-siRNAs) ou en *cis* par l'appariement des transcrits sens et anti-sens Pol II d'un même locus (*cis*-nat-siRNAs) (Borges and Martienssen, 2016 ; **Figure 6**). Il peuvent également dériver de l'hybridation de transcrits Pol II issus de séquences inversées et répétées (IR) du génome et sont alors qualifiés d'endogenous Inverse Repeat siRNAs (endoIR-siRNAs) (Bologna and Voinnet, 2014). Si le dsRNA se forme *a priori* sans l'intervention des RDRs, son accumulation nécessite que les protéines Pol IV, RDR6 et SGS3 soient fonctionnelles (Borsani et al., 2005). Il est ensuite clivé en duplex de 21, 22 ou 24-nt nat-siRNAs primaires par DCL1, DCL2 ou DCL3 et après méthylation de leur extrémité 3' par HEN1, ils sont pris en charge par une protéine AGO non-caractérisée à ce jour (Borsani et al., 2005; Katiyar-Agarwal et al., 2006; Borges and Martienssen, 2015). Le complexe AGO/nat-siRNAs primaires cible un transcrit complémentaire, qui sera alors transformé en dsRNA par RDR6 avant d'être clivé en nat-siRNAs secondaires de 21-nt qui ciblent leur transcrit primaire. SGS3 et Pol IV sont également nécessaires pour cette étape (Borsani et al., 2005). Si leur rôle biologique n'est pas connu, ils pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de gènes en condition de stress biotique ou abiotique ainsi que dans le développement des gamétophytes chez *A. thaliana* (Borsani et al., 2005; Katiyar-Agarwal et al., 2006; Ron et al., 2010).

4) Rôle biologique des petits RNAs endogènes

a) Les protéines ARGONAUTES

Le complexe RISC est un acteur essentiel du RNA silencing, responsable de la reconnaissance des RNAs cibles par complémentarité de base avec le petit RNA pris en charge (Fang and Qi, 2016). Parmi les protéines qui le composent, les protéines ARGONAUTES jouent un rôle clef et sont ainsi très conservées chez les Eucaryotes où le RNAi est observé (Carmell et al., 2002). AGO1 est la première ARGONAUTE caractérisée lors d'un screen génétique forward chez *A. thaliana* et est à l'origine du nom de ces protéines, car les mutants *ago1* ont un développement très affecté et possèdent des feuilles semblables aux tentacules des calamars du genre *Argonauta sp* (Bohmert, 1998).

Les protéines AGO sont constituées de 4 domaines principaux : un domaine N-terminal variable et les domaines conservés MIDLE (MID), PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE (PAZ) et PIWI (P-element induced wimpy testes) (Vaucheret, 2008). Le domaine PAZ fixe le nucléotide en 3' sur l'extrémité sortante du dsRNA cible grâce à son motif Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding (OB). Il est également impliqué dans la séparation du brin guide et du brin passager (Gu et al., 2012). Les domaines MID et PIWI forment une structure tubulaire qui fixent le nucléotide en 5' (Vaucheret, 2008; Frank et al., 2012; Zhang et al., 2014). Grâce à son motif RNase H, le domaine PIWI entraîne le clivage du RNA cible complémentaire au brin guide. La fonction du domaine N-terminal n'est pas encore clair, mais il pourrait jouer dans la séparation du petit RNA guide et du RNA ciblé après clivage comme c'est le cas chez la bactérie *Thermus thermophilus* (Wang et al., 2009) ou dans des études *in vitro* avec des AGOs humaines (Kwak and Tomari, 2012).

Il existe 10 protéines ARGONAUTES chez *A. thaliana*, classées en 3 clades selon leur proximité phylogénétique : AGO1, AGO1 et AGO10 dans le clade I, AGO2, AGO3 et AGO7 dans le clade II et AGO4, AGO6, AGO8 et AGO9 dans le clade III (Vaucheret, 2008). La proximité phylogénétique au sein de chaque clade n'est cependant pas corrélée avec leur rôle biologique. La taille du duplex de petits RNAs et son nucléotide en 5' sont déterminants dans la prise en charge par les AGOs. Ainsi, AGO1, AGO2, AGO5, AGO7 et AGO10 fixent préférentiellement les petits RNAs de 21-nt quand AGO3, AGO4, AGO6 et AGO9 plûtôt ceux de 24-nt. AGO1 et AGO10 ont une plus forte affinité pour les duplex de petits RNAs avec un Uracyl en 5' quand AGO2, AGO3, AGO4, AGO6, AGO7 et AGO9 privilégient les duplex avec une Adénine en 5'. AGO5 quant à elle a une plus forte affinité pour les petits RNAs avec une Cytosine en 5' (Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008; Montgomery et al., 2008a; Zhu et al., 2011; Havecker et al., 2010).

Parmi les co-facteurs aux AGOs présents dans le complexe RISC, on trouve la protéine chaperone HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) et ses co-chaperones, qui sont nécessaires à la prise en charge du duplex de petits RNAs par AGO1 et AGO4 de manière ATP-dépendante (Landthaler, 2010; Earley and Poethig, 2011; Iki et al., 2012; Ye et al., 2012).

b) Régulation de l'expression des gènes endogènes et des éléments transposables par le RNAi

Les RNAs produits par les gènes endogènes sont rarement la cible du RNAi puisque nécessaires au développement de l'organisme (Elvira-Matelot et al., 2017). La plupart des RNAs endogènes aberrants sont en effet pris en charge par le RQC. C'est seulement lorsque le RQC est déficient qu'on observe la production de petits RNAs à partir des RNAs endogènes (Martinez de Alba et al., 2015; Zhang et al., 2015). Cela peut également arriver en cas de duplication d'un gène codant non-essentiel (Elvira-Matelot et al., 2017) mais aussi en cas d'infection virale, probablement parce que les virus inhibent le RQC ou boostent la production de RNAs aberrants, entraînant la production de virus activated short interfering RNAs (va-siRNAs) à partir de transcrits endogènes (Cao et al., 2014; Li and Wang, 2018).

En dehors des cas exceptionnels pré-cités, la régulation de gènes endogènes par des petits RNAs a donc lieu essentiellement lorsqu'ils présentent une complémentarité de séquence avec un miRNA ou siRNA. La protéine AGO1 est majoritairement impliquée dans la prise en charge des miRNAs de 21-nt produits par DCL1, responsables de la régulation de gènes de développement et de résistances au stress (Vaucheret, 2004; Dolata et al., 2016; Bajczyk et al., 2019), dans la prise en charge des miR173 et miR828 pour le clivage des RNAs issus des gènes *TAS1a-c*, *TAS2* et *TAS4* comme précédemment décrit (Yoshikawa, 2013) ainsi que dans la défense contre les acides nucléiques viraux comme nous le verrons par la suite (Bologna and Voinnet, 2014). Le RNA complémentaire aux miRNAs ou siRNAs chargés par AGO1 est alors clivé ou sa traduction est inhibée (Baumberger and Baulcombe, 2005; Brodersen et al., 2008). Lorsqu'AGO1 prend en charge un siRNA de 22-nt issus de l'action de DCL2 sur un dsRNA RDR-dépendant, le clivage du mRNA cible est suivi de la production de siRNAs secondaires (Mlotshwa et al., 2008; Chen et al., 2010; Garcia-Ruiz et al., 2010; Wang et al., 2011).

La protéine AGO2 est également impliquée dans une moindre mesure dans la prise en charge des miRNAs, notamment via l'association avec le miR408 qui régule l'expression du gène *PLANTACYANIN* de manière redondante avec AGO1 (Maunoury and Vaucheret, 2011) et possiblement de manière redondante à AGO7 via l'association avec le miR390 dans la biogenèse des ta-siRNAs issus des gènes *TAS3a-c* (Mi et al., 2008; Montgomery et al., 2008a). Cependant, contrairement aux mutants *ago1* aux anomalies développementales fortes (Bohmert, 1998), les mutants *ago2* sont viables. En effet, l'expression du gène *AGO2* est régulée négativement par l'association AGO1/miR403, ce qui suggère une redondance

hiérarchisée entre AGO1 et AGO2 (Harvey et al., 2011). AGO2 est également impliquée dans la défense de la plante contre les bactéries en association avec le miR393 qui cible les transcrits du gène *MEMBRIN 12 (MEMB12)* et conduit à l'exocytose de la protéine anti-microbienne PATHOGENIS-RELATED 1 (PR1) (Zhang et al., 2011). Mais son rôle est majoritaire dans la défense de la plante contre les acides nucléiques viraux avec AGO1 (Harvey et al., 2011; Bologna and Voinnet, 2014)

La protéine AGO10 peut également prendre en charge certains miRNAs, notamment en entrant en compétition avec AGO1 pour le chargement des miR165 et miR166. En conséquence, les transcrits cibles issus des gènes *HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER (HD-ZIP)* de classe III, impliqués dans la formation du méristème apical caulinaire et la polarité des feuilles, sont réprimés pour leur traduction (Zhu et al., 2011; Zhang and Zhang, 2012; Zhou et al., 2015).

Les protéines AGO4, AGO6 et AGO9 sont majoritairement impliquées dans la méthylation de l'ADN au sein de la RdDM ou dans les modifications des histones, notamment au niveau des TEs (Borges and Martienssen, 2015).

Si AGO4 prend en charge majoritairement des petits RNAs de 24-nt, elle pourrait aussi agir de manière partiellement redondante à AGO1 et AGO7 dans la régulation du gène *APETALA 2 (AP2)* impliqué dans la floraison en association avec le miR172 et dans la biogenèse des ta-siRNAs issus des gènes *TAS3a-c* en association avec le miR390 (Qi et al., 2006). De plus, une étude récente montre qu'AGO4 est capable de prendre en charge des petits RNAs de 20 à 60-nt produit par les 3'-5' exonucléases de manière indépendante des DCLs (siRNAs independent of DCLs ou sidRNAs) à partir de transposons et de régions intergéniques et d'induire la méthylation de l'ADN cible dans les contextes CHG et CHH (Ye et al., 2016). AGO4 est également impliquée dans la résistance à la bactérie *Pseudomonas syringae* (Agorio and Vera, 2007) et dans la défense de la plante contre les infections virales (Raja et al., 2008; Bhattacharjee et al., 2009; Brosseau et al., 2016).

AGO6 est exprimé au niveau des méristèmes racinaires et apicaux où il pourrait y agir en complément de AGO4 sur différents *loci* (Zheng et al., 2007; Havecker et al., 2010; Eun et al., 2011; Duan et al., 2015). *AGO9* est pour sa part exprimé au niveau de *foci* cytoplasmiques des cellules compagnes des cellules somatiques et pourrait avoir un rôle dans la formation des gamètes femelles (Olmedo-Monfil et al., 2010; Havecker et al., 2010).

La protéine AGO3 agit de manière partiellement redondante à AGO4 et AGO6 dans la prise en charge des siRNAs de 24-nt et, si son rôle n'est pas encore clair, elle pourrait être impliquée

dans la réponse de la plante lors de stress abiotiques (Zhang et al., 2016) et lors d'infection virale (Minoia et al., 2014).

La protéine AGO7 est exprimée dans les siRNA-bodies cytoplasmiques, où elle colocalise avec RDR6 et SGS3 (Jouannet et al., 2012b). Elle est impliquée dans la prise en charge du miR390, conduisant au clivage des pri-TAS3 et régule l'expression des gènes de développement *AUXINE RESPONSIVE FACTOR 3 (ARF)* et *ARF4* (Adenot et al., 2006; Montgomery et al., 2008a). En conséquence, les mutants *ago7* présentent un phénotype d'enroulement des feuilles caractéristique de l'absence des ta-siRNAs appelé « zippy », autre nom d'AGO7.

La protéine AGO5 est exprimée dans les cellules somatiques et si le mutant *ago5* se développe normalement il est affecté dans le développement des gamètes (Tucker et al., 2012). Récemment, des études suggèrent son implication dans le RNAi dirigé contre les pseudogènes dans les inflorescences et les siliques (Marchais et al., 2019) et dans la régulation du timing de floraison via son association avec le miR156 (Roussin-Léveillée et al., 2020). Son expression est également induite en cas d'infection par différents virus et elle peut prendre en charge certains siRNAs viraux, suggérant un rôle dans la défense anti-virale de la plante de manière redondante à AGO2 (Takeda et al., 2008; Brosseau and Moffett, 2015).

Enfin, le gène *AGO8*, par sa faible expression lors du développement de la plante, est assimilé à un pseudogène et aucune fonction biologique ne lui est attribuée pour le moment (Mallory and Vaucheret, 2010). On peut extrapoler qu'il n'existe que 9 AGOs fonctionnelles chez *A. thaliana*.

III] Le RNA silencing contre les acides nucléiques exogènes invasifs

Comme nous l'avons vu dans la partie historique, certains RNAs issus d'éléments exogènes invasifs (transgènes ou pathogènes) peuvent induire le RNAi au même titre que les RNAs aberrants issus de gènes endogènes ou d'éléments transposables.

1) Les transgènes

a) IR-PTGS

Lorsque les transgènes transcrivent des séquences en Inverse-Repeat (IR), la formation de dsRNA est systématique (Waterhouse et al., 1998; Chuang and Meyerowitz, 2000). Le dsRNA est clivé par DCL2, DCL3 et DCL4 en siRNAs de 22, 24 et 21-nt. Les siRNAs de 21 et 22-nt sont pris en charge par AGO1 et probablement AGO2, tandis que les siRNAs de 24-nt sont pris en charge par AGO4, AGO6 ou AGO9. Si la séquence en IR correspond au promoteur d'un gène endogène ou d'un autre transgène, les siRNAs de 24-nt provoquent le TGS de ces (trans)gènes (Mette et al., 2000), et les siRNAs de 21 et 22-nt n'ont pas d'action notable. Si la séquence en IR correspond à la séquence transcrite d'un gène endogène ou d'un autre transgène, les siRNAs de 21 et 22-nt provoquent le PTGS de ces (trans)gènes (Béclin et al., 2002; Dunoyer et al., 2007; Parent et al., 2015a), et les siRNAs de 24-nt n'ont pas d'action notable.

b) S-PTGS

Lorsque les transgènes transcrivent des séquences qui ne sont pas censées former de dsRNA (transgènes sens constitués d'un promoteur, d'une séquence sans répétition et d'un terminateur), il arrive pourtant que le transgène s'inactive par TGS ou PTGS après intégration dans le génome (Elmayan and Vaucheret, 1996; Elmayan et al., 1998, 2005). Lorsque l'inactivation se fait par PTGS, on parle alors de S-PTGS pour Sens-PTGS. Lorsque le transgène qui induit le S-PTGS transcrit une séquence homologue à la séquence transcrite d'un gène endogène, il y a S-PTGS en *trans*, autrefois appelé co-suppression (Bologna et al., 2018). Si les transgènes intégrés conduisent occasionnellement au TGS ou PTGS, l'étape d'expression extra-chromosomique qui précède l'intégration dans le génome conduit systématiquement à la

production de siRNAs par les transgènes sens (Johansen and Carrington, 2001), suggérant qu'un nombre de copies élevé (ce qui est le cas dans la phase extra-chromosomique qui précède l'intégration) est déterminant dans l'induction du RNAi.

Après intégration dans le génome, un transgène sens induit le S-PTGS uniquement s'il produit des RNA aberrants dont la quantité excède la capacité de dégradation du RQC et qui peuvent servir de substrats aux RDRs (Luo and Chen, 2007; Parent et al., 2015b). C'est par exemple le cas pour la lignée d'*Arabidopsis thaliana* appelée *LI* qui porte deux copies d'un T-DNA comportant le transgène *35S:GUS* (ou *35S:UIDA*). Cette lignée caractérisée par notre équipe depuis 25 ans, montre une dégradation systématique des RNAs *GUS* à chaque génération alors que le transgène est transcrit correctement. A l'inverse, la lignée *6b4* qui porte une seule copie du même T-DNA montre une expression stable dans un contexte sauvage (Elmayan et al., 1998). Toutefois, dans différents fonds mutants déficients pour le RQC, la lignée *6b4* déclenche le S-PTGS comme le fait la lignée *LI* spontanément, suggérant une différence quantitative et non qualitative entre ces deux lignées. La recherche de RNAs aberrants chez la lignée *LI* a permis d'identifier un RNA non-coiffé anti-sens du RNA *GUS*, et dénommé *SUG*. Ce RNA *SUG* est abondant chez *LI* et chez *6b4* en contexte mutant pour le RQC, mais quasiment indétectable chez la lignée *6b4* en fond sauvage. L'origine de *SUG* est incertaine, mais comme le gène *NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE (NPT)* conférant la résistance à la kanamycine est en anti-sens par rapport au gène *35S:GUS* (**Figure 16**), il est possible que le terminateur bactérien du gène *NPT* permette une transcription permissive jusque dans le transgène *35S:GUS*. Le RNA *NPT-SUG* produit serait alors clivé au site de polyadénylation du terminateur, libérant un RNA aberrant non-coiffé *SUG* et un RNA *NPT* correctement coiffé et polyadénylé (Elmayan et al., 1998; Parent et al., 2015b). En faveur de cette hypothèse, la lignée *6b4* montre une très faible résistance à la kanamycine alors que la lignée *LI* montre une très forte résistance à la kanamycine, suggérant que la transcription du gène *NPT* est plus forte chez *LI* que chez *6b4*, conduisant à une production plus importante de RNAs *NPT-SUG* et de RNAs *SUG* chez *LI*, expliquant ainsi la capacité de cette lignée à déclencher spontanément le S-PTGS alors que la lignée *6b4* ne déclenche le S-PTGS que lorsque le RNA *SUG*, moins abondant, est stabilisé par un défaut de RQC. Cette hypothèse explique également l'importance du nombre de copies et du niveau d'expression du transgène qui avait été notée dès le début des études sur le S-PTGS (Que et al., 1997; Vaucheret et al., 1997).

2) Les virus

Chez la plupart des Eucaryotes, les infections virales conduisent à la production de petits RNAs issus de la séquence du pathogène (Cottrell and Doering, 2003; Ding and Lu, 2011). Le RNA silencing est également impliqué dans la réponse anti-virale chez les plantes, et les virus doivent le contrecarrer pour réussir leur infection (Pumplin and Voinnet, 2013).

Les virus sont des agents infectieux capables de se répliquer uniquement au sein d'une cellule vivante d'un organisme. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires qui utilisent la machinerie cellulaire de son hôte pour se répliquer (Wolkowicz and Schaechter, 2008). Le scientifique russe Dmitri Ivanovski constate en 1892 qu'une solution issue de feuilles de tabac infectés, filtrée au travers d'un filtre de Chamberland spécifique des bactéries, reste capable d'induire des symptômes (Lecoq, 2001). Il observe sans le savoir les effets de l'infection par le *Tobacco mosaic virus* (TMV). Des résultats similaires ont été obtenus par le microbiologiste allemand Adolf Meyer en 1886 sans qu'il suspecte pour autant un agent infectieux autre qu'une bactérie (Lecoq, 2001). Par la suite, le concept de virus est défini par le scientifique hollandais Martinus Beijerinck en 1898. A partir de résultats similaires à Ivanovski et la possibilité d'observer l'agent infectieux sur un gel d'agarose, il conclut qu'un agent infectieux d'un nouveau type qualifié de « *contagium vivum fluidum* » est responsable des symptômes observés (Beijerinck, 1898; Lecoq, 2001).

Ils sont aujourd'hui classés sur le modèle du système Linnéen par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) selon leur homologie de séquences, et par la classification de Baltimore selon la composition de leur génome avec, entre autre, le groupe I pour les virus à ADN double brin (dsDNA), le groupe II pour les virus à ADN simple brin (ssDNA), le groupe III pour les virus à RNA double brin (dsRNA) et les groupes IV et V respectivement pour les virus à RNAs simples brin (ssRNA) positif et négatif (Murphy et al., 1995). Le matériel génétique généralement court du virus et les protéines associées forment un virion, protégé par une capsid de forme et taille variées selon les familles, pouvant elle-même être protégée par une enveloppe lipidique dérivée des membranes plasmiques de l'hôte (Bamford et al., 2005).

Dans le cas des virus à ssRNAs, majoritaires chez les plantes, une RNA-Dependant RNA POLYMERASE (RdRP) virale transforme les ssRNAs viraux en dsRNAs lors de la réplication du virus (Hamilton, 1974). Ces intermédiaires de réplication virale peuvent être un support pour l'action des DCLs de la plante, induisant ainsi la réponse PTGS anti-virale, mais il est

également possible que les DCLs s'attaquent aux ssRNAs viraux sur des régions structurées en dsRNAs pour induire le PTGS (Molnár et al., 2005; Donaire et al., 2008; Blevins et al., 2011; Aregger et al., 2012). De plus, certains virus produisent des RNAs génomiques ou sub-génomiques dont la structure diffère de celle des mRNAs de l'hôte (soit par l'absence de coiffe à leur extrémité 5', soit par l'absence de queue polyA à leur extrémité 3'). Ces RNA considérés comme aberrants par la cellule peuvent être soit attaqués par le RQC, soit utilisés comme matrice par les RDRs cellulaires pour induire le PTGS (Burgyán and Havelda, 2011).

De manière générale les protéines DCL4 et DCL2 peuvent transformer les dsRNAs viraux en duplex de siRNAs 21- et 22-nt (Deleris et al., 2006; Bouché et al., 2006). Après leur méthylation en 3' par HEN1 (Boutet et al., 2003; Li et al., 2005) ils sont pris en charge par une protéine AGO, généralement AGO1 ou AGO2 mais occasionnellement AGO5, AGO7 ou AGO10, pour guider le clivage du RNA viral complémentaire (Carbonell and Carrington, 2015). Si le clivage est effectué par AGO1 associée à un siRNA de 22-nt, les protéines d'amplification du PTGS sont recrutées : le RNA viral simple brin clivé est protégé de la dégradation par la protéine SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) et transformé en dsRNA par RDR1 ou RDR6, assisté de SDE5, puis clivé par DCL2 et DCL4 (Mourrain et al., 2000; Hernandez-Pinzon et al., 2007; Wang et al., 2011). Cela entraîne la production de siRNAs secondaires qui permettent d'amplifier la dégradation du RNA viral et se propagent aux cellules voisines sur une courte distance via les plasmodesmes et à longue distance via le phloème (Wang et al., 2010; Vazquez and Hohn, 2013; Garcia-Ruiz et al., 2010). Dans le cas des virus à ADN, les siRNAs secondaires entraînent généralement la méthylation du génome viral et impliquent de nombreux facteurs du TGS tel que DCL3, RDR2 et Pol IV (Raja et al., 2008; Pooggin, 2013)

Ainsi, de nombreux mutants du TGS et du PTGS montrent une hyper-susceptibilité aux infections virales avec des symptômes plus sévères que les plantes sauvages et une production de siRNAs viraux altérée. Par exemple, c'est le cas pour les mutants *ago1* face au *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Morel et al., 2002), des mutants *ago2* face au *Turnip crinckle virus* (TCV) et au CMV (Harvey et al., 2011), des mutants *dcl2dcl4* face au TCV (Bouché et al., 2006) ou pour les mutants impliqués dans la méthylation de l'ADN tel que *dcl3*, *rdr2*, *ddm1* et *met1* face au virus à ssDNA *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) (Raja et al., 2008).

Cependant, l'analyse des mutants du RNAi ne suffit pas à déterminer les facteurs dirigés contre les infections virales. En effet, la plupart des virus produisent des protéines capables de réprimer

les différentes étapes du RNAi : les Viral Suppressor of RNA silencing (VSR) (Csorba et al., 2015; Pumplin and Voinnet, 2013). Par exemple, la protéine P0 des *Turnip yellows virus* (TuYV) se lie à AGO1 et entraîne sa dégradation (Fusaro et al., 2012; Michaeli et al., 2019). La protéine P19, VSR caractéristique des virus de la famille des Tombusvirus, est quant à elle capable de séquestrer les siRNAs (Lakatos et al., 2004, 2006). Les différents VSR ne présentent pas d'homologie de séquences, divergent par leur fonction, et certains ont d'ailleurs plusieurs fonctions. Dans le cas du *Turnip mosaic virus* (TuMV), le VSR nommé HC-Pro (Helper Component-Proteinase) est impliqué dans les différentes étapes de la multiplication virale (Maia et al., 1996) et séquestre les siRNAs dérivés du génome de TuMV afin d'empêcher un chargement sur les AGOs et l'amplification le RNAi (Garcia-Ruiz et al., 2015). Dans le cas du TCV, le VSR est la protéine de capsid P38 et inhibe l'activité d'AGO1 (Azevedo et al., 2010; Iki et al., 2017). C'est également le cas de la protéine 2b du CMV, qui induit des symptômes de nécroses sur les feuille d'*A. thaliana* (Masuta et al., 2012) et est capable d'inhiber AGO1 et de fixer les dsRNAs ((Fang et al., 2016). La protéine 16K du *Tobacco rattle virus* (TRV) est importante pour la stabilisation du RNA2 du génome viral (Deng et al., 2013) et semble affecter la formation du complexe RISC (Fernández-Calvino et al., 2016). Le *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) a pour VSR sa protéine de mouvement P69, essentielle à la propagation du virus, à l'induction des symptômes de mosaïque jaune et ayant un effet sur les miRNAs et le S-PTGS transgénique (Bozarth et al., 1992; Chen et al., 2004; Ni et al., 2017). Dans le cas du virus à ADN *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), la protéine P6 est impliquée dans le mouvement et la réplication virale (Rodriguez et al., 2014) et est capable d'interagir avec DRB4, inhibant alors indirectement l'activité de DCL4 dont DRB4 est un cofacteur (Haas et al 2008).

L'action des VSR peut être caractérisée en testant leur effet sur le PTGS induit par un transgène en Inverse-Repeat (IR-PTGS) ou par un transgène sens (S-PTGS) (Verchot-Lubicz and Carr, 2008). Ainsi, certains VSR inhibent efficacement S-PTGS et IR-PTGS (P19, P38, HC-Pro) alors que la protéine de mouvement P69 du TYMV semble avoir un effet très faible sur le S-PTGS et pas d'effet sur l'IR-PTGS (Chen et al 2004). Toutefois, la caractérisation des VSR par des systèmes transgéniques est compliquée par le fait que leur localisation peut être restreinte. Par exemple, bien qu'il ait un fort effet sur l'homéostasie de AGO1, l'action de P0 est restreinte au phloème de la plante car c'est là que le virus se réplique (De Cillia et al., 2010).

IV] Objectifs de la thèse

La plante *A. thaliana* possède trois gènes appelés *RNase THREE-LIKE (RTL)* codant potentiellement des protéines comportant un domaine RNase III et un ou plusieurs domaines de fixation aux dsRNAs (DRB). *A. thaliana* possède également plusieurs gènes codant potentiellement des protéines comportant seulement un domaine RNase III. Notre équipe s'intéresse au rôle biologique des trois gènes *RTL*.

- *RTL1* s'exprime faiblement dans les racines, les siliques en cours de maturation et dans les feuilles sénescents (données Bar.UToronto, **Figure 39**). La protéine est constituée d'un domaine RNase III et d'un domaine DRB. De manière intéressante, elle est la seule RTL dont l'expression est induite par l'infection de différents virus, suggérant un rôle dans la défense anti-virale de la plante (Shamandi et al., 2015). Notre équipe a également montré qu'elle est capable de cliver les dsRNAs endogènes et en conséquence d'inhiber la production des siRNAs et des young miRNAs, mais pas des miRNAs, suggérant une spécificité pour les longs dsRNAs parfaits ou quasi-parfaits (Shamandi et al., 2015). Une analyse *in vitro* a également démontré le clivage de dsRNAs de 100 à 500-nt par RTL1 (Tschopp et al., 2017) et son domaine DRB est essentiel à son activité (Charbonnel et al., 2017). En conséquence, les plantes qui surexpriment *RTL1* miment un triple mutant *dcl2dcl3dcl4* dans leur profil de petits RNAs et sont affectés dans leur développement avec des feuilles zippées signatures de l'absence des ta-siRNAs, un nanisme, un retard dans la floraison et une faible viabilité des graines (Shamandi et al., 2015).
- *RTL2* s'exprime de manière constitutive dans la plante. La protéine est constituée d'un domaine RNase III et de deux domaines DRBs. Elle est impliquée majoritairement dans le pré-clivage de certains précurseurs longs dsRNAs des het-siRNAs (Elvira-Matelot et al., 2016) et dans la maturation du RNA ribosomal 45S (Comella et al., 2008). Cependant, les mutants *rtl2* ne sont pas affectés dans leur développement en condition standard de croissance en serre (Elvira-Matelot et al., 2016).
- *RTL3* est composé d'un domaine RNase III et de plusieurs domaines DRBs, mais n'est jamais exprimé dans la plante et est donc considéré comme un pseudogène (Comella et al., 2008). Les mutants *rtl3* ne sont pas affectés dans leur développement en condition standard de croissance en serre (données non publiées du laboratoire).

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de RTL1 dans la défense anti-virale de la plante. En effet, de par l'induction de son expression lors d'une infection par des virus à ssRNAs (CMV, TCV, TuMV, TVCV et TYMV) et de par son activité de clivage des dsRNAs, (Shamandi et al., 2015), nous avons supposé dans un premier temps que RTL1 agissait en complément des DCLs pour cliver les dsRNAs viraux et induire la réponse anti-virale. Par ailleurs, nous avons observé que des plusieurs VSR (HC-Pro du TuMV, P38 du CMV et 2b du TCV) inhibaient l'activité de RTL1, confortant l'hypothèse d'un rôle de RTL1 dans la défense anti-virale. Cependant, nous avons aussi observé qu'un VSR (P69 du TYMV) n'inhibait pas l'activité de RTL1. Qui plus est, des plantes surexprimant *RTL1* montraient une hypersensibilité au TYMV (Shamandi et al., 2015). Il semble donc que le rôle de RTL1 dans les infections virales soit conditionné par le type de VSR, et que RTL1 puisse même limiter les défenses de la plante. L'activité de RTL1 pourrait donc être délétère pour la plante lors de l'infection par un virus n'ayant pas évolué pour inhiber son activité. Ces résultats suggèrent donc un antagonisme et plusieurs questions auxquelles nous essaierons de répondre par la suite.

Dans une première partie, nous avons essayé de comprendre pourquoi certains VSR comme HC-Pro, P38 et 2b inhibaient l'activité de RTL1. Nous avons fait l'hypothèse que RTL1 pouvait cibler les dsRNAs viraux des virus correspondants. Pour réussir leur infection, ces derniers auraient donc évolué de manière à inhiber non seulement les composants du PTGS anti-viral mais également RTL1. Pour tester cette hypothèse, nous avons donc étudié le rôle de RTL1 dans l'infection d'un virus, le TuMV, en comparant des plantes sauvages et des plantes surexprimant *RTL1*, infectées par le TuMV sauvage ou par une version mutante, délétée de son VSR.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés au rôle de RTL1 dans l'infection par des virus dont le VSR n'a pas d'effet sur RTL1. Quand on compare des plantes surexprimant *RTL1* à des plantes sauvages, on observe une accumulation accrue du TYMV et une absence de siRNAs issus du PTGS anti-TYMV (Shamandi et al., 2015). En n'inhibant pas l'activité de RTL1, le TYMV semble donc favorisé puisque RTL1 inhibe le PTGS anti-viral. Le rôle de RTL1 ressemblerait donc à celui de la RNase III codée par le virus d'insecte *Heliothis virescens ascovirus* (Hussain et al., 2010) et de la RNase III codée par le virus de plante *Sweet potato chlorotic stunt virus* qui clive les siRNAs viraux en duplex de 14-nt que le RNAi ne peut plus prendre en charge (Cuellar et al., 2009). Dans cette partie, nous avons mis en évidence que

RTL1 pouvait s'attaquer directement aux siRNAs. Nous avons analysé en détail les acteurs du PTGS impliqués dans la défense anti-TYMV de la plante modèle *A. thaliana*, ainsi que l'effet du VSR P69 sur le PTGS induit par divers transgènes et sur la production des ta-siRNAs. Grâce à la génération de mutants nul pour *rtl1*, nous avons également étudié l'effet de l'absence de RTL1 sur l'infection du TYMV et sur le PTGS anti-TYMV. Enfin, nous avons commencé à étudier l'effet de la mutation *rtl1* sur l'infection par d'autres virus produisant des symptômes aussi faibles que le TYMV, le *Tobacco rattle virus* (TRV) et le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV).

Dans une troisième et dernière partie, nous nous sommes intéressés au rôle de RTL1 dans la plante en dehors d'un contexte d'infection virale. Les plantes qui surexpriment *RTL1* ont un phénotype très affecté (Shamandi et al., 2015), ce qui pourrait expliquer pourquoi *RTL1* est peu, voire pas exprimé aux cours du développement chez *A. thaliana*. Pourtant, *RTL1* est conservé chez *A. thaliana* (projet 10001 Génome), ce qui suggère que RTL1 pourrait être importante dans le développement de la plante. La faible expression de *RTL1* dans les racines, les siliques et les feuilles sénescents nous a conduit à étudier l'effet de l'absence de RTL1 sur différents stades de développement de la plante, notamment via l'utilisation de la plateforme de phénotypage haut-débit de notre centre de recherche, l'analyse de différents paramètres dans la graine, l'analyse des racines et les phénomènes d'hétérosis et de triploïd block. Toutes nos analyses ayant été réalisées dans l'accession Col-0, nous avons également généré des mutants *rtl1* dans l'accession *Ler* et commencé à documenter les différences entre ces deux accessions liées à RTL1.

RESULTATS

| Famille, genre | Virus type | VSR | Effets connus | Inhibe l'activité de RTL1 ? | Références |
|----------------------------------|-----------------------------------|------------------|--|-----------------------------|--|
| Luteoviridae, Potyvirus | <i>Beet western yellow virus</i> | P0 | Déstabilisation de AGO1 | nd | Pazhouhandeh et al., 2006; Bortolamiol et al., 2007; Baumberger et al., 2007; Fusaro et al., 2012; Michaeli et al., 2019 |
| Caulimoviridae, Caulimovirus | <i>Cauliflower mosaic virus</i> | P6 | Interaction avec DRB4 | nd | Haas et al., 2002; Love et al., 2007; Haas et al., 2008; Love et al., 2012; Laird et al., 2013 |
| Virgaviridae, Tobravirus | <i>Tobacco rattle virus</i> | 16K | Interaction avec AGO4 | nd | Voinnet et al., 1999; Reavy et al., 2004; Ghazala et al., 2008; Martínez-Priego et al., 2008; Martín-Hernández and Baulcombe, 2008; Fernández-Calvino et al., 2016 |
| Tombusviridae, Tombusvirus | <i>Tomato bushy stunt virus</i> | P19 | Séquestration des siRNAs | nd | Voinnet et al., 1999; Lakatos et al., 2004, 2006; Silhavy et al., 2002; Chapman et al., 2004 |
| Alphaflexiviridae, Potexvirus | <i>Potato virus X</i> | P25 | déstabilisation de AGO1 | nd | Voinnet et al., 2000; Bayne et al., 2005; Chiu et al., 2010 |
| Tombusviridae, Carmovirus | <i>Turnip crinckle virus</i> | P38 | fixation sur AGO1 et AGO2, sur les dsRNAs et dérégulation des DCLs | oui | Thomas et al., 2003; Mérai et al., 2006; Deleris et al., 2006; Azevedo et al., 2010; Jin and Zhu, 2010; Várallyay and Havelda, 2013; Pérez-Cañamás and Hernández, 2015; Shamandi et al., 2015; Iki et al., 2017; Zheng et al., 2019 |
| Tymoviridae, Tymovirus | <i>Turnip yellow mosaic virus</i> | P69 | Dérégulation de DCL1 | non | Chen et al., 2004; Shamandi et al., 2015 |
| Potyviridae, Potyvirus | <i>Turnip mosaic virus</i> | P1/HC-Pro et VPg | Séquestration des siRNAs et dérégulation de différents acteurs du RNAi et du protéasome | oui | Carrington and Herndon, 1992; Kasschau and Carrington, 1998; Anandalakshmi et al., 1998; Kasschau et al., 2003; Chapman et al., 2004; Ballut et al., 2005; Garcia-ruiz et al., 2010; Garcia-Ruiz et al., 2015; Shamandi et al., 2015; Ivanov et al., 2016; Cheng and Wang, 2017; Hafrén et al., 2018 |
| Bromoviridae, Cucumovirus | <i>Cucumber mosaic virus</i> | 2b | Séquestration des siRNAs, fixation sur AGO1 et AGO4 et dérégulations des AGOs et de DCL1 | oui | Li et al., 1999; Zhang et al., 2006; Goto et al., 2007; Diaz-Pendon et al., 2007; Lewsey et al., 2007; Ye et al., 2009; Duan et al., 2012; González et al., 2012; Hamera et al., 2012; Várallyay and Havelda, 2013; Feng et al., 2013; Nemes et al., 2014; Shamandi et al., 2015 |

Tableau 1 : Mode d'action de différents VSR sur le RNAi et sur l'activité de RTL1

La caractérisation de l'effet des VSR sur l'activité de RTL1 résultent des travaux de Shamandi et al., 2015. nd : non-déterminé.

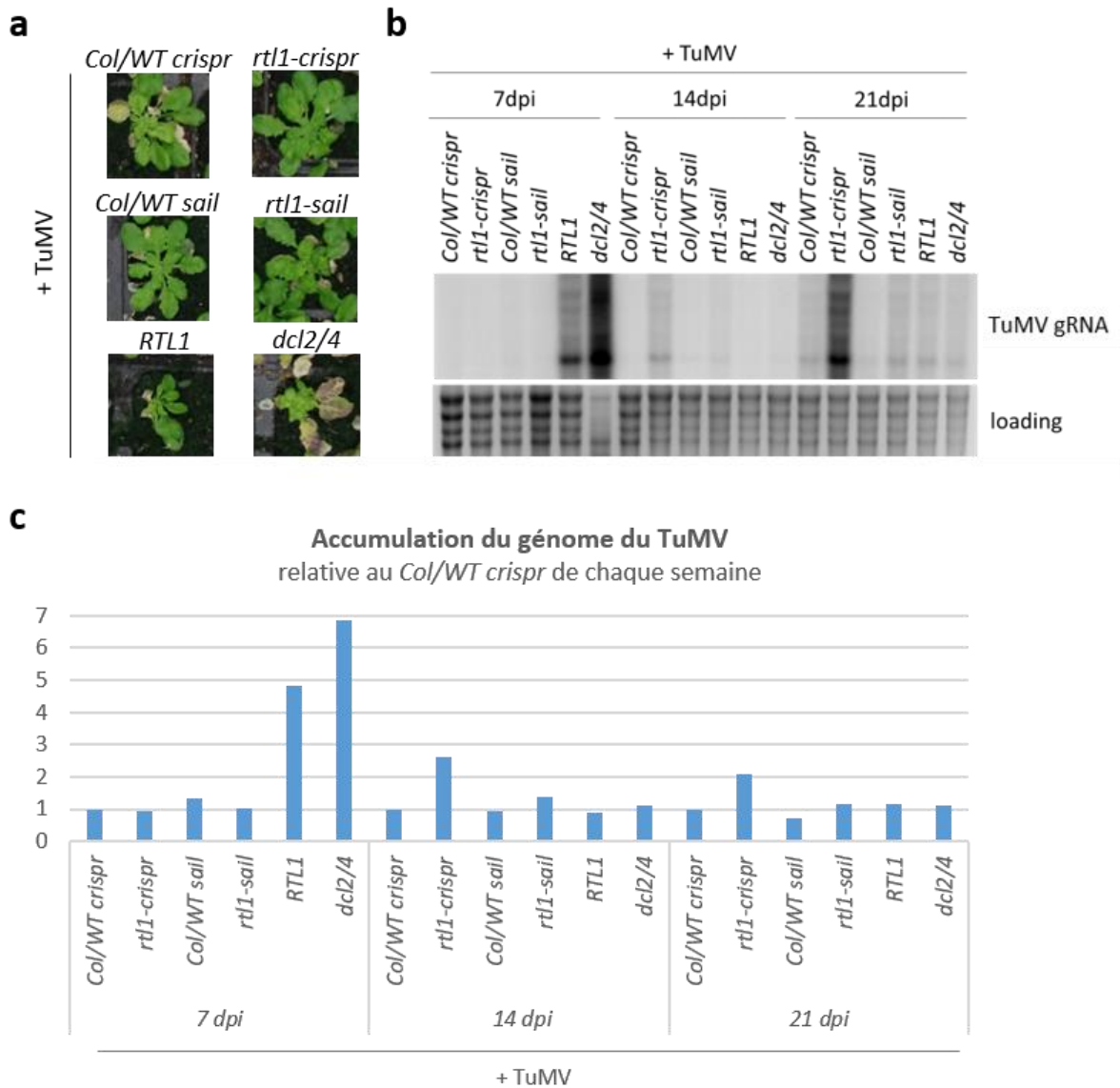


Figure 8 : Effet de la mutation et de la sur-expression de *RTL1* sur l'infection du TuMV

16 plantes par génotype sont infectées avec le TuMV 4 semaines post-germination en jours courts. **a)** Les photos sont prises 4 semaines post-infection et une plante représentative par génotype est présentée. **b)** 2 feuilles par plante et par génotype (16 plantes en tout) infectées avec le TuMV sont prélevées 1 semaine (7 dpi), 2 semaine (14 dpi) et 3 semaine (21 dpi) après infection. Un northern blot HMW est effectué à partir de l'extraction des grands RNAs génomiques (gRNAs). Une sonde correspondant à l'ORF de la *COAT PROTEIN* (*CP*) du TuMV est marquée au P^{32} et hybridée. Le loading correspond à la migration des RNAs sur gel d'agarose révélé à l'EtBr. A noter que le puit *dcl2/4* à 7dpi est smireux. **c)** L'intensité de la bande correspondant à la *CP* est quantifiée sur ImageJ et relativisée à l'intensité de la bande du point *Col/WT crispr* pour chaque semaine de cinétique.

I] Pourquoi certains virus inhibent-ils RTL1 ?

1) Analyse du rôle de RTL1 dans l'infection par le TuMV

Pour expliquer que certains VSR comme HC-Pro, P38 et 2b inhibent l'activité de RTL1, nous avons fait l'hypothèse que RTL1 pouvait cibler les dsRNAs viraux des virus correspondants. Pour réussir leur infection, ces derniers auraient donc évolué de manière à inhiber non seulement les composants du PTGS anti-viral mais également RTL1. Afin de tester la première partie de cette hypothèse, le *Turnip mosaic virus* (TuMV) dont le VSR HC-Pro inhibe totalement le PTGS et RTL1 a été choisi comme modèle. Le TuMV est un virus à RNA simple brin positif de la famille des Potyviridae, genre *Potyvirus*. Les Potyvirus, qui constituent un tiers des phytovirus recensés, sont transmis de manière non-persistante par les pucerons à une large gamme de plantes dicotylédones et monocotylédones, dont les Brassicacées et la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Revers and García, 2015). Ils induisent des symptômes caractéristiques de mosaïques claires, de crispation des feuilles et des fruits, et sont responsables de pertes en rendement et qualité des cultures considérables.

Quatre semaines après l'inoculation du TuMV, on ne constate pas de différence dans la force des symptômes entre les mutants *rtl1* (*rtl1-sail* et *rtl1-crispr*) et les lignées isogéniques sauvages associées (*Col/WT sail* et *Col/WT crispr*) (**Figure 8a**). Les plantes surexprimant *RTL1* ne semblent pas non plus hypersensibles à l'infection par le TuMV, contrairement au double mutant *dcl2/4* qui présentent une sénescence des feuilles précoces très marquée (**Figure 8a**). Nous avons donc suivi sur 3 semaines l'accumulation des grands RNAs issus du TuMV dans ces différents fonds génétiques (**Figure 8b**). On constate que lors de la première semaine d'infection, les grands RNAs viraux s'accumulent plus fortement dans la lignée *RTL1* et le double mutant *dcl2/4* que chez les plantes sauvages et mutées pour *RTL1* infectées par le TuMV (**Figure 8b et c**). Cela confirme que les protéines DCL4 et DCL2 sont importantes dans la restriction de l'infection TuMV (Garcia-Ruiz et al., 2010) et met en lumière leur rôle prépondérant dans le stade précoce de l'infection. Garcia-Ruiz et al. observent par ailleurs que la COAT PROTEIN (CP) d'une version taggée -*GFP* du TuMV s'accumule plus fortement chez les mutants *dcl2/4* dans les feuilles inoculées mais pas dans les feuilles caulinaires et les inflorescences par rapport aux plantes sauvages infectées (Garcia-Ruiz et al., 2010). Cela

suggère également que l'activité de RTL1 n'est pas inhibée par le TuMV dans le stade précoce de l'infection et qu'elle est favorable à l'infection, probablement en agissant sur les dsRNAs viraux non nécessaires à la réplication virale en amont de l'action des DCLs, gênant en conséquence la mise en place du RNAi. Nous ne pouvons d'ailleurs pas exclure que l'accumulation accrue de grands RNAs viraux chez les mutants *dcl2/4* lors de la première semaine d'infection soit renforcée par l'induction de l'expression de *RTL1* par le TuMV.

Cependant, cet effet s'estompe pendant les deuxième et troisième semaines post-infection, et si le mutant *rtl1-crispr* accumule plus de grands RNAs viraux que la lignée isogénique sauvage associée, ce n'est pas le cas du mutant *rtl1-sail* (**Figure 8b et c**). Il semble donc que la mutation *rtl1* n'a pas d'effet dramatique sur l'infection par le TuMV. De plus, les mutants *dcl2/4* pourtant très affectés au niveau des symptômes n'accumulent pas plus de grands RNAs viraux en deuxième et troisième semaine post-infection par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 8**). Etant donné l'implication de DCL2 et DCL4 dans le RNAi anti-viral, il est vraisemblable que leur action est inhibée directement ou indirectement par le TuMV dans les stades tardifs de l'infection (Valli et al., 2018; Garcia-Ruiz et al., 2010). L'hypothèse la plus simple est donc que le VSR HC-Pro du TuMV inhibe différents facteurs du PTGS - dont potentiellement DCL2 et DCL4 (Valli et al., 2017 ; **Tableau 1**) - puis inhibe RTL1 à partir de la deuxième semaine d'infection. De ce fait, à terme, l'absence ou la sur-expression de *RTL1* n'affecte pas l'infection par le TuMV. La question du rôle de l'inhibition de RTL1 par HC-Pro reste donc entière.

2) Rôle de RTL1 dans l'infection par un TuMV délété de son VSR

Afin de déterminer pourquoi le VSR du TuMV était capable d'inhiber l'activité RTL1, nous avons décidé d'utiliser un TuMV délété de son VSR afin de déterminer si RTL1 pouvait cliver les dsRNAs produits par le TuMV et empêcher l'infection. Il a été montré que la mutation AS9 dans la séquence de HC-Pro empêche la propagation systémique du virus en fond WT car ce virus dépourvu de VSR fonctionnel est ciblé par le PTGS. En revanche, le virus muté *TuMV-AS9* peut se propager en fond mutant *dcl2dcl3dcl4* (*dcl2/3/4*) (Garcia-Ruiz et al., 2015, 2010). L'équipe de Jim Carrington avait réalisée deux constructions : i) *p35S:TuMV-GFP* permettant

d'exprimer le génome du TuMV sous le contrôle du promoteur 35S fusionné à la protéine fluorescence GFP (*TuMV-GFP*) et ii) *p35S:TuMV-AS9-GFP* permettant d'exprimer le génome du TuMV muté dans son VSR fusionné à la GFP (Kasschau et al., 1997; Garcia-Ruiz et al., 2010). Pour aller plus loin, l'équipe d'Olivier Voinnet à l'ETH de Zurich a construit des transgènes *OE-TuMV-GFP* et *OE-TuMV-AS9-GFP* où le *p35S* a été remplacé par un système inductible par l'œstradiol (*OE*) (Brand et al., 2006 ; données de Rajeswaran Rajendran non publiées). Ces constructions ont été introduites dans des Arabidopsis sauvages ou des mutants *dcl2/3/4*. La fusion avec la GFP permet de suivre la propagation du virus après induction de l'infection par l'œstradiol (*OE*).

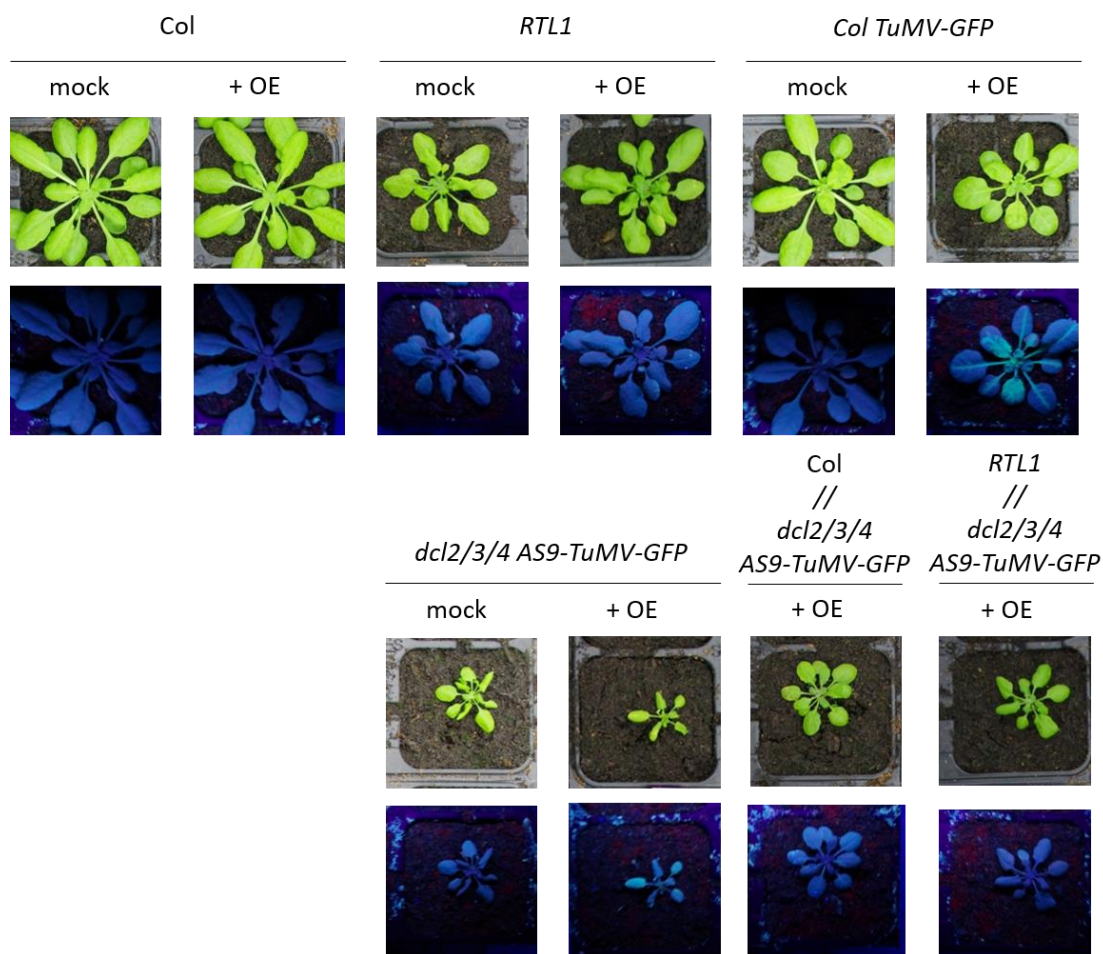


Figure 9 : RTL1 bloque la propagation du TuMV délété de son VSR

Les photos sont prises 3 semaines après le repiquage en chambre de culture en jours courts avec et sans exposition à une lampe UVA. Le génotype du greffon est indiqué avant « // », celui du porte-greffe après « // » : greffon//porte-greffe. Les plantes traitées à l'œstradiol sont indiquées par « +OE ». On observe un signal GFP (bleu clair) correspondant à une propagation du *TuMV-GFP* et du *TuMV-AS9-GFP* respectivement chez les plantes *Col TuMV-GFP* et *dcl2/3/4 TuMV-AS9-GFP* traitées à l'OE.

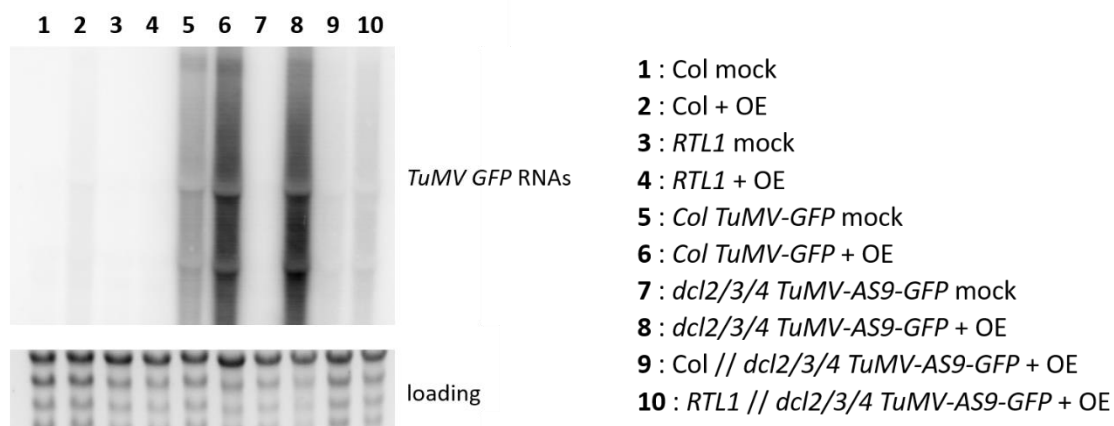


Figure 10 : RTL1 bloque l'accumulation des ARNs issus TuMV délété de son VSR

Les plantes sont récoltées 4 semaines après repiquage. Les grands RNAs sont extraits et analysés par northern blot HMW. La révélation est faite avec une sonde GFP radioactive marquée au P³². Le génotype du greffon est indiqué avant « // », celui du porte-greffe après « // » : greffon//porte-greffe. Les plantes traitées à l'œstradiol sont indiquées par « +OE ». Le loading correspond à la migration des RNAs sur gel d'agarose révélé à l'EtBr.

Chez la lignée *OE-TuMV-GFP Col* (désignée par *Col TuMV-GFP*) traitée à l'œstradiol on observe en effet un signal GFP fort dans les feuilles et plus particulièrement dans les nervures par rapport aux plantes non traitées (**Figure 9**). Ceci confirme que le protocole d'induction fonctionne et permet de visualiser la propagation du *OE-TuMV-GFP*. De même, chez la lignée *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2dcl3dcl4* (désignée par *dcl2/3/4 TuMV-AS9-GFP*) traitée à l'œstradiol on observe un signal GFP dans les feuilles contrairement aux plantes non traitées (**Figure 9**). Il faut noter toutefois qu'une accumulation non négligeable de GFP est observée chez les plantes *OE-TuMV-GFP Col* non traitées à l'œstradiol, suggérant une fuite d'expression possible de la construction dans cette lignée.

Afin d'étudier l'effet de RTL1 sur un TuMV dépourvu de VSR actif, nous avons d'abord greffé des plantes sauvages (*Col*) ou *p35S:RTL1-myc (RTL1)* sur un porte greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2/3/4*. Dans les deux types de greffons, aucun signal GFP n'est visible dans les feuilles, indiquant que la propagation du *TuMV-AS9-GFP* est bloquée. Ces résultats sont appuyés par l'analyse de l'accumulation grands RNAs viraux (**Figure 10**). En effet, on observe une forte accumulation des RNAs *GFP* chez les plantes témoins *OE-TuMV-GFP Col* et *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2/3/4* traitées à l'œstradiol, mais pas dans les greffons *Col* et *RTL1* greffés sur des porte-greffes *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2/3/4* traitées à l'œstradiol.

L'absence de *TuMV-AS9-GFP* dans le greffon *Col* greffé sur un porte-greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2/3/4* traités à l'œstradiol s'explique par un PTGS actif chez *Col* (**Figure 9** et **Figure 10**). En revanche, dans le greffon *RTL1* greffé sur un porte-greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2dcl3dcl4* traités à l'œstradiol, le PTGS n'est pas actif puisqu'il est inhibé par l'expression forte de *RTL1* (Shamandi et al., 2015 ; **Figure 9** et **Figure 10**). L'absence de *TuMV-AS9-GFP* dans ces greffons pourrait donc s'expliquer un clivage des dsRNAs viraux par RTL1.

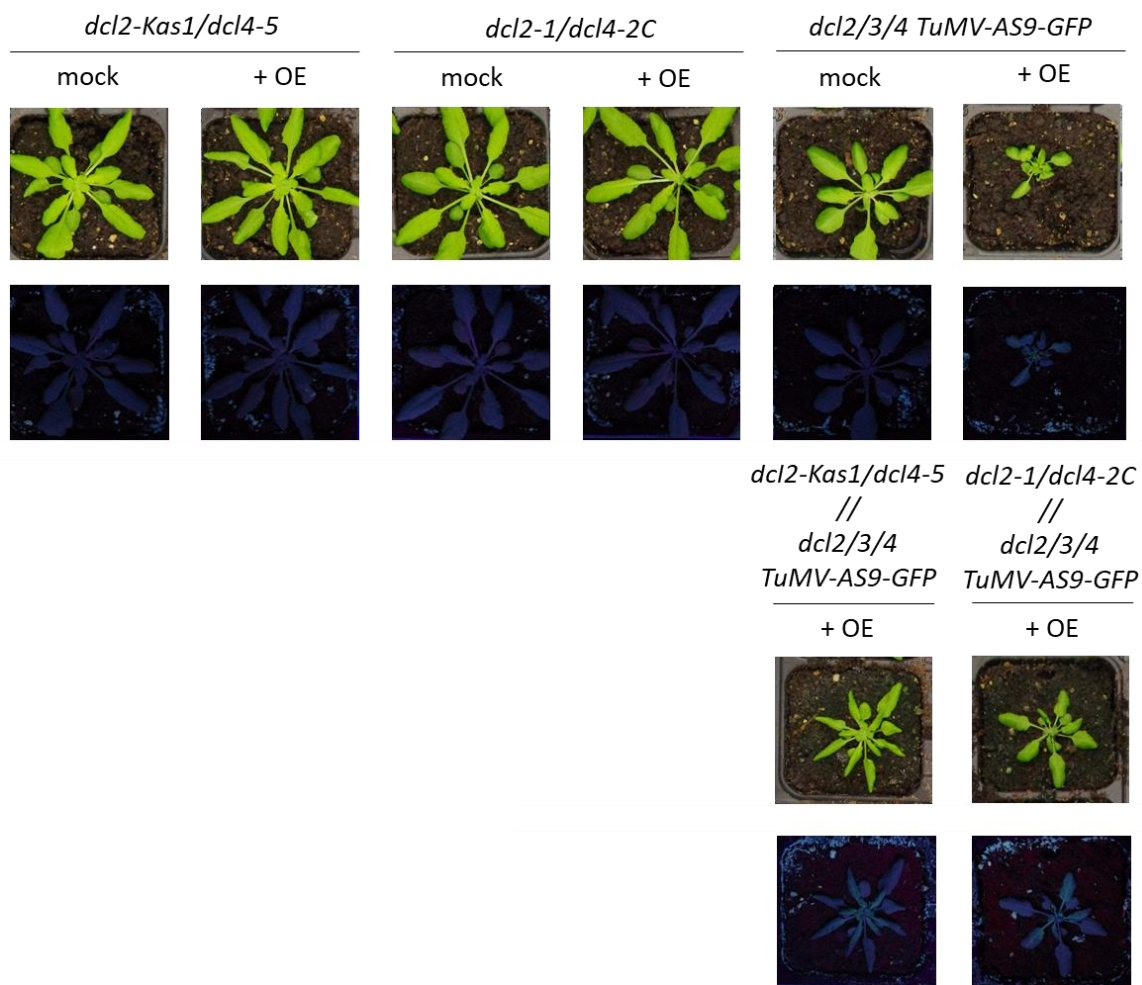


Figure 11 : Le TuMV-AS9-GFP est capable de se propager du porte-greffe au greffon *dcl2/dcl4*

Les photos sont prises 3 semaines après le repiquage en chambre de culture en jours courts avec et sans exposition à une lampe UVA. On observe un signal GFP (vert clair) correspondant à une propagation du *TuMV-AS9-GFP* dans les feuilles des plantes témoins non greffées *dcl2/3/4 TuMV-AS9-GFP* et dans les feuilles des greffes *dcl2-Kas1/dcl4-5 // dcl2/3/4 TuMV-AS9-GFP* et les greffes *dcl2-1/dcl2-2C // dcl2/3/4 TuMV-AS9-GFP* traitées à l'OE. Nomenclature : « greffon »// «porte-greffe », « +OE » : traitement à l'œstradiol

Ces résultats sont en faveur de notre hypothèse de départ, mais devront être validés. Dans un premier temps, nous avons décidé de produire des plantes *p35S:RTL1-myc dcl2dcl4* (*RTL1 dcl2/4*) et de les greffer sur un porte-greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2dcl3dcl4* traité à l'œstradiol, les témoins étant des plantes *dcl2dcl4* greffées sur un porte-greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2/3/4* traité à l'œstradiol. Le passage du TuMV par la greffe a d'abord été validé en greffant les double mutants *dcl2-Kas1/dcl4-5* (Dunoyer et al., 2005; Parent et al., 2015a; Taochy et al., 2017) et *dcl2-1/dcl4-2* (Xie et al., 2004, 2005; Deleris et al., 2006), puisque l'on sait que le *TuMV-AS9-GFP* est capable de se propager en fond *dcl2-1/dcl4-2* (Garcia-Ruiz et al., 2010). On observe un signal GFP fort dans les feuilles, et en particulier dans les nervures, des greffons *dcl2-Kas1/dcl4-5* et *dcl2-1/dcl4-2* greffés sur le porte-greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2/3/4* traités à l'œstradiol (**Figure 11**), indiquant un passage du TuMV par la greffe. Des plantes *RTL1 dcl2/4* générées à partir des allèles *dcl2-Kas1/dcl4-5* ont été obtenues, et seront greffées pour tester notre hypothèse.

Une seconde validation sera effectuée en utilisant des plantes *OE-TuMV-AS9-GFP p35S:RTL1-myc dcl2dcl4*. Ces plantes, et les témoins isogéniques *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2dcl4*, seront directement traitées à l'œstradiol afin de déterminer si RTL1 est capable d'inhiber la réplication du TuMV en l'absence de son VSR. Les plantes *OE-TuMV-AS9-GFP p35S:RTL1-myc dcl2dcl4* générées à partir des allèles *dcl2-Kas1/dcl4-5* sont en cours d'obtention et seront testées dès que possible.

II] Pourquoi certains virus n'inhibent-ils pas RTL1 et comment réussissent-ils leur infection ?

Nos résultats suggèrent que les virus dont les RNAs sont sensibles à la fois au PTGS et à RTL1 ont besoin d'exprimer un VSR capable d'inhiber PTGS et RTL1 pour réussir leur infection. Cependant, il existe des virus n'inhibant pas (ou peu) le PTGS et RTL1, et qui restent pourtant capables d'infecter leur hôte et d'induire des symptômes. Afin de mieux comprendre le fonctionnement de ces virus, nous avons choisi le TYMV comme modèle.

Le *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) est un phytovirus à RNA simple brin (ssRNA) à polarité positive de la famille des Tymoviridae, espèce modèle du genre *Tymovirus*. En Europe ce sont les plantes du genre *Brassica*, dont la plante modèle *Arabidopsis thaliana* fait partie, qui constituent ses hôtes de prédilection (Suzuki and Haselkorn, 1968; Matthews, 1981). Lors de l'infection par le TYMV, la protéine virale 140K est adressée à la membrane externe des chloroplastes, entraînant un réarrangement de la membrane externe en invaginations (Moriceau et al., 2017) et le recrutement des protéines du complexe viral de réplication, dont la RdRP virale 66K (Prod'homme et al., 2003). Le TYMV produit aussi une protéine de mouvement appelée P69, qui est essentielle au mouvement de cellule à cellule du TYMV (Bozarth et al., 1992). Son expression *in planta* suffit à induire les symptômes de mosaïques jaunes des feuilles caractéristiques de l'infection par ce virus, notamment par son interaction avec les protéines GOLDEN-LIKE 1 et 2 nécessaires à la synthèse de la chlorophylle (Ni et al., 2017). La protéine P69 est considérée comme un VSR. Toutefois, son effet est extrêmement faible car il n'inhibe pas l'IR-PTGS et a un faible effet sur le S-PTGS (Chen et al., 2004 ; **Tableau 1**). De plus, ni l'infection par le TYMV, ni l'expression de *P69* n'inhibent l'activité de RTL1 (Shamandi et al., 2015 ; **Tableau 1**). En revanche, la surexpression de *RTL1* chez des plantes d'*Arabidopsis* transgéniques entraîne une aggravation des symptômes induits par le TYMV (Shamandi et al., 2015). La relation particulière qui se dégage entre le TYMV et RTL1 en fait un virus modèle particulièrement intéressant pour comprendre le rôle de RTL1 dans l'infection des virus sans VSR ou à VSR ayant un faible effet sur le PTGS.

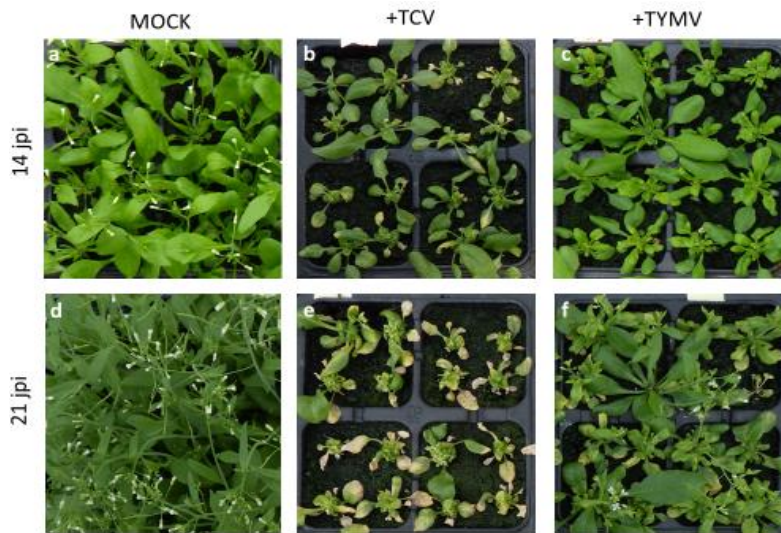


Figure 12 : Symptômes provoquées par le TCV et le TYMV sur des *Arabidopsis* sauvages

Les plantes cultivées en jours longs sont infectées 7 jours post-germination par le *Turnip crinckle virus* (TCV) et le *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) et sont photographiées 14 et 21 jours post-inoculation (jpi). Les plantes témoins « MOCK » ne sont pas infectées.

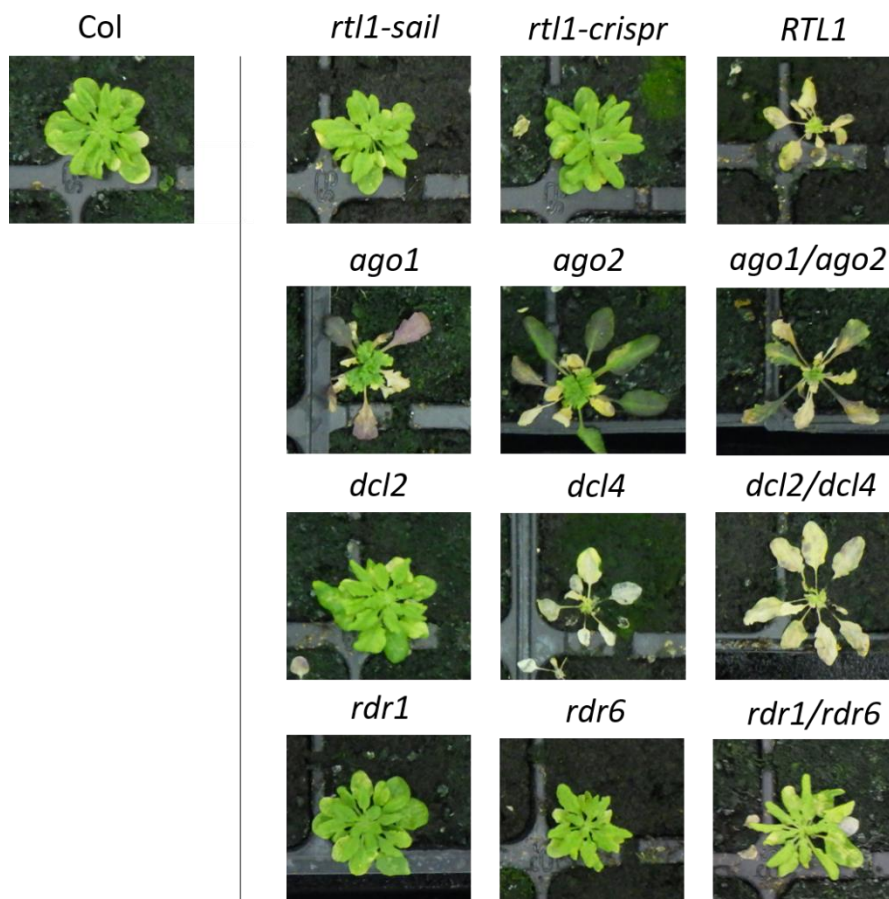


Figure 13 : Symptômes provoqués par le TYMV sur différents mutants du RNAi

Les plantes d'*A. thaliana* sauvages et mutantes sont cultivées en jours courts et infectées par le TYMV 1 mois post-germination. 16 plantes par génotype sont suivies et les photos sont prises 1 mois post-inoculation. Une plante représentative des symptômes est présentée par génotype. Les allèles suivants en fond Col sont utilisés : *rtl1-sail*, *rtl1-crispr* (décrits par la suite), *35S:RTL1-myc* (*RTL1*), *ago1-27* (*ago1*), *ago2-3* (*ago2*), *ago1-27/ago2-3* (*ago1/ago2*) *dcl2-4* (*dcl2*), *dcl4-2C* (*dcl4*), *dcl2-4/dcl4-2C* (*dcl2/dcl4*), *rdr1*, *rdr6* et *rdr1/rdr6*.

1) Caractérisation du PTGS anti-viral limitant la prolifération du TYMV

L'infection de plantes sauvages d'*Arabidopsis* par le TYMV n'induit pas de symptômes forts contrairement aux plantes sauvages infectées avec le *Turnip crinckle virus* (TCV), dont le VSR inhibe S-PTGS et IR-PTGS suggérant la mise en place d'un PTGS anti-TYMV relativement efficace (**Figure 12**). Par ailleurs, la surexpression de *RTL1* chez des plantes d'*Arabidopsis* transgéniques entraîne une aggravation des symptômes induits par le TYMV, vraisemblablement parce que RTL1 inhibe ce PTGS anti-viral en empêchant la production de siRNAs dirigés contre le virus (Shamandi et al., 2015). A ce jour, le PTGS anti-viral mis en place pour lutter contre le TYMV n'a pas été totalement élucidé. Une étude montre une implication de DCL4 et DRB4 dans la défense anti-TYMV puisque les mutants *dcl4* et *drb4* montrent des symptômes aggravés et l'accumulation de deux fois plus de RNAs viraux par rapport aux plantes sauvages infectées (Jakubiec et al., 2012). Des études plus systématiques menées sur le *Cucumber mosaic virus* (CMV) et le *Turnip mosaic virus* (TuMV) ont montré une action redondante de RDR1 et RDR6, de DCL2 et DCL4, et de AGO1 et AGO2, les doubles mutants *rdr1/rdr6*, *dcl2/dcl4* et *ago1/ago2* étant plus sensibles et accumulant beaucoup plus de RNAs viraux que les simples mutants (Wang et al., 2010, 2011; Garcia-Ruiz et al., 2015, 2010). Nous avons donc analysé les symptômes et l'accumulation des grands et petits RNAs viraux chez une série de simples et doubles mutants impliquant *rdr1*, *rdr6*, *dcl2*, *dcl4*, *ago1* et *ago2*.

Confirmant les résultats publiés par Jakubiec et al., 2012, on constate une hypersensibilité des mutants *dcl4* à l'infection par le TYMV, avec des symptômes de crispation des feuilles, de jaunissement, de senescence et de croissance réduite aggravés par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 13**). En revanche, chez le mutant *dcl2* les symptômes du TYMV sont similaires à ceux des plantes sauvages infectées. De plus, chez le double mutant *dcl2/dcl4* les symptômes sont aussi forts que chez les simples mutants *dcl4*, suggérant que DCL2 ne contribue pas au PTGS anti-viral dirigé contre le TYMV. Chez les simples mutants *ago1* et *ago2* on observe des symptômes plus forts que ceux des plantes sauvages infectées, suggérant que AGO1 et AGO2 participent au PTGS anti-viral dirigé contre le TYMV. Chez le double mutant *ago1/ago2*, les symptômes sont encore plus forts, suggérant que AGO1 et AGO2 participent de manière non-redondante. Enfin, les symptômes observés chez les mutants d'amplification du PTGS *rdr1*, *rdr6* et *rdr1/rdr6* sont similaires à ceux des plantes sauvages,

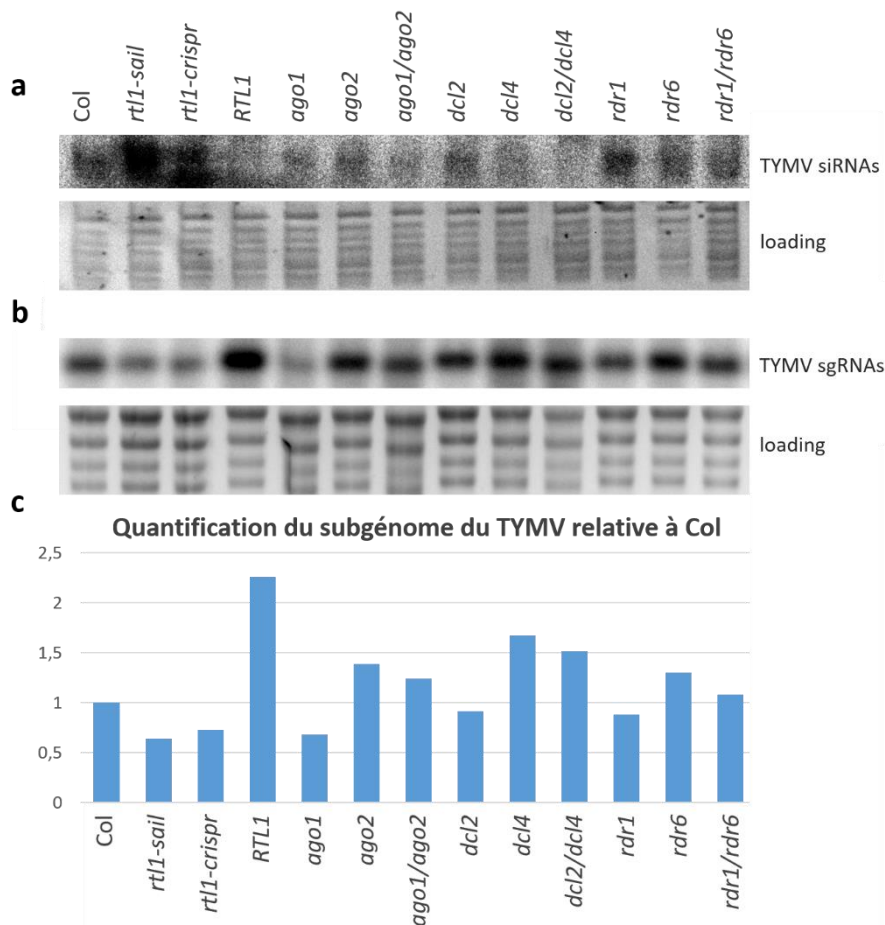


Figure 14 : Analyse de l'accumulation des siRNAs et mRNAs viraux chez les mutants du RNAi infectés par le TYMV

a et b) Les siRNAs et RNAs viraux subgénomiques (sgRNAs) d'un pool de 16 plantes infectées par le TYMV sont analysés par northern blot LMW (**a**) et HMW (**b**). Une sonde correspondant à l'ORF subgénomique de la *COAT PROTEIN (CP)* du TYMV est utilisée pour la détection par marquage radioactif au P³². Le loading correspond à la migration des RNAs sur gel d'acrylamide (LMW, **a**) et d'agarose (HMW, **b**) révélé à l'EtBr. **c)** La quantification du sgRNA du TYMV est calculée à partir du northern HMW à l'aide du logiciel ImageJ et relativisée aux plantes sauvages *Col* infectées par le TYMV.

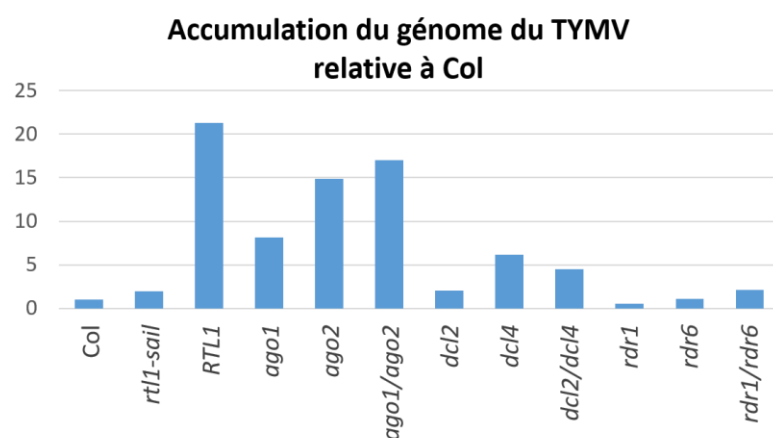


Figure 15 : Le TYMV s'accumule plus chez les mutants du RNAi hypersensibles à l'infection

L'accumulation du génome du TYMV est déterminée par RT-qPCR sur l'ORF *P69* 5 à 6 semaines post-inoculation sur un pool de 16 plantes infectées par le TYMV. Les valeurs sont relativisées par rapport à celles des plantes *Col* infectées par le TYMV.

suggérant que les facteurs d'amplification du PTGS ne semblent pas impliqués dans le PTGS anti-viral dirigé contre le TYMV ou que leur action est inhibée par le TYMV. Cependant, l'étude des symptômes n'étant pas suffisante pour caractériser strictement les acteurs du PTGS anti-TYMV, l'accumulation des siRNAs viraux issus du TYMV et des RNAs viraux est analysée.

En cohérence avec l'analyse des symptômes, on observe une accumulation accrue des mRNAs viraux de l'ORF de la *COAT PROTEIN* (*CP*) du TYMV chez les simples et doubles mutants *ago2*, *ago1/ago2*, *dcl4* et *dcl2/dcl4* par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 14b et c**). Cependant chez le mutant *ago1* la corrélation entre la force des symptômes et l'accumulation des mRNAs viraux n'est pas établie : en effet, on observe une diminution de l'accumulation des siRNAs et des mRNAs viraux de la *CP* du TYMV par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 14**). Toutefois, des données de RT-qPCR sur l'ORF *P69* du TYMV montrent une accumulation 7 fois plus forte de l'ARN génomique du TYMV (gRNA) chez les mutants *ago1* par rapport aux plantes sauvages infectées ainsi qu'une accumulation plus forte du gRNA chez les mutants *ago2*, *ago1/ago2*, *dcl4* et *dcl2/dcl4* (**Figure 15**). De plus, on observe une accumulation plus faible des siRNAs issus de la *CP* du TYMV chez les mutants *ago1*, *ago2*, *ago1/ago2*, *dcl4* et *dcl2/dcl4* (**Figure 14a**). Ces résultats confirment l'implication de AGO1, AGO2 et DCL4 dans le PTGS anti-viral dirigé contre le TYMV. Enfin, on observe chez le mutant *rdr1* une accumulation des siRNAs du TYMV légèrement plus forte et une accumulation des mRNAs du TYMV légèrement plus faible que chez les plantes sauvages, tandis que l'inverse est observé chez le mutant *rdr6* (accumulation légèrement plus faible des siRNAs et accumulation des mRNAs du TYMV légèrement plus forte que chez les plantes sauvages ; **Figure 14**). Ces effets sont annulés chez le double mutant *rdr1/rdr6*, suggérant une légère implication de RDR6 dans le PTGS anti-viral dirigé contre le TYMV, et une compétition de substrat entre RDR1 et RDR6.

L'absence de différence flagrante dans la sévérité des symptômes et l'accumulation des siRNAs et grands RNAs du TYMV chez les mutants *dcl2*, *rdr1* et *rdr6* par rapport aux plantes sauvages suggère soit que DCL2, RDR1 et RDR6 ne participent pas au PTGS anti-viral dirigé contre le TYMV, soit que leur activité est inhibée par le TYMV chez les plantes sauvages infectées. Etant donné que DCL2 et RDR6 sont nécessaires à l'étape d'amplification du S-PTGS mais pas

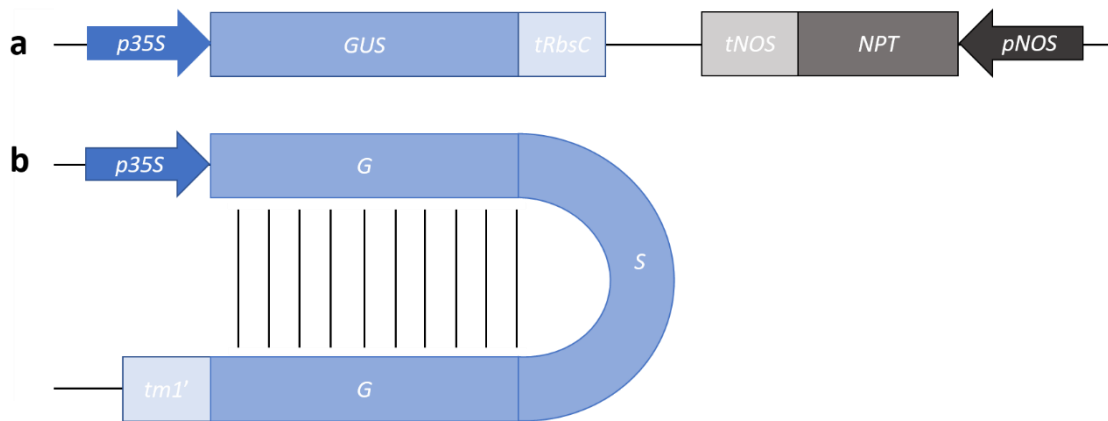


Figure 16 : Structure de l'insertion T-DNA des lignées transgéniques p35S:GUS et p35S:hpGUS utilisées

a) insertion T-DNA des lignées 6b4, L1 et Hc1. La séquence codante du gène bactérien *E. coli* UIDA (*GUS*) est sous le contrôle du promoteur 35S du *Cauliflower mosaic virus* (p35S) et du terminateur de la petite sous-unité de la RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE du pois *P. sativum* (*tRbsC*). Le gène de résistance bactérien *E. Coli* NPTII (*NPT*) est sous le contrôle du promoteur et terminateur bactérien *NOPALINE SYNTHASE* (*NOS*). b) insertion T-DNA de la lignée 6b4/306. La séquence codante du gène *GUS* est répétée et inversée de manière à ce que 558 pb en 3' forment une structure en tête d'épingle (*hpGUS*) avec la partie 5'. Une délétion interne de 231 pb est présente. La construction *hpGUS* est sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur d'*Agrobacterium TUMOR MORPHOLOGY* *tm1'*.

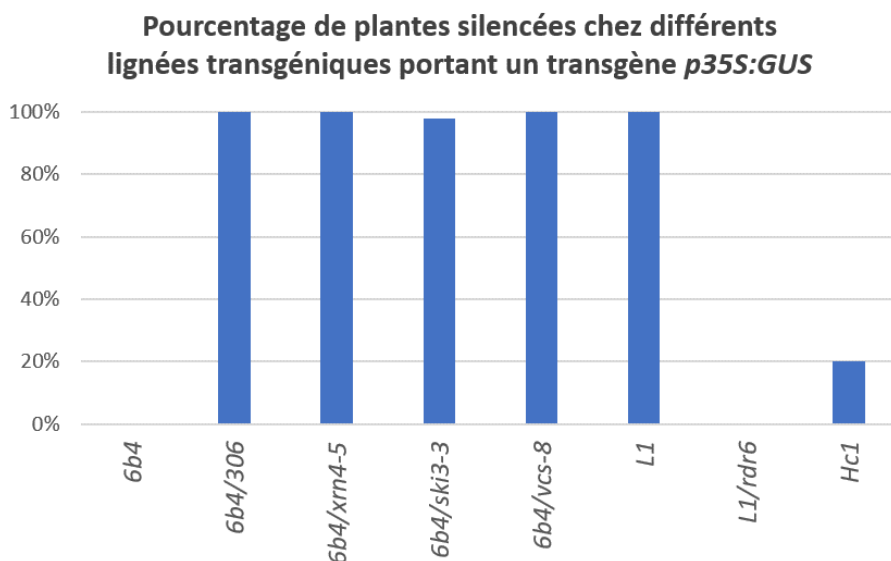


Figure 17 : Probabilité de déclenchement de silencing chez les lignées transgéniques p35S:GUS et p35S:hpGUS sauvages et mutantes utilisées

La lignée 6b4 exprime le transgène p35S:GUS de manière stable et 0% des plantes déclenchent le silencing du transgène. La lignée 6b4/306 porte un transgène p35S:hpGUS et 100% des plantes déclenchent le silencing du transgène. Les lignées mutées pour les gènes du RQC *XRN4*, *SKI3* et *VCS* en fond 6b4 déclenchent le silencing du transgène quasiment à 100%. C'est également le cas de la lignée L1 où le transgène p35S:GUS n'est pas exprimé de manière stable. Une mutation dans le gène *RDR6* chez L1 bloque le silencing du transgène dans 100% des plantes. Les plantes de la lignée Hc1 expriment de manière stable le transgène p35S:GUS dans 80% des cas et déclenchent le silencing du transgène dans 20% des cas.

à l'IR-PTGS, nous avons infecté par le TYMV des lignées transgéniques portant des transgènes silencés par S-PTGS ou IR-PTGS afin de trancher entre ces deux hypothèses.

2) Caractérisation de l'effet du TYMV sur le PTGS transgénique

Les symptômes faibles observés sur des plantes sauvages infectées par le TYMV suggèrent que le PTGS anti-viral limite la prolifération du virus (**Figure 12**). Toutefois, ces plantes n'éliminent pas le virus, suggérant que le virus exprime un VSR capable de contrecarrer partiellement le PTGS anti-viral. Afin de tester cette hypothèse, différentes lignées transgéniques ont été infectées par le TYMV.

La lignée *LI* porte deux copies en Inverse Repeat (IR) d'un T-DNA comportant le transgène *p35S:GUS-tRbcS*. A chaque génération, le S-PTGS se met en place spontanément très tôt au cours du développement. Ainsi, 5 jours après germination, il ne reste dans la plante *LI* que 10% de l'activité GUS présente dans une plante *LI/rdr6* chez laquelle le S-PTGS est bloqué par la mutation *rdr6* (Elmayan et al., 1998). A 11 jours, il ne reste chez *LI* plus que 3% de l'activité GUS présente dans *LI/rdr6*, et au-delà de 18 jours moins de 1% (Elmayan et al., 1998). La lignée *6b4* porte une seule copie du même T-DNA portant le transgène *p35S:GUS-tRbcS* mais ne déclenche jamais le S-PTGS spontanément et l'activité GUS est la même dans les plantes *6b4* et *6b4/rdr6* (Parent et al., 2015b).

Les lignées *6b4* et *LI* produisent toutes les deux un RNA issu de la transcription permissive ou « readthrough » du transgène *pNOS:NPT-tNOS* à travers le terminateur bactérien *tNOS*, qui se prolonge dans le transgène *p35S:GUS-tRbcS* (Parent et al., 2015 ; **Figure 16a**) . Après clivage du transcrit *NPT-SUG* au site de polyadénylation du terminateur *tNOS*, deux RNAs sont produits : un mRNA *NPT* coiffé (« cappé ») et polyadénylé, traduit en une protéine conférant la résistance à la kanamycine, et un RNA *SUG* non cappé. Aucun RNA readthrough *GUS-TPN* n'est produit par le transgène *p35S:GUS-tRbcS* qui utilise le terminateur de plante *tRbcS* plus efficace que le terminateur bactérien *tNOS*. La transcription des transgènes *pNOS:NPT-tNOS* et *p35S:GUS-tRbcS* est plus forte au locus *LI* qu'au locus *6b4*. Ceci a été mis en évidence par des expériences de run-on (Elmayan et al., 1998), par RT-qPCR en fond *rdr6* (Parent et al., 2015b), en comparant le niveau de résistance à la kanamycine apporté par le transgène *pNOS:NPT-tNOS* des deux lignées (Parent et al., 2015b) et le niveau d'activité GUS des lignées *6b4* et *LI/rdr6* (**Figure 18**). La quantité de RNAs aberrants *SUG* non cappés est par conséquent

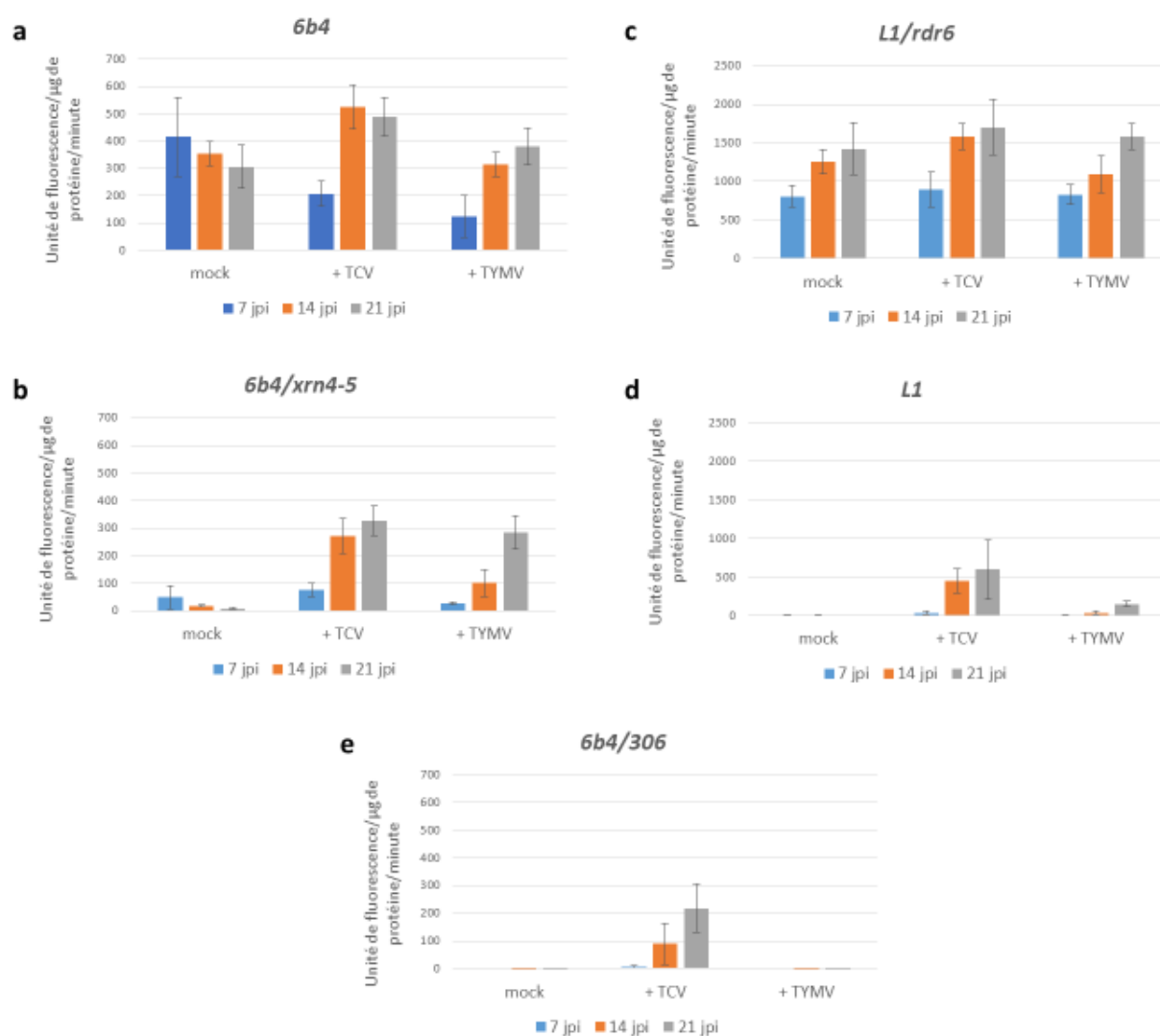


Figure 18 : L'infection par le TYMV lève le silencing du transgène chez les lignées 6b4/xrn4, a un faible effet chez L1 et aucun chez 6b4/306

16 plantes/conditions/génotypes sont infectées 7 jours post-germination et sont analysées en jours longs. L'activité GUS est mesurée en unité de fluorescence par µg de protéine totale par minute 7, 14 et 21 jours post-inoculation (jpi) par le TCV et le TYMV. Les moyennes de l'activité GUS des 16 plantes/génotypes sont représentées et les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

plus grande chez *L1* que chez *6b4* (Parent et al., 2015b) et échappe en partie à la dégradation par le RNA Quality Control (RQC), ce qui entraîne vraisemblablement le déclenchement spontané du S-PTGS chez *L1* (**Figure 17**). En faveur de cette hypothèse, des mutations dans le RQC, par exemple *xrn4*, conduisent à une augmentation de la quantité de RNAs aberrants *SUG* non cappés chez *6b4*, et un déclenchement spontané du S-PTGS de *6b4* (Parent et al., 2015b).

Enfin, la lignée *6b4/306* est issue d'un croisement entre la lignée *6b4* et la lignée *306* qui porte un transgène *p35S:hpGUS* constitué de la séquence du gène *GUS* délétée en interne de 231 pb (séquence *GS*) suivie des 538 premières bp de *GUS* (séquence *G*) en orientation inverse (Béclin et al., 2002 ; **Figure 16b**). Ce transgène *p35S:hpGUS* produit donc un dsRNA directement transformé en siRNA par les DCLs sans intervention des RDRs. Dans la lignée *6b4/306*, on observe donc un IR-PTGS du transgène *p35S:GUS-tRbcS* de *6b4* induit en *trans* par le locus *306* sans intervention des RDRs (Béclin et al., 2002 ; **Figure 17**).

Nous avons donc infecté les lignées *L1*, *6b4/xrn4* et *6b4/306* avec le TYMV et comparé leur activité GUS à celle de plantes témoins non silencées *L1/rdr6* et *6b4* infectées par le même virus. Nous avons également infecté ces lignées par le *Turnip crinckle virus* (TCV) qui exprime un VSR dont l'effet sur le S-PTGS et sur l'IR-PTGS a déjà été décrit (Mourrain et al., 2000; Béclin et al., 2002 ; **Tableau 1**).

Sur la **Figure 12**, on constate chez les plantes d'*Arabidopsis thaliana* non inoculées (mock) un développement végétatif normal (**a, d**). Ce n'est pas le cas des plantes inoculées où l'infection a considérablement affecté la croissance des plantes et retardé la floraison (**b, c, e, f**). Pour l'infection au TCV la présence de nécroses est observée dès la deuxième semaine post-inoculation (**b**). Cet état empire à la troisième semaine post-inoculation et seules certaines plantes réussissent à fleurir, sans toutefois développer de hampe florale (**e**). L'effet du TYMV sur le développement de la plante est moins fort et l'on voit apparaître un jaunissement des feuilles dès la seconde semaine d'infection (**c**). On voit à la troisième semaine le développement de hampes florales (**f**), mais plus petites que chez les plantes mock. Les plantes sont donc beaucoup plus sensibles au TCV qu'au TYMV. Ces résultats ont été observés chez tous les génotypes testés, soit *6b4*, *6b4/306*, *6b4/xrn4*, *L1* et *L1/rdr6*.

Chez *L1* (**Figure 18d**), le S-PTGS conduit à une absence totale d'activité GUS (plantes mock). Une levée progressive du silencing est observée chez les plantes *L1* infectées par le TCV en

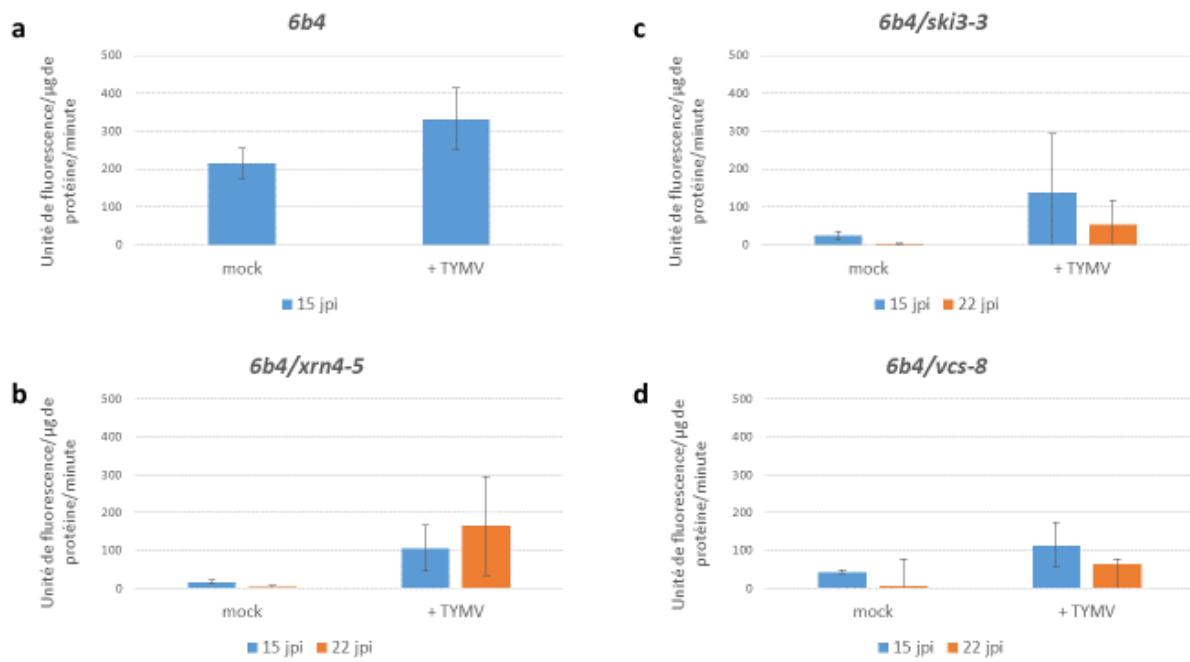


Figure 19 : L'infection par le TYMV lève le silencing de *6b4* uniquement en fond RQC-déficient

16 plantes/conditions/génotype sont infectées avec le TYMV 7 jours post-germination et sont analysées en jours longs. L'activité GUS est mesurée à 15 et/ou 22 jours post-inoculation (jpi) par le TYMV et est exprimée en unité de fluorescence/μg de protéine/minute. Les moyennes de l'activité GUS des 16 plantes/génotypes sont représentées et les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

accord avec ce qui a déjà été publié (Mourrain et al., 2000). L'activité des plantes *LI* infectées par le TYMV reste quant à elle très inférieure à celle des plantes *LI/rdr6* (**Figure 18c**), indiquant que l'effet du TYMV sur le S-PTGS de *LI* est très faible. En revanche, les plantes *6b4/xrn4* infectées par le TYMV (**Figure 18b**) montrent une levée de silencing aussi importante que les plantes *6b4/xrn4* infectées par le TCV, indiquant que le TYMV inhibe le S-PTGS de *6b4* induit par la mutation *xrn4* aussi efficacement que le TCV.

Chez *6b4/306* (**Figure 18e**), l'IR-PTGS conduit à une absence totale d'activité GUS (plantes mock). Une activité GUS est détectée chez les plantes *6b4/306* infectées par le TCV, à un niveau toutefois inférieur à celui détecté chez les plantes *6b4* témoins infectées par le TCV. En revanche, aucune activité GUS n'est détectée chez les plantes *6b4/306* infectées par le TYMV. Ces résultats confirment donc que l'IR-PTGS est levé par le TCV (Béclin et al., 2002) mais pas par le TYMV (Chen et al., 2004).

L'expérience décrite ci-dessus ayant été réalisée en serre pendant une période de fortes chaleurs qui a induit une montée à fleur précoce, nous avons voulu vérifier ces résultats en conditions de température, de lumière et d'humidité contrôlées en chambre de culture, et nous nous sommes placés en conditions de jours courts afin de pouvoir mener les expérimentations sur un temps plus long. En raison du coût de ces chambres, seul l'effet du TYMV a été testé. Les résultats obtenus en chambre de culture en jours courts (**Figure S1 Annexes**) sont semblables aux résultats obtenus en serre en jours longs (**Figure 18**), confirmant que le TYMV a un effet faible sur le S-PTGS de *LI*, aucun sur l'IR-PTGS de *6b4/306* mais supprime le S-PTGS de *6b4* induit dans le fond *xrn4*.

Afin de savoir si l'effet fort du TYMV sur le S-PTGS de *6b4/xrn4* est spécifique d'un défaut de RQC ou s'il est le résultat d'un effet plus fort du TYMV sur la lignée *6b4* que sur la lignée *LI*, nous avons infecté par le TYMV les lignées *6b4/ski3* et *6b4/vcs* qui déclenchent le S-PTGS aussi efficacement que *6b4/xrn4* (Martinez de Alba et al., 2011; Martínez de Alba et al., 2015; Yu et al., 2015). La protéine SUPERKILLER3 (SKI3) permet d'adresser les RNAs à dégrader vers l'exosome. La protéine VARICOSE (VCS) fait quant à elle partie du complexe de suppression de la coiffe (decapping) précédant l'action des XRN. Les mutations *ski3* et *vcs* induisent donc le S-PTGS de *6b4* par un défaut RQC, comme *xrn4*.

Chez les plantes *6b4/xrn4*, *6b4/ski3* et *6b4/vcs* mock, aucune activité GUS n'est détectée, en

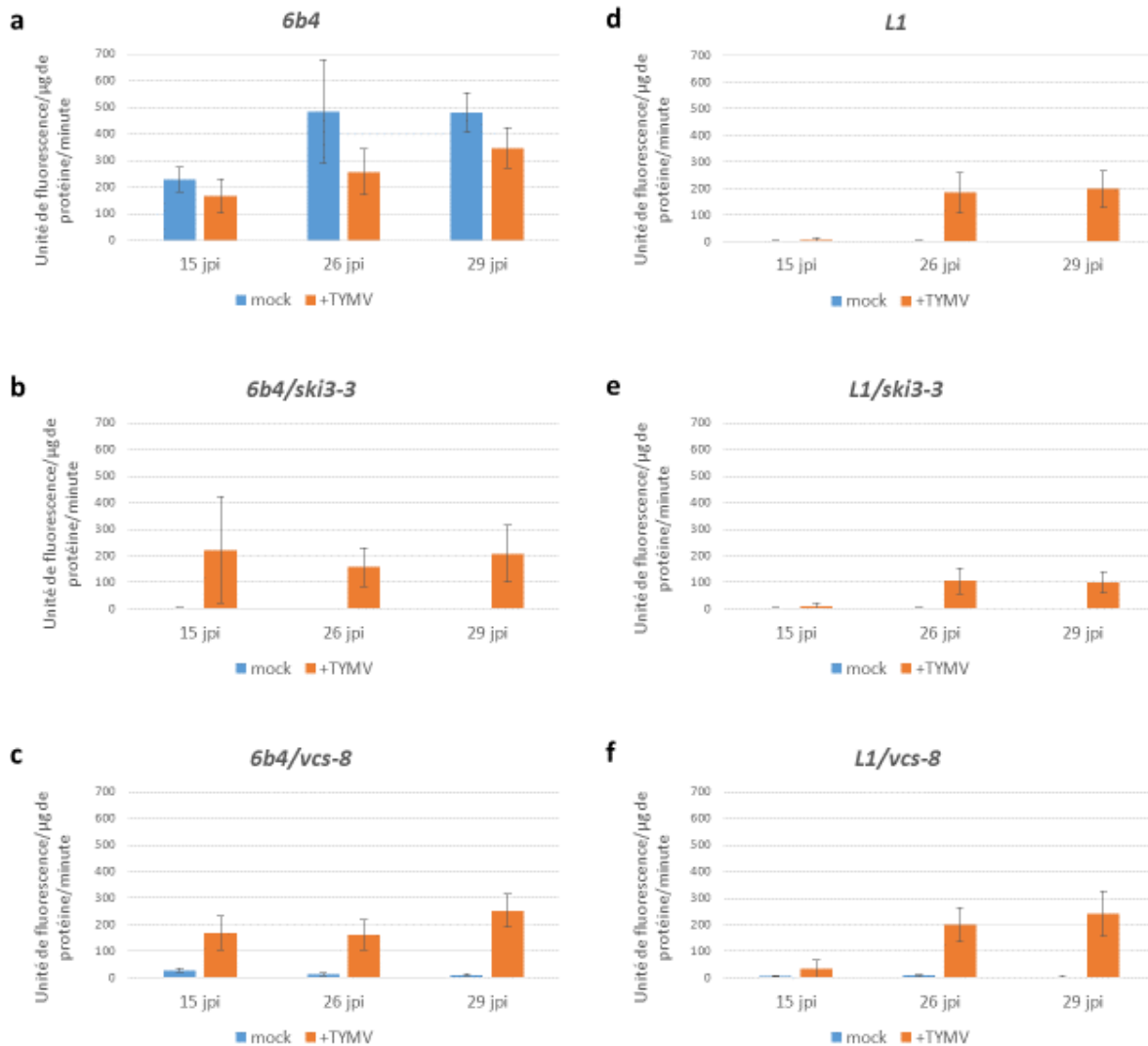


Figure 20 : L'infection par le TYMV lève le silencing de la lignée L1 indépendamment des mutations du RQC

16 plantes mock et 32 plantes par génotype sont infectées par le TYMV 7 jours post-germination et sont analysées en jours longs. L'activité GUS est mesurée 15, 26 et 29 jours post-inoculation (jpi) par le TYMV et est exprimée en unité de fluorescence/μg de protéine/minute. Les moyennes de l'activité GUS des 16 ou 32 plantes/génotypes sont représentées et les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

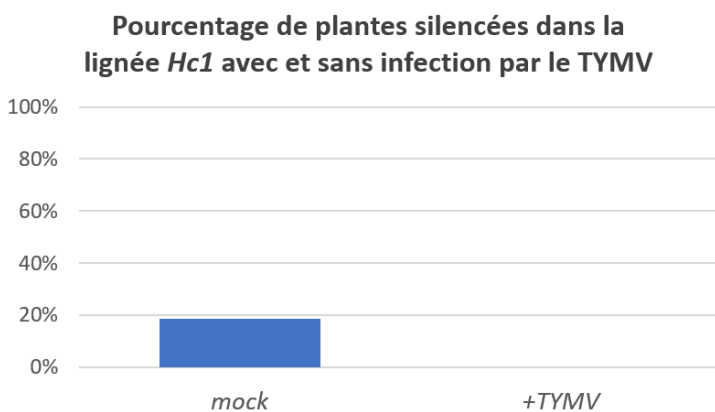


Figure 21 : L'infection par le TYMV supprime le silencing chez Hc1

Les comptages sont effectués 4 semaines après inoculation en jours longs sur 96 plantes mock et 96 plantes infectées 7 jours post-germination.

accord avec les résultats publiés (Martínez de Alba et al., 2011; Martinez de Alba et al., 2015; Yu et al., 2015 ; **Figure 19b, c et d**). Par contre, chez les plantes *6b4/xrn4*, *6b4/ski3* et *6b4/vcs* infectées par le TYMV, on observe une levée du silencing du transgène *p35S:GUS*. Bien que l'activité GUS soit un peu inférieure chez *6b4/ski3* et *6b4/vcs* par rapport à *6b4/xrn4* (**Figure 19a**), on peut conclure que le TYMV est capable d'inhiber le S-PTGS induit par des mutations dans les gènes de RQC *XRN4*, *SKI3* et *VCS*.

Afin de comprendre si c'est l'absence d'un RQC fonctionnel qui permet au TYMV de lever efficacement le S-PTGS de *6b4*, nous avons infecté les lignées *L1*, *L1/ski3* et *L1/vcs* avec le TYMV et comparé l'activité GUS avec les lignées *6b4*, *6b4/ski3-3* et *6b4/vcs-8*. On observe aucune activité GUS chez les plantes *6b4/ski3-3* et *6b4/vcs-8* mock et une levée du silencing chez les plantes *6b4/ski3-3* et *6b4/vcs-8* infectées par le TYMV, sans atteindre le niveau d'activité GUS de *6b4* (**Figure 20a, b et c**). Ces résultats confirment les observations précédentes (**Figure 19**). Chez les plantes *L1*, *L1/ski3* et *L1/vcs* mock, aucune activité GUS n'est détectée (**Figure 20d, e et f**). En revanche, le TYMV inhibe le S-PTGS chez les lignées *L1/ski3-3* et *L1/vcs-8* aussi efficacement que chez la lignée *L1*. Il semble donc que l'effet du TYMV sur le S-PTGS dépende plus du locus transgénique ciblé et de son potentiel de déclenchement du S-PTGS que de la fonctionnalité ou non du RQC.

Afin de tester cette hypothèse, un locus présentant une efficacité de S-PTGS intermédiaire entre *6b4* et *L1* a été utilisé. La lignée transgénique *Hc1* porte le même transgène *p35S:GUS* que les lignées *6b4* et *L1* mais seules 20% des plantes *Hc1* déclenchent le S-PTGS du transgène à chaque génération (Elmayan et al., 1998 ; **Figure 17**). Nous avons donc infecté cette lignée avec le TYMV et déterminé le pourcentage de plantes silencées par S-PTGS. Comme attendu, on observe chez les plantes *Hc1* mock 19% de plantes silencées, alors que chez les plantes *Hc1* infectées par le TYMV aucune plante n'est silencée (**Figure 21**). Le TYMV supprime donc le S-PTGS de *Hc1*, confirmant que le TYMV inhibe efficacement le S-PTGS de lignées faibles (*6b4*, *Hc1*) mais peine à supprimer le S-PTGS de lignées fortes (*L1*).

Activité GUS chez différentes lignées transgéniques avec ou sans *p35S:P69*

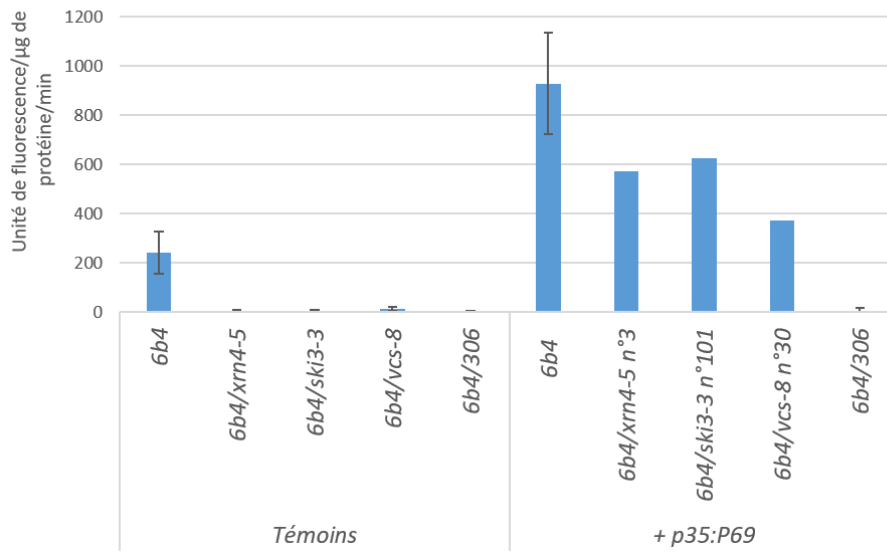


Figure 22 : L'expression de P69 in planta lève le silencing de 6b4 induit en fond RQC-déficient et n'a pas d'effet sur l'IR-PTGS de 6b4/306

L'activité GUS est mesurée en unité de fluorescence/µg de protéine/min. Les analyses sont faites sur des T1 aux feuilles jaunes (8 T1 pour *6b4/p35S:P69*, 10 pour *6b4/306/p35S:P69* et des T1 individuelles pour les autres génotypes) et sur 5 à 16 plantes pour les témoins non-transformés.

3) Caractérisation du VSR du TYMV

a) Effet de l'expression de *P69 in planta* sur le S-PTGS et l'IR PTGS des transgènes et l'accumulation des ta-siRNAs endogènes

La protéine P69 qui est nécessaire au mouvement de cellule à cellule du virus (Bozarth et al., 1992) est considérée comme le VSR du TYMV (Chen et al., 2004). Afin de confirmer que P69 est bien responsable de l'inhibition du S-PTGS provoquée par l'infection par le TYMV, les lignées *6b4*, *6b4/ski3-3*, *6b4/xnr4-5* et *6b4/306* ont été transformées avec une construction *p35S:P69*, et l'activité GUS des transformants a été déterminée. De par son interaction avec les protéines GOLDEN-LIKE 1 et 2 nécessaires à la synthèse de la chlorophylle, les plantes qui expriment correctement *P69* sont facilement identifiables par la couleur jaune de leurs feuilles (Chen et al., 2004; Ni et al., 2017 ; **Figure 23a**)

Chez *6b4/xnr4*, *6b4/ski3* et *6b4/vcs-8*, l'expression du transgène *p35S:P69* conduit à une inhibition du S-PTGS plus forte que celle observée lors de l'infection par le TYMV (**Figure 22** comparée à la **Figure 18b**, **Figure 19bcd** et **Figure 20bc**). Il semble donc qu'une très forte expression de *P69* permette une inhibition totale du S-PTGS induit chez *6b4* en fond mutant déficient pour le RQC. Cela montre aussi l'absence d'interférence entre les transgènes *p35S:GUS* et *p35S:P69*. En revanche, chez *6b4/306*, l'expression du transgène *p35S:P69* ne permet pas de retrouver une activité GUS, confirmant l'absence d'effet du TYMV sur l'IR-PTGS (Chen et al., 2004 ; **Figure 22** comparée à la **Figure 18e**). On peut noter que les transformants *6b4/p35S:P69* ont une activité GUS supérieure aux plantes témoins *6b4*, ce qui suggère un effet de P69 sur l'expression du transgène GUS, la stabilité de la protéine GUS ou son activité enzymatique (**Figure 22**).

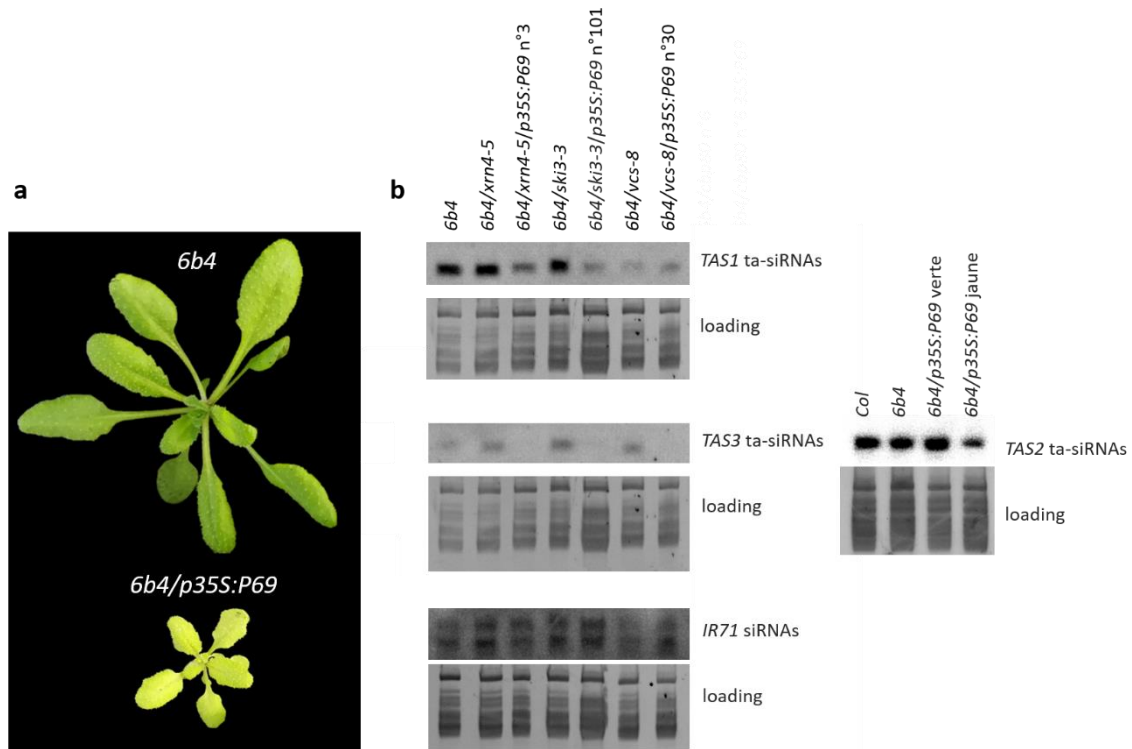


Figure 23 : L'expression de P69 in planta induit une diminution de l'accumulation des TAS siRNAs
a) effet de l'expression de P69 sur le développement chez *Arabidopsis thaliana*, **b)** analyse par northern blot LMW de l'accumulation des TAS1, TAS2, TAS3 et IR71 siRNAs. Une sonde radioactive marquée au P³² correspondant aux siRNAs est hybridée. Le loading correspond à la migration des RNAs sur gel d'acrylamide révélé à l'EtBr.

L'absence d'effet du TYMV et du transgène *p35S:P69* sur l'IR-PTGS de *6b4/306* (**Figure 18e** et **Figure 22**) suggère que la phase d'amplification du S-PTGS, inutile à l'IR-PTGS, pourrait être la cible du VSR du TYMV. Nous avons donc analysé l'accumulation des *TAS* siRNAs chez les plantes exprimant *p35S:P69* car leur production dépend de RDR6, SDE5 et SGS3 qui sont requis pour le S-PTGS mais pas l'IR-PTGS. L'accumulation des siRNAs dérivés du double-brin endogène *IR71* est testée en témoin positif car sa production ne dépend pas de RDR6, SDE5 et SGS3 (Henderson et al., 2006; Dunoyer et al., 2010).

Chez les plantes qui expriment *P69* on observe une diminution de l'accumulation des ta-siRNAs dérivés des gènes *TAS1* et *TAS2*, et une absence des ta-siRNAs dérivés des gènes *TAS3*, tandis qu'aucune différence n'est observée dans l'accumulation des endoIR-siRNAs issus du double-brin *IR71* par rapport aux plantes non-transformées (**Figure 23b**). Ces résultats renforcent l'hypothèse que *P69* cible l'étape d'amplification du S-PTGS et pas les DCLs qui sont nécessaires à l'IR-PTGS et à la production des endoIR-siRNAs d'*IR71* (Dunoyer et al., 2010).

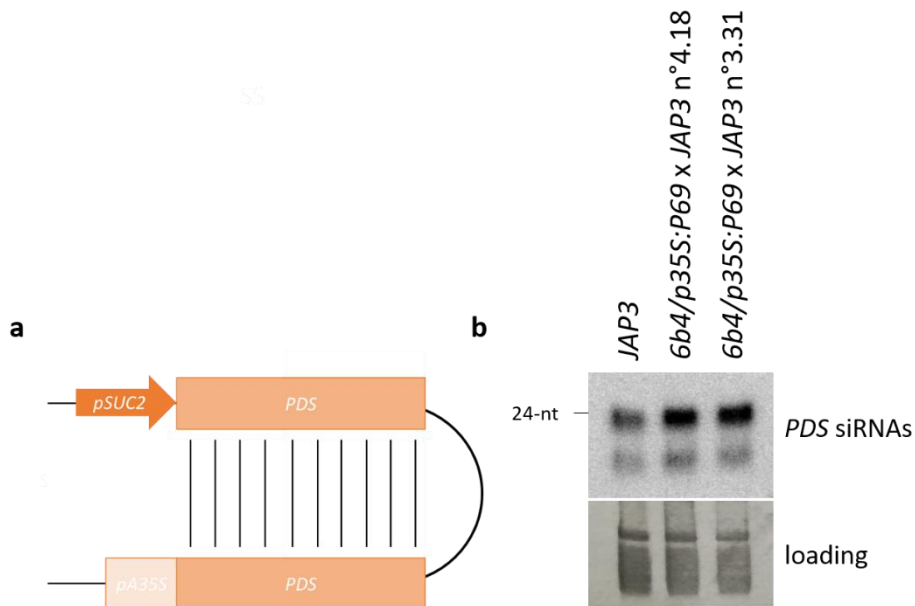


Figure 24 : L'expression de P69 n'a pas d'effet sur l'accumulation des siRNAs PDS dans la lignée JAP3
a) insertion T-DNA en IR chez la lignée JAP3. Le gène de la *PHYTOENE DESATURASE* (*PDS*) est répété et inversé sous le contrôle du promoteur du gène *SUCROSE SYMPORTER 2* (*SUC2*) et du terminateur 35S (*pA35S*) du CaMV.
b) analyse par northern blot LMW de l'effet de l'expression de *p35S:P69* sur l'accumulation des siRNAs *PDS* en fond JAP3. Deux lignées issues du croisements entre *6b4/p35S:P69* et JAP3 sont analysées. Une sonde radioactive marquée au P^{32} correspondant aux siRNAs *PDS* est hybridée. Le loading correspond à la migration des RNAs sur gel d'acrylamide révéillé à l'EtBr.

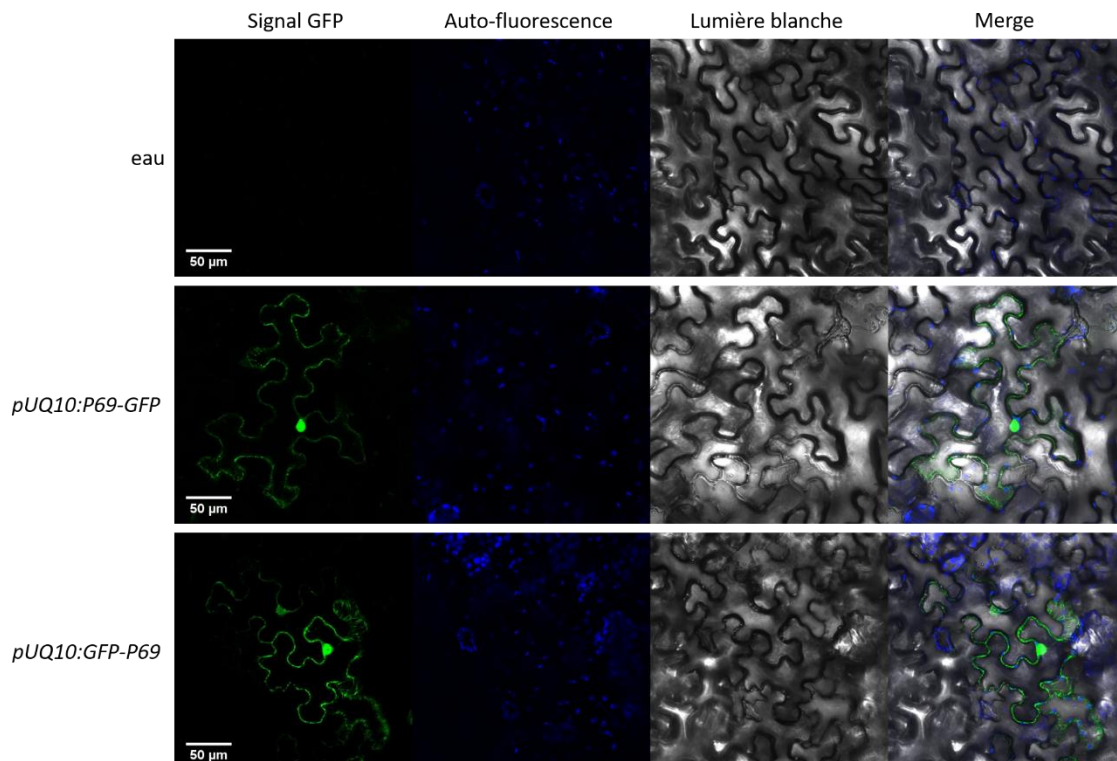


Figure 25 : P69 a une localisation cytoplasmique et nucléaire

Des feuilles de *Nicotiana benthamiana* sont infiltrées avec de l'eau et des agrobactéries portant les constructions *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ1:GFP-P69*. Le signal GFP (vert) et l'auto-fluorescence des chloroplastes (bleue) sont révélées par microscopie confocale deux jours post-agroinfiltration. Le merge correspond à la superposition des signaux GFP, d'auto-fluorescence et de la lumière blanche.

Pour confirmer l'absence d'effet de P69 sur l'IR-PTGS, nous avons testé l'effet de l'expression de *P69* sur un autre système transgénique : *JAP3* (**Figure 24a**). Dans cette lignée, un dsRNA correspondant à une partie du gène *PHYOTENE DESATURASE (PDS)* est produit sous le contrôle du promoteur du gène *SUCROSE SYMPORTER 2 (SUC2)* qui s'exprime spécifiquement dans les cellules compagnes du phloème. Le dsRNA *PDS* est clivé en siRNAs de 21-nt par DCL4 et de 24-nt par DCL3, mais seuls les siRNAs de 21-nt sont responsables du silencing de *PDS* (Smith et al., 2007; Dunoyer et al., 2007). Les siRNAs *PDS* sont transmis dans les tissus périphériques du mésophylle et entraînent la dégradation des mRNAs *PDS* endogènes nécessaires à l'accumulation de la chlorophylle, conduisant à l'apparition de nervures blanches (Smith et al., 2007; Dunoyer et al., 2007). Cet IR-PTGS de *PDS* est indépendant de RDR6 et SGS3 (Himber et al., 2003; Smith et al., 2007 ; données non publiées du laboratoire). Chez les plantes *JAP3/p35S:P69*, l'accumulation des siRNAs *PDS* de 21-nt est inchangée par rapport aux témoins *JAP3* (**Figure 24b**). La production des siRNAs *PDS* étant indépendante de RDR6 et P69 n'ayant pas d'effet sur leur accumulation, l'étape d'amplification du S-PTGS semble donc être la cible du VSR du TYMV.

b) Etude de la localisation de P69 *in planta*

L'inhibition du S-PTGS par P69 pourrait s'expliquer par une inhibition de l'activité ou une délocalisation d'un ou plusieurs facteurs impliqués dans l'étape d'amplification du S-PTGS. L'introduction de la construction *p35S:P69-GFP* dans des protoplastes a montré une localisation cytoplasmique et nucléaire (Ni et al., 2017). Les protéines RDR6 et SGS3 du S-PTGS s'accumulent au niveau de structures cytoplasmiques appelées siRNA-bodies (SB) (Glick et al., 2008; Elmayan et al., 2009; Kumakura et al., 2009). En condition de stress (chaleur, stress oxydatif, UV ou infection) où les ribosomes se mésappariaient des mRNAs, des agrégats cytoplasmiques appelés Stress Granules (SG) se forment et colocalisent avec les SB. Les granules de stress sont formés de complexes de ribonucléoprotéines où les RNAs transcriptionnellement inactifs sont stockés (Weber et al., 2008), probablement en vue d'être traduits ou transférés vers les Processing-bodies (PB) où le RQC a lieu.

Afin de déterminer plus précisément la localisation cytoplasmique de P69, des constructions *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* ont été réalisées et d'abord testées par agro-infiltration de feuilles de tabac. On observe une localisation nucléaire et cytoplasmique de P69 (**Figure 25**), en cohérence avec les résultats déjà publiés (Ni et al., 2017).

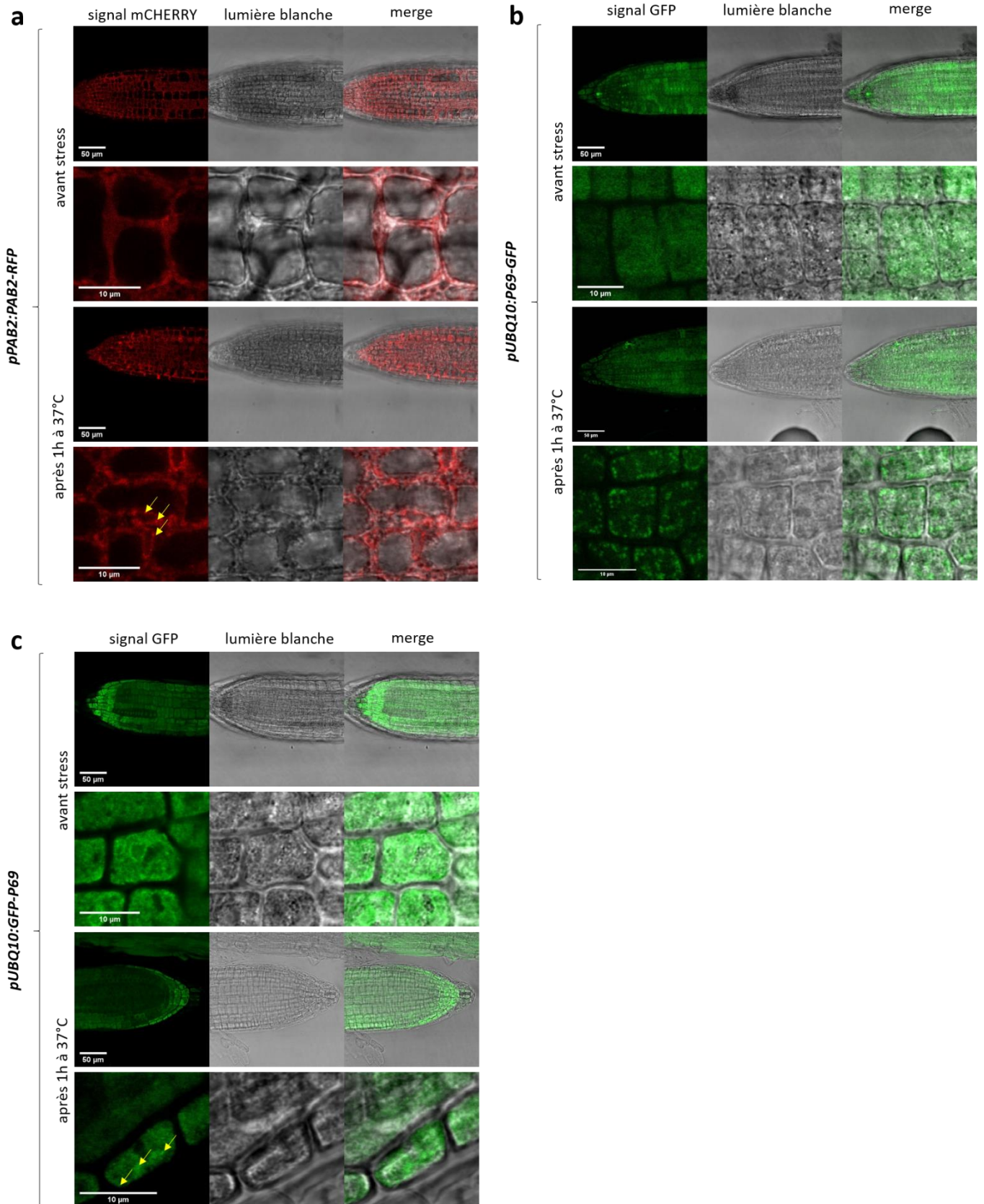


Figure 26 : P69 forme des granules en condition de stress chaud et colocalise avec PAB2 (figure 1/2)

Les signaux GFP (vert) et RFP (rouge) des racines *pPAB2:PAB2-RFP* (a), *pUBQ10:P69-GFP* (b) et *pUBQ10:GFP-P69* (c) sont analysés 5 jours post-germination par microscopie confocale en séquentiel (SP5) et objectifs x10 et x63. Les flèches jaunes indiquent les *foci* formés après stress lorsque les signaux GFP et RFP sont faibles. Le merge correspond à la superposition des signaux RFP ou GFP avec la lumière blanche.

Des transformants stables d'*A. thaliana* exprimant les constructions *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* ont été produits, et la localisation de P69 a été déterminée dans les racines en conditions normale ou de stress. Des plantes portant la construction *pPAB2:PAB2-RFP*, où la protéine POLYADENYLATE-BINDING 2 fusionnée à la RFP est utilisée comme marqueur des granules de stress (Weber et al 2008), ont été analysées en même temps. Afin d'étudier une éventuelle colocalisation entre P69 et les SB et/ou SG, des croisements entre les plantes *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* et les plantes *pPAB2:PAB2-RFP* ont également été générés. Les signaux GFP et RFP des racines sont analysés par microscopie confocale avant et après avoir été soumis à un stress chaud d'1h à 37°C. La taille de la figure produite étant conséquente, les résultats sont donc présentés sur deux pages pour faciliter leur lecture (**Figure 26** et **Figure 27**). On observe chez le témoin *PAB2-RFP* avant stress un signal RFP diffus cytoplasmique (**Figure 26a**). Comme attendu, après stress chaud, on observe la formation de *foci* correspondant aux SG. Chez les plantes *P69-GFP* et *GFP-P69*, on observe avant stress un signal diffus cytoplasmique (**Figure 26b** et **c**), cohérent avec les résultats d'infiltration de tabac (**Figure 25**), mais pas systématiquement de signal nucléaire. Après le stress chaud, on observe également la formation de *foci* pouvant correspondre à des SB ou SG de manière plus forte chez les plantes *P69-GFP* (**Figure 26b**) que chez les plantes *GFP-P69* (**Figure 26c**), suggérant que la fusion en N-terminal affecte l'activité de la protéine P69. Chez les croisements *pUBQ10:P69-GFP* avec les plantes *pPAB2:PAB2-RFP* on observe après stress que les *foci* *P69-GFP* colocalisent avec les *foci* de SG de *PAB2-RFP* (**Figure 27d**). C'est également le cas d'une manière moins forte chez les croisements entre les plantes *pUBQ10:GFP-P69* avec les plantes *pPAB2:PAB2-RFP* où les quelques *foci* *GFP-P69* formés semblent colocaliser avec les *foci* *PAB2-RFP* (**Figure 27e**). En condition de stress les SB et SG colocalisent et ne sont pas distinguables, ces résultats montrent ainsi que P69 colocalise avec les SB et/ou les SG en condition de stress chaud.

(Afin de faciliter la lecture sur papier de ce manuscrit, cette page est laissée vide.)

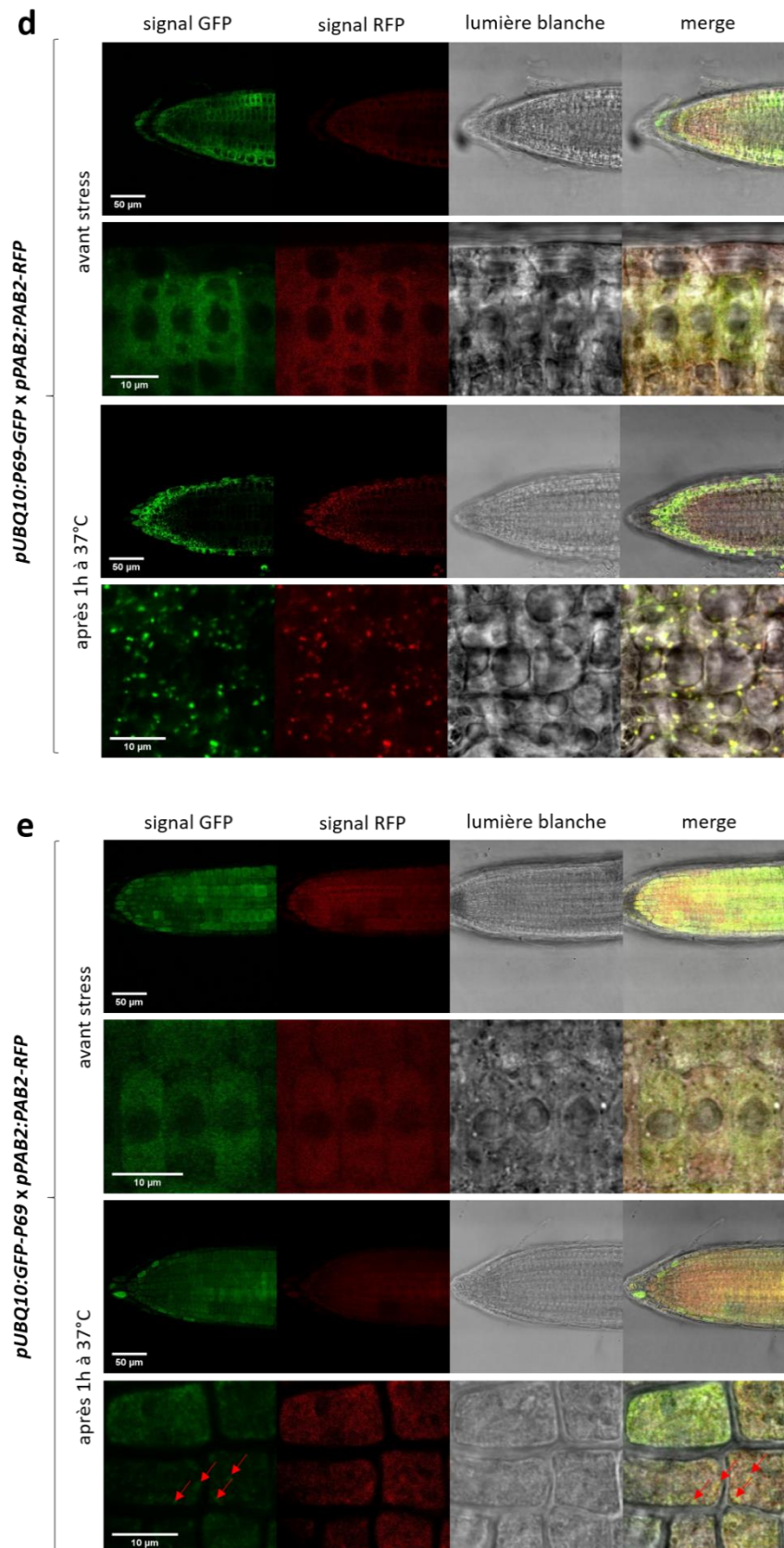


Figure 27 : P69 forme des granules en condition de stress chaud et colocalise avec PAB2 (figure 2/2)

Les signaux GFP (vert) et RFP (rouge) des racines de croisements entre *pPAB2:PAB2-RFP* et *pUBQ10:P69-GFP* (d) et *pUBQ10:GFP-P69* (e) sont analysés 5 jours post-germination par microscopie confocale en séquentiel (SP5) et objectifs x10 et x63. Les flèches rouges indiquent les *foci* formés après stress qui colocalisent lorsque les signaux GFP et RFP sont faibles. Le merge correspond à la superposition des signaux RFP et GFP avec la lumière blanche.

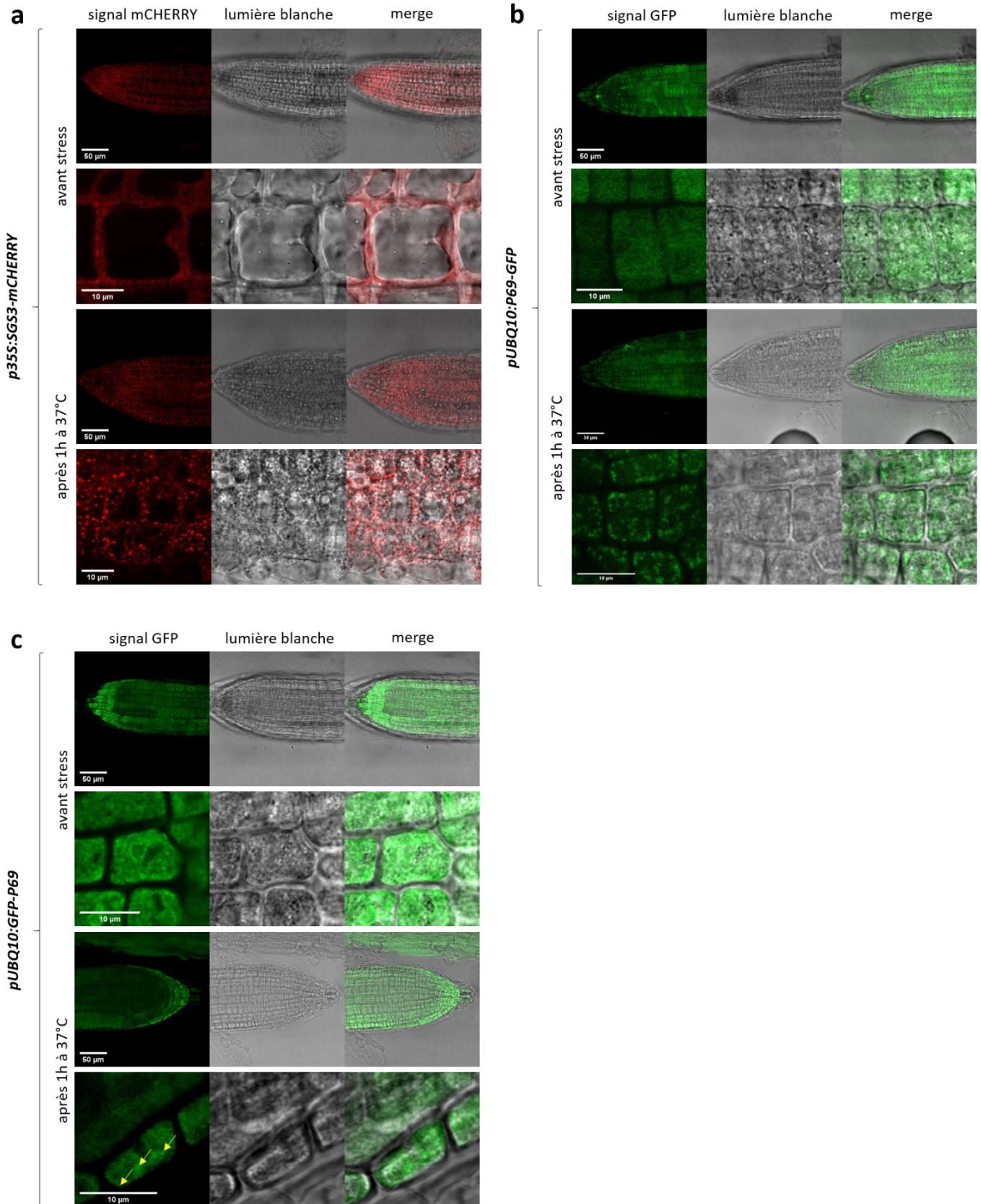


Figure 28 : P69 forme des granules en condition de stress chaud et colocalise avec SG3 (figure 1/2)

Les signaux GFP (vert) et mCherry (rouge) des racines *p35S:SG3-mCherry* (a), *PUBQ10:P69-GFP* (b) et *PUBQ10:GFP-P69* (c) sont analysés 5 jours post-germination par microscopie confocale en séquentiel (SP5) et objectifs x10 et x63. Les flèches jaunes indiquent les *foci* formés après stress lorsque le signal GFP est faible. Le merge correspond à la superposition des signaux mCherry ou GFP avec la lumière blanche.

Pour confirmer ces résultats, les plantes *d'Arabidopsis thaliana* *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* ont été croisées avec une lignée *p35S:SGS3-mCherry* qui marque les SB. En effet, le promoteur endogène de SGS3 est très faible, et les constructions *pSGS3:SGS3-tag* ne donnent pas de signal détectable. Les signaux GFP et mCherry des racines sont analysés par microscopie confocale avant et après avoir été soumis à un stress chaud d'1h à 37°C. La taille de la figure produite étant conséquente, les résultats sont donc aussi présentés sur deux pages (**Figure 28** et **Figure 29**). On observe chez le témoin *p35S:SGS3-mCherry* avant stress une localisation diffuse cytoplasmique de la protéine SGS3-mCherry et après stress la formation de *foci* correspondants aux SB (**Figure 28a**). Chez les plantes *P69-GFP* et *GFP-P69* on observe comme précédemment un signal GFP diffus cytoplasmique avant stress et la formation de *foci* cytoplasmiques après stress, de manière plus forte pour *P69-GFP* que pour *GFP-P69* (**Figure 28b** et **c**). Chez les croisements *pUBQ10:P69-GFP* x *p35S:SGS3-mCherry* et *pUBQ10:GFP-P69* x *p35S:SGS3-mCherry* on observe que les agrégats formés après stress colocalisent (**Figure 29d** et **e**), ce qui suggère que P69 colocalise avec SGS3 et confirme que P69 colocalise avec les SB et/ou les SG.

Ces analyses de colocalisation soutiennent donc l'hypothèse d'une inhibition de l'amplification du S-PTGS par P69. Cependant, lors d'une infection par le TYMV, l'inhibition du S-PTGS n'est que partielle (**Figure 18**, **Figure 19** et **Figure 20**), et ne suffit pas à expliquer le succès de l'infection. On peut donc raisonnablement imaginer que l'activation du suppresseur endogène de RNAi RTL1 lors de l'infection par le TYMV (Shamandi et al., 2015) vient compléter l'inhibition partielle de l'amplification du S-PTGS par le VSR du TYMV P69. C'est ce que nous avons entrepris de tester au chapitre suivant.

(Afin de faciliter la lecture sur papier de ce manuscrit, cette page est laissée vide.)

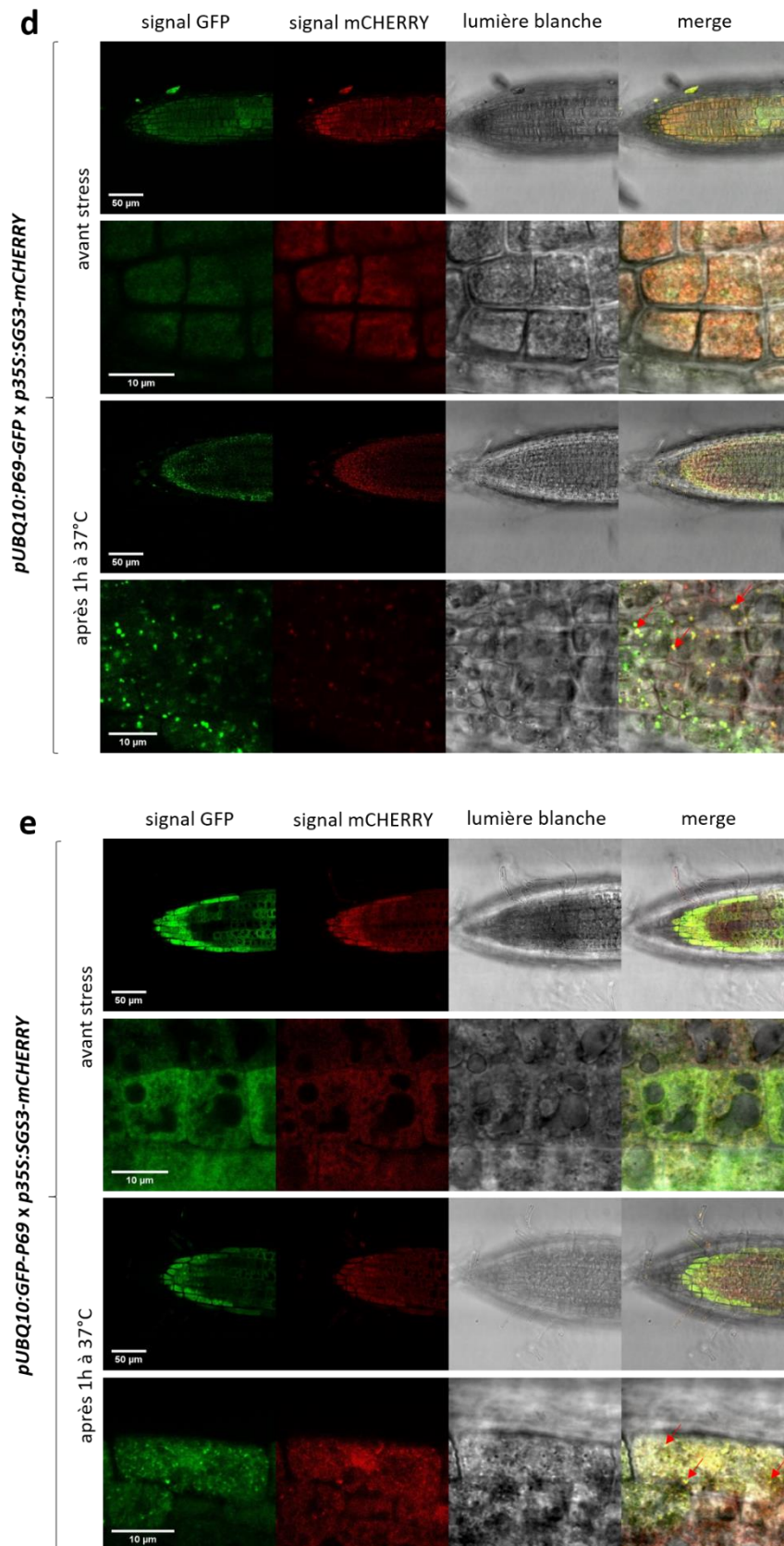
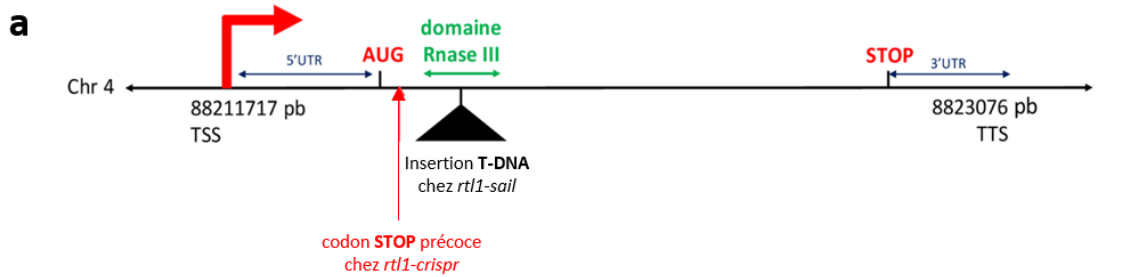


Figure 29 : P69 forme des granules en condition de stress chaud et colocalise avec SG3 (figure 2/2)

Les signaux GFP (vert) et mCherry (rouge) des racines de croisements entre *p35S:SG3-mCherry* et *pUBQ10:P69-GFP* (d) et *pUBQ10:GFP-P69* (e) sont analysés 5 jours post-germination par microscopie confocale en séquentiel (SP5) et objectifs x10 et x63. Les flèches rouges indiquent les *foci* formés après stress qui colocalisent lorsque les signaux GFP et mCherry sont faibles. Le merge correspond à la superposition des signaux RFP et GFP avec la lumière blanche.



b

Alignment of Sequence_1: [RTL1-CDS.xdna] with Sequence_2: [RTL1_CRISPR_23.242_putative_CDS.xdna]

Similarity : 109/795 (13,71 %)

```

Seq_1 1      M G S Q L S N A I D G K D N T K T I G S
          ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAAT-CGACGGTAAAGATAACACCAAACCATCGGATC 59
          |||
Seq_2 1      ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAAT TCGACGGTAAAGATAACACCAAACCATCGGATC 60
          M G S Q L S N A I R R * R * H Q N H R I
          |||

Seq_1 60      A D P D Q L M E I E S L E K I L N Y K F
          AGCGGATCCGGACCAGCTTATGGAGATCGAATCCTTGGAGAAGATCTTAAATTACAAGTT 119
          |||#####
Seq_2 61      AGCGGATCCGGACCAGCTTATGGAGATCGAATCCTTGGAGAAGATCTTAA----- 110
          S G S G P A Y G D R I L G E D L X
  
```

Figure 30 : Schéma de l'insertion T-DNA dans le mutant *rtl1-sail* 337F04 et de la mutation CRISPR chez le mutant *rtl1-crispr*

a) La lignée commerciale SAIL_337_F04.1 (*rtl1-sail*) porte un T-DNA inséré dans le premier exon du gène RTL1. La lignée générée par CRISPR (*rtl1-crispr*) porte un T entre le 25^e et 26^e nucléotide de la séquence codante WT de RTL1, entraînant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop dès le 12^{ème} nucléotide. TSS : Transcription Start Site, TTS : Transcription Termination Site, UTR : Untranslated Region. **b)** Alignement de la séquence de *RTL1* sauvage avec la séquence mutée par CRISPR avec le logiciel SerialCloner. La thymine (T) insérée dans le gène *RTL1* chez la lignée *rtl1-crispr* est indiquée en rouge ainsi que le codon Stop précoce induit. L'alignement est effectué sur les 100 premières paires de bases des séquences sauvage et mutée. Les acides aminés prédits sont indiqués au-dessus et en dessous des séquences.

4) Rôle de RTL1 dans l'infection par le TYMV

En plus des DCLs, il existe chez la plante d'autres RNase de type III agissant sur les dsRNAs. L'une d'entre elle, appelée RTL1, a une expression induite lors d'infections par différents virus (TCV, CMV, TVCV et TYMV) et est capable de cliver les dsRNAs endogènes et exogènes (Shamandi et al., 2015). Si la plupart des virus testés inhibent son activité via leur VSR (**Tableau 1**), ce n'est pas le cas du TYMV. De plus, les plantes qui surexpriment *RTL1* sont hypersensibles à l'infection par le TYMV, suggérant que RTL1 favorise l'infection par ce virus (Shamandi et al., 2015 ; **Figure 14**).

Afin de déterminer si le gène *RTL1* endogène joue effectivement un rôle dans l'infection par le TYMV, deux mutants *rtl1* ont été infectés : un mutant nul SAIL caractérisé pendant mon stage de M2 et un mutant CRISPR généré pendant ma thèse (désignés par *rtl1-sail* et *rtl1-crispr* ; **Figure 30**). Il faut noter que la mutation générée par CRISPR induit un frameshift au niveau du 9^{ème} acide aminé, conduisant à l'apparition d'un codon stop précoce et à la production d'un peptide court sans domaine RNase ou DRB. Ce codon stop étant situé après la 2^{ème} méthionine en phase de la protéine RTL1, il est par ailleurs exclu qu'une réintiation de la traduction ait lieu à cette 2^{ème} Met. La lignée *35S:RTL1-myc* (désignée par *RTL1*) a été également infectée. On observe chez les plantes *RTL1* des symptômes très forts par rapport aux plantes sauvages infectées, en cohérence avec les résultats déjà publiés (Shamandi et al., 2015 ; **Figure 13**). On observe également une accumulation deux fois plus forte des RNAs de la CP du TYMV, une perte de l'accumulation des siRNAs dérivés de la CP (**Figure 14**) ainsi qu'une accumulation 20 fois supérieure du TYMV gRNA par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 15**). En effet, la surexpression de *RTL1* inhibe la production des siRNAs du PTGS anti-viral, ce qui favorise la multiplication du TYMV (Shamandi et al., 2015) et augmente la quantité de protéines virales. En revanche, chez les mutants *rtl1* infectés, les symptômes sont similaires à ceux des plantes sauvages infectées (**Figure 13**). Ces résultats valident que le mutant *rtl1-crispr* est nul et se comporte comme le mutant *rtl1-sail*.

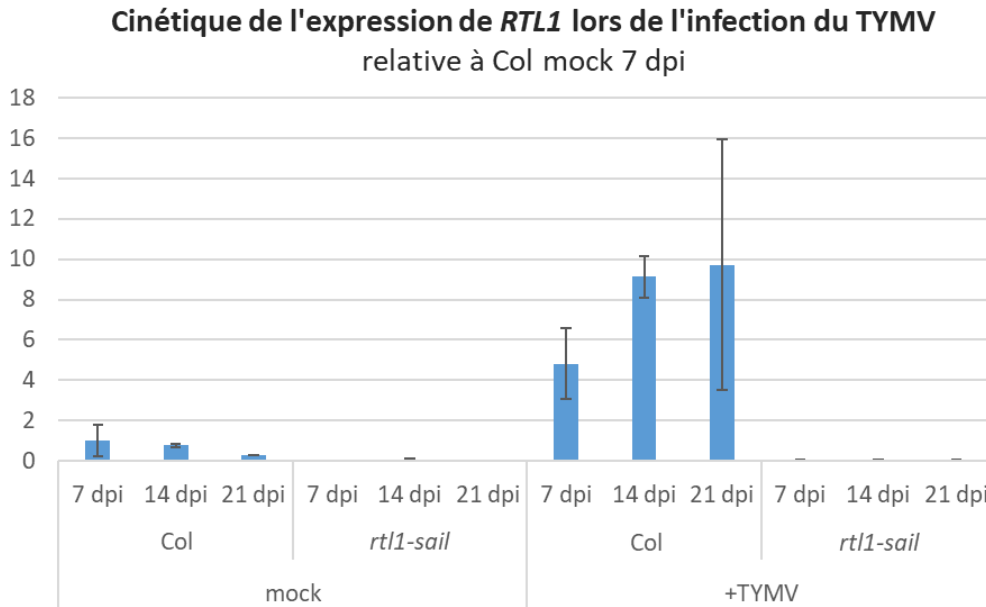


Figure 31 : L'expression de *RTL1* n'est pas induite par l'infection du TYMV chez *rtl1-sail*

L'expression de *RTL1* dans les plantes *rtl1-sail* et les plantes sauvages Col est suivie par RT-qPCR 7, 14 et 21 jours post-infection (dpi) par le TYMV en jours longs. Les plantes « mock » ne sont pas infectées. Un pool de 16 plantes/génotype est analysé pour chaque point de la cinétique. Le gène *GAPDH* est utilisé en contrôle interne. Les données sont relativisées par rapport à Col mock 7 dpi.

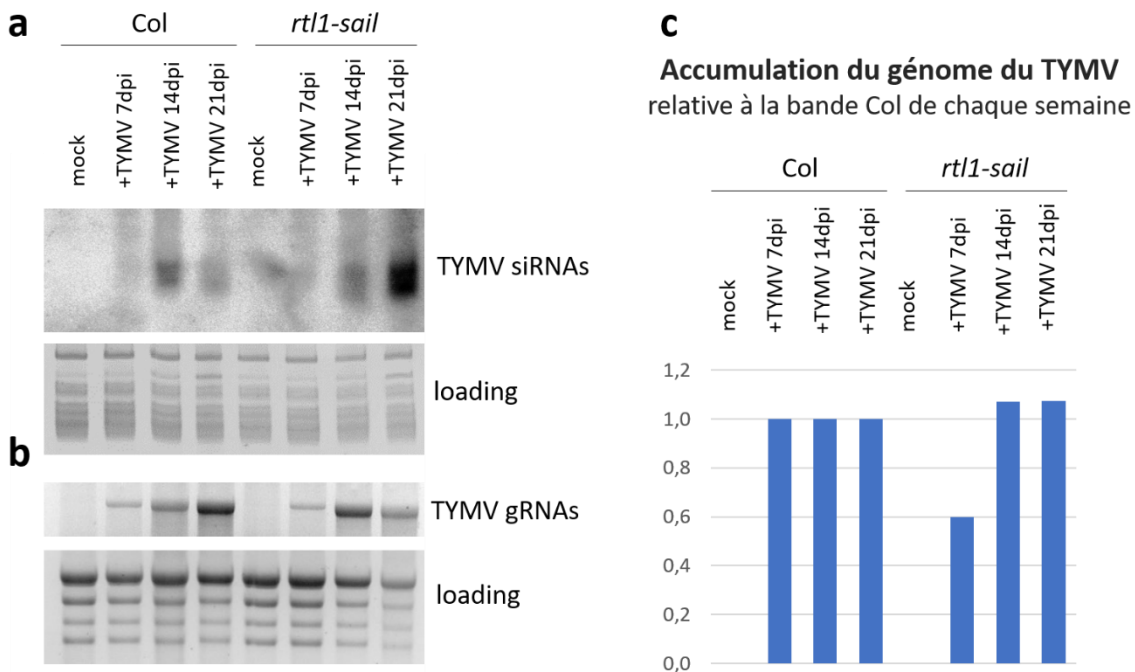


Figure 32 : La mutation *rtl1* favorise la production des siRNAs et ralentie la réplication du TYMV

a et **b**) Un pool de 16 plantes infectées par le TYMV par génotype est analysé 7, 14 et 21 jours post-inoculation (dpi) en jours longs. Les siRNAs et RNAs viraux génomiques (gRNAs) sont analysés par northern blot LMW et HMW. Une sonde correspondant à l'ORF *P69* du TYMV est utilisée pour la détection par marquage radioactif au P^{32} . Le loading correspond à la migration des RNAs sur gel d'acrylamide (LMW) et d'agarose (HMW) révélé à l'EtBr. **c**) La quantification de la bande du TYMV gRNA est calculée à l'aide du logiciel ImageJ à partir du northern HMW et relativisée aux plantes sauvages Col infectées par le TYMV de chaque semaine de la cinétique.

Une cinétique d'infection par le TYMV a également été effectuée en jours longs chez des plantes sauvages et le mutant *rtl1-sail* et l'expression de *RTL1* et l'accumulation des siRNAs et grands RNAs viraux génomiques (gRNAs) sont analysés (**Figure 31** et **Figure 32**). On observe que l'expression de *RTL1* n'est pas induite pas l'infection du TYMV chez le mutant *rtl1-sail* contrairement aux plantes sauvages infectées (**Figure 31**), ce qui confirme que le mutant *rtl1-sail* est un mutant nul. De plus, chez les mutants *rtl1-sail*, on observe une accumulation accrue des siRNAs du TYMV par rapport aux plantes sauvages infectées, confirmant les résultats précédents (**Figure 32a**). Enfin, on observe un ralentissement de la réplication du TYMV, avec une accumulation des gRNAs plus faible la première semaine d'infection chez les mutants *rtl1-sail* par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 32b** et **c**).

Le comportement des mutants *rtl1* est donc opposé à celui des plantes *RTL1*, indiquant que l'induction de l'expression du gène *RTL1* endogène lors de l'infection par le TYMV favorise bien la prolifération du virus. Toutefois, les subtilités de l'induction de l'expression de *RTL1* en condition d'infection virale ne sont pas connues. On sait en revanche que le promoteur de *RTL1* est constitué d'un transposon de type hélitron dont l'ADN est méthylé (données 1001 Genomes ; **Figure 64**), et des travaux sont actuellement en cours au laboratoire afin de déterminer si les facteurs impliqués dans la méthylation des transposons sont également impliqués dans la régulation de l'expression du gène *RTL1*.

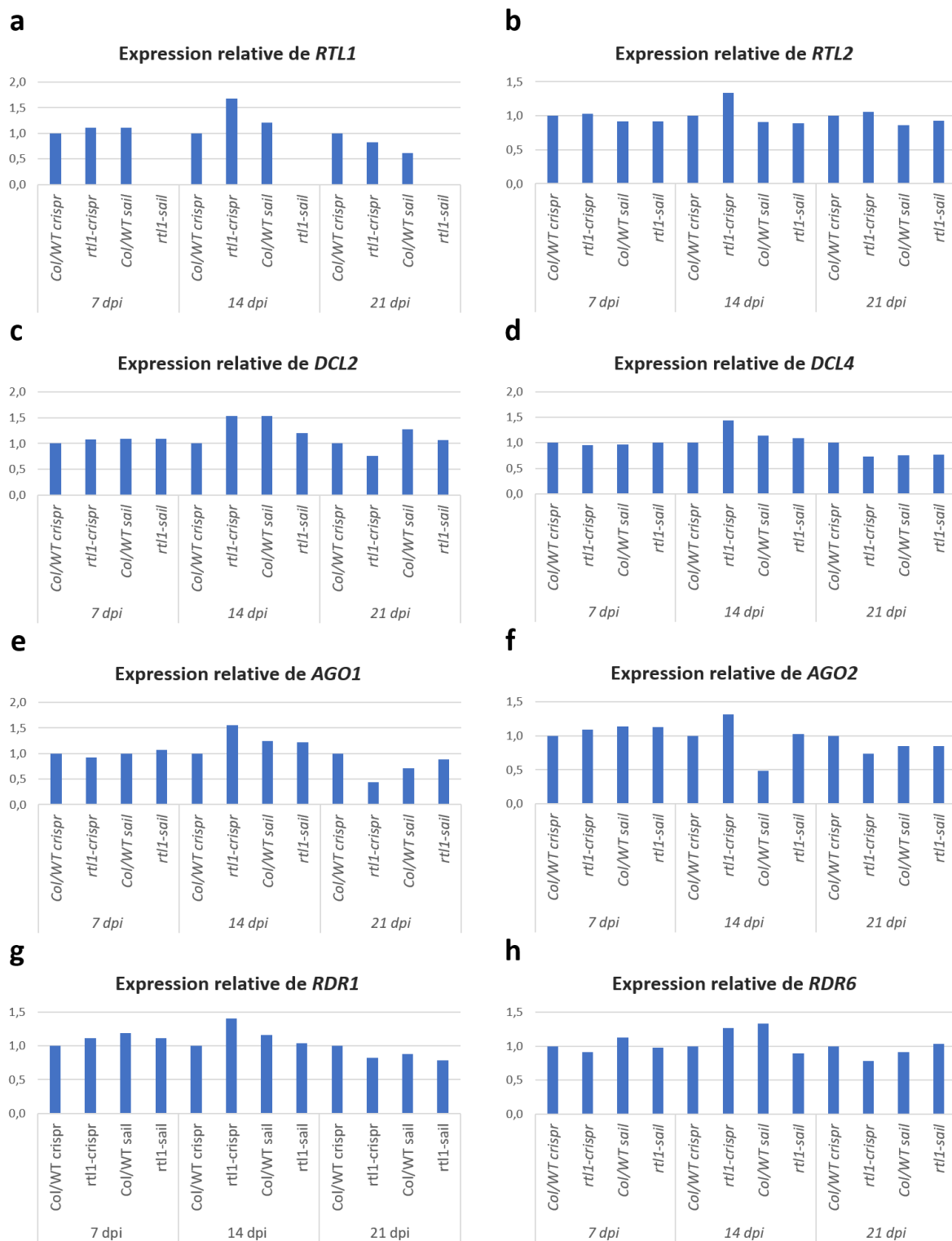


Figure 33 : La mutation *rt1-1* n'a pas d'effet sur l'expression de différents facteurs du PTGS anti-viral
a à h) Un pool de 16 plantes mutantes pour *rt1-1-crispr* et *rt1-1-sail* et plantes sauvages isogéniques *Col/WT crisper* et *Col/WT sail* infectées par le TCV sont prélevées 7, 14 et 21 jours post-inoculation (dpi) en jours courts. Les cDNAs obtenus à partir des extraits de grands RNAs sont analysés par RT-qPCR. Le gène endogène de la *GAPDH* est utilisé en contrôle interne. Les données sont relativisées par rapport au *Col/WT crisper* infecté de chaque semaine. Les amorces utilisées sont décrites dans en Annexes (Tableau des primers p.217).

L'induction de l'expression de *RTL1* en condition d'infection virale pourrait aussi affecter l'expression des autres facteurs du PTGS impliqués dans la défense de la plante. Nous avons donc testé l'expression des gènes *DCL1*, *DCL2*, *AGO1*, *AGO2*, *RDR1* et *RDR6* en fond sauvage et mutant pour *rtl1* lors d'une cinétique d'infection avec le virus TCV en jours courts. L'expression de *RTL1* est également analysée en témoin ainsi que l'expression du gène *RTL2* afin d'étudier une potentielle redondance. *RTL3* n'est pas analysé car il n'est jamais exprimé dans la plante.

L'expression du gène *RTL1* est induite par l'infection du TCV contrairement à celle du gène *RTL2*, confirmant les résultats précédemment publiés (Shamandi et al., 2015 ; **Figure 33a** ; **Figure S4 Annexes**). Cependant, il n'y a pas différence claire dans le niveau d'expression de *RTL1* chez les plantes mutantes *rtl1-crispr* et sauvages infectées. Comme attendu, aucune expression de *RTL1* n'est visible chez le mutant *rtl1-sail* car la présence de l'insertion T-DNA dans le corps du gène impacte fortement la transcription contrairement à la mutation ponctuelle chez le mutant *rtl1-crispr*. L'expression du gène *RTL2* n'est pas non plus affecté par les mutations *rtl1* et est similaire au niveau d'expression des plantes sauvages infectées (**Figure 33b**). L'expression des facteurs du PTGS *DCL2*, *DCL4*, *AGO1*, *AGO2*, *RDR1* et *RDR6* est également similaires chez les plantes sauvages et mutantes *rtl1* infectées par le TCV (**Figure 33c à h**). On peut noter que l'expression d'*AGO1* et dans une moindre mesure d'*AGO2* et de *RDR1* sont induites par l'infection du TCV, en cohérence avec de précédentes études (Harvey et al., 2011; Várallyay and Havelda, 2013 ; **Figure S4 Annexes**).

Il semble donc que l'expression de *RTL1* n'impacte ni l'expression de *RTL2* ni celles des différents facteurs du PTGS anti-viral testés. Ces résultats devront donc être confirmés par l'étude de l'expression de ces différents gènes lors d'une cinétique d'infection avec le TYMV afin de vérifier si l'activité de la protéine RTL1 impacte l'expression des différents facteurs du PTGS anti-viral.

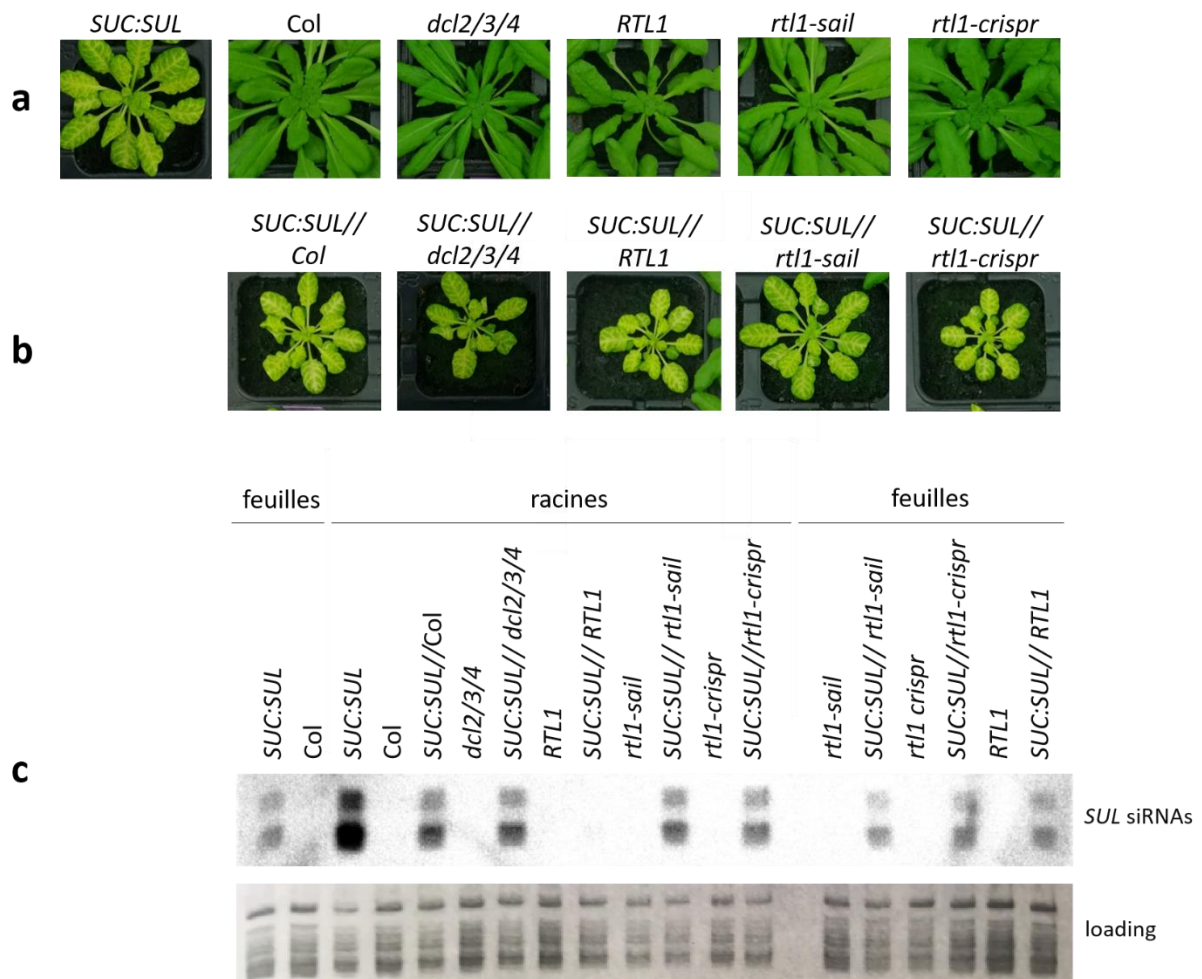


Figure 34 : *RTL1* clive les siRNAs *SUL*

a) plantes témoins non greffées, **b)** plantes greffées, **c)** profil de siRNAs analysé par northern blot LMW dans les feuilles et les racines 1 mois après la greffe. La révélation est faite avec une sonde PCR *SUL* marquée au P^{32} . Le génotype du greffon est indiqué avant « // », celui du porte-greffe après « // » : greffon//porte-greffe

a) RTL1 s'attaque aussi aux siRNAs

RTL1 clive les grands dsRNAs précurseurs de siRNAs *in vivo* et *in vitro* (Shamandi et al., 2015). RTL1 clive également des courts dsRNAs de 34 et 98-nt *in vitro* (Tschopp et al., 2017). Il est donc raisonnable de penser que RTL1 favorise la prolifération du virus en clivant les dsRNAs produits lors de l'étape d'amplification du PTGS anti-viral. Toutefois, cette étape est déjà inhibée par P69. De plus, des siRNAs dirigés contre le TYMV sont également produits directement à partir des intermédiaires de réplication du virus sans intervention des RDRs cellulaires. Il est donc envisageable que l'effet favorable de RTL1 vis-à-vis du TYMV soit du non seulement au clivage des dsRNAs viraux produits par les RDRs cellulaires, mais aussi au clivage direct des siRNAs viraux. Un clivage des siRNAs par RTL1 permettrait de plus d'expliquer pourquoi aucun siRNA n'est détectée dans les plantes surexprimant *RTL1* (Shamandi et al., 2015).

Pour tester cette hypothèse, le système transgénique *SUC:SUL* est utilisé (Himber, 2003; Dunoyer et al., 2007; Smith et al., 2007). Dans cette lignée, un dsRNA correspondant à une partie du gène *SULPHUR* (*SUL*) est produit sous le contrôle du promoteur du gène *SUC2*, qui s'exprime spécifiquement dans les cellules compagnes du phloème (transgène *pSUC2:SUL-LUS*). Le double brin de *SUL* est ensuite clivé par DCL4 et les siRNAs *SUL* produits sont transmis dans les tissus périphériques du mésophylles, entraînant la dégradation des mRNAs *SUL* endogènes et l'apparition de nervures blanches (**Figure 34a**). Les siRNAs *SUL* produits dans les feuilles migrant en grande quantité vers les racines (Devers et al., 2020), des greffes ont été réalisées entre des parties aériennes *SUC:SUL* et des racines sauvages, *rtl1*, *RTL1* ou *dcl2dcl3dcl4* (*dcl2/3/4*). Le profil des siRNAs *SUL* dans les racines a ensuite été analysé afin d'étudier l'effet de *RTL1* sur l'accumulation des siRNAs *SUL* dans les racines où ils ne sont pas produits (**Figure 34**).

Dans les racines des plantes *SUC:SUL* non-greffées, on observe une accumulation de siRNAs *SUL* très forte par rapport aux feuilles *SUC:SUL* en cohérence avec les résultats de Devers et al., 2020 (**Figure 34c**). Cette accumulation est aussi visible dans les racines des greffes *SUC:SUL//Col*, alors que les plantes sauvages ne produisent pas de siRNAs *SUL*, et dans les racines des greffes *SUC:SUL//dcl2dcl3dcl4*, alors que les DCLs ne sont plus actives (**Figure 34c**). Ces résultats démontrent donc que les siRNAs *SUL* détectés dans les racines sont bien produits dans les feuilles et que ce n'est pas leur précurseur qui migre avant d'être découpé en siRNAs dans les racines. Par contre, dans les racines des greffes *SUC:SUL//RTL1* il n'y a plus

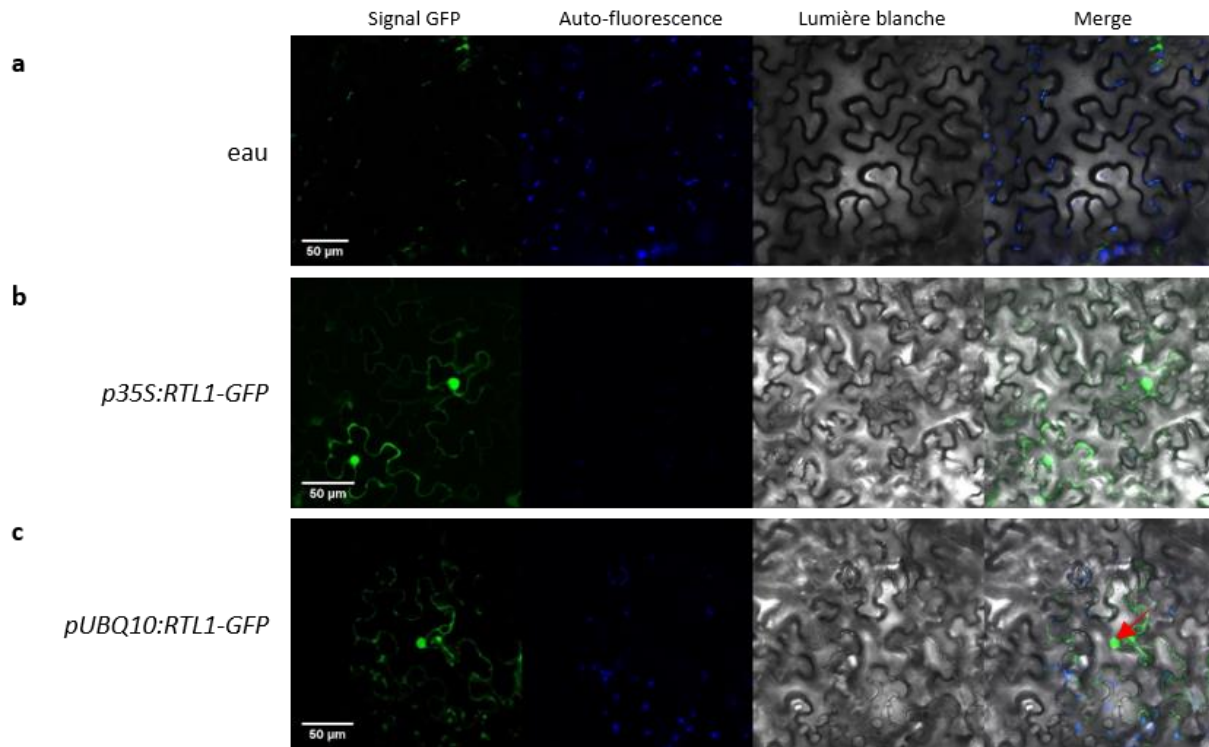


Figure 35 : *RTL1* n'est pas localisée dans les chloroplastes

De jeunes tabacs *N. bentamiana* sont infiltrés avec de l'eau (a) ou agroinfiltrés avec les constructions *p35S:RTL1-GFP* (b), *pUBQ10:RTL1-GFP* (c). Les analyses sont effectuées 72h post-agroinfiltration par microscopie confocale (SP5). Le merge correspond à la superposition du signal GFP (vert), de l'auto-fluorescence des chloroplastes (bleu) et de la lumière blanche. La flèche rouge indique les nucléoles.

d'accumulation des siRNAs *SUL*, alors qu'ils sont présents dans les feuilles (**Figure 34c**). Ces résultats montrent que, en plus de son effet sur les dsRNAs endogènes et exogènes, RTL1 est capable de s'attaquer aux siRNAs. Il est intéressant de noter que l'effet de RTL1 se limite à sa zone d'expression puisque les feuilles des greffes *SUC:SUL//RTL1* maintiennent un phénotype de silencing de *SUL* (**Figure 34b**). Dans les racines des greffes *SUC:SUL//rtl1*, on observe une accumulation des siRNAs *SUL* identique aux témoins *SUC:SUL//Col* (**Figure 34c**), indiquant que la faible expression de *RTL1* dans les racines de Col est insuffisante pour impacter l'accumulation des siRNAs dans ces tissus (voir partie III-4 p.143 ; **Figure 56**).

b) RTL1 est localisée dans les siRNA-bodies

Les résultats présentés ci-dessus confortent l'hypothèse d'un clivage par RTL1 des siRNAs dérivés du TYMV, expliquant le rôle favorable de RTL1 lors de l'infection par ce virus. Il est toutefois nécessaire que les dsRNAs intermédiaires de réplication du virus échappent au clivage par RTL1. Sachant que les siRNAs sont produits dans les SB (Jouannet et al., 2012; Moreno et al., 2013) et que le TYMV se réplique à la surface des chloroplastes (Ushiyama and Matthews, 1970; Hatta et al., 1973; Prod'homme et al., 2003), nous avons étudié la localisation de RTL1. Ne disposant pas encore au laboratoire de constructions portant les ORFs de réplicases 140K et 66K du TYMV fusionnée à la protéine GFP marquant les chloroplastes, des plantes de tabac mock ont été agroinfiltrées avec les constructions *p35S:RTL1-GFP* et *pUBQ10:RTL1-GFP*, et le signal GFP a été analysé par microscopie confocale (**Figure 35**).

Dans les feuilles des plantes agroinfiltrées, on observe une très nette localisation cytoplasmique et nucléoplasmique de *RTL1-GFP*. En effet, les nucléoles ne semblent pas marqués par la GFP (**Figure 35**, flèche rouge). De manière intéressante, les signaux chloroplastiques (auto-fluorescence) et le signal GFP de RTL1 ne se superposent jamais, expliquant vraisemblablement pourquoi les dsRNAs intermédiaires de réplication du virus échappent au clivage par RTL1.

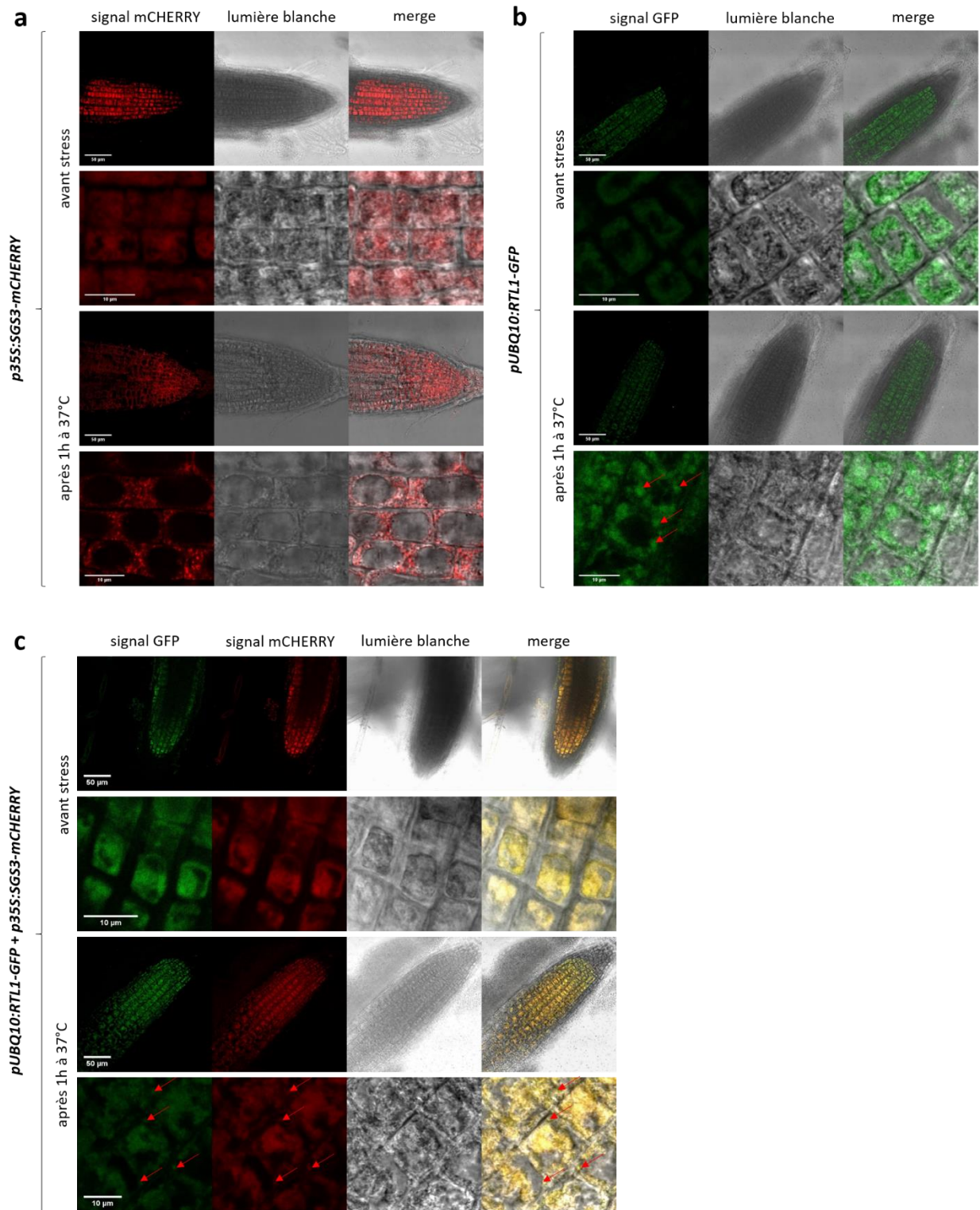


Figure 36 : RTL1 colocalise avec SGS3 en condition de stress chaud

Des plantules de 5 jours d'A. *thaliana* sauvages sont agroinfiltrées avec les constructions *pUBQ10::RTL1-GFP* et/ou *p35S::SG3-mCherry*. Les analyses sont effectuées 72h post-agroinfiltration par microscopie confocale (SP5) sur les racines des plantules. Le merge correspond à la superposition du signal GFP (vert), du signal mCherry (rouge) et de la lumière blanche. Les bodies sont marquées d'une flèche rouge lorsqu'ils sont peu visibles.

Pour aller plus loin, de jeunes plantules d'*A. thaliana* sauvages sont agroinfiltrées avec les constructions *pUBQ10:RTL1-GFP* et *p35S:SGS3-mCherry* précédemment utilisées. Des co-agroinfiltrations entre ces constructions sont aussi effectuées. Les signaux GFP et mCherry dans les racines des plantules agroinfiltrées sont analysés par microscopie confocale avant et après stress chaud d'1h à 37°C (**Figure 36**). Dans les racines des témoins *p35S:SGS3-mCherry*, on observe avant stress un signal mCherry diffus cytoplasmique et après stress la formation de *foci* correspondants aux SB (**Figure 36a**). Cela confirme que notre protocole d'agroinfiltration de plantules fonctionnent. Dans les racines des plantules *pUBQ10:RTL1-GFP*, on observe également avant stress un signal GFP diffus cytoplasmique et après stress la formation de granules (**Figure 36b**). De plus, ces granules colocalisent avec les granules SGS3-mCherry après stress dans les racines des plantules co-agroinfiltrées avec les constructions constructions *pUBQ10:RTL1-GFP* et *p35S:SGS3-mCherry* (**Figure 36c**). Ces résultats suggèrent que RTL1 colocalise avec SGS3 dans les SB et/ou les SG en condition de stress chaud et appuie l'hypothèse que RTL1 interfère avec le PTGS anti-viral dans les SB lors d'une infection.

Pour compléter ces résultats, nous générons actuellement des transformants stables d'*A. thaliana* portant les constructions *p35S:RTL1-GFP*, *pUBQ10:RTL1-GFP*, *p35S:RTL1-GFP/p35S:SGS3-mCherry* et *pUBQ10:RTL1-GFP/p35S:SGS3-mCherry* afin de voir si RTL1 colocalise avec les SB lors d'une infection par le TYMV comme c'est le cas lors d'un stress chaud. La localisation de RTL1 et SGS3 avant et après infection devra être analysée dans les racines des transformants pour éviter l'auto-fluorescence des chloroplastes. Il serait aussi intéressant de transformer les plantes *RTL1-GFP* avec une construction *140K-RFP* et *66K-RFP* afin de tester si RTL1 colocalise avec les facteurs de réplication virale du TYMV dans les chloroplastes des feuilles.

Il est probable que chez les plantes infectées par le TYMV, les dsRNAs intermédiaires de réplication du virus échappent au clivage par RTL1 grâce à la localisation du complexe de réplication viral dans des invaginations de la membrane des chloroplastes (Ushiyama and Matthews, 1970; Hatta et al., 1973; Prod'homme et al., 2003), et que RTL1 de par sa localisation au niveau des SB clive les dsRNAs et siRNAs viraux produits par le PTGS anti-viral. Par ailleurs, P69 inhibe partiellement l'étape d'amplification du PTGS anti-viral lors d'une infection (**Figure 18**, **Figure 19** et **Figure 20**). Dans ce modèle, RTL1 complète l'action anti-virale faible du VSR P69. On peut noter que cette stratégie ressemble à celle du Potyvirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* qui exprime un VSR P22 (Kreuze et al., 2005) ainsi qu'une RNase de type III de structure similaire à RTL1 capable de cliver des dsRNAs et siRNAs qui renforce l'action de P22 (Kreuze et al., 2005; Cuellar et al., 2009).

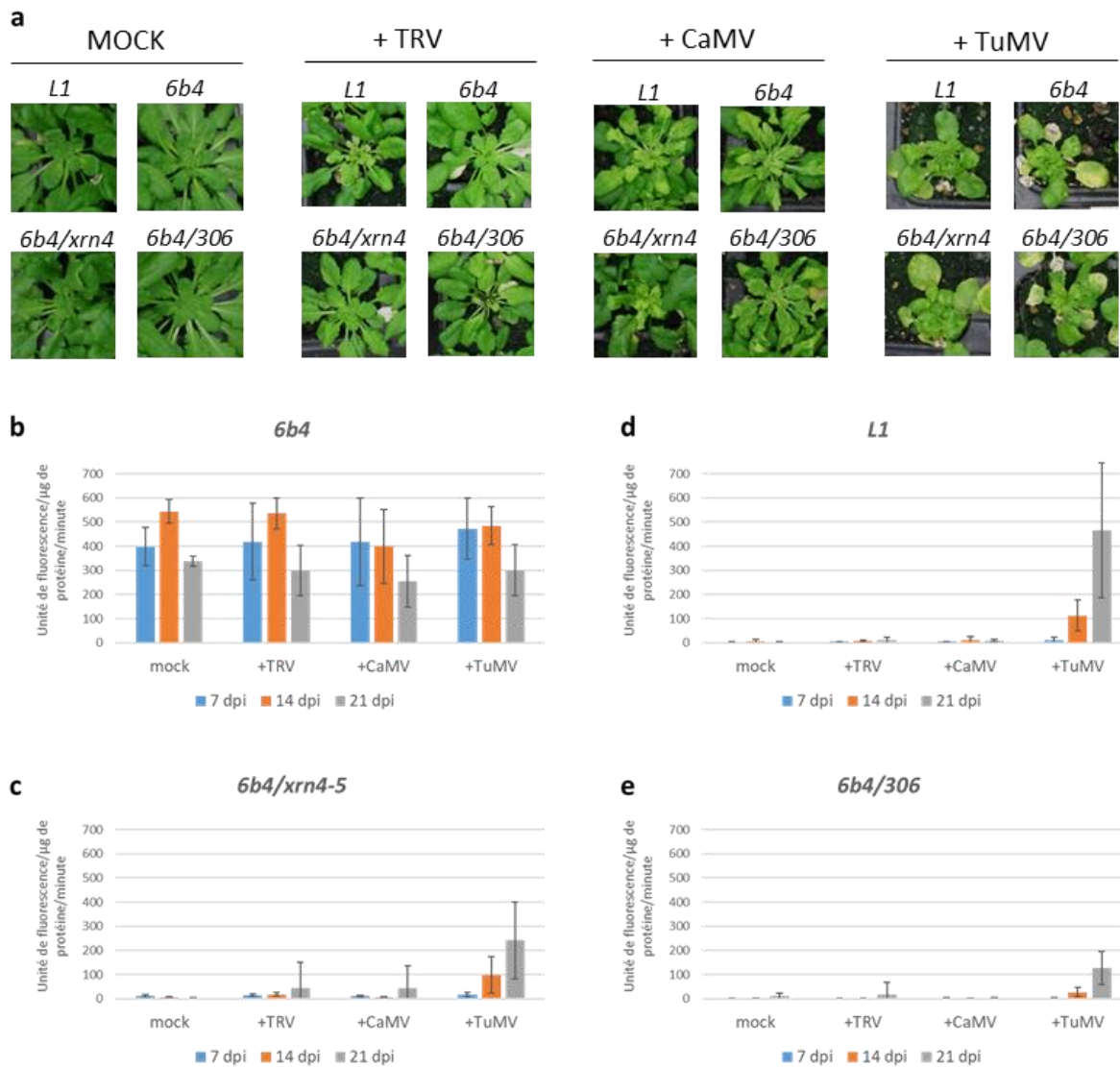


Figure 37 : Symptômes et effets de l'infection par le TRV, le CaMV et le TuMV sur le S-PTGS, l'IR-PTGS et le S-PTGS induit en fond RQC-déficient

a) 16 plantes par géotypes sont infectées ou non (mock) avec le TRV, le CaMV et TuMV 4 semaines post-germination en jours courts. Les plantes sont photographiées 4 semaines après infection en jours courts et une plante représentative par condition est présentée. **b à e)** 16 plantes pour les lignées *6b4*, *L1*, *6b4/xrn4-5* et *6b4/306* sont testées pour leur activité GUS, exprimée en unité de fluorescence par minute par μg de protéines, pendant 3 semaines sans infection (mock) ou avec infection par le TRV, le CaMV et le TuMV. Les moyennes sont représentées et les barres d'erreur correspondent aux écart-types. dpi : jours post-inoculation

5) Rôle de RTL1 dans l'infection par d'autres virus conduisant à des symptômes faibles chez Arabidopsis

Afin de déterminer si le modèle décrit pour le TYMV pouvait être généralisé à d'autres virus conduisant à des symptômes faibles chez Arabidopsis, nous avons entrepris de caractériser le rôle de RTL1 dans l'infection par le virus à RNA *Tobacco rattle virus* (TRV) et par le virus à DNA *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Comme le TYMV ces deux virus engendrent des symptômes faibles chez Arabidopsis, et comme le TYMV ils codent des VSR (16K et P6) qui ont peu d'effet sur le PTGS (Haas et al., 2008; Martín-Hernández and Baulcombe, 2008 ; **Tableau 1**).

Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer le peu d'effet du TRV et du CaMV sur le S-PTGS et l'IR-PTGS des transgènes. En témoin nous avons utilisé le *Turnip mosaic virus* (TuMV) dont le VSR HC-Pro inhibe l'activité de RTL1 et le PTGS (Shamandi et al., 2015 ; **Tableau 1**). 4 lignées transgéniques *p35S:GUS* précédemment décrites sont infectées en jours courts (**Figure 16** ; **Figure 17**) : le transgène *p35S:GUS* s'exprime de manière stable dans la lignée *6b4* mais pas dans la lignée *L1*, la mutation *xrn4* induit le S-PTGS du transgène par la déficience du RQC dans la lignée *6b4* et le transgène est silencé par IR-PTGS induit par la construction *p35S:hpGUS* dans la lignée *6b4/306*.

On observe que les symptômes causés 4 semaines après l'inoculation du TuMV sont très forts, avec des plantes plus petites, un développement très impacté et une senescence précoce des feuilles par rapport aux plantes mock (**Figure 37a**). L'infection par le CaMV induit des symptômes moins forts avec une ondulation et un jaunissement des feuilles, et ceux induits par le TRV sont beaucoup plus discrets (**Figure 37a**). L'activité GUS du transgène est analysée pendant 3 semaines post-inoculation chez les plantes mock et infectées. Comme attendu, on observe aucune activité GUS chez les plantes mock *L1*, *6b4/xrn4* et *6b4/306* (**Figure 37b à e**). L'infection par le TuMV lève progressivement le S-PTGS de la lignée *L1* et de la lignée *6b4/xrn4* et a un effet partiel sur l'IR-PTGS de la lignée *6b4/306* (**Figure 37b à e**). Par contre, l'infection par le TRV et le CaMV n'a pas d'effet sur le S-PTGS de la lignée *L1* ni d'effet clair le S-PTGS induit de la lignée *6b4/xrn4* et l'IR-PTGS de la lignée *6b4/306* (**Figure 37b à e**). Ces résultats confirment les VSR du TRV et du CaMV ont très peu d'effet sur le PTGS contrairement au VSR du TuMV (Haas et al., 2008; Martín-Hernández and Baulcombe, 2008 ; **Tableau 1**).

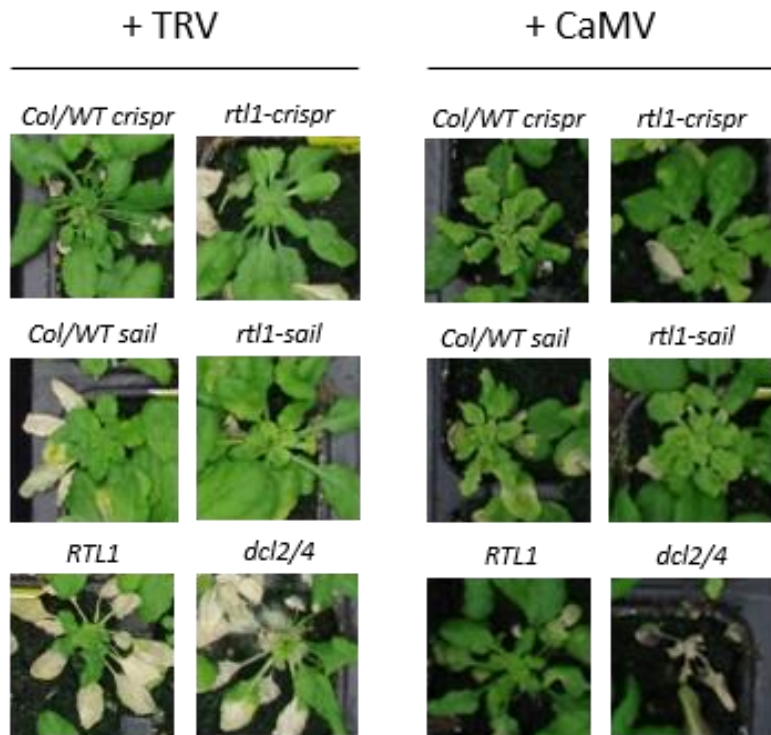
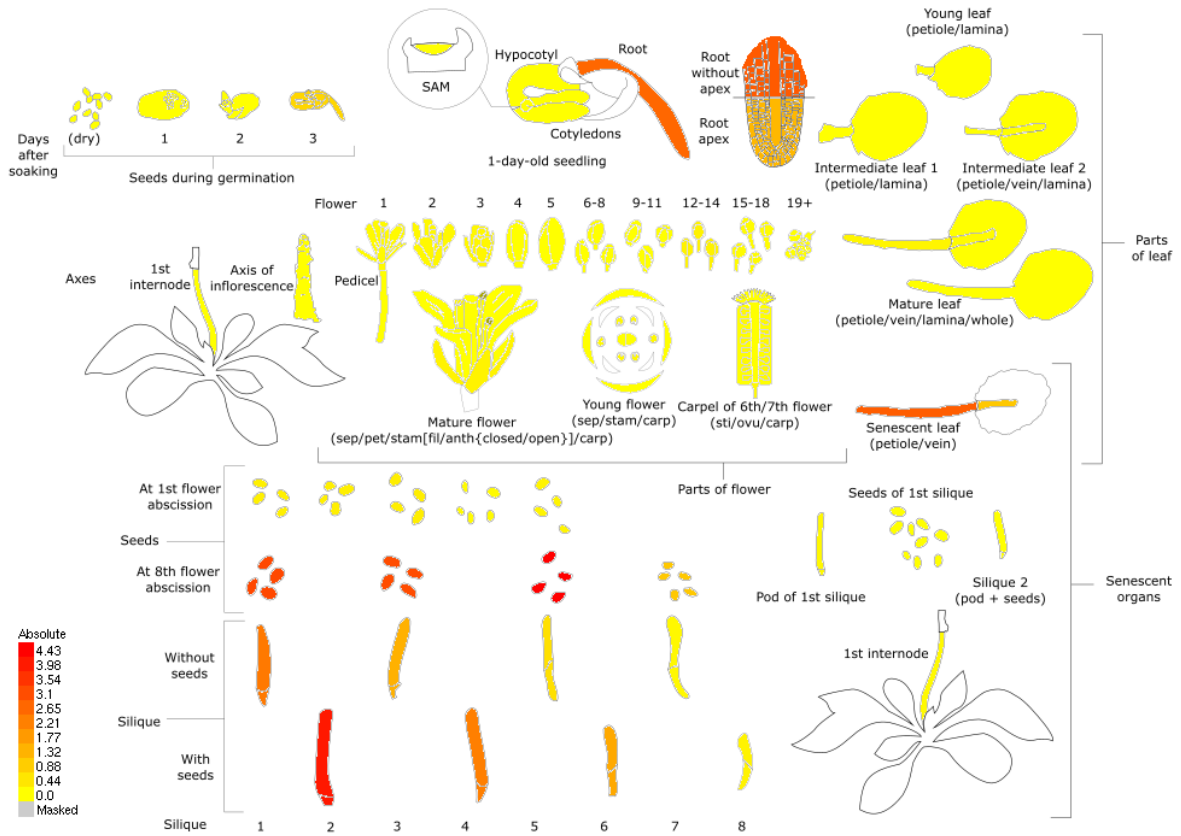


Figure 38 : Effet de l'absence et de la sur-expression de RTL1 les symptômes induits par l'infection du TRV et du CaMV

16 plantes par génotype sont infectées avec le TRV et le CaMV 4 semaines post-germination en jours courts. Les photos sont prises 4 semaines post-infection et une plante représentative par génotype est présentée.

Afin d'étudier le rôle de RTL1 dans l'infection du CaMV et du TRV, des plantes sauvages (*Col/WT crispr* et *Col/WT sail*), mutantes pour *rtl1* (*sail* et *crispr*) et surexprimant *RTL1(35S :RTL1-myc* désignée par *RTL1*) ont été infectées avec ces virus. Les mutants *dcl2dcl4* (*dcl2/4*) ont été utilisés comme témoins. On ne constate pas de différence claire dans la force des symptômes entre les mutants *rtl1* et les plantes sauvages isogéniques infectées par le TRV et le CaMV (**Figure 38**). En revanche, la lignée *RTL1* semble hypersensible à l'infection par le TRV de manière similaire au TYMV (Shamandi et al., 2015 ; **Figure 13**), suggérant que RTL1 favorise l'infection du TRV. Il est plus difficile de conclure pour les plantes *RTL1* infectées par le CaMV, où une forte hétérogénéité dans les symptômes était présente (**Figure 38**). Cependant, certaines plantes *RTL1* montrent une hypersensibilité à l'infection du CaMV. Les mutants *dcl2/4* semblent également hypersensibles à l'infection par ces deux virus.

Pour compléter ces résultats, l'accumulation des siRNAs et RNAs viraux du TRV et du CaMV chez les plantes sauvages, mutantes pour *rtl1* et surexprimant *RTL1* devra être analysée par northern blot. Les analyses effectuées pour la caractérisation du VSR P69 du TYMV devront également être reconduites pour 16K et P6. Le clonage de ces ORFs a été effectué et des fusions GFP seront générées afin de tester une colocalisation possible avec les SB ou SG.



Data from A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling: Klepikova et al., 2016, Plant J. 88:1058-1070. Total RNA was extracted with RNeasy Plant Kit and Illumina cDNA libraries were generated using the respective manufacturer's protocols. cDNA was then sequenced using Illumina HiSeq2000 with a 50bp read length. The read data are publicly available in NCBI's Sequence Read Archive under the BioProject ID 314076 (accession: PRJNA314076). Reads were aligned to the reference TAIR10 genome (Lamesch et al., 2012) using TopHat (Trapnell et al., 2009). Default TopHat settings and job resource parameters were used, with read groups unspecified. Reads per gene were counted with an in-house Python script using functions from the HTSeq package (Anders et al., 2015). Reads were filtered so that only uninterrupted reads corresponding to a region within exactly one gene were used for RPKM calculation. If a gene's expression level is not displayed, this indicates the reads for this gene did not pass the filtering criteria. RPKM values were compiled using an in-house R script.

Figure 39 : Profil d'expression de *ATRTL1* chez *Arabidopsis thaliana* (données du site bar.utoronto.ca)

III] Pourquoi *RTL1* est-il maintenu dans le génome d'*Arabidopsis* ?

Dans cette dernière partie, nous avons cherché à comprendre pourquoi *RTL1* est conservé chez les Brassicacées alors qu'il semble sans effet (CMV, TCV, TuMV, TVCV) ou défavorable (TYMV et potentiellement CaMV et TRV) à la défense d'*A. thaliana* contre les virus. En effet, malgré la présence évidente de SNPs, la structure et les domaines de *RTL1* sont conservés chez les 1135 génomes séquencés du projet 1001 Genome. Cela suggère que *RTL1* pourrait être nécessaire dans d'autres conditions. De plus, l'analyse du ratio entre les mutations synonymes et non-synonymes (K_A/K_S) de séquences homologues à *RTL1* dans 42 espèces d'Eucotylédones montre une valeur systématiquement inférieure à 1, suggérant que *RTL1* ne subit pas de mutation positive mais est au contraire en cours de stabilisation, car probablement trop essentiel au développement et à la fitness de la plante (**Tableau S1 Annexes**).

RTL1 n'est pas exprimé dans les parties végétatives chez l'accession Columbia (Col) d'*Arabidopsis thaliana* (**Figure 39**). Cependant, une faible expression est visible dans les feuilles en sénescence, dans la racine (notamment au niveau de l'épiderme des cellules trichoblastiques, communication personnelle de Filipe Borges), et dans les graines en développement (notamment dans l'endosperme, communication personnelle de de Filipe Borges). Une analyse des parties aériennes, des racines et des graines des mutants *rtl1* (obtenus dans l'accession Col) a donc été effectuée. Enfin, les mutations *rtl1* ont été introgressées dans les accessions Landsberg *erecta* (*Ler*) et Wassilewskija (*Ws*) afin de déterminer si le rôle de *RTL1* varie selon le fond génétique.

1) Phénotypage parties aériennes des mutants *rtl1*

La plateforme de phénotypage haut-débit de notre institut a été mobilisée afin de phénotyper les mutants *rtl1-sail* et *rtl1-crispr* (*Col/rtl1-sail* et *Col/rtl1-crispr*) et les comparer aux lignées isogéniques sauvages correspondantes (*Col/WT sail* et *Col/WT crispr*) (Tisné et al., 2013). Pour chacun des 4 génotypes, 3 lignées sœurs sont cultivées dans les mêmes conditions en chambre de culture en jours courts. Leur descendance est analysée par la plateforme Phenoscope en condition de culture standard et différents traits phénotypiques sont mesurés :

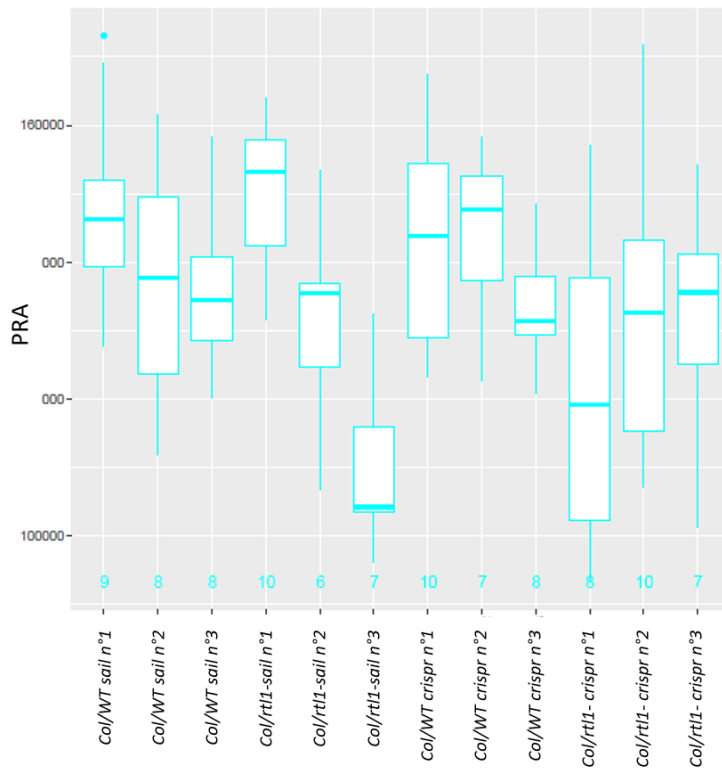


Figure 40 : La mutation *rtl1* induit une variabilité intra-lignée du PRA

Les données sont analysées 23 jours post-repiquage. Le PRA est exprimé en pixel. Le nombre de plantes analysées par lignée est indiqué au-dessus de la légende en bleu.

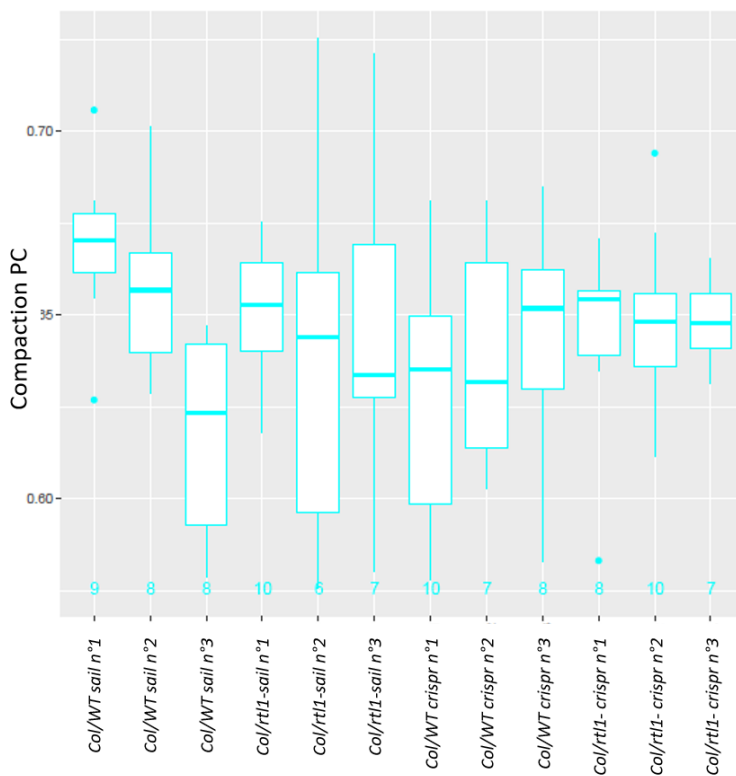


Figure 41 : La mutation *rtl1* n'a pas d'effet sur la compaction de la rosette

Les données sont analysées 23 jours post-repiquage. Le PC est calculé en relativisant le PRA par rapport à l'aire du polygone contenant la rosette. Le nombre de plantes analysées par lignée est indiqué au-dessus de la légende en bleu.

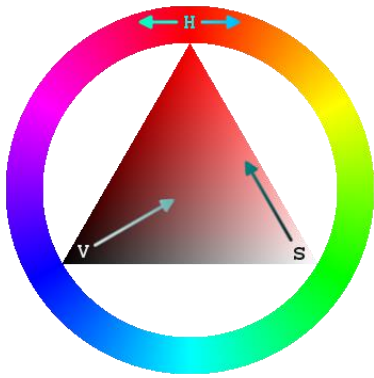


Figure 42 : Illustration des composants HSV (Source Wikipédia)

- l'aire projetée de la rosette ou PRA : il correspond à la surface foliaire totale et est exprimé en pixel
- la compaction ou PC : il correspond à la compaction de la rosette et est issu du ratio entre le PRA et l'aire du polygone dans lequel se développe la rosette
- le taux d'expansion relatif ou RER : il correspond à la croissance de la rosette
- la teinte (Hue), l'intensité (saturation) et l'éclat (value) de la rosette ou composants HSV : ils correspondent à l'analyse des couleurs de la rosette (**Figure 42**)

Les données présentées correspondent aux valeurs des paramètres 23 jours après le repiquage. Les analyses sont effectuées par la plateforme Phénoscope de l'IJPB.

a) Effet de la mutation *rtl1* sur l'aire de la rosette

On constate chez les lignées isogéniques sauvages pour les mutants *SAIL (Col/WT sail)* et *CRISPR (Col/WT crispr)* des valeurs de PRA proches (**Figure 40**). En revanche, chez les mutants *Col/rtl1-sail* et *Col/rtl1-crispr* la valeur du PRA est très variable entre les lignées du même génotype et par rapport aux plantes sauvages. Chez *Col/rtl1-crispr* cet effet est également présent au sein des plantes d'une même lignée. Il semble que la mutation *rtl1* induise une perte dans l'homogénéité de l'aire de la rosette dans la descendance d'une même plante.

b) Effet de la mutation *rtl1* sur la compaction de la rosette

On observe chez les lignées des plantes *Col/WT sail* et *Col/WT crispr* une compaction de la rosette variable (**Figure 41**). Cet effet est également visible chez les lignées *Col/rtl1-sail*, mais pas chez les lignées *Col/rtl1-crispr*. Cependant, en compilant les données des 3 lignées pour chaque génotype, la comparaison de la compaction des lignées isogéniques et des mutants *rtl1* correspondants ne démontre pas de différence significative (**Figure S3** et **Figure S4 Annexes**) Il semble que la mutation *rtl1* n'affecte pas la compaction de la rosette.

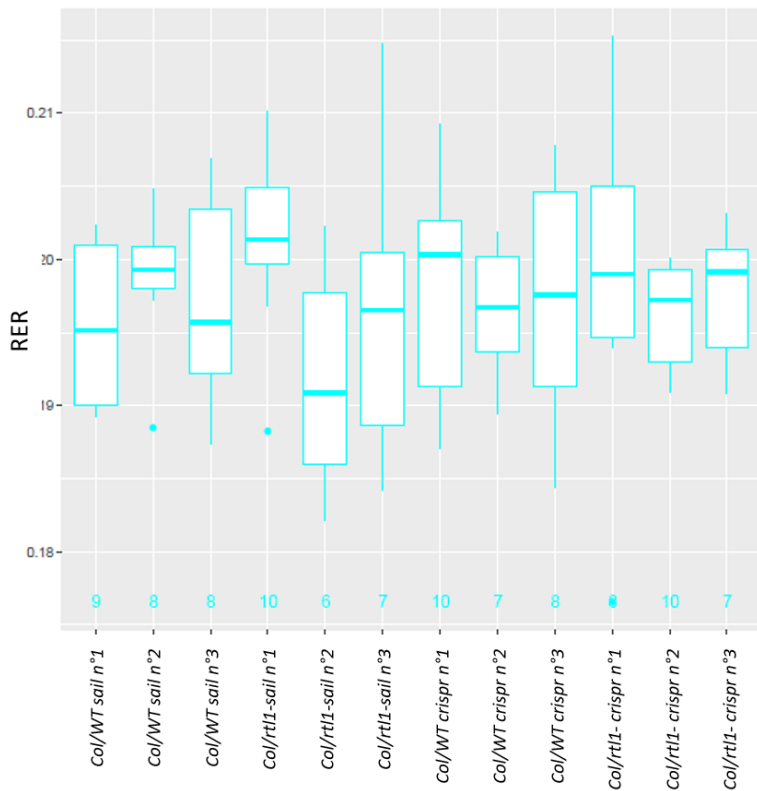


Figure 43 : La mutation *rtl1* n'a pas d'effet sur le taux d'expansion de la rosette

Les données sont analysées 23 jours post-repiquage. Le RER résulte de l'intégration des données du PRA sur 23 jours. Le nombre de plantes analysées par lignée est indiqué au-dessus de la légende en bleu.

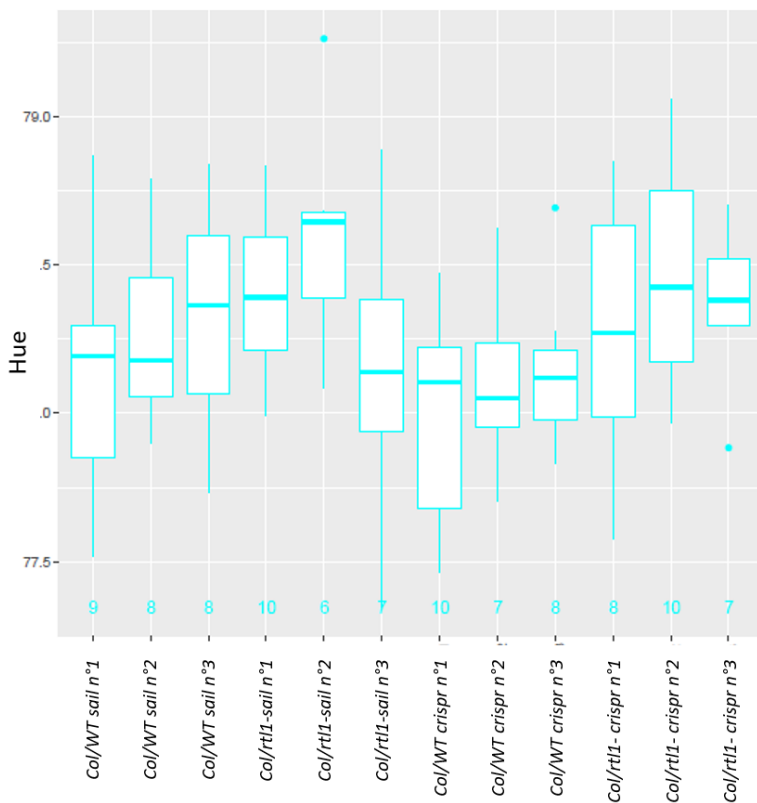


Figure 44 : La mutation *rtl1* n'a pas d'effet clair sur la teinte des feuilles de la rosette

Les données sont analysées 23 jours post-repiquage. Le nombre de plantes analysées par lignée est indiqué au-dessus de la légende en bleu.

c) Effet de la mutation *rtl1* sur le taux d'expansion de la rosette

On observe chez les lignées des plantes *Col/WT sail* et *Col/WT crispr* un taux d'expansion de la rosette variable (**Figure 43**). Cet effet est également visible chez les lignées *Col/rtl1-sail*, mais moins présent chez les lignées *Col/rtl1-crispr*. Cependant, la comparaison du RER des lignées isogéniques et des mutants *rtl1* correspondants compilés ne met pas en évidence une différence significative (**Figure S3** et **Figure S4** Annexes). Il semble que la mutation *rtl1* n'affecte pas le taux d'expansion de la rosette.

d) Effet de la mutation *rtl1* sur les couleurs de la rosette

On observe chez les lignées des plantes *Col/WT sail* et *Col/rtl1-sail* une variation légère dans la teinte des feuilles (**Figure 44**). Cependant, la comparaison du Hue entre les plantes *Col/WT sail* et *Col/rtl1-sail* compilées ne démontre pas de différence significative (**Figure S3** et **Figure S4** Annexes). Chez les lignées des plantes *Col/WT crispr*, la valeur du Hue est stable alors que chez les lignées *Col/rtl1-crispr* elle est variable et supérieure aux plantes sauvages. De plus, la comparaison de la teinte entre les lignées *Col/WT crispr* et *Col/rtl1-crispr* compilées montre une différence significative (**Figure S3** et **Figure S4** Annexes). Cependant, cet effet n'étant pas visible dans les deux mutants *rtl1*, il ne peut être considéré de manière certaine.

Des conclusions similaires sont tirées de l'analyse de la saturation des feuilles des plantes sauvages et mutantes pour *rtl1* (**Figure 45**). Si une variabilité est observée entre les lignées d'un même génotype, elles ne permettent pas de mettre en évidence une différence significative entre les lignées sauvages et les mutants *rtl1* compilées (**Figure S3** et **Figure S4** Annexes).

Enfin, l'analyse de l'éclat de la rosette montre chez les lignées *Col/WT sail* et *Col/WT crispr* des valeurs proches (**Figure 46**). En revanche, chez les mutants *Col/rtl1-sail* et *Col/rtl1-crispr* la Value est très variable entre les plantes d'une même lignée, les lignées du même génotype et par rapport aux plantes sauvages. De plus, la comparaison de la Value entre les plantes sauvages et les mutants correspondants compilés montrent une diminution significative de l'éclat de la rosette chez les deux mutants *rtl1* par rapport aux plantes sauvages (**Figure S3** et **Figure S4** Annexes). Il semble que la mutation *rtl1* induise une perte d'éclat la rosette et une hétérogénéité de cette perte dans la descendance d'une même plante.

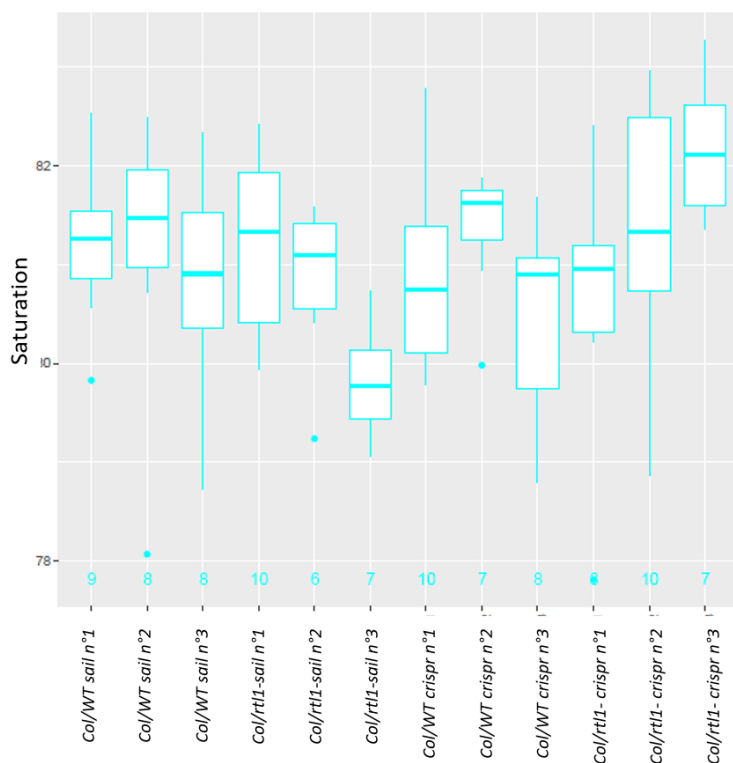


Figure 45 : La mutation rtl1 n'a pas d'effet sur la saturation des feuilles de la rosette

Les données sont analysées 23 jours post-repiquage. Le nombre de plantes analysées par lignée est indiqué au-dessus de la légende en bleu.

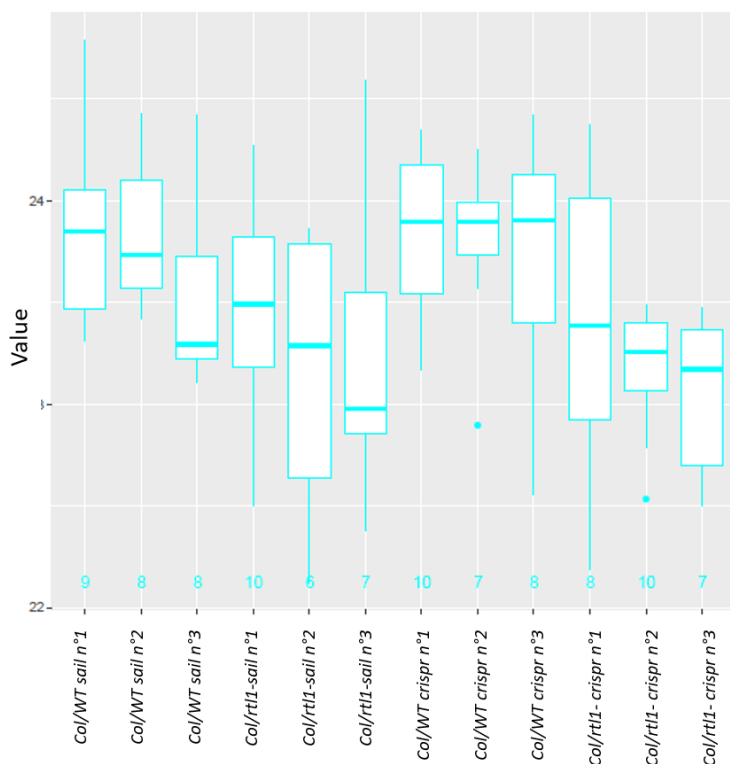


Figure 46 : La mutation rtl1 induit un éclat plus fort et variable de la rosette

Les données sont analysées 23 jours post-repiquage. Le nombre de plantes analysées par lignée est indiqué au-dessus de la légende en bleu.

En conclusion, le phénotypage montre de faibles différences entre les plantes sauvages et les mutants *rtl1*. Si la variabilité dans l'éclat des feuilles est difficilement interprétable, la variabilité dans l'aire de la rosette chez les mutants *rtl1* suggère que la protéine RTL1 est impliquée dans le maintien d'une certaine forme de la plante. Cet effet est d'autant plus visible chez le mutant *rtl1-crispr*.

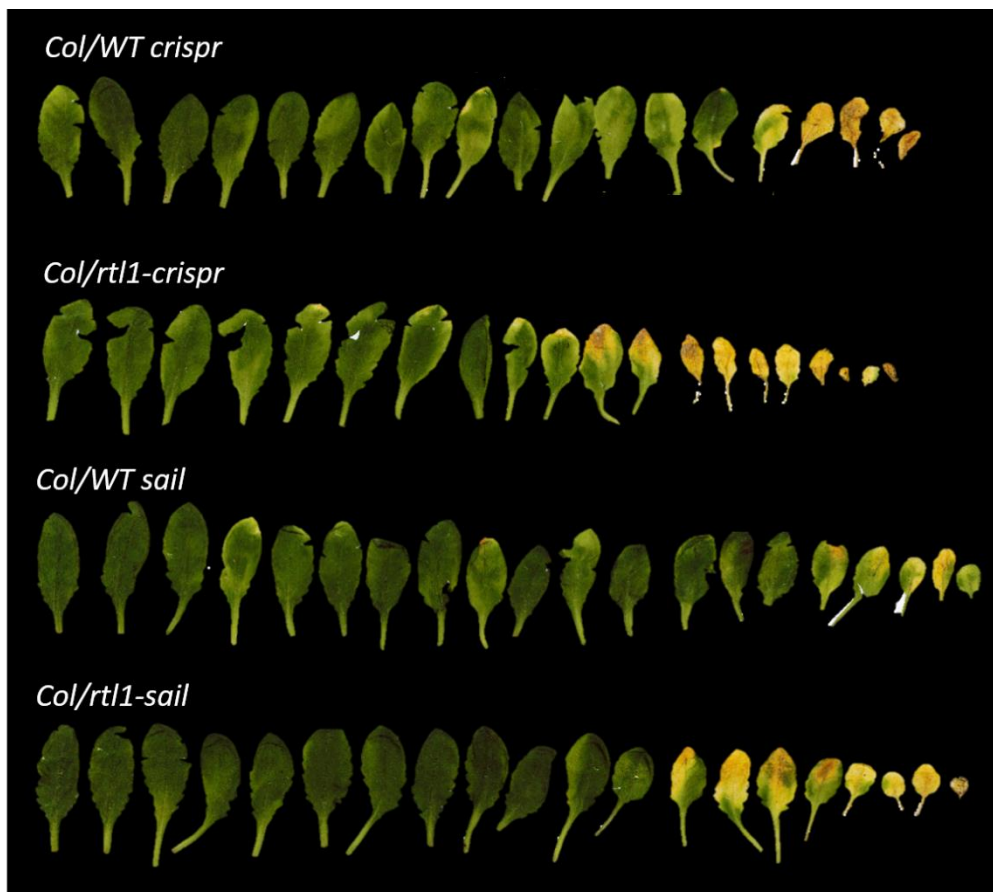


Figure 47: Analyse du phénotype de sénescence chez les plantes sauvages et *rtl1* mutantes

Les rosettes des plantes sont prélevées 2 mois après semis en chambre de culture (jours longs). Les feuilles sont ensuite détachées, classées selon leur taille et scannées pour le traitement des images avec ImageJ. Une des trois plantes analysées par génotype est représentée.

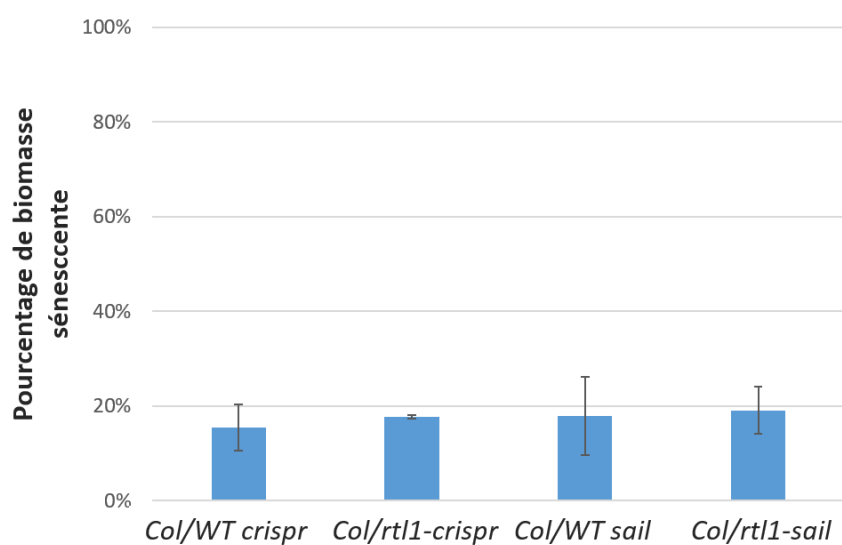


Figure 48 : La mutation *rtl1* n'a pas d'effet sur la quantité de biomasse sénescente

Le pourcentage de biomasse sénescente est calculé par soustraction de l'aire de la biomasse verte des feuilles à l'aire total des feuilles. 3 plantes par génotypes sont analysées, les résultats représentent la moyenne des données et les barres d'erreur correspondent aux écart-types. Les analyses sont effectuées sur le logiciel ImageJ.

2) Analyse de la sénescence chez les mutants *rtl1*

Pour aller plus loin dans le phénotypage des mutants *rtl1*, nous nous sommes intéressés à la sénescence des feuilles. En effet, *RTL1* est faiblement exprimé dans les feuilles en sénescence, en particulier dans le pétiole (**Figure 39**).

Lors du vieillissement des feuilles, ses différents composants (chlorophylles, protéines, acides nucléiques, lipides...) sont dégradés et relocalisés vers les graines et les organes en croissance ou de stockage de la plante afin d'y être recyclés (Kim et al., 2018). Le profil d'expression de la feuille sénescente diffère de la feuille mature, avec entre autres l'induction de dizaines de gènes associés à la sénescence (*SAGs*) liée à l'augmentation des marques H3K4me3 des *SAGs* (Brusslan et al., 2015; Cho et al., 2016; Chen et al., 2016; Liu et al., 2019). De même, des ta-siRNAs issus des gènes *TAS1*, *TAS3* et *TAS4* sont impliqués dans la régulation des *SAGs* (Woo et al., 2016). Il est donc possible que par son activité sur les dsRNAs et siRNAs, *RTL1* joue un rôle dans la transition de la feuille mature à la feuille sénescente.

Nous avons donc comparé le pourcentage de biomasse sénescente entre les lignées mutantes pour *rtl1* et les lignées isogéniques sauvages associées. On constate qu'il n'y a pas de différence évidente dans la biomasse sénescente entre les lignées sauvages et mutantes (**Figure 47**). Ces résultats sont confirmés par l'analyse des images (**Figure 48**), où aucune différence significative dans le pourcentage de biomasse sénescente n'est observée entre les lignées sauvages et mutantes. Dans nos conditions de culture, il semble donc que *RTL1* n'est pas impliquée dans la mise en place de la sénescence.

3) Analyse des graines des mutants *rtl1*

Nous nous sommes également intéressés à un autre stade de développement où *RTL1* est exprimé : la graine (**Figure 39**). Chez les Angiospermes, elles sont le résultat d'une double fécondation et sont formées d'un tégument entourant l'endosperme triploïde ($2m+1p$), d'origine diploïde maternel (m) et haploïde paternel (p), et d'un embryon diploïde ($1m + 1p$), d'origine haploïde maternel et paternel (Bhatnagar and Johri, 1972). Quatre étapes caractérisent le développement de la graine : la formation de l'embryon, la maturation de la graine avec l'accumulation des réserves, l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et l'installation de la dormance (Devic and Roscoe, 2016). L'acide abscissique (ABA) est un régulateur positif de la

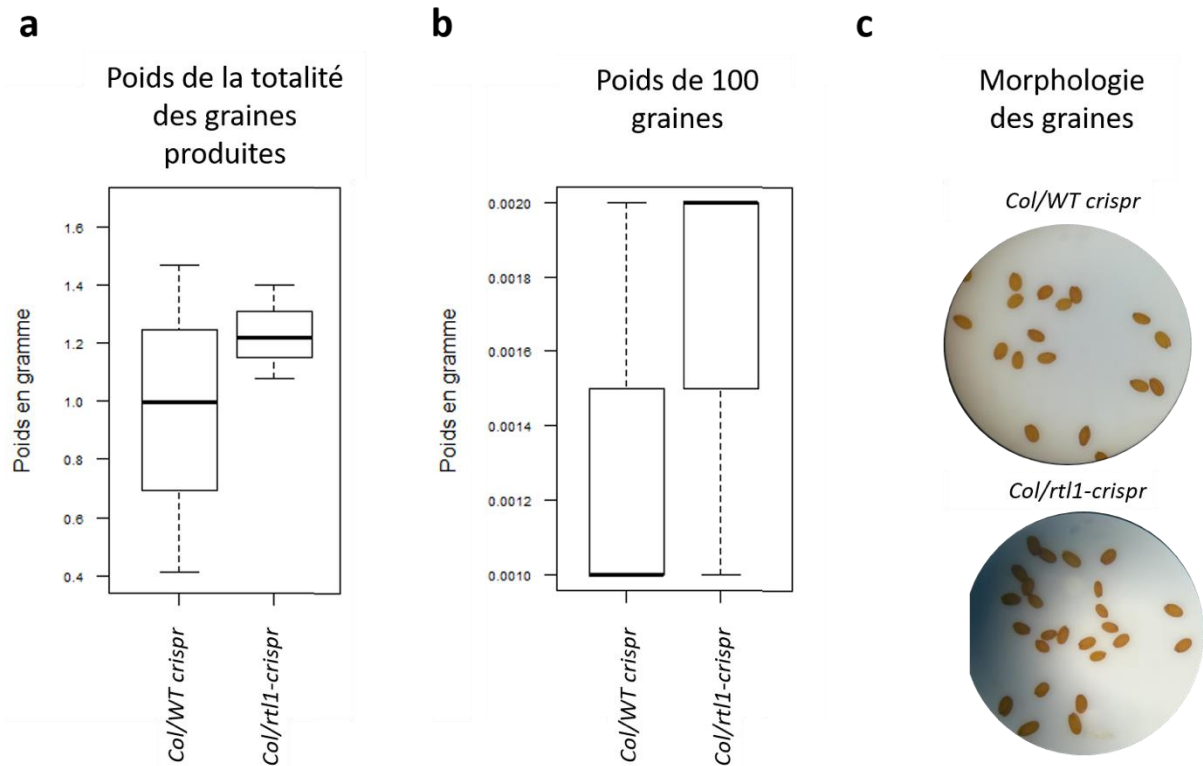


Figure 49 : La mutation *rtl1* augmente le poids des graines

Les graines de 3 à 4 lignées homozygotes *rtl1-crispr* issues de 6 back-crosses avec l'accèsion Col (*Col/rtl1-crispr*) ainsi que des lignées isogéniques associées (*Col/WT crispr*) sont analysées. Environ 70 jours post-semis, les graines sont récoltées, séchées, battues et pesées. Le poids de la totalité des graines est représenté (a) ainsi que le poids de lots de 100 graines (b). La morphologie des graines est observée sous loupe binoculaire (c). Les boxplots sont effectués sur R.

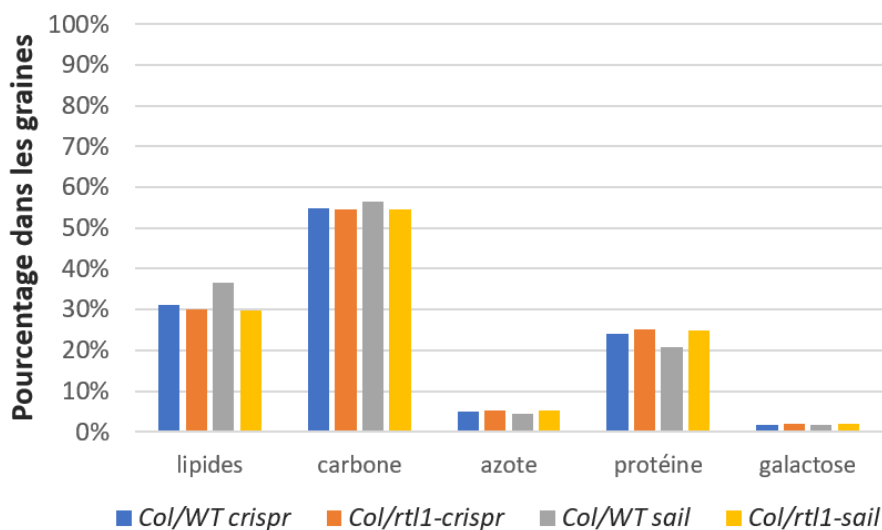


Figure 50 : La mutation *rtl1* n'affecte pas la composition de la graine

1 lot de 300 μ L de graines par génotype est analysé au NIRS. Les résultats sont indiqués en pourcentage par rapport au lot de graine total.

maturation de la graine et de la dormance et son antagoniste gibbérelline (GA) régule la germination (Kermode, 2005; Martin et al., 2010). Une reprogrammation du génome a également lieu avec une modification de la structure de la chromatine (Saijo, 2013). Cependant, le rôle des modifications post-transcriptionnelles est peu caractérisé.

a) Quantité de graines et poids des graines chez *rtl1*

Dans un premier temps, nous avons testé si la mutation *rtl1* affecte le développement de la graine. Nous avons comparé le poids des graines produites par la lignée *Col/rtl1-crispr* par rapport à la lignée isogénique sauvage *Col/WT crispr* (**Figure 49**). Dans un premier temps, on observe que les mutants *Col/rtl1-crispr* produisent plus de graines que les lignées isogéniques sauvages *Col/WT crispr* (**Figure 49a**). Par ailleurs, en comparant le poids d'un lot de 100 graines entre les lignées *Col/rtl1-crispr* et les lignées *Col/WT crispr*, on observe que la mutation *rtl1-crispr* induit une augmentation du poids de la graine (**Figure 49b**), suggérant que *RTL1* est impliquée dans le développement de la graine. Cependant, la morphologie de la graine ne semble pas affectée par la mutation *rtl1-crispr* (**Figure 49b**). Des analyses complémentaires seront conduites sur les différents tissus de la graine afin de comprendre comment *RTL1* limite le poids de la graine.

b) Analyse de la composition des graines des mutants *rtl1* au NIRS

La spectroscopie dans l'infrarouge proche ou NIRS est l'analyse du spectre de réflexion d'un échantillon dans une gamme de longueur d'onde allant de 0,78 à 2,5 μm . Les liaisons chimiques de molécules organiques fréquentes telles que le carbone, l'azote ou l'oxygène peuvent être analysées et les composants d'un échantillon déduits à partir de modèles. Avec l'aide de l'équipe de Philippe Guerche de l'IJPB, qui a développé plusieurs équations pour l'étude des composants de l'hémicellulose des cellules des graines d'*Arabidopsis thaliana* (Jasinski et al., 2016), 300 μL de graines des mutants *Col/rtl1-crispr* et *Col/rtl1-sail* ainsi que des lignées sauvages isogéniques correspondantes sont analysées pour leur composition en lipide, carbone, azote, protéine et galactose (**Figure 50**). On n'observe pas de différence dans la composition en lipide (environ 30%), carbone (environ 50%), azote (environ 5%), protéine (environ 20%) et galactose (environ 2 %) des graines entre les lignées sauvages et les lignées mutantes pour *rtl1* (**Figure 50**). La hausse du pourcentage de lipides dans les graines de la lignée *Col/WT sail* est trop faible pour faire sens et est vraisemblablement due à la variabilité naturelle entre les

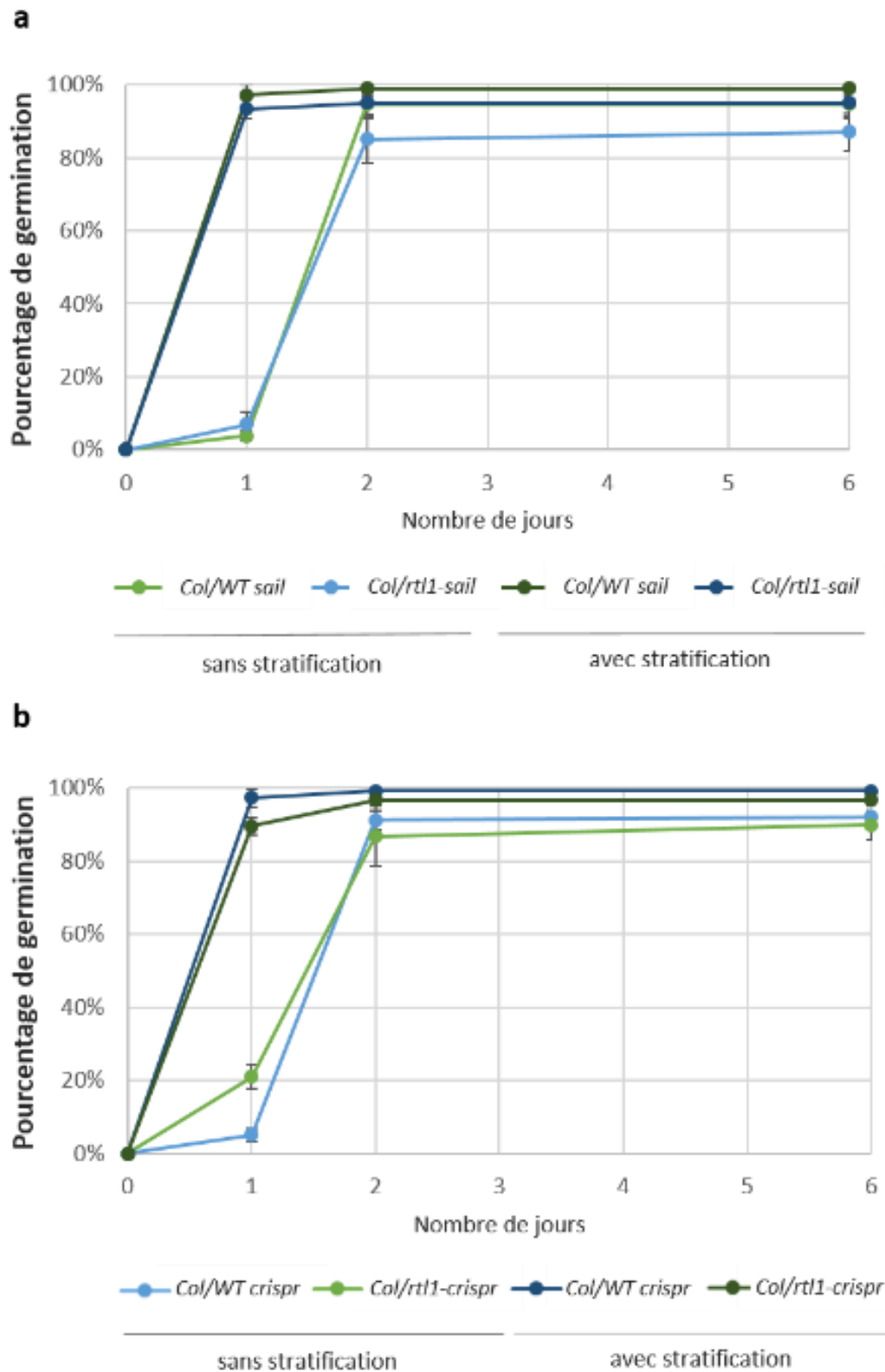


Figure 51 : La mutation *rtl1* n'affecte pas le taux de germination des graines

Le nombre de graines germées avec ou sans stratification 48h à 4°C est compté sur 6 jours pour les mutants *Col/rtl1-sail* comparé à la lignée isogénique *Col/WT sail* (a) et pour les mutants *Col/rtl1-crispr* comparé à la lignée isogénique *Col/WT crispr* (b). 3 lots de graines par génotype sont analysés. Les analyses sont effectuées par Boris Collet.

lignées. RTL1 ne semble donc pas impliquée dans l'accumulation de ces composants dans la graine.

c) Analyse de germination des graines des mutants *rtl1*

La germination implique la levée de la dormance des graines, notamment par l'inhibition des protéines DELLA de synthèse de l'ABA par la GA lorsque les conditions de température, de rayonnement et d'imbibition sont réunies (Achard and Genschik, 2009). Nous nous sommes demandés si la germination des graines et la levée de la dormance pouvaient être affectées par la mutation *rtl1*. Boris Collet de l'équipe Physiologie de la germination dirigée par Loïc Rajjou l'IJPB a analysé le pourcentage de germination de trois lots de graines pour les mutants *Col/rtl1-crispr* et *Col/rtl1-sail* ainsi que les graines des lignées sauvages isogéniques correspondantes, avec et sans stratification (**Figure 51**). Sans stratification, on observe au bout de 6 jours que la germination n'est pas optimale : respectivement, 95% et 92% des graines des lignées *Col/WT sail* et *Col/WT crispr* ont germé contre respectivement 87% et 90% des graines pour les mutants *Col/rtl1-sail* et *Col/rtl1-crispr* sans stratification (**Figure 51a et b**). Ces différences ne sont pas significatives, comme l'indique les barres d'erreur. Après stratification, on observe une germination plus rapide et plus efficace, avec respectivement 99% et 95% des graines des lignées *Col/WT sail* et *Col/WT crispr* qui ont germées contre respectivement 99% et 97% des graines pour les mutants *Col/rtl1-sail* et *Col/rtl1-crispr* (**Figure 51a et b**). Là non plus, ces différences ne sont pas significatives. Il semble que la mutation *rtl1* n'impacte pas le taux de germination des graines.

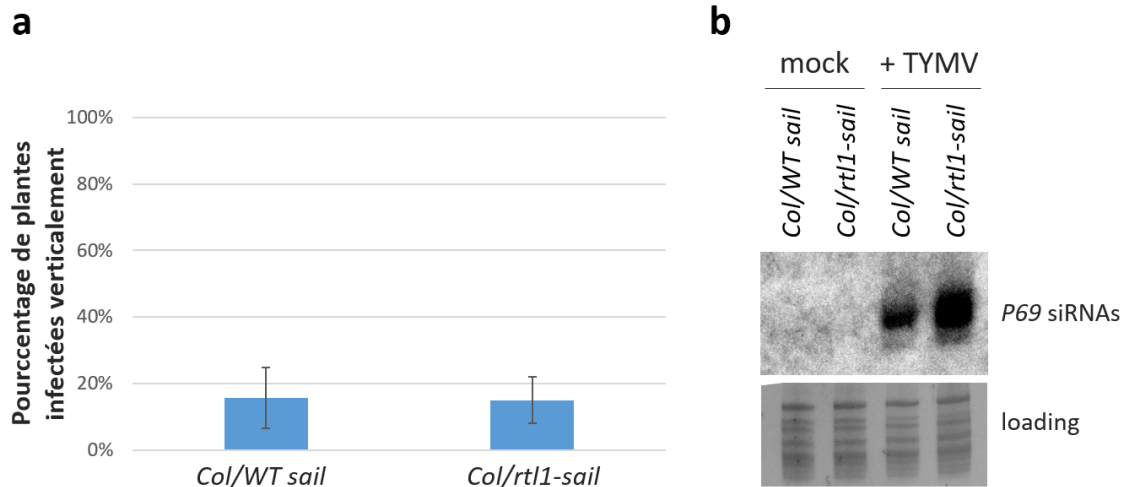


Figure 52 : La mutation *rtl1* n'affecte pas le taux de transmission du TYMV par la graine

8 plantes par génotype (*Col/WT sail* et *Col/rtl1-sail*) sont infectées par le TYMV. 40 graines par plante sont semées et le nombre de plantes poussant avec les symptômes du TYMV est compté. Les pourcentages moyens sur les 8 lots de graine sont moyennés et les barres d'erreur représentent les écart-types (a). Une analyse des siRNAs issus du TYMV est effectuée par northern blot LMW à partir des RNAs totaux extraits des plantes descendantes infectées et non-infectées verticalement (b). La révélation est effectuée à l'aide d'une sonde correspondant à *P69* marquée au P³². Le loading correspond à la migration des RNAs sur gel d'acrylamide révélé à l'EtBr.

d) Analyse de la transmission des virus par la graine chez les mutants *rtl1*

De nombreux virus sont capables de contaminer le pollen, le tégument de la graine ou directement l'embryon (Sastry, 2013). On parle alors de transmission verticale de l'infection, quand la transmission horizontale de l'infection nécessite un contact direct ou indirect entre une plante infectée et une plante saine. Lors d'une infection des plantes *A. thaliana* par le TYMV, les symptômes sont faibles et les plantes peuvent monter à fleur et produire des graines (**Figure 12**). Dans l'accession Dijon, 2% des descendants de plantes infectées par le TYMV développent des symptômes, et 7% dans l'accession Landsberg (de Assis Filho and Sherwood, 2000). Aucune donnée n'était disponible pour l'accession Col.

Nous avons donc infecté 8 plantes sauvages et 8 plantes *Col/rtl1-sail* par le TYMV. Après récolte, 40 graines par plantes infectées ont été semées. Très tôt, des plantes présentant des symptômes de l'infection au TYMV ont été identifiées. On observe que 18% des descendants des plantes *Col/WT sail* et *Col/rtl1-sail* infectées par le TYMV sont elles-mêmes infectées (**Figure 52a**). La mutation *rtl1* ne semble donc pas avoir d'effet sur la transmission de l'infection par la graine. L'analyse des siRNAs dérivés du TYMV chez les descendants infectés confirme une plus forte accumulation de siRNAs dérivés du TYMV chez *Col/rtl1-sail* par rapport à *Col/WT sail* (**Figure 52b**), suggérant que le rôle favorable de RTL1 dans l'infection du TYMV est conservé au travers des générations.

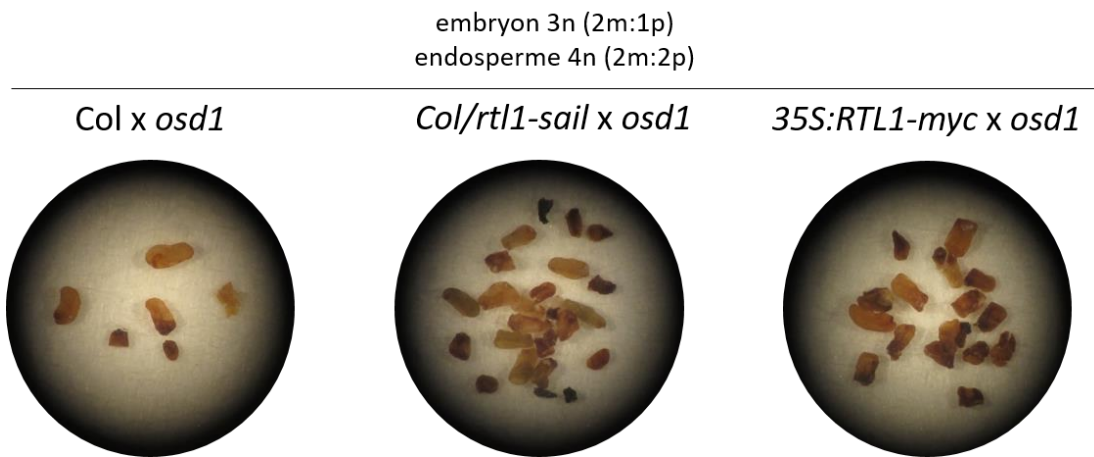


Figure 53 : La dérégulation de *RTL1* ne modifie pas l'effet de la mutation *osd1*

Les graines issues des croisements de plante sauvage Col, de mutant *Col/rtl1-sail* et de la lignée *35S:RTL1-myc* (fleurs) avec le mutant *osd1-3* (pollen) sont analysées sous loupe binoculaire. Les graines avortées sont flétries et parfois plus sombre.

e) Analyse de l'effet d'une dérégulation de RTL1 sur le triploïd block

Chez les Angiospermes, le pollen est constitué d'une cellule végétative contenant deux cellules spermatiques haploïdes (Dumas and Rogowsky, 2008). L'ovule du sac embryonnaire est quant à lui constitué d'une cellule œuf haploïde et d'une cellule centrale diploïde, chacune fécondée par une des cellules spermatiques du pollen. Elles forment alors respectivement un embryon diploïde et l'endosperme triploïde. La régulation de cette répartition de la ploïdie est assurée par les composants du « triploïd block » (Greco et al., 2012). En effet, un excès ou un déficit dans cette répartition impacte la cellularisation de l'endosperme et conduit à l'avortement de la graine. Il a d'ailleurs été démontré une implication des Pol IV-dépendant siRNAs (p4-siRNAs) dans la régulation négative de l'expression d'un gène régulateur de la cellularisation de l'endosperme *AMAGOUS LIKE (AGL) 2* (Lu et al., 2012). RTL1 pourrait donc être impliquée dans la régulation des dsRNAs et siRNAs du triploïd block.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le mutant *osd1* affecté dans le gène *OMISSION OF SECOND DIVISION* nécessaire à la méiose II (d'Erfurth et al., 2009). Au lieu d'une tétrade de pollen haploïde, une dyade de pollen diploïde est produite. Les graines issues de croisements entre le pollen d'un mutant *osd1* et l'ovule d'une plante sauvage ont alors une répartition de la ploïdie modifiée, avec un embryon triploïde $1m + 2p$ et un endosperme $1m + 2p$, conduisant à un avortement de la graine du au triploïd block (d'Erfurth et al., 2009; Kradolfer et al., 2013). Or la mutation de la méthyltransférase *met1* en fond *osd1* conduit à une hypométhylation du pollen, supprime le triploïd block et restaure la viabilité du pollen (Schatlowski et al., 2014).

Nous avons donc testé si l'inhibition de RTL1 (mutant *rtl1-sail*) ou la sur-expression de *RTL1* (lignée *35S:RTL1-myc*) modifiait la viabilité des graines issues d'un croisement avec le mutant nul *osd1-3* (Heyman et al., 2011).

Aucune différence dans la proportion de graines avortées n'est observée chez les graines issues des croisements Col x *osd1*, Col/*rtl1-sail* x *osd1* et *35S:RTL1-myc* x *osd1* (Figure 53). Les croisements n'ont pas été faits dans l'autre sens car *osd1* produit des ovules haploïdes comme le sauvage. De plus, l'expression de *RTL1* est spécifique à l'endosperme (communication personnelle de Filipes Borges). RTL1 ne semble donc pas impliquée dans la régulation du triploïd block.

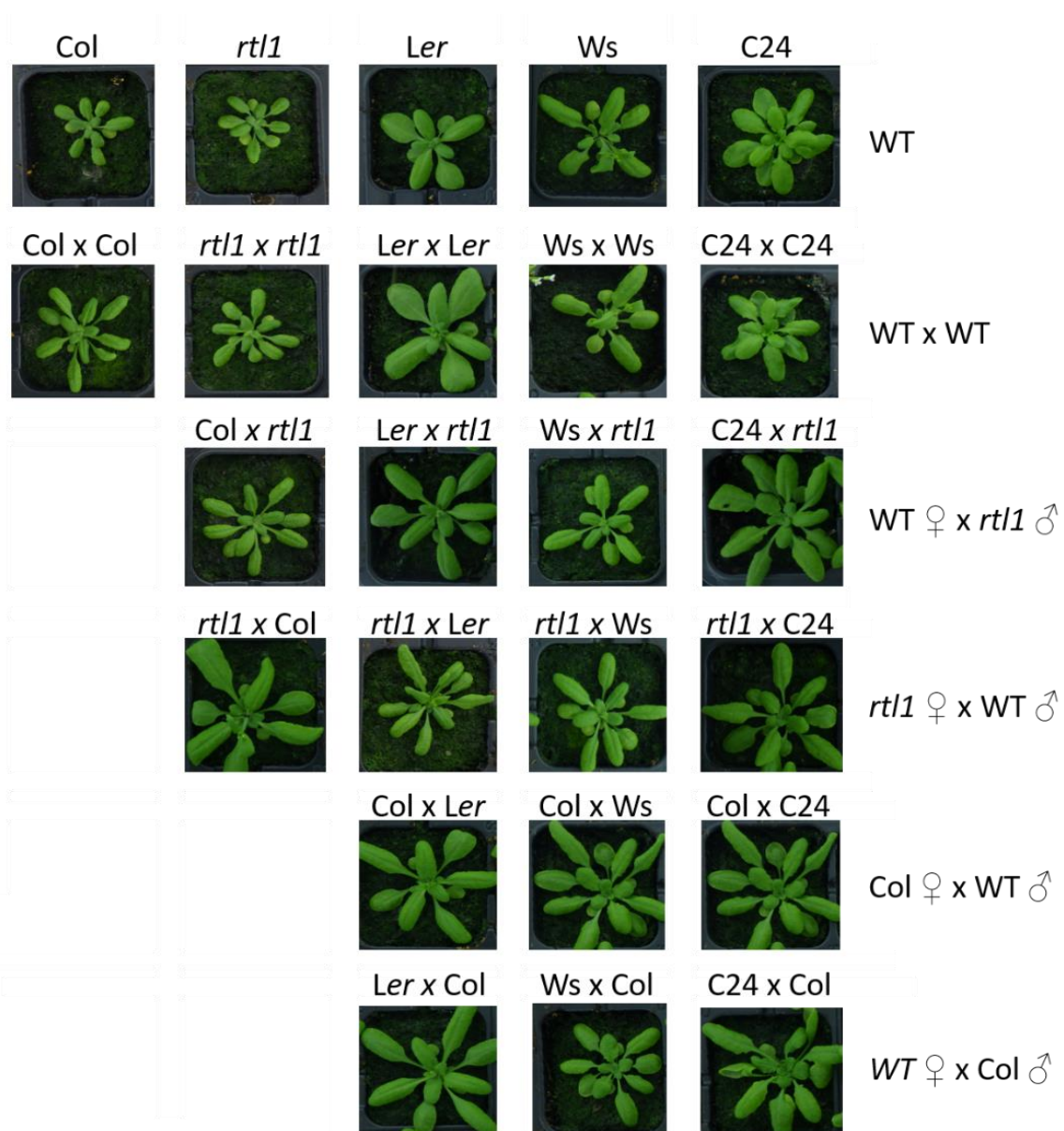


Figure 54 : La mutation *rtl1* n'affecte pas la vigueur hybride

Des croisements entre le mutant *Col/rtl1-sail* (désigné par *rtl1*) et différentes accessions d'*A. thaliana* (Col-0, Ler-0, Ws et C24) sont effectués. 4 à 12 graines par croisements sont analysées. Afin d'indiquer le sens du croisement, le symbole ♀ identifie le génotype du pollen utilisé et le symbole ♂ celui du gamétophyte femelle. Les photos sont prises 1 mois après semis en chambre de culture (jours longs).

f) Analyse de l'effet de la mutation *rtl1* sur l'hétérosis

L'hétérosis, ou vigueur hybride, est décrite comme l'obtention de traits de meilleure qualité, tels que la taille, la biomasse ou la production de graines, dans les descendants F1 hybrides par rapport à leurs parents (Hochholdinger and Hoecker, 2007). La méthylation de l'ADN joue un rôle dans ce processus. En effet, une modification du profil des p4-siRNAs a été observée dans les descendants F1 d'un croisement entre l'écotype *Ler* et l'écotype C24 où l'hétérosis est observée par rapport à leurs parents *Ler* et C24 (Groszmann et al., 2011), notamment dans les régions différenciellement méthylées entre les parents *Ler* et C24 (Shen et al., 2012). Nous nous sommes donc demandé si RTL1 pouvait réguler les p4-siRNAs de l'hétérosis.

Les croisements entre l'écotype *Col* et les écotypes *Ler*, C24 et WS donnant lieu à de l'hétérosis, les descendants F1 issus des croisements entre le mutant *Col/rtl1-sail* et les écotypes *Col*, *Ler*, WS et C24 sont analysés. Les lignées non croisées et les lignées auto-fécondées sont utilisées en témoins négatifs. Les croisements entre la lignée *Col* et les écotypes *Ler*, WS et C24 sont utilisés en témoin positif. Les croisements sont effectués dans les deux sens (**Figure 54**).

Dans un premier temps, on observe que les rosettes des lignées *Col*, *Ler*, WS, C24 et *Col/rtl1-sail* auto-fécondées naturellement ne sont pas de la même taille que les rosettes des plantes obtenues par auto-fécondation manuelle (**Figure 54**). Cela suggère un impact du croisement manuel sur le développement de la graine et de la plante. On observe également que les croisements dans les deux sens entre *Col* et les écotypes *Ler*, WS et C24 ont des rosettes de taille supérieure aux témoins *Col*, *Ler*, WS et C24 auto-fécondés manuellement (**Figure 54**). Cela confirme que ces croisements conduisent à l'hétérosis de la F1. Cependant, l'hétérosis est aussi observée chez les croisements dans les deux sens entre *Col/rtl1-sail* et les écotypes *Col*, *Ler*, WS et C24 (**Figure 54**). Ces résultats suggèrent que la mutation *rtl1* n'impacte pas la mise en place de l'hétérosis.

En conclusion de cette analyse des graines, RTL1 semble limiter le poids des graines (**Figure 49**), sans que cela ne modifie la composition en lipide, carbone, azote, protéine et galactose (**Figure 50**). RTL1 ne semble pas participer à l'hétérosis, ni au triploid block (**Figure 53** et **Figure 54**).

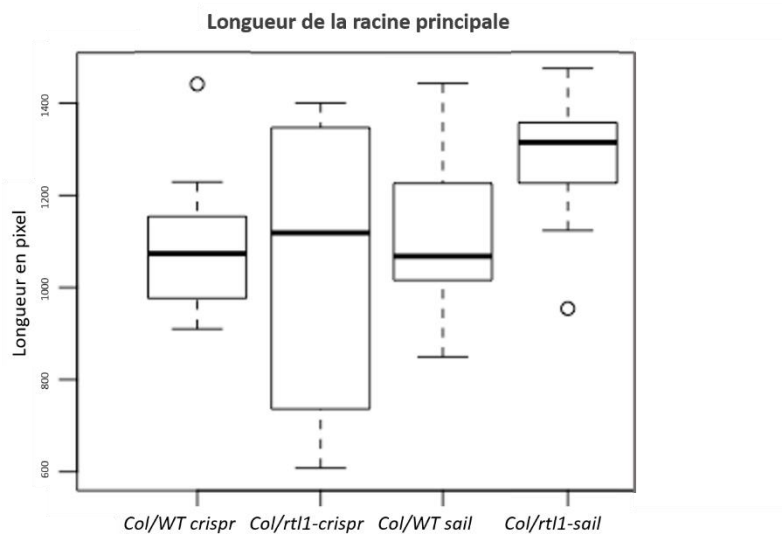
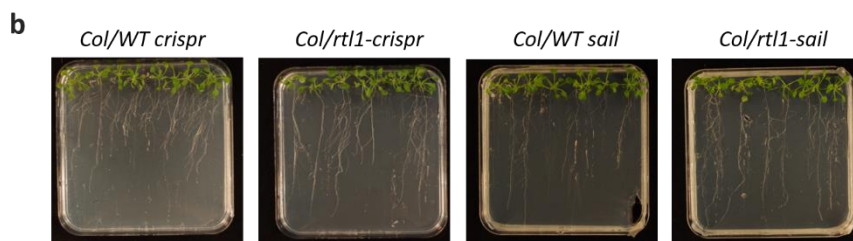
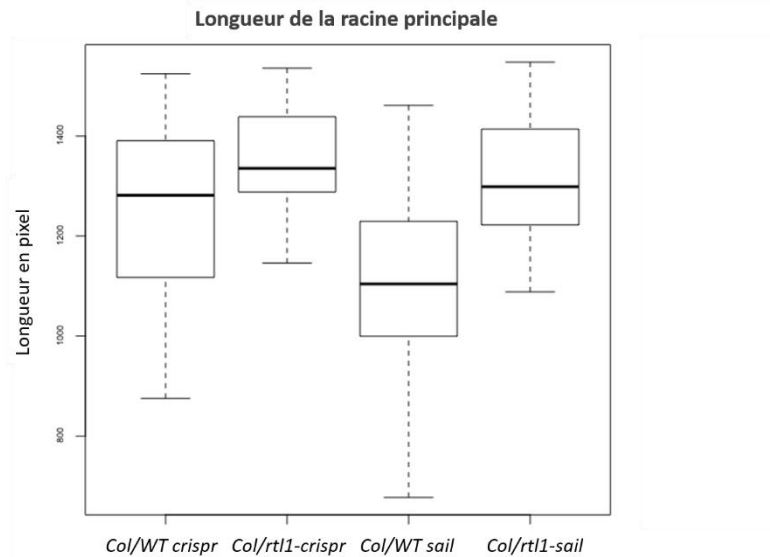
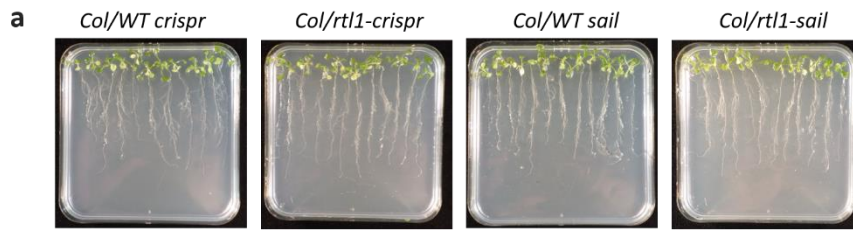


Figure 55 : Effet de la mutation *rtl1* sur la longueur de la racine principale

Des plantes T2 (a) et T3 (b) homozygotes pour les mutations *rtl1-sail* et *rtl1-crispr* ainsi que les lignées isogéniques sauvages correspondantes (*Col/WT sail* et *Col/WT crispr*) sont analysés 3 à 4 semaines après semis in vitro sur milieu 1/2MS+vit 1% sucrose. La longueur des racines est analysée à l'aide du plugin NeuronJ du logiciel ImageJ et est exprimée en pixel. Un boxplot est effectué sur le logiciel R.

4) Phénotypage des racines des mutants *rtl1*

Le système racinaire des plantes, divisé en racines principales et secondaires, est chargé de l'enracinement ainsi que de la prospection de l'eau et des nutriments du sol. Lors de la germination, le méristème apical racinaire prolifère et se différencie en un centre quiescent de prolifération cellulaire, une zone de transition, une zone d'élongation et une zone de maturation des cellules racinaires (Smith and De Smet, 2012). C'est dans cette dernière que l'assise de poils racinaires se développe. Cette organisation est finement régulée en fonction des conditions, par exemple via l'auxine qui stimule la production de racines latérales (Gaffar and Koch, 2019) ou par la régulation de la structure chromatinienne (Chen et al., 2018).

RTL1 est exprimé dans la zone pilifère (zone mature) et dans l'épiderme des cellules trichoblastiques, cellules initiales des poils racinaires (communication personnelle de Filipe Borges). Les poils racinaires sont spécialisés dans la captation des éléments nutritifs du sol (Gilroy and Jones, 2000). Nous avons donc testé l'impact de la mutation *rtl1* sur le phénotype racinaire des plantes.

Chez les mutants *Col/rtl1-crispr* et *Col/rtl1-sail* la longueur de la racine principale tend à être plus longue que celle des témoins isogéniques *Col/WT crispr* et *Col/WT sail* à la génération T2 (**Figure 55a**). Cependant, cet effet est perdu dans les T3 *rtl1-crispr* issues de l'autofécondation des T2 homozygotes précédemment utilisées (**Figure 55b**). Il semble donc que la mutation *rtl1-sail* induise un allongement de la racine principale, quand la mutation *rtl1-crispr* induit une variabilité dans la longueur de la racine principale. Cette différence entre les deux mutants, déjà observée dans le phénotypage des feuilles (partie III-1 p.123), peut s'expliquer par la ségrégation d'off-targets induits par la technique CRISPR (Zhang et al., 2018). Quoiqu'il en soit, l'observation de plantes *rtl1-crispr* présentant des racines similaires aux plantes sauvages suggère que l'allongement de la racine principale du mutant *rtl1-sail* pourrait être dû à une autre mutation portée par cette lignée.

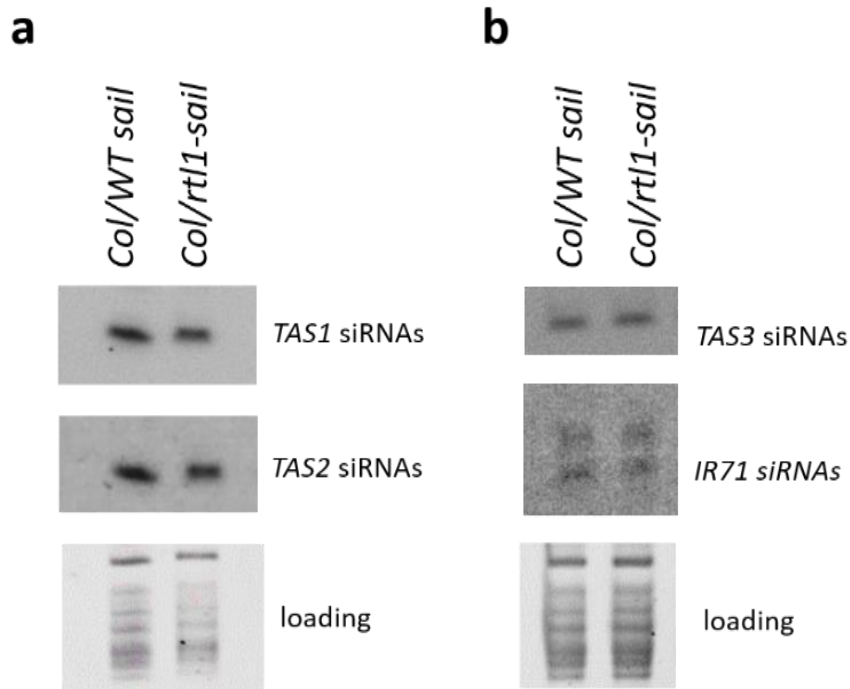


Figure 56 : La mutation *rtl1* n'a pas d'effet sur l'accumulation des *ta*-siRNAs et des *endoIR*-siRNAs dans les racines

L'accumulation des *TAS1*, *TAS2* (**a**), *TAS3* et *IR71* (**b**) siRNAs est analysée par northern blot LMW à partir des extraits de RNAs totaux des racines d'un pool de 8 à 12 plantes. Une sonde complémentaire aux siRNAs est utilisée pour la détection par marquage radioactif au P^{32} . Le loading correspond à la migration des RNAs sur gel d'acrylamide révélée à l'EtBr. Ces résultats ont été générés par Agnès Yu dans notre équipe.

La faible expression de *RTL1* dans la racine nous a amené également à déterminer si *RTL1* régulait l'accumulation des siRNAs dans ce tissu. Des expériences de northern blot réalisées par Agnès Yu dans notre équipe montrent que la mutation *rtl1-sail* n'a pas d'effet sur l'accumulation des ta-siRNAs ou des endoIR-siRNAs dans la racine (**Figure 56**). Ces résultats corroborent l'absence d'effet de *RTL1* sur l'accumulation des siRNAs *SUL* qui migrent de la feuille vers la racine (**Figure 34c**), suggérant que la faible expression de *RTL1* dans la racine semble insuffisante pour impacter l'accumulation des siRNAs. Toutefois, il est possible que *RTL1* affecte l'accumulation de certains siRNAs très spécifiques ou de mRNAs qui présentent des structures locales en dsRNA qui les rendent sensibles à *RTL1*. Pour aller plus loin, une analyse du profil des grands et petits RNAs des racines des mutants *rtl1* et des plantes sauvages pourra être effectué.

5) Effet de la mutation *rtl1* chez les accessions *Ler* et *Ws*

a) Effet sur le PTGS

A bien des égards, *Col* constitue une accession atypique d'*Arabidopsis thaliana* (Weigel, 2012), en particulier en ce qui concerne les facteurs impliqués dans le RQC et le PTGS. Par exemple, le gène de l'exoribonucléase *SUPPRESSOR OF VARICOSE (SOV)* du complexe de l'exosome du RQC est naturellement muté chez *Col* et l'introduction d'une copie fonctionnelle du gène *SOV* issue de l'accession *Ler* montre que plusieurs milliers de RNAs pourraient être ciblés par *SOV* chez *Col* (Zhang et al., 2010; Sorenson et al., 2018). Le profil des siRNAs et la méthylation des gènes endogènes cibles varient aussi selon les accessions (Koornneef et al., 2011; Zhang et al., 2008; Zhai et al., 2008), de même que la réponse à l'infection virale (Hillung et al., 2012) et une étude récente montre que le polymorphisme de la séquence du gène *AGO2* est impliqué dans la sensibilité différentielle des accessions à l'infection du *Potato virus X (PVX)* (Brosseau et al., 2020). Autres exemples marquants, les mutants *ago10* ont un développement normal chez *Col* alors que les mutants *ago10* sont fortement affectés dans le développement du méristème apical caulinaire et ne survivent pas chez *Ler* (Mallory et al., 2009; Liu et al., 2009b; Liou et al., 2014; Jaubert et al., 2011; Yu et al., 2017a; Zhu et al., 2011). De même, les allèles *ago1-32* et *hen1-8* chez *Col* montrent une fertilité fortement réduite (Sorin et al., 2005; Yu et al., 2010; Wei et al., 2020) alors que les mêmes mutations chez *Ler* affectent peu la fertilité (Yang et al., 2006; Yu et al., 2010; Wei et al., 2020). Enfin, le gène *SGS3* est quatre

Pourcentage de plantes silencées

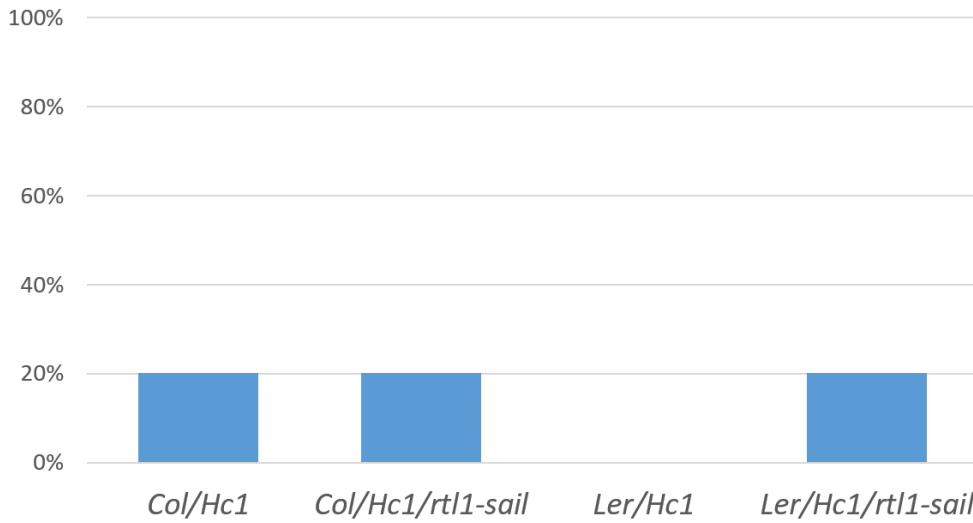


Figure 57 : La mutation *rtl1* induit le silencing de la lignée *Hc1* en fond *Ler*

Les lignées mutantes *Col/Hc1/rtl1-sail* et *Ler/Hc1/rtl1-sail* et les lignées sauvages *Col/Hc1* et *Ler/Hc1* sont semées *in vitro* sans antibiotique de sélection et les plantes sont repiquées en chambre de culture en jours longs 2 semaines post-germination. Le pourcentage de plantes dont l'activité du transgène *p35S:GUS* de *Hc1* est inhibée est déterminé au Fluoroskan sur environ 90 plantes par lignées 4 semaines post-repiquage après la montée à fleur. Une lignée est analysée par génotype.

Expression de *RTL1* dans les feuilles et les fleurs relative à *Col* (feuilles)

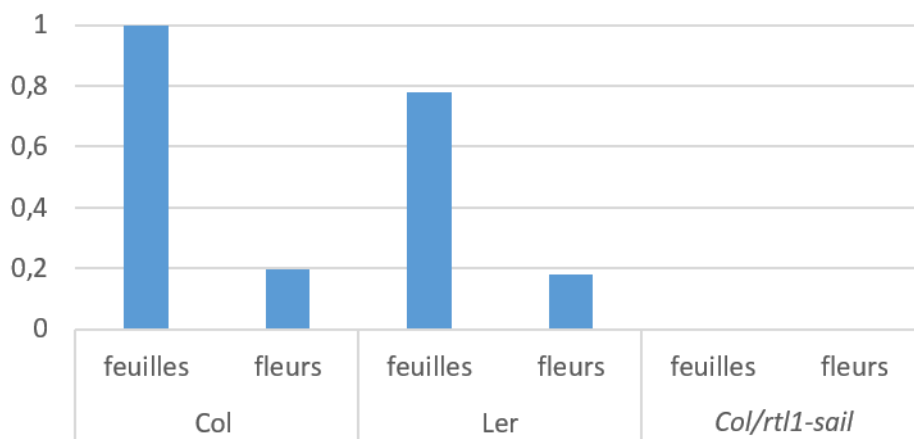


Figure 58 : L'expression de *RTL1* est similaire dans les feuilles et les fleurs des accessions *Col* et *Ler*

L'expression de *RTL1* dans les feuilles et les fleurs d'un pool de 4 plantes/génotype est analysée par RT-qPCR. Les plantes sauvages *Col* et *Ler* ainsi que les plantes mutantes *Col/rtl1-sail* sont testées. Le gène *GAPDH* est utilisé en contrôle interne. Les valeurs sont normalisées par rapport à *Col* (feuilles).

fois moins exprimé chez Col que chez *Ler* (communication personnelle de Taline Elmayan).

En introgressant les *loci Ll* et *Hcl* de Col vers *Ler* et *Ws* par 10 back-cross successifs, notre équipe a constaté que le PTGS est plus efficace chez Col que chez *Ler* ou *Ws*. En effet, si *Ll* déclenche le PTGS chez 100% des plantes en fond Col, *Ler* ou *Ws*, la cinétique d'inactivation est plus rapide chez Col que chez *Ler* et *Ws*. La différence entre Col, *Ler* et *Ws* est encore plus spectaculaire en ce qui concerne *Hcl* puisque 20% des plantes portant *Hcl* déclenchent le PTGS en fond Col alors qu'aucune plante ne déclenche en fond *Ler* et *Ws*. Afin d'être sûr que ces différences n'avaient pas été induites par les séries de back-cross, l'équipe a également généré des lignées en transformant directement *Ws* avec la construction *p35S:GUS*. Une lignée, appelée 159, qui déclenche le PTGS à 100% et une lignée, appelée 86, qui ne déclenche pas le PTGS, ont pu être identifiées. Ces lignées ont ensuite été back-crossées 10 fois à Col. La lignée *Col/159* a montré une cinétique de PTGS beaucoup plus rapide que la lignée *Ws/159*, et la lignée *Col/86* a montré un déclenchement du PTGS chez 20% des plantes tandis que la lignée *Ws/86* ne déclenche jamais, confirmant que le PTGS est plus efficace chez Col que chez *Ws*, indépendamment des étapes d'introgression.

Nous nous sommes donc demandés si *RTL1* contribuait à ces différences d'efficacité du PTGS entre Col, *Ler* et *Ws*. Pour cela, les mutants *rtl1-sail* et *rtl1-crispr* (obtenus en fond Col) ont été back-crossés 6 fois à *Ler* et 5 fois à *Ws* en sélectionnant à chaque génération la présence de la mutation *rtl1*. Les mutants *rtl1* en fond Col, *Ler* ou *Ws* ont ensuite été croisés aux lignées *Hcl* et 86 en fond Col, *Ler* ou *Ws* puis auto-fécondés, et des plantes isogéniques homozygotes pour *Hcl* ou 86, et homozygotes pour la mutation *rtl1* ou l'allèle sauvage *RTL1* ont été sélectionnées. A ce jour, nous avons pu obtenir et analyser les lignées isogéniques *Col/Hcl* et *Col/Hcl/rtl1-sail* ainsi que les lignées *Ler/Hcl* et *Ler/Hcl/rtl1-sail*. Nos analyses montrent que la mutation *rtl1-sail* n'affecte pas l'efficacité du PTGS chez Col, tandis qu'elle induit le PTGS de *Hcl* chez *Ler* au niveau observé chez un Col sauvage (**Figure 57**). Ces résultats suggèrent donc que *RTL1* limite le PTGS de *Hcl* chez *Ler*, mais pas chez Col. L'analyse des plantes *Col/Hcl*, *Col/Hcl/rtl1-crispr*, *Ler/Hcl* et *Ler/Hcl/rtl1-crispr* permettra de tester cette hypothèse. Cependant, le niveau d'expression de *RTL1* est similaire dans les feuilles et les fleurs des accessions Col et *Ler* (**Figure 58**). Le niveau d'expression de *RTL1* dans les racines des plantes Col et *Ler* devra être testé. L'analyse du PTGS chez les plantes *Ws/Hcl/rtl1*, *Ws/86/rtl1* et *Col/86/rtl1*, comparée aux plantes *Ws/Hcl* (0% de PTGS), *Ws/86* (0% de PTGS), *Col/Hcl* (20% de PTGS), *Col/Hcl/rtl1* (20% de PTGS) et *Col/86* (20% de PTGS) permettra de déterminer si *RTL1* contribue également à limiter le PTGS chez *Ws*.

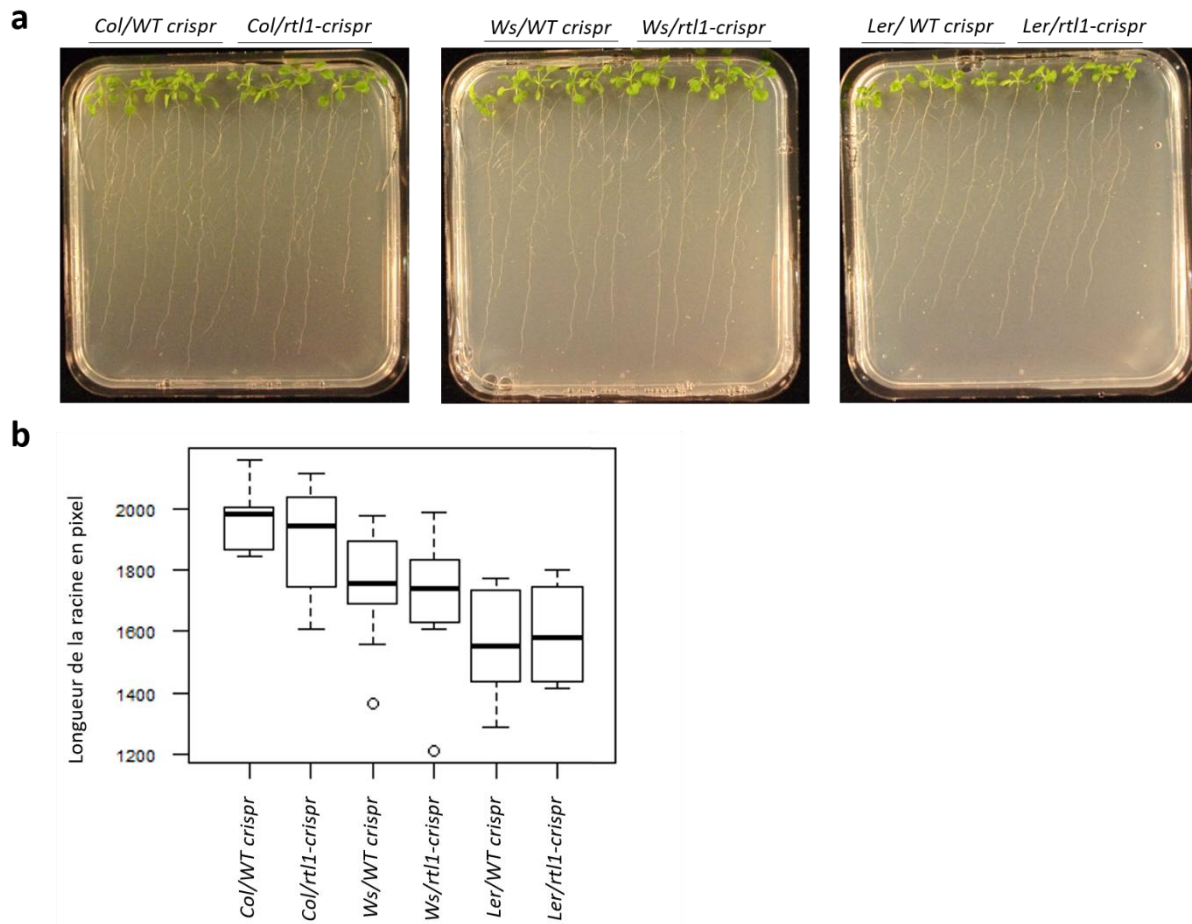


Figure 59 : La mutation *rtl1* n'affecte pas la longueur de la racine principale de différents accessions d'*Arabidopsis*

Les lignées homozygotes *rtl1-crispr* issues de 6 back-crosses avec les accessions Col et Ler et de 5 back-crosses avec l'accension Ws sont analysées sur semis in vitro sur un milieu ½ MS + 1% Sucrose. Les photos sont prises 3 semaines post-germination (a) et les longueurs des racines est analysées avec le plugin NeuronJ du logiciel ImageJ et est exprimée en pixel (b). Un boxplot est effectué sur le logiciel R.

b) Effet sur le développement

- Analyse de l'effet de la mutation *rtl1* sur la racine principale

Nous avons vu précédemment que la mutation *rtl1-sail* affecte la longueur de la racine principale, mais pas la mutation *rtl1-crispr* (**Figure 55**). Nous avons donc comparé la longueur de la racine principale des plantes *Col/rtl1-crispr*, *Ws/rtl1-crispr* et *Ler/rtl1-crispr* à celle des lignées isogéniques sauvages associées *Col/WT crispr*, *Ws/WT crispr* et *Ler/WT crispr* (**Figure 59**). On observe que la racine principale des plantes *Col/WT crispr* est plus longue que celle des plantes *Ws/WT crispr* et *Ler/WT crispr* en accord avec des résultats précédemment publiés (Aceves-García et al., 2016) mais que la racine principale des plantes *Ws/WT crispr* est plus longue que celle des plantes *Ler/WT crispr*, contrairement aux résultats publiés par la même étude (Aceves-García et al., 2016 ; **Figure 59b**). Ces variations pourraient être dues aux conditions de culture ou à l'effet des back-crosses successifs. Cependant, la mutation *rtl1-crispr* n'a pas d'effet sur la longueur de la racine principale chez les plantes *Col/rtl1-crispr*, *Ws/rtl1-crispr* et *Ler/rtl1-crispr* par rapport aux lignées sauvages isogéniques *Col/WT crispr*, *Ws/WT crispr* et *Ler/WT crispr* (**Figure 59b**). Ces résultats confirment donc que RTL1 ne semble pas impliquée dans la régulation de la taille de la racine principale chez *Col*, *Ws* et *Ler*. La différence dans la taille de la racine principale entre les plantes *Col/WT sail* et *Col/rtl1-sail* pourrait donc être due à un effet secondaire de l'insertion T-DNA ou à une autre insertion T-DNA dans le génome (**Figure 55**).

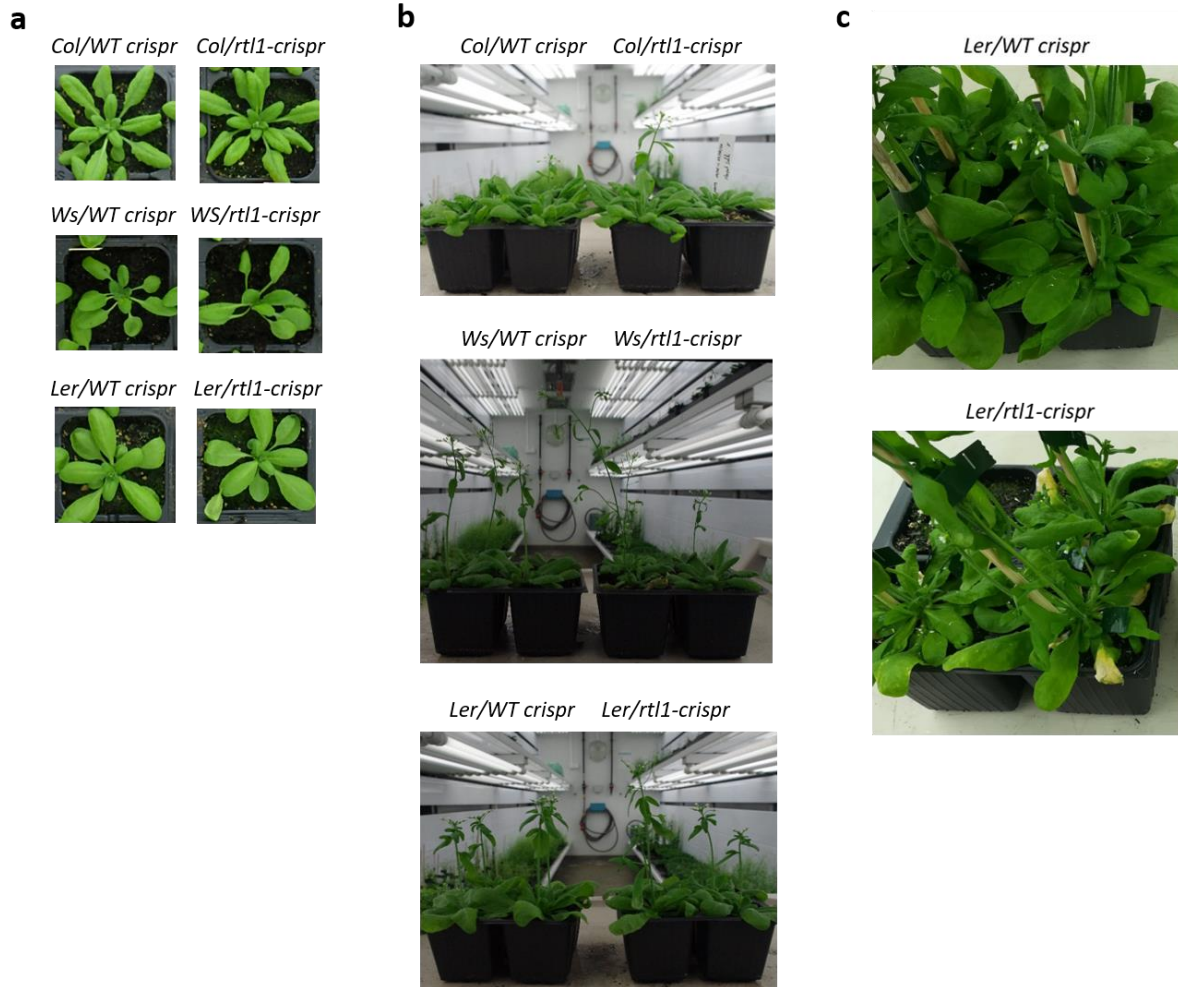


Figure 60 : Effet de la mutation *rtl1* sur le développement de différentes accessions d'*Arabidopsis*
 Les lignées homozygotes *rtl1-crispr* issues de 6 back-crosses avec les accessions Col et Ler et de 5 back-crosses avec l'accension Ws sont analysées. Les mutants et les lignées isogéniques associées sont semées en chambre de culture et en jours longs et les photos sont prises 4 semaines post-germination (**a**), lors de la montée à fleur 5 semaines post-germination (**b**) et les feuilles sénescentes sont photographiées 6 semaines post-germination chez les plantes *Ler/WT crispr* et *Ler/rtl1-crispr* (**c**).

- Analyse de l'effet de la mutation *rtl1* sur le développement

L'analyse du phénotype des feuilles par la plateforme Phenoscope ayant montré de faibles différences entre les plantes sauvages Col et les mutants *rtl1* (Partie III-1 p.123), nous nous sommes demandé s'il en était de même dans les accessions Ler et Ws. Nous avons donc étudié l'impact de la mutation *rtl1-crispr* sur le développement des plantes *Col/rtl1-crispr*, *Ws/rtl1-crispr* et *Ler/rtl1-crispr* par rapport aux lignées sauvages isogéniques *Col/WT crispr*, *Ws/WT crispr* et *Ler/WT crispr* (**Figure 60**). On n'observe pas de différences fortes dans le développement (**Figure 60a**) et le timing de floraison (**Figure 60b**) chez les plantes *Col/rtl1-crispr*, *Ws/rtl1-crispr* et *Ler/rtl1-crispr* par rapport aux plantes *Col/WT crispr*, *Ws/WT crispr* et *Ler/WT crispr*. Par contre, les plantes *Ler/rtl1-crispr* semblent plus sénescentes que les plantes *Ler/WT crispr* (**Figure 60c**) alors que la mutation *rtl1* en fond Col n'a pas d'effet sur le phénotype de sénescence des feuilles par rapport aux plantes sauvages (**Figure 47** et **Figure 48**). Pour aller plus loin, une analyse plus poussée du phénotype de sénescence chez les plantes *Ler/rtl1-crispr* et *Ler/WT crispr* devra être effectuée.

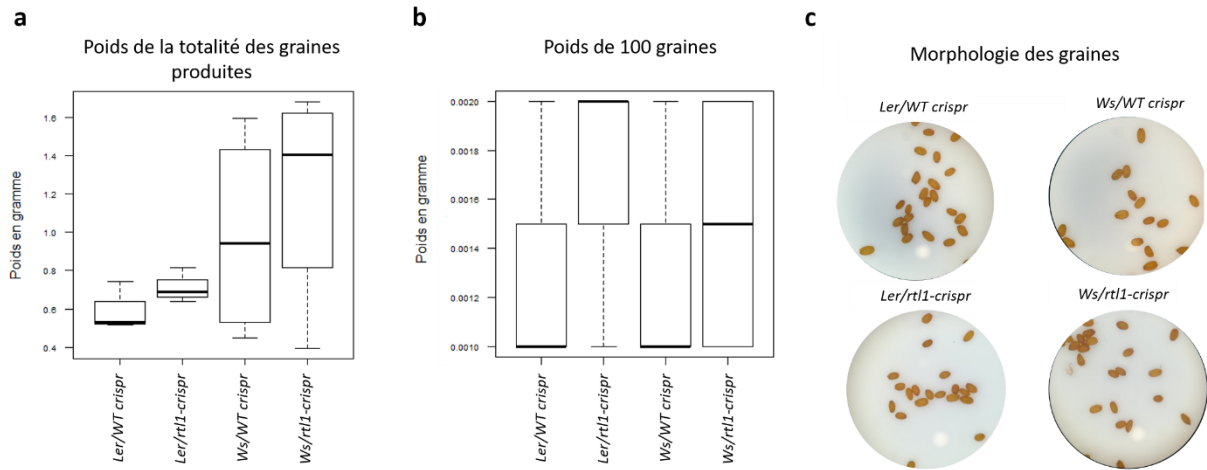


Figure 61 : La mutation *rtl1* affecte le poids des graines chez différentes accessions d'*A. thaliana*

Les graines de 3 à 4 lignées homozygotes *rtl1-crispr* issues de 6 back-crosses avec l'accension *Ler* et de 5 back-crosses avec l'accension *Ws* ainsi que les lignées isogéniques associées sont analysées. Environ 70 jours post-semis, les graines sont récoltées, séchées, battues et pesées. Le poids de la totalité des graines est représenté (a) ainsi que le poids de lots de 100 graines (b). La morphologie des graines est observée sous loupe binoculaire (c). Les boxplots sont effectués sur R.

- Analyse de l'effet de la mutation *rtl1* sur les graines

Nous avons vu précédemment que le poids de graines produit par les plantes *Col/rtl1-crispr* était supérieur à celui des lignées sauvages isogéniques *Col/WT crispr*, et que cet effet était due à un poids plus important des graines des plantes *Col/rtl1-crispr* par rapport à celles des lignées sauvages isogéniques *Col/WT crispr* (**Figure 49**). Nous avons donc comparé les graines des plantes *Ws/rtl1-crispr* et *Ler/rtl1-crispr* à celles des lignées sauvages isogéniques *Ws/WT crispr* et *Ler/WT crispr* (**Figure 61**). On constate que les accessions Col et Ws produisent une quantité équivalente de graines (environ 1g par plante) alors que l'accession *Ler* en produit beaucoup moins (environ 500 mg par plante) (**Figure 49a** et **Figure 61a**). Il est difficile d'estimer si ces valeurs sont standards car elles varient selon conditions de culture, une étude récente montre par exemple que l'accession Col produit environ 550 mg de graines et les accessions *Ler* et Ws environ 350 mg (Wang et al., 2020). Par contre, on observe que la mutation *rtl1-crispr* entraîne une augmentation du poids total des graines produites dans les accessions *Ler* et Ws comme nous l'avons observé chez Col (**Figure 49a** et **Figure 61a**), et l'analyse du poids de 100 graines par génotype révèle que la mutation *rtl1-crispr* induit une augmentation du poids de la graine chez *Ler* et Ws comme précédemment observé chez Col (**Figure 49b** et **Figure 61b**). Nous n'avons cependant pas non plus constaté de différences dans la taille et la morphologie des graines entre les accessions mutées pour *rtl1* et les accessions isogéniques sauvages (**Figure 49c** et **Figure 61c**). Bien que le poids d'un lot de 100 graines soit très faible (1 à 2 mg) et que des analyses plus poussées sur la morphologie de la graine doivent être effectuées sur un plus grand nombre de plantes (ainsi que sur les mutants *rtl1-sail* back-crossés aux accessions *Ler* et Ws), ces résultats suggèrent une implication de RTL1 dans la formation de la graine, en cohérence avec son expression pendant lors de la maturation des siliques (**Figure 39**), et ce dans les trois accessions étudiées.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I] Existe-t-il une relation entre l'effet des VSR sur le PTGS et leur effet sur RTL1 ?

Lors des interactions plante-virus, un équilibre entre les défenses de la plante et celles du virus est nécessaire au développement et à la survie des deux protagonistes. Selon que l'interaction est incompatible (avec la présence de gènes de résistance) ou compatible, le virus est restreint à la zone d'infection ou se propage de manière systémique dans toute la plante, pouvant conduire à l'apparition de symptômes développementaux et à la mort de son hôte (Roossinck, 2015).

En réponse à l'infection, différents événements sont induits chez la plante pour réduire la propagation du virus et sa réplication (Mandadi and Scholthof, 2013) :

- la réponse hypersensible (HR) locale ou systémique, où la détection de Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) par les protéines PATHOGENE RECOGNITION RECEPTOR (PRR) de la plante entraîne l'apoptose des cellules de la zone d'infection. Elle peut être modulée par les effecteurs et/ou éliciteurs viraux ainsi que par l'induction de l'expression des gènes de résistance (*R*) de la plante (Camagna and Takemoto, 2018). La HR est notamment caractérisée par un pic cytosolique de calcium Ca^{2+} et de Reactive Oxigene Species (ROS).
- la résistance systémique acquise (SAR) avec l'accumulation d'acide salicylique (SA) et d'acide jasmonique (JA), responsable de l'induction de l'expression du gène *NON-EXPRESSOR OF PR (NPR) 1* et la modification de l'expression de nombreux gènes de défense dans les tissus systémiques non infectés (Fu and Dong, 2013).
- la modulation du système de dégradation Ubiquitin/Proteasome 26S (UPS) qui régule, entre autres, la transduction des signaux, la transcription et le cycle cellulaire (Sharma et al., 2016) et conduit selon les virus à une augmentation ou une diminution de la sensibilité de la plante à l'infection (Reichel and Beachy, 2000; Liu et al., 2002; Drugeon and Jupin, 2002; Baumberger et al., 2007; Camborde et al., 2010; Verchot, 2016).
- le RNA silencing (RNAi) anti-viral qui produit des siRNAs à partir du génome viral afin de guider la méthylation des DNAs viraux par un mécanisme apparenté au TGS,

ou la dégradation des RNAs viraux par le mécanisme de PTGS (Muhammad et al., 2019).

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à ce dernier point. La plupart des virus codent pour des protéines appelées Viral Suppressor of RNA Silencing (VSR), capables d'inhiber une ou plusieurs étapes du RNAi. Leurs modes d'action sont multiples, de la séquestration et l'inhibition de la production des siRNAs à la déstabilisation des protéines du RNAi (Csorba et al., 2015). Toutefois, certains VSR peuvent aussi recruter ou activer des suppresseurs endogènes du RNAi.

C'est le cas du VSR AC2 du *Mungbean yellow mosaic virus* (Voinnet et al., 1999; Wang et al., 2003, 2005; Kumar et al., 2015) qui trans-active l'expression de différents gènes chez *N. benthamiana*, dont le suppresseur de silencing *WERNER EXONUCLEASE-LIKE (WEL) 1* ayant une possible activité 3'-5' exonucléase (Trinks et al., 2005). Il a aussi été démontré que la protéine AC2 du *Tomato golden leaf virus* interagit avec la protéine KRYPTONITE et inhibe son activité méthyltransférase H3K9 des histones (Castillo-González et al., 2015).

De même, l'infection de tabac par le *Tomato yellow leaf virus* induit l'expression du gène *CALMODULINE-LIKE 39 (CML39)*, qui pourrait diminuer l'expression du gène *RDR6* (Li et al., 2014). Son expression est également induite lors de l'infection par les géminivirus *Cabbage leaf curl virus* et *Beet curly top virus-A* (Yong Chung et al., 2014). Il a également été montré que l'expression du VSR des Potyvirus HC-Pro et du VSR des géminivirus AC2 suffit à induire l'expression de *CML39* chez *N. tabacum* et *N. benthamiana* (Anandalakshmi et al., 2000; Yong Chung et al., 2014), et un screen double-hybride suggère qu'ils pourraient interagir avec la protéine *CML39* (Yong Chung et al., 2014). Enfin, les plantes qui surexpriment *CML39* sont hypersensibles à l'infection par le *Tomato golden mosaic virus (TGMV)*, avec une augmentation de l'accumulation d'ADN viral, quand les mutants *cml39* sont moins sensibles à l'infection par le TGMV (Anandalakshmi et al., 2000; Li et al., 2014; Yong Chung et al., 2014). Cependant, des résultats contradictoires sont obtenus par transformation de protoplastes et agro-infiltrations de tabac et suggèrent que *CML39* se lie au domaine de liaison aux dsRNAs de la protéine HC-Pro, l'empêche de séquestrer les siRNAs et entraîne sa dégradation (Nakahara et al., 2012).

C'est également le cas du facteur de transcription *RAV2*, nécessaire à l'inhibition de la production des siRNAs primaires par HC-Pro du *Turnip mosaic virus* (TuMV) et P38 du *Turnip crinckle virus* (TCV) (Endres et al 2010). L'activité de HC-Pro nécessite aussi les suppresseurs endogènes de RNAi *FIERY* (*FRY1*) (Gy et al., 2007) et *CML38*, homologue de *CML39* (Endres et al 2010).

Il semble donc que la manipulation des suppresseurs endogènes du RNAi par les virus constitue, en plus de l'activité directe de leur VSR sur le RNAi, une seconde ligne d'attaque contre les défenses de la plante. Dans ce sens, notre équipe a montré que le gène *RNase THREE-LIKE 1* (*RTL1*), dont l'expression est induite chez *Arabidopsis thaliana* lors de l'infection par le CMV, le TCV, TVCV et le TYMV, constitue un nouveau suppresseur endogène de RNAi (Shamandi et al., 2015). *RTL1* clive les dsRNAs endogènes et exogènes, précurseurs des siRNAs, et inhibe le PTGS des transgènes. Toutefois, l'activité de *RTL1* est inhibée par certains VSR qui inhibent le PTGS (2b du CMV, P38 du TCV et HC-Pro du TuMV), mais pas par le VSR P69 du TYMV qui a faible effet sur le PTGS (Shamandi et al., 2015). Ces résultats suggèrent que le rôle de *RTL1* dans les infections virales pourrait être conditionné par l'effet des VSR sur le PTGS.

En effet, il est possible que les VSR capables d'inhiber fortement le PTGS ont besoin d'inhiber aussi *RTL1* pour réussir leur infection. Le corolaire de cette hypothèse est que les virus qui les produisent sont sensibles à son activité. Inversement, les virus à VSR ayant peu d'effet sur le PTGS réussissent certainement à contourner *RTL1* sans avoir besoin de l'inhiber pour réussir leur infection, et les résultats préliminaires obtenus avec le TYMV suggèrent même que le TYMV tire profit de *RTL1* pour réussir à infecter *Arabidopsis* (Shamandi et al., 2015).

Pour aller plus loin, nous envisageons de tester l'effet d'autres VSR sur l'activité de *RTL1*, mais aussi l'effet de BSR (Bacterial Suppressor of RNAi), comme par exemple HopT1 de *Pseudomonas syringae* qui agit sur l'activité d'AGO1 (Navarro et al., 2008). En effet, notre équipe a observé que l'expression de *RTL1* est induite non seulement lors d'une infection virale, mais également par un traitement à la flagelline (Nahid Shamandi, données non publiées du laboratoire). Il serait donc intéressant d'infecter des plantes sauvages, des mutants *rtl1* et des plantes surexprimant *RTL1* avec *P. syringae* afin de voir si l'absence ou la surexpression de *RTL1* module l'infection de *P. syringae*. Des expérimentations avaient été initiées, mais elles ont été interrompues par le confinement.

Le VSR P1 du *Rice yellow mottle virus* (RYMV) est également un candidat intéressant à tester. En effet, il induit une diminution de l'accumulation des 24-nt siRNAs et augmente la propagation du silencing chez le tabac (Voinnet et al., 1999; Lacombe et al., 2010). Il est possible que cet antagoniste soit le fruit de la co-évolution entre le RYMV et sa plante hôte, conduisant à un équilibre entre l'efficacité de l'infection du RYMV et les défenses RNAi de la plante. Or, des études ont montré une corrélation entre la présence des 24-nt siRNAs ou de leurs précurseurs dans la systémie du silencing (Hamilton, 2002; Himber, 2003). Des expériences préliminaires de co-agroinfiltrations de feuilles de tabac réalisées par notre équipe montrent que P1 n'inhibe pas efficacement l'activité de RTL1 (Lucas Sanchez, travaux de M2 interrompus par le confinement). Ces résultats sont très intéressants et devront être confirmés. En effet, comme RTL1 clive les dsRNAs et les siRNAs (Shamandi et al., 2015 ; **Figure 34**), il sera intéressant de déterminer si l'expression de *RTL1* est induite lors de l'infection d'*A. thaliana* par le RYMV, et si RTL1 participe à la perte d'accumulation des 24-nt siRNAs causées par l'infection du RYMV. Des plantes sauvages, des mutants *rtl1* et les plantes surexprimant *RTL1* pourront aussi être infectés avec le RYMV et l'accumulation des siRNAs et grands RNAs viraux sera analysée.

II] Pourquoi certains virus inhibent-ils RTL1 ?

Afin de comprendre les raisons de l'inhibition de RTL1 lors de l'infection par certains virus, nous avons étudié l'interaction Arabidopsis-TuMV puisque : i) l'activité de RTL1 est inhibée par HC-Pro (Shamandi et al., 2015) et ii) il existe des versions sauvages du TuMV et des versions mutées dans HC-Pro (Garcia-ruiz et al., 2010; Garcia-Ruiz et al., 2015).

Dans un premier temps, nous avons observé que les mutants *rtl1* ont des symptômes identiques et accumulent environ autant de grands RNAs du TuMV que les plantes sauvages (WT) infectées (**Figure 8**). De manière étonnante, en première semaine d'infection les plantes surexprimant *RTL1* semblent hypersensibles à l'infection par le TuMV et accumulent plus de grands RNAs viraux par rapport aux plantes WT infectées, mais ce n'est plus le cas en deuxième et troisième semaine d'infection (**Figure 8**). Ces résultats confirment que l'infection par le TuMV inhibe l'activité de RTL1 *in planta*, vraisemblablement par son VSR HC-Pro, puisque les grands RNAs du TuMV s'accumulent chez les plantes surexprimant *RTL1* et que l'absence de RTL1 n'affecte pas l'infection par le TuMV. Ils suggèrent aussi que ce processus prend un certain temps : l'accumulation accrue des grands RNAs viraux en première semaine d'infection peut-être due à une inhibition du PTGS par RTL1 (Shamandi et al., 2015), ce qui favorise l'infection par le TuMV. Dans le sens de cette hypothèse, nous savons que l'induction de l'expression de *RTL1* par une infection virale chez des plantes WT est graduelle (**Figure 31**). On peut supposer que dans les stades précoces de l'infection RTL1 n'est pas défavorable à l'infection par le TuMV car il n'y a pas assez de protéines RTL1 produites et qu'une partie ciblent aussi le PTGS mais qu'à long terme, avec l'augmentation de l'expression de *RTL1*, l'infection par le TuMV requiert aussi l'inhibition de RTL1. Il est aussi possible que l'expression de l'ORF *HC-Pro* du TuMV soit graduelle, et qu'il n'y ait pas assez de protéines HC-Pro produites par le TuMV en première semaine d'infection pour inhiber toutes les protéines produites chez les plantes qui surexpriment *RTL1*. Cette hypothèse est cohérente avec la cinétique d'accumulation de la protéine HC-Pro chez des plantes WT infectées par le TuMV publiée par Hafrén et al., 2018. Les plantes mutées *dcl2dcl4* sont également hypersensibles à l'infection en première semaine d'infection, avec des symptômes plus forts et une accumulation de grands RNAs viraux accrue par rapport aux plantes WT infectées mais pas en deuxième et troisième semaine d'infection (**Figure 8**). C'est étonnant, car on sait que le TuMV est capable

de se propager dans ce fond mutant (*dcl2-1 dcl4-2*) (Garcia-Ruiz et al., 2010) mais cohérent avec l'hypothèse d'une inhibition du PTGS résiduel par RTL1 en première semaine d'infection. De plus, il a aussi été montré que DCL4 et dans une moindre mesure DCL2 participent au PTGS anti-viral au niveau des feuilles inoculées par un TuMV mais pas dans les feuilles caulinaires (Garcia-Ruiz et al., 2010). Il est donc possible qu'un biais d'expérimentation soit à l'origine de nos observations en deuxième et troisième semaines d'infection. En effet, en première semaine d'infection les feuilles disponibles pour les prélèvements sont principalement les feuilles inoculées mécaniquement par le TuMV, qui sont plus affectées par la mutation *dcl2dcl4* que les feuilles disponibles pour les prélèvements en deuxième et troisième semaines d'infection (majoritairement des feuilles systémiques infectées). De plus, les RNAs issus des plantes *dcl2dcl4* après une semaine d'infection semblent légèrement dégradés, ce qui pourrait influencer nos résultats (**Figure 8b**). Toutefois, nous pouvons exclure que l'activité de RTL1 varie aussi entre les feuilles inoculées et les feuilles systémiques puisque les mutants *rtl1* sont globalement aussi sensibles à l'infection que les plantes WT sur toute la durée de la cinétique (**Figure 8**). Ces expériences devront donc être reconduites en prenant en compte ce biais de prélèvement afin de valider définitivement ces résultats.

Dans le sens de l'hypothèse que l'infection par le TuMV requiert l'inhibition de RTL1, nos expériences de micro-greffes ont montré que le TuMV muté dans HC-Pro, peut se répliquer dans le porte greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2dcl3dcl4*, mais n'est pas capable de se propager dans les feuilles des greffons Col et *RTL1* (**Figure 9** et **Figure 10**). Puisque RTL1 inhibe le PTGS (Shamandi et al., 2015), il est tentant de penser que privé d'un VSR fonctionnel, le TuMV est sensible à l'activité de RTL1 et que l'infection du TuMV soit en partie dépendante de l'inhibition de RTL1 par HC-Pro. Cependant cet effet étant aussi observé chez les greffons Col et pourrait être dû à l'activité des DCLs dans les rosettes. Afin de tester cette hypothèse, nous avons validé préliminairement que le TuMV muté dans HC-Pro est capable de se propager dans les mutants *dcl2-2 dcl4-2* et *dcl2-Kas dcl4-5* greffés sur le porte greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2dcl3dcl4* (**Figure 11**). Nous avons ensuite croisé ces mutants avec les lignées *RTL1* et généré des plantes *RTL1 dcl2dcl4*. Nous testerons si le TuMV muté dans HC-Pro produit par le porte-greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2dcl3dcl4* est capable ou non de se propager dans les feuilles du greffon *RTL1 dcl2dcl4*.

Si la sensibilité à RTL1 du TuMV muté dans HC-Pro est confirmée, nous chercherons si la protéine RTL1 a accès aux dsRNAs de la réplication du TuMV. Chez les Potyvirus, les

complexes de réplication virale (VRC) se forment au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique avant d'être relocalisés au niveau des chloroplastes, où ils provoquent leur agrégation et forment des structures tubulaires entre les chloroplastes (Mäkinen and Hafrén, 2014). Nous avons observé que, chez le tabac, le signal de la protéine RTL1 fusionnée à la GFP ne colocalise pas avec l'auto-fluorescence des chloroplastes mais les entoure (**Figure 35**). Toutefois, ces expériences devront être refaites en conditions d'infection par le TuMV. Une construction *6K2-RFP*, marqueur des VRC (Hafrén et al., 2018), pourra être aussi co-agroinfiltrée en feuilles de tabac avec la construction *RTL1-GFP* afin de déterminer que RTL1 peut cliver des dsRNAs issus de la réplication du TuMV.

Il est également important de noter que les Potyvirus possèdent un second VSR, la protéine VIRAL GENOME-LINKED PROTEIN (VPg), qui pourrait moduler l'activité de RTL1. De par sa structure désordonnée et flexible, VPg interagit avec différentes protéines chez *Arabidopsis thaliana*, dont SGS3, PABP-2 et le facteur d'initiation de la traduction eIF4 (Beauchemin and Laliberté, 2007; Beauchemin et al., 2007; Rajamäki et al., 2014). De plus, il a été démontré que la protéine VPg du TuMV interagit avec et entraîne la dégradation des protéines SGS3 et RDR6 par le protéasome 20S et la voie de l'autophagie (Cheng and Wang, 2017). Il est donc possible que VPg puisse également moduler l'activité de RTL1 et/ou que la délétion du VSR du TuMV ait un effet sur l'activité de VPg.

Cependant, la construction *OE-TuMV-AS9-GFP* induit efficacement l'infection du TuMV en fond *dcl2dcl3dcl4* (Garcia-ruiz et al., 2010; **Figure 9** et **Figure 10**). Si une protéine HC-Pro fonctionnelle était nécessaire à l'activité de VPg, le développement du virus aurait été altéré, car elle est essentielle à de multiples étapes de la vie du virus (Mäkinen and Hafrén, 2014). Afin de tester si VPg inhibe l'activité de RTL1, nous analyserons si l'activité de RTL1 sur les siRNAs du TuMV issus du porte greffe *OE-TuMV-AS9-GFP dcl2dcl3dcl4*, où VPg est vraisemblablement fonctionnelle, est inhibée ou non dans le greffon *RTL1*.

III] Pourquoi certains virus n'inhibent-ils pas RTL1, et comment réussissent-ils leur infection ?

Les VSR peuvent inhiber le PTGS en séquestrant les dsRNAs ou les siRNAs, ou en inhibant les acteurs du (DCLs ou AGOs) qui participent de façon redondante au S-PTGS et à l'IR-PTGS (Csorba et al., 2015). Les VSR peuvent également inhiber spécifiquement le S-PTGS en inhibant les acteurs de l'amplification du PTGS (RDR6, SGS3, SDE5) qui ne sont pas indispensables à l'IR-PTGS.

Certains VSR peuvent donc avoir un effet est limité sur le PTGS. C'est le cas du *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), dont la protéine de mouvement P69 provoque une sur-accumulation des miRNAs, vraisemblablement en augmentant l'expression de *DCL1*, mais n'est pas capable d'inhiber l'IR-PTGS et a un faible effet sur le S-PTGS du transgène *p35S:GUS* chez *Arabidopsis* (Chen et al., 2004). Contrairement au virus TCV qui provoque des symptômes forts, du fait de l'existence d'un VSR capable d'inhiber S-PTGS, IR-PTGS et PTGS (**Tableau 1**), le TYMV induit des symptômes limités, suggérant que le PTGS limite le TYMV (**Figure 12**). En accord avec cette hypothèse, les mutants *drb4* et *dcl4* sont hypersensibles à l'infection par le TYMV et montrent des symptômes aggravés et une accumulation accrue de la protéine CP par rapport aux plantes sauvages infectées (Jakubiec et al., 2012). L'expression de *DRB4* est également augmentée lors de l'infection par le TYMV et la protéine DRB4 est relocalisée du noyau au cytoplasme, probablement au niveau des siRNA-bodies (Jakubiec et al., 2012). Cependant, les acteurs du PTGS dirigé contre le TYMV n'ont pas tous été caractérisés. Etant donné que P69 n'a pas d'effet sur l'IR-PTGS, cela suggère qu'il agit en amont de la production des dsRNAs (Chen et al., 2004). De plus, P69 n'a pas d'effet sur l'activité de RTL1 (Shamandi et al., 2015). Or, les résultats précédemment discutés montrent que le TuMV, privé de son VSR, semble sensible à l'action de RTL1. Cela ne semble pas être le cas du TYMV.

Le système *Arabidopsis*-TYMV constitue donc un système idéal pour l'étude de l'interaction entre RTL1 et le PTGS dans les interactions entre plantes et virus dont le VSR n'inhibe pas (ou très peu) le PTGS. Dans un premier temps, nous avons donc cherché à caractériser les acteurs du PTGS impliqués dans la défense anti-TYMV de la plante.

1) AGO1, AGO2 et DCL4 participent au PTGS anti-TYMV

AGO1 et AGO2 ont une action redondante dans la défense d'*A. thaliana* contre le CMV et le TuMV (Wang et al., 2011; Garcia-Ruiz et al., 2015). Cette redondance est également observée dans la défense d'*A. thaliana* contre le TYMV. En effet, nous avons observé que les mutants *ago1* et *ago2* ainsi que le double mutant *ago1ago2* sont hypersensibles à l'infection par le TYMV, avec des symptômes plus forts (**Figure 13**), une accumulation plus forte du TYMV gRNA (**Figure 15**) et une accumulation plus faible des siRNAs issus de la CP du TYMV (**Figure 14a**) par rapport aux plantes sauvages infectées. Nous avons également observé chez le mutant *ago2* ainsi que chez le double mutant *ago1ago2* une accumulation plus forte des RNAs issus de la CP par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 14bc**). Ces résultats montrent que AGO2 a un rôle plus important que AGO1 dans le PTGS anti-TYMV.

AGO1 pourrait avoir une affinité inférieure à AGO2 pour les siRNAs issus du TYMV produits par les DCLs. En effet, le nucléotide en 5' du duplex de siRNAs est déterminant pour le chargement sur les AGOs, avec préférentiellement un 5'U pour AGO1 et 5'A pour AGO2 (Mi et al., 2008; Fang and Qi, 2016). En accord avec cette hypothèse, l'accumulation des RNAs du TYMV chez le mutant *ago1* infecté par le TYMV est diminuée par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 14bc**). Un séquençage des siRNAs associés à AGO1 et AGO2 chez des plantes sauvages infectées par le TYMV permettrait de le déterminer. Le TYMV pourrait aussi inhiber partiellement le chargement des siRNAs mais pas des miRNAs sur AGO1. En effet, les plantes sauvages infectées par le TYMV présentent des feuilles incurvées vers le bas (**Figure 13**) semblables aux mutants déficients pour la production de trans acting-siRNAs (ta-siRNAs) qui ne peuvent plus réguler l'expression de gènes *AUXIN RESPONSIVE FACTOR ARF3* et *ARF4* (Yoshikawa, 2013). L'analyse du niveau d'expression des facteurs de transcription *ARF3* et *ARF4*, cibles des ta-siRNAs *TAS3*, pourra être comparée chez des plantes sauvages mock ou infectées par le TYMV.

De plus, l'allèle *ago1-27* testé lors de nos expériences montre une hyper-sensibilité au CMV et aggrave la sensibilité du mutant *ago2* au CMV et au TuMV (Morel et al., 2002; Wang et al., 2011a; Garcia-Ruiz et al., 2015). Il est toutefois possible que cet allèle hypomorphe conserve suffisamment d'activité pour le RNAi dirigé contre le TYMV. Un allèle plus fort pourra être utilisé pour le confirmer.

DCL2 et DCL4 ont également une action redondante dans la défense d'*A. thaliana* contre le CMV, le TCV et le TuMV (Bouché et al., 2006; Deleris et al., 2006; Garcia-Ruiz et al., 2010; Wang et al., 2011). Nos résultats montrent que ce n'est pas le cas lors de l'infection d'*A. thaliana* par le TYMV. Nous avons observé que le mutant *dcl4* ainsi que le double mutant *dcl2dcl4* sont hypersensibles à l'infection par le TYMV, avec des symptômes plus forts (**Figure 13**), une accumulation plus forte du TYMV gRNA (**Figure 15**), une accumulation plus faible des siRNAs issus de la CP du TYMV et une accumulation plus forte des RNAs issus de la CP (**Figure 14**) par rapport aux plantes sauvages infectées. Ces résultats confirment l'implication de DCL4 dans le PTGS anti-TYMV (Jakubiec et al., 2012). En revanche, le mutant *dcl2* a la même sensibilité que les plantes sauvages à l'infection par le TYMV (**Figure 13**, **Figure 14** et **Figure 15**). Ces résultats sont cohérents avec le séquençage des petits RNAs chez des plantes d'*A. thaliana* infectées par le TYMV, qui montre exclusivement des petits RNAs de 21-nt (Jakubiec et al., 2012).

Il semble donc que DCL2 ne soit pas impliquée dans le PTGS anti-TYMV. On peut imaginer que DCL2 ne peut pas accéder aux dsRNAs du TYMV car une compartimentation pourrait le rendre accessible uniquement à DCL4, ou que DCL2 peut ne pas avoir d'affinité pour les dsRNAs du TYMV produit par la RdRP virale. Un séquençage des siRNAs produits lors de l'infection du mutant *dcl4* par le TYMV permettrait de déterminer si DCL2 est incapable de cliver les dsRNAs du TYMV ou si les siRNAs viraux de 22-nt produits par DCL2 sont incapables d'être chargés sur les AGOs lors de l'infection par le TYMV.

Enfin, RDR1 et RDR6 ont une action redondante dans la défense d'*A. thaliana* contre le CMV et le TuMV (Wang et al., 2010; Garcia-Ruiz et al., 2010). Les simples mutants *rdr1* et *rdr6* ainsi que le double mutant *rdr1rdr6* ont la même sensibilité que les plantes sauvages à l'infection par le TYMV (**Figure 13**, **Figure 14** et **Figure 15**). L'amplification du PTGS via les RDRs est basée sur la synthèse de dsRNAs lors de la formation d'un complexe RISC composé d'AGO1 et d'un siRNA de 22-nt (Mourrain et al., 2000; Hernandez-Pinzon et al., 2007; Wang et al., 2010; Vazquez and Hohn, 2013; Wang et al., 2011). Étant donné que DCL2 (qui produit les siRNAs de 22-nt) ne semble pas participer au PTGS anti-TYMV et que AGO1 n'est pas majoritairement impliquée, il ne peut donc pas y avoir production majeure de siRNAs secondaires et d'amplification forte de la réponse anti-virale. Il est donc logique que les mutants RDR-déficients ne montrent pas d'hypersensibilité au TYMV si DCL2 ne participe pas au PTGS anti-TYMV. Pour aller plus loin, le triple mutant *rdr1rdr2rdr6* devra être infecté par le

TYMV afin de tester une éventuelle implication de RDR2 lorsque RDR1 et RDR6 sont mutées puisque l'analyse du triple mutant *rdr1rdr2rdr6* a montré qu'il était plus sensible à l'infection par le TuMV que le double mutant *rdr1rdr6* (Garcia-Ruiz et al., 2010).

Etant donné que : i) DCL2 et RDR6 sont nécessaires à l'amplification du S-PTGS mais ne sont pas nécessaires à l'IR-PTGS, ii) le VSR du TYMV P69 a un faible effet sur le S-PTGS et n'a pas d'effet sur l'IR-PTGS (Chen et al., 2004), il est donc possible que l'activité de DCL2 et/ou de RDR6 (ou d'un autre acteur spécifique du S-PTGS) soit inhibé par P69. Plusieurs publications ayant montré que les résultats obtenus en confrontant plusieurs transgènes exprimés sous le contrôle du promoteur 35S n'étaient pas toujours fiables (Daxinger et al., 2008; Mlotshwa et al., 2010), nous avons repris les analyses de Chen et al., 2004 en conditions physiologiques, c'est à dire dans des plantes infectées par des virus sauvages et non pas en exprimant des protéines virales sous le contrôle du promoteur 35S. Pour aller plus loin, nous avons donc testé l'effet de l'infection par le TYMV sur des lignées portant un transgène *p35S:GUS* silencé par S-PTGS ou IR-PTGS.

2) P69 cible l'étape d'amplification RDR-dépendante du S-PTGS

Nos résultats confirment que le TYMV a peu ou pas d'effet sur le PTGS (**Figure 18**). En effet, alors que le TCV inhibe l'IR-PTGS du transgène *p35S:GUS* chez la lignée *6b4/306* et le S-PTGS chez la lignée *L1*, le TYMV n'inhibe pas l'IR-PTGS chez la lignée *6b4/306* et a un effet marginal sur le S-PTGS spontané de la lignée *L1* en fond sauvage ou déficient pour le RQC (**Figure 18** et **Figure 20**). Il semble que le RQC ne soit pas impliqué dans la défense anti-TYMV de la plante et que le TYMV peine à inhiber des systèmes forts de PTGS.

De plus, le TYMV inhibe le S-PTGS partiel de la lignée *Hc1* (**Figure 21**) et le S-PTGS induit par une mutation du RQC chez la lignée *6b4* (**Figure 18** et **Figure 19**). Ces résultats montrent que le TYMV inhibe le S-PTGS de lignées faibles, ce qui est cohérent avec l'effet faible de P69 sur le S-PTGS de la lignée *L1* précédemment publié (Chen et al., 2004). De plus, l'expression de la construction *p35S:P69* inhibe fortement le S-PTGS induit par une mutation du RQC chez la lignée *6b4* mais pas l'IR-PTGS chez la lignée *6b4/306* (**Figure 22**), confirmant que l'effet du TYMV sur le S-PTGS est dû à son VSR P69.

De manière étonnante, nous avons observé une activité plus forte de la protéine GUS chez la lignée *6b4* transformée avec la construction *p35S:P69* par rapport aux plantes non-transformées (**Figure 22**). Puisque cet effet n'est pas observé chez les plantes *6b4* infectées par le TYMV sauvage (**Figure 18**, **Figure 19** et **Figure 20**), il semble que le niveau d'expression de *P69* conditionne la force de son inhibition du S-PTGS induit par une mutation du RQC chez *6b4*. Cependant, il n'y a pas de S-PTGS dirigé contre le transgène *p35S:GUS* chez *6b4* (Parent et al., 2015b). Ainsi, l'expression de *P69* pourrait également avoir un effet direct ou indirect sur l'expression, la traduction et/ou l'activité du transgène *p35S:GUS*. Cette hypothèse est appuyée par le fait que *P69* induit une déméthylation du transgène *p35S:GUS* et une augmentation de l'accumulation des mRNAs *GUS* chez *L1* par rapport aux plantes non-transformées (Chen et al., 2004). Pour aller plus loin, des plantes *pUBQ10:GUS*, *6b4/rdr6* et *L1/rdr6*, où le S-PTGS ne se produit pas ou est inhibé, ont été transformées avec la construction *p35S:P69* et l'activité du transgène sera analysée.

L'absence d'effet du TYMV et du transgène *p35S:P69* sur l'IR-PTGS suggère que l'étape d'amplification du PTGS pourrait être la cible du TYMV (**Figure 18** et **Figure 22**). Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé l'accumulation de divers ta-siRNAs chez les plantes exprimant *p35S:P69*. En effet, leur production implique RDR6, SDE5 et SGS3, qui sont également requis pour le S-PTGS mais pas pour l'IR-PTGS (Yoshikawa, 2013). Chez les plantes exprimant *p35S:P69*, nous avons observé que l'accumulation des *TAS1* et *TAS2* siRNAs est réduite et celle des *TAS3* siRNAs est supprimée par rapport aux plantes non-transformées, alors que l'accumulation des endoIR-siRNAs d'*IR71* est inchangée (**Figure 23b**). Ces résultats appuient l'hypothèse que *P69* cible l'étape d'amplification du PTGS mais pas les DCLs nécessaires à la production d'*IR71* et aux précurseurs des *TAS* siRNAs (Henderson et al., 2006; Yoshikawa, 2013; Dunoyer et al., 2010).

Nous avons également testé l'effet de l'expression de *P69* sur l'IR-PTGS de la lignée *JAP3*, où un transgène en IR produit un dsRNA du gène *PDS* sous le contrôle du promoteur *SUC2*, dont l'expression est spécifique aux cellules compagnes du phloème (**Figure 24a**). Les siRNAs

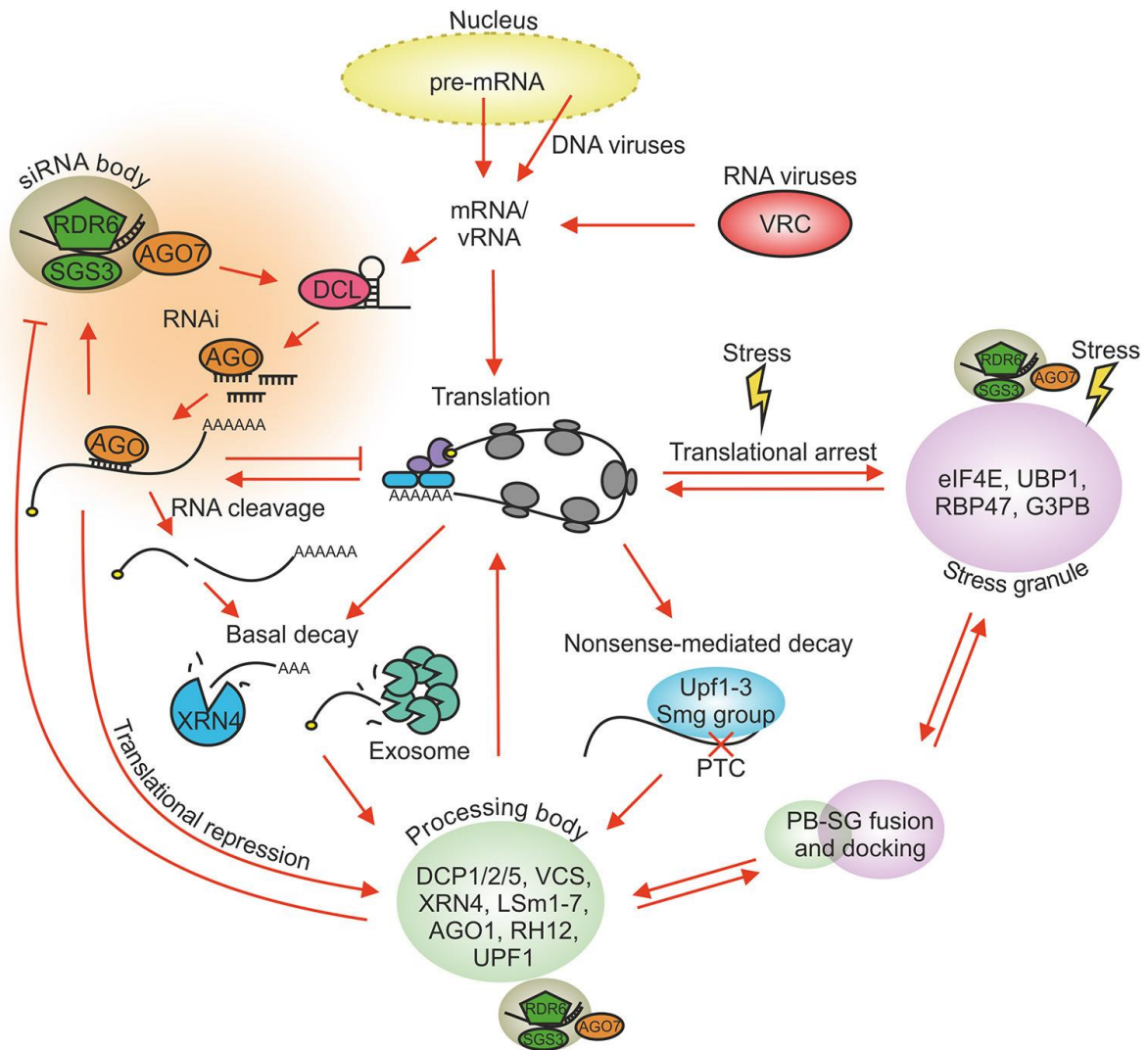


Figure 62 : "Major RNA regulatory processes in plant cells" de la review Mäkinen et al 2017

Légende de l'article : Les mRNAs de l'hôte coiffés en 5' et polyadénillés en 3' sont recrutés par les ribosomes pour leur traduction. Les RNAs viraux (vRNAs) ont évolué de manière à réguler la machinerie traductionnelle de l'hôte. De nombreux stress cellulaires induisent la formation des granules de stress et augmentent le nombre et la taille des Processing-bodies (PB). Les complexes de pré-initiation de traduction sont stoppés et s'agrègent dans les granules de stress (SG) afin d'être relâchés quand les conditions le permettent. Les RNAs aberrants sans coiffe ou sans queue polyA sont ciblés afin d'être dégradés alors que les RNAs transcriptionnellement inactifs peuvent être libérés des PB afin d'être traduits. Les PB et SG peuvent être adjacents, fusionnés et échanger du matériel. Les vRNAs et les mRNAs ciblés par le RNAi et par les mécanismes de contrôle des RNAs aberrants (NMD) sont dégradés. Le RNAi agit au sein des siRNA-bodies et les NMD dans les PB. Les SB peuvent s'associer avec les PB et les SG lors d'un stress. Les principaux acteurs des différents granules sont représentés.

produits ciblent le gène *PDS* endogène de la plante et se propagent dans les tissus périphériques du mésophylle. Il a été montré que le silencing du gène *PDS* dépend de DCL4 mais pas de DCL2, RDR6 et SGS3 (Himber et al., 2003; Smith et al., 2007; Dunoyer et al., 2007 ; données non publiées du laboratoire). Nous n'avons pas observé de différences dans l'accumulation des siRNAs *PDS* de 21-nt dans les plantes *p35S:P69/JAP3* par rapport aux plantes *JAP3* (**Figure 24b**). Ces résultats appuient à nouveau l'hypothèse que P69 cible l'étape d'amplification du PTGS, et plus précisément RDR6 ou d'autres facteurs de cette étape comme SDE5 ou SGS3.

L'inhibition du S-PTGS par P69 pourrait s'expliquer par une inhibition de l'activité ou une délocalisation d'un ou plusieurs facteurs impliqués dans l'étape d'amplification du S-PTGS. On sait que RDR6 et SGS3 s'accumulent au niveau de structures cytoplasmiques appelées siRNA-bodies (SB), où le PTGS a lieu (Glick et al., 2008; Elmayan et al., 2009; Kumakura et al., 2009). Il a été montré que les SB sont adjacents aux Processing-bodies (PB), structures cytoplasmiques où le RQC a lieu (**Figure 62** ; Jouannet et al., 2012; Moreno et al., 2013; Martinez de Alba et al., 2015). Il est vraisemblable que lorsqu'ils sont en trop grande quantité, les RNAs aberrants saturent les capacités du RQC et sont redirigés vers les siRNA-bodies afin d'être traités par le PTGS (Elvira-Matelot et al., 2017). De plus, en condition de stress chaud, on observe la formation de granules de stress (SG) cytoplasmiques qui co-localisent avec les SB (**Figure 62** ; Jouannet et al., 2012). Les SG sont formés de complexes ribonucléoprotéiques où les RNAs non-traduits sont stockés et dont la protéine PABP-2 (PAB2) est un marqueur (Weber et al., 2008).

Il a été montré que l'infection par différents virus affecte la formation et l'activité de ces bodies (Mäkinen et al., 2017 ; **Figure 62**). Lors de l'infection de la plante *N. benthamiana* par le Potexvirus *Potato virus A*, la protéine virale VPg limite la formation des SG et promeut la traduction des RNAs viraux (Hafrén et al., 2015). La protéine VPg du Potyvirus TuMV interagit aussi avec RDR6 et SGS3 des SB et entraîne leur dégradation par le protéasome 20S (Cheng and Wang, 2017). De même, le VSR P6 du Rhabdovirus *Rice yellow stunt virus* inhibe l'activité de RDR6 et limite la production des siRNAs issus du génome viral chez *Arabidopsis thaliana* (Guo and Lu, 2013). Les PB peuvent également être ciblés par les VSR : c'est le cas de la protéine P19 du Potexvirus *Potato virus X* qui limite la formation des PB lors de l'infection d'*Arabidopsis thaliana* (Meteignier et al., 2016). L'interaction entre le VSR P69 du TYMV et les différents bodies n'est pas connue mais l'inhibition du S-PTGS par P69 via les facteurs d'amplification du PTGS suggère une co-localisation entre P69 et les SB et/ou les SG.

Afin de tester la co-localisation entre P69 et les siRNA-bodies, nous avons d'abord comparé les signaux GFP et RFP avant et après un stress chaud dans les racines de plantes d'*A. thaliana* portant le transgène *pUBQ10:P69-GFP*, *pUBQ10:GFP-P69* ou *pPAB2:PAB2-RFP* (**Figure 26**). Contrairement à nos résultats d'agro-infiltration de feuilles de *N.benthamiana* par les constructions *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* (**Figure 25**) et à des résultats obtenus par transformation de protoplastes précédemment publiés (Ni et al., 2017), nous n'avons pas observé systématiquement de signal nucléaire pour P69-GFP et GFP-P69 avant ou après stress dans les racines des plantes *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* (**Figure 26** et **Figure 28**). Cette différence pourrait être due au système et/ou à la technique utilisée. L'agro-infiltration de feuilles d'*A. thaliana* avec les constructions *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* et l'analyse du signal GFP par microscopie confocale permettra de trancher.

En revanche, nous avons observé avant stress un signal diffus cytoplasmique et après stress la formation de *foci* pour les deux constructions *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* ainsi que pour la construction *pPAB2:PAB2-RFP* (**Figure 26**), pouvant correspondre à des SG dont PAB2 est un marqueur (Weber et al., 2008), à des SB qui interagissent avec les SG en condition de stress chaud et dont SGS3 est un marqueur (Jouannet et al., 2012b) ou à des PB qui se forment également en condition de stress chaud et dont XRN4 est un marqueur (Weber et al., 2008). Dans ce sens, les *foci* définis par *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* colocalisent avec les *foci* définis par *pPAB2:PAB2-RFP* en condition de stress chaud dans les croisements entre les plantes d'*Arabidopsis thaliana* *pUBQ10:P69-GFP* ou *pUBQ10:GFP-P69* avec les plantes *pPAB2:PAB2-RFP* (**Figure 27**). Afin de vérifier la nature des *foci* formés après stress par *P69-GFP*, nous avons également réalisé des croisements entre les plantes d'*Arabidopsis thaliana* *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* et une lignée *p35S:SGS3-mCherry*. L'analyse des signaux GFP et mCherry après un stress chaud dans les racines des croisements montre une co-localisation entre les *foci* définis par *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:GFP-P69* avec les *foci* définis par *p35S:SGS3-mCherry* (**Figure 29**). Ainsi, P69 pourrait interagir avec les bodies impliquant les facteurs d'amplification du PTGS et affecter leur activité. Cependant, un screen-double hybride entre P69 et une banque de cDNA d'*A. thaliana* a permis d'identifier 15 interactants dont ni SGS3 ni RDR6 ne font partie (Ni et al., 2017). Cette technique pouvant être faillible, un pool-down assay dans les croisements *P69-GFP* x *SGS3-mCherry* et *GFP-P69* x *SGS3-mCherry* ou des expériences Bi-FC pourront être réalisés.

3) RTL1 favorise l'infection par le TYMV

Lors d'une infection par le TYMV, l'inhibition du S-PTGS n'est que partielle (**Figure 18**, **Figure 19** et **Figure 20**), et ne suffit pas à expliquer le succès de l'infection. On peut donc imaginer que l'activation du suppresseur endogène de RNAi RTL1 lors de l'infection par le TYMV (Shamandi et al., 2015) vient compléter l'inhibition partielle de l'amplification du S-PTGS par le VSR du TYMV P69.

En cohérence avec cette hypothèse, nous avons montré que deux mutants *rtl1* sont moins sensibles à l'infection du TYMV que les plantes sauvages infectées. En effet, ils accumulent plus de siRNAs issus du TYMV (**Figure 14a**), moins de grands RNAs viraux (**Figure 14bc**), et l'accumulation du TYMV gRNA est diminuée (**Figure 15**) par rapport aux plantes sauvages infectées, suggérant un PTGS plus efficace contre le TYMV en fond *rtl1* qu'en fond WT. Une cinétique d'infection du TYMV réalisée avec le mutant *rtl1-sail* montre d'ailleurs un ralentissement de l'accumulation des grands RNAs viraux par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 32**). Cet effet n'est vraisemblablement pas dû à une redondance avec les autres facteurs du PTGS en absence de RTL1 lors d'une infection virale, puisque nous avons montré que le niveau d'expression des gènes *RTL2*, *AGO1*, *AGO2*, *DCL2*, *DCL4*, *RDR1* et *RDR6* est le même chez les mutants *rtl1* et les plantes sauvages infectées avec le TCV (**Figure 33**).

La baisse de sensibilité des mutants *rtl1* à l'infection du TYMV est à première vue surprenante car RTL1 pourrait potentiellement cibler les dsRNAs issus de la réplication du TYMV. Il semble donc que le TYMV se réplique à l'abri de l'action de RTL1. On sait qu'il se réplique dans des invaginations de la membrane externe des chloroplastes (Ushiyama and Matthews, 1970; Hatta et al., 1973; Prod'homme et al., 2003), nous avons donc analysé la localisation d'une protéine RTL1 taggée avec la GFP en condition d'infection et de stress chaud.

Grâce à l'agroinfiltration des constructions *pUBQ10:RTL1-GFP* et *p35S:RTL1-GFP* dans des feuilles de tabac, nous avons confirmé que RTL1 a une localisation cytoplasmique et nucléoplasmique (Shamandi et al., 2015 ; **Figure 37bc**). Qui plus est, nous avons observé que RTL1 ne colocalisent jamais avec le signal d'auto-fluorescence des chloroplastes (**Figure 35bc**).

De plus, dans les racines de plantules d'*A. thaliana* sauvages agroinfiltrées avec la construction *pUBQ10:RTL1-GFP*, nous avons observé un signal diffus cytoplasmique *RTL1-GFP* avant stress et la formation de granules *RTL1-GFP* après stress chaud (**Figure 36**). Nous n'avons pas observé de signal nucléaire pour *RTL1-GFP*, contrairement à la localisation cytoplasmique et nucléoplasmique de RTL1 montrée par immunomarquage et par agroinfiltration de feuilles de tabac (Shamandi et al., 2015 ; **Figure 35**). Cette différence résulte peut-être d'un biais technique, et nous générons actuellement des lignées stables *pUBQ10:RTL1-GFP* pour s'en assurer. Afin de déterminer la nature des *foci RTL1-GFP* formés après stress chaud, nous avons co-agroinfiltré les constructions *pUBQ10:RTL1-GFP* et *p35S:SGS3-mCherry* dans des plantules d'*A. thaliana* sauvage et analysé les signaux GFP et mCherry dans les racines. Nous avons montré que les granules *RTL1-GFP* colocalisent avec les *foci SGS3-mCherry* formés après stress dans les plantules co-agroinfiltrées (**Figure 36**) et pourraient correspondre à des siRNA-bodies.

Nos résultats suggèrent donc que lors de l'infection RTL1 est relocalisée au niveau des siRNA-bodies. Ils suggèrent également que le TYMV est à l'abri de l'action de RTL1 car RTL1 n'est pas localisée dans les chloroplastes, où le TYMV se réplique. Pour compléter ces résultats, nous générons actuellement des transformants stables d'*Arabidopsis* portant les constructions *p35S:RTL1-GFP*, *pUBQ10:RTL1-GFP*, *p35S:RTL1-GFP/p35S:SGS3-mCherry* et *pUBQ10:RTL1-GFP/p35S:SGS3-mCherry* afin de confirmer que RTL1 colocalise avec les SB lors d'une infection avec le TYMV comme c'est le cas lors d'un stress chaud. Il sera aussi nécessaire de transformer les plantes *RTL1-GFP* avec une construction *140K-RFP* afin vérifier si RTL1 colocalise avec les facteurs de réplication virale du TYMV dans les chloroplastes des feuilles (Moriceau et al., 2017).

Comme P69 inhibe partiellement l'étape d'amplification du PTGS anti-viral lors d'une infection (**Figure 18**, **Figure 19** et **Figure 20**), on peut aussi imaginer que RTL1 complète l'action anti-virale faible du VSR P69 en ciblant le PTGS dans les siRNA-bodies. Cette stratégie ressemble à celle du Potyvirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* qui exprime un VSR P22 (Kreuze et al., 2005) ainsi qu'une RNase de type III de structure similaire à RTL1 capable de cliver des dsRNAs et siRNAs et qui agit en complément de P22 (Kreuze et al., 2005; Cuellar et al., 2009). Nous avons donc cherché à savoir si RTL1 pouvait directement cliver les siRNAs en plus des longs dsRNAs. Nos expériences de greffes ont montré sans ambiguïté que RTL1 pouvait cliver les siRNAs (**Figure 34**). RTL1 peut donc potentiellement cibler les dsRNAs et

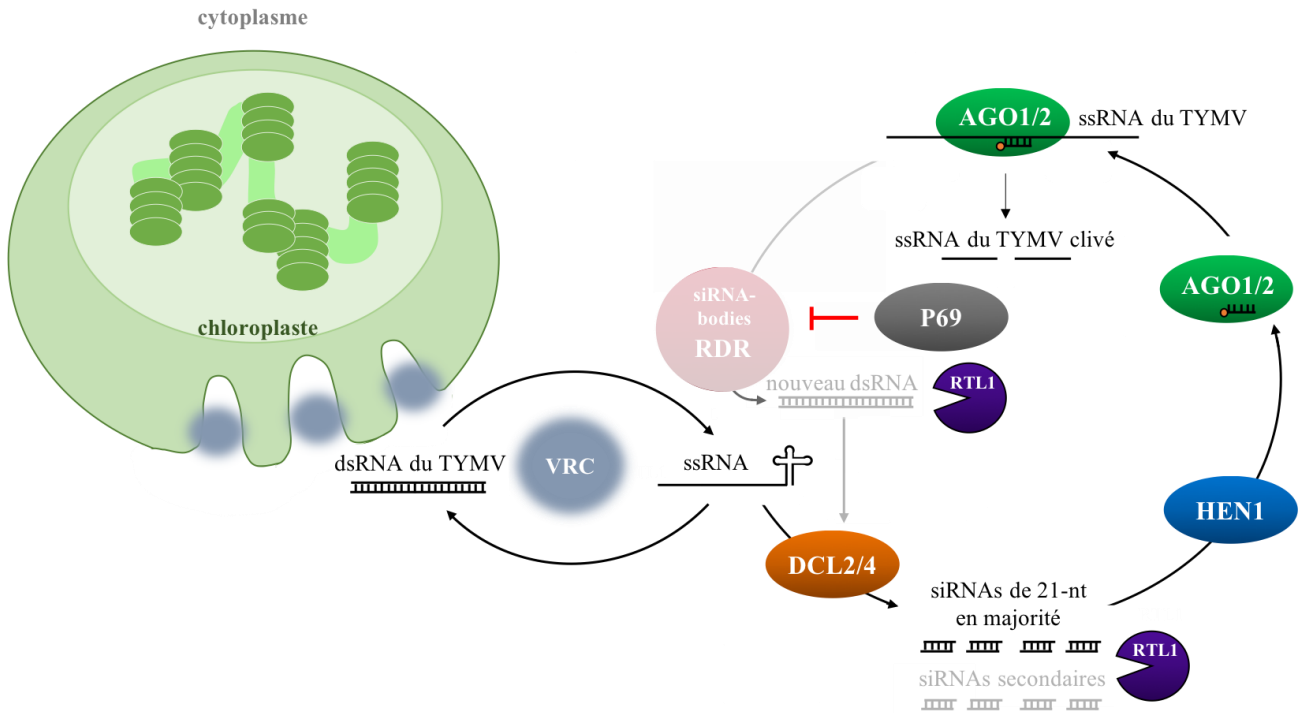


Figure 63 : Modèle du RNAi dirigé contre le TYMV

L'infection par le TYMV entraîne la formation d'invaginations dans la membrane externe des chloroplastes où les complexes de réplication viraux (VRC) se forment. Les RNAs simple brins (ssRNAs) de polarité positive du TYMV y sont transformés en RNAs double brins (dsRNAs) par la RNA-dépendant RNA POLYMERASE (RdRP) virale, et les ssRNAs de polarité négative servent de matrice pour reproduire des ssRNAs de polarité positive. Les dsRNAs intermédiaires de la réplication virale ou des structures secondaires tel que la structure tRNA-like en 3' du génome du TYMV peuvent être clivés en duplex 21-nt siRNAs par DCL4. Les siRNAs sont pris en charge par AGO1 ou AGO2, et le complexe siRNAs/AGO cible les ssRNAs viraux et entraîne leur clivage. Le clivage des dsRNAs par DCL2 peut théoriquement produire des siRNAs de 22-nt, et le complexe 22-nt siRNA/AGO1 entraine le recrutement de RDR6 et SGS3 et induire l'amplification du PTGS dans les siRNA-bodies ainsi que la production de siRNAs secondaires. Toutefois, cette étape est inhibée par le VSR P69 codé par le TYMV. De plus, le gène cellulaire *RTL1* est induit lors de l'infection virale, et la protéine RTL1 clive les dsRNAs produits par RDR6 dans les siRNA-bodies ainsi que les 21-nt siRNAs produits par DCL4, limitant encore plus l'efficacité du PTGS.

les siRNAs du PTGS induit en réponse à l'infection par le TYMV. L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer le modèle ci-contre du RNAi dirigé contre le TYMV (**Figure 63**).

Cependant, comme des siRNAs issus du TYMV s'accumulent dans les plantes sauvages infectées (**Figure 14**), l'action conjointe de RTL1 et P69 n'est vraisemblablement pas suffisante pour totalement inhiber le PTGS. On peut supposer que le niveau d'accumulation de ces deux protéines est trop faible lors de l'interaction Arabidopsis-TYMV. En accord avec cette hypothèse, seules les plantes *p35S:RTL1* n'accumulent plus du tout de siRNAs (Shamandi et al., 2015) et seules les plantes *p35S:P69* montrent un effet fort sur le S-PTGS des transgènes (**Figure 22**). De plus, les plantes qui surexpriment *RTL1* ou *P69* ont un développement très affecté (**Figure 26a** ; Shamandi et al., 2015; Ni et al., 2017). Une inhibition totale du PTGS pourrait donc désavantager le TYMV en entraînant la mort prématurée de sa plante hôte et en limitant par conséquent sa propagation par les graines ou par contact. Afin de tester cette hypothèse, une analyse sur différentes accessions d'*Arabidopsis thaliana*, dans lesquelles le niveau d'expression de *RTL1* diffère, pourra être menée afin d'étudier une possible corrélation entre l'activité de RTL1 dans ces accessions et leur sensibilité à l'infection du TYMV.

4) Le rôle de RTL1 dans l'interaction Arabidopsis-TYMV est-il généralisable ?

Afin de vérifier si la relation entre RTL1 et le TYMV est unique ou généralisable à d'autres virus, nous avons commencé à étudier le rôle de RTL1 dans l'infection par le *Tobacco rattle virus* (TRV) et le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) qui comme le TYMV induisent des symptômes faibles chez Arabidopsis. Dans un premier temps, nous avons confirmé que les infections du TRV et du CaMV ne suppriment pas le S-PTGS de la lignée *LI*, le S-PTGS induit par déficience du RQC de la lignée *6b4/xrn4* et l'IR-PTGS de la lignée *6b4/306* (**Figure 37**). Ces résultats confirment que le VSR 16K du TRV et le VSR P6 du CaMV ont très peu d'effet sur le PTGS (Martín-Hernández and Baulcombe, 2008; Haas et al., 2008). Il serait intéressant de transformer ces lignées transgéniques avec les constructions *p35S:16K* et *p35S:P6* afin de tester si l'expression stable des VSR du TRV et du CaMV conditionne leur effet sur le PTGS comme nous l'avons observé pour *P69* (**Figure 22**).

Pour aller plus loin, nous avons donc infecté des plantes sauvages, des mutants *rtl1* et des plantes surexprimant *RTL1* avec le TRV et le CaMV. Nous avons observé que les mutants *rtl1*

infectés avec le TRV ou le CaMV développent des symptômes similaires à ceux des plantes WT infectées (**Figure 38**), comme nous l'avons observé pour les mutants *rtl1* infectés avec le TYMV par rapport aux plantes sauvages infectées (**Figure 13**). De plus, les plantes surexprimant *RTL1* infectées avec le TRV présentent des symptômes aggravés par rapport aux plantes WT infectées, et certaines plantes surexprimant *RTL1* infectées avec le CaMV présentent aussi des symptômes aggravés par rapport aux plantes WT infectées (**Figure 38**). Or les plantes qui surexpriment *RTL1* sont aussi hypersensibles à l'infection par le TYMV (Shamandi et al., 2015). Ces résultats sont encourageants et suggèrent que l'absence ou surexpression de *RTL1* a le même effet sur l'infection du TRV et du CaMV que sur l'infection du TYMV. Pour aller plus loin dans l'étude du rôle de *RTL1* dans l'infection de ces deux virus, nous étudierons l'accumulation des siRNAs viraux et grands RNAs viraux dans les plantes sauvages, mutées *rtl1* ou surexprimant *RTL1* infectées.

IV] Pourquoi *RTL1* est-il maintenu dans le génome d'*Arabidopsis* ?

Au regard de nos résultats, l'activité de RTL1 lors de l'infection d'*Arabidopsis thaliana* par un virus est soit sans effet car le virus exprime un VSR inhibe l'activité de RTL1, soit délétère car RTL1 complète l'action des VSR ayant peu ou pas d'effet sur le PTGS en inhibant le PTGS anti-viral. Dans un premier temps, nous avons pensé que RTL1 constituait une défense primaire contre les infections virales, contournée par les virus sensibles à son activité et utilisée par les virus qui ne sont pas sensibles à son activité car à l'abri de son action. Dans ce cas, RTL1 est défavorable à la fitness de la plante et la séquence de *RTL1* pourrait être perdue au cours de l'évolution. Pourtant, la structure du gène *RTL1* est très conservée chez les différentes accessions d'*Arabidopsis thaliana* malgré la présence de SNPs (données 1001 Génomes), et une analyse préliminaire de la conservation des mutations synonymes et non-synonymes des séquences homologues à *RTL1* chez 42 Eucotylédones révèle que le gène *RTL1* est sujet à une sélection de conservation (**Tableau S1** Annexes). Il est possible que le gène *RTL1* soit essentiel à la survie de la plante, malgré un impact négatif sur la sensibilité aux infections virales.

On sait que *RTL1* est faiblement exprimé dans les racines (notamment dans la zone pilifère et l'épiderme des cellules trichoblastiques, communication personnelle de Filipe Borges), les graines (notamment dans l'endosperme, communication personnelle de Filipe Borges) et les feuilles sénescents (**Figure 39**). Nous avons donc étudié l'impact de l'absence de *RTL1* dans ces différents organes.

1) *RTL1* ne semble pas impliquée dans le développement de la plante

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si l'absence de RTL1 affecte le développement de la plante. Le phénotypage des rosettes des mutants *rtl1-sail* et *rtl1-crispr* n'a cependant pas mis en évidence de différences claires avec les lignées isogéniques sauvages associées (Partie III-1 p.123, **Figure 40** à **Figure 46**). On observe certes une diminution de l'éclat des feuilles chez les mutants *rtl1* par rapport les lignées isogéniques sauvages, mais cette donnée est difficilement interprétable (**Figure 46**). Toutefois, nous avons observé une variabilité dans l'aire de la rosette des mutants *rtl1* mais pas celles des lignées isogéniques

sauvages, ce qui suggère que la protéine RTL1 est impliquée dans le maintien d'une certaine forme de la plante (**Figure 40**). Cet effet est d'autant plus visible chez le mutant *rtl1-crispr*. Ces résultats ont été générés par la plateforme Phénoscope de l'IJPB en conditions contrôlées en jours courts, ce qui pourraient masquer un autre effet de l'absence de RTL1. Il serait intéressant de challenger les mutants *rtl1* dans d'autres conditions de culture (variation dans la durée de l'éclairage, intensité de la lumière, arrosage, type de sol, stress biotique).

Puisque *RTL1* est légèrement exprimé dans les feuilles en sénescence (**Figure 39**) et que de nombreux gènes associés à la sénescence sont régulés épigénétiquement (Brusslan et al., 2015; Chen et al., 2016; Woo et al., 2016; Liu et al., 2019), nous nous sommes ensuite demandé si RTL1 participe à la transition de la feuille mature à la feuille sénescente. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative dans le taux de biomasse sénescence dans les feuilles entre les mutants *rtl1* et les lignées isogéniques sauvages (**Figure 47**). Ces expériences seront reconduites en hydroponie, car les feuilles sénescentes au contact de la terre mouillée ont tendance à pourrir et se dégrader, ce qui a pu biaiser à nos analyses. Il serait également intéressant de tester l'expression de gènes marqueurs de la sénescence dans les feuilles sénescentes des mutants *rtl1* et des lignées isogéniques sauvages, comme le facteur de transcription *WRKY22*, le gène *SENESCENCE ASSOCIATED (SAG) 1* et le gène *ARABIDOPSIS THALIANA SENESCENCE (SEN) 1* (Woo et al., 2019).

2) La dérégulation de *RTL1* affecte le poids des graines

RTL1 est aussi faiblement exprimé dans les graines (**Figure 39**), notamment dans l'endosperme (communication personnelle Filipe Borges). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de la dérégulation de l'expression de *RTL1* sur le processus de triploïd block, dont les composants participent au maintien de la ploïdie de l'embryon (Greco et al., 2012). En effet, l'implication de p4-siRNAs dans le triploïd block a été démontré (Lu et al., 2012) et RTL1 est capable de cliver les dsRNAs et les siRNAs (**Figure 34** ; Shamandi et al., 2015). Des fleurs sauvages, *rtl1-sail* et surexprimant *RTL1* sont fécondées avec le pollen diploïde du mutant *osd1* où le triploïd block est induit (d'Erfurth et al., 2009; Kradolfer et al., 2013). Les graines issues des croisements *rtl1-sail* x *osd1* et *RTL1* x *osd1* sont avortées comme les graines Col x *osd1* (**Figure 53**). Nous pourrions aussi croiser les mutants *osd1* avec le mutant *rtl1-crispr* et une lignée isogénique sauvage pour consolider ces observations, mais ces résultats suggèrent fortement que RTL1 ne participe pas au triploïd block.

Pour les mêmes raisons, nous nous sommes intéressés à une possible implication de RTL1 dans le phénomène d'hétérosis. En effet, une modification du profil des p4-siRNAs a été observée dans les descendants F1 d'un croisement entre l'écotype *Ler* et l'écotype C24 où l'hétérosis est observée par rapport à leurs parents *Ler* et C24 (Groszmann et al., 2011). Cependant, nous n'avons pas montré de différence dans le phénotype d'hétérosis des croisements (dans les deux sens) des mutants *rtl1-sail* avec les accessions Col, *Ler*, *Ws* et C24 par rapport aux croisement dans les deux sens de Col- avec *Ler*, *Ws* et C24 (**Figure 54**). Nous ne disposons pas encore du mutant *rtl1-crispr* lors de cette expérience et pourront la reproduire avec cet allèle pour confirmer ce résultat. Cependant, là aussi il semble que l'absence de RTL1 n'affecte pas le phénomène d'hétérosis.

Comme les mutants *rtl1* sont moins sensibles à l'infection du TYMV que les plantes sauvages infectées (**Figure 13**, **Figure 14** et **Figure 15**) et que le TYMV est capable de se transmettre de la plante mère infectée aux graines de la descendance dans les accessions Dijon et Landsberg (de Assis Filho and Sherwood, 2000), nous nous sommes demandé si il pouvait aussi se transmettre par la graine dans l'accession Col, et si RTL1 pouvait affecter son taux de transmission. L'analyse étant lourde (768 plantes analysées), le taux de transmission du TYMV est analysé seulement chez mutant *rtl1-sail* et la lignée isogénique sauvage correspondante. Nous avons montré que le taux de transmission du TYMV par la graine est d'environ 18% chez les plantes sauvages et chez les mutants *rtl1-sail* (**Figure 52**). RTL1 n'est donc pas impliquée dans la transmission verticale de l'infection du TYMV en fond Col.

Nous nous sommes ensuite intéressé au métabolisme de la graine et, à l'aide d'une analyse au NIRS, nous avons observé que la composition en lipide, carbone, azote, protéine et galactose ne varient pas dans les graines des mutants *rtl1-sail* et *rtl1-crispr* par rapport aux lignées isogéniques sauvages associées (**Figure 50**). La taille et la morphologie des graines sont similaires entre les mutants *rtl1* et les lignées isogéniques sauvages (**Figure 49**) et le taux de germination des graines, avec ou sans stratification, est identique pour les mutants *rtl1* et les lignées isogéniques sauvages associées (**Figure 51**).

Cependant, les graines des mutants *rtl1* tendent à être plus lourde que les graines des plantes sauvages (**Figure 49**). Ce résultat est d'autant plus étonnant que les graines des plantes qui surexpriment *RTL1* sont plus grosses et de couleur plus foncées que les graines des plantes sauvages (communication personnelle Filipe Borges). L'analyse globale des graines masque peut-être des spécificités tissulaires. Afin de déterminer le(s) facteur(s) responsable(s)

impliqué(s) dans ce phénotype, des analyses plus fines seront nécessaires comme l'étude des différents tissus séparés de la graine (tégument, embryon et endosperme) et de leur composition après microdissection laser. Une analyse transcriptomique des gènes différentiellement exprimés dans les différents tissus des graines des mutants *rtl1* par rapport aux graines des lignées isogéniques sauvages est aussi envisagée (Belmonte et al., 2013; Sakai et al., 2018).

3) L'absence de RTL1 ne semble pas affecter le développement de la racine

RTL1 est légèrement exprimé dans les racines des plantes sauvages (Figure 39), notamment au niveau de la zone pilifère et dans l'épiderme des cellules trichoblastiques (communication personnelle de Filipe Borges). Nous avons donc analysé l'effet des mutations *rtl1-crispr* et *rtl1-sail* sur la taille de la racine principale par rapport aux lignées isogéniques sauvages associées. Si dans les T2 *rtl1-sail* et *rtl1-crispr* la racine principale est plus longue que celles des lignées isogéniques sauvages, ce n'est plus le cas pour le mutant *rtl1-crispr* dans les T3 (Figure 55). Nous avons pensé dans un premier temps que la présence de potentielles off-targets dues à la technique CRISPR était responsable de ce phénotype (Zhang et al., 2018). Cependant, les mutants *rtl1-crispr* back-crossés 6 fois à Col ont une racine principale de même longueur que celle de la lignée isogénique sauvage associée (Figure 59). Il est donc plus probable le mutant *rtl1-sail* comporte d'autre(s) mutation(s) ou insertion(s) affectant le développement de la racine principale. Des back-crosses entre les mutants *rtl1-sail* et des plantes sauvages sont en cours afin d'éliminer les potentielles mutations parasites et valider cette hypothèse. Il serait tout de même intéressant de tester l'effet de la supplémentation d'hormone végétale sur le développement racinaire des mutants *rtl1* par rapport aux plantes isogéniques sauvages comme par exemple l'auxine, qui inhibe la croissance de la racine principale et stimule celle des racines secondaires, les cytokinines, qui stimulent les divisions et la différenciation des cellules du méristème de la racine principale et inhibent en conséquence le développement des racines secondaires, ou les gibbérellines, qui inhibent la croissance des racines secondaires (Ubeda-Tomás et al., 2012; Vissenberg et al., 2020). Cependant, en l'état, nos résultats ne corroborent pas l'hypothèse de l'implication de RTL1 dans le développement de la racine.

Qui plus est, la mutation *rtl1-sail* n'a pas d'effet sur l'accumulation racinaire des ta-siRNAs issus des gènes *TAS1*, *TAS2* et *TAS3* et de l'endo-siRNAs issus *IR71* (Figure 56), alors que les plantes qui surexpriment *RTL1* inhibent la production des siRNAs (Shamandi et al., 2015). Il est possible que la faible expression de *RTL1* dans les racines ne permette pas une forte activité

de la protéine RTL1. Pour le confirmer, l'accumulation des ta-siRNAs sera analysée dans les racines des plantes exprimant *RTL1* sous le contrôle du promoteur fort *p35S* et sous le contrôle du promoteur constitutif *pUBQ10*. Il est aussi possible que l'activité de RTL1 soit restreintes à certaines assises cellulaires et qu'en conséquence son effet soit dilué dans la racine entière. Il est également possible que RTL1 agisse sur quelques RNAs spécifiques, capables d'adopter des structures double brins. Un transcriptome des feuilles et des racines de plantes sauvages et mutantes *rtl1* permettra de trancher. Si une dérégulation de l'expression de certains gènes est observée, nous le confirmerons par RT-qPCR sur les différents tissus de la racine des mutants *rtl1* et des plantes sauvages.

4) Le rôle de RTL1 diffère dans différentes accessions d'*A. thaliana*

Jusqu'à présent, toutes nos analyses ont été effectuées dans l'accession Col qui constitue une accession atypique d'*A. thaliana*, notamment en ce qui concerne les facteurs impliqués dans le RQC et le PTGS (voir Partie III-5, p.145). Nous avons donc commencé à analyser le développement des plantes *Ler/rtl1-crispr* et *Ws/rtl1-crispr* par rapport aux plantes *Ler* et *Ws* sauvages isogéniques. Nous n'avons pas montré de différences dans la taille de la racine principale (**Figure 59**), la taille des rosettes et le délai de florescence (**Figure 60**) chez les plantes *Ler/rtl1-crispr* et *Ws/rtl1-crispr* par rapport aux plantes *Ler* et *Ws* sauvages isogéniques. En revanche, les plantes *Ler/rtl1-crispr* semblent plus sénescentes que les plantes *Ler* sauvages isogéniques (**Figure 60**) contrairement aux plantes *Col/rtl1-sail* et *Col/rtl1-crispr* par rapport aux plantes sauvages isogéniques (**Figure 47**). Une comparaison de la biomasse sénescence des plantes *Ler/rtl1-crispr* et des plantes *Ler/rtl1-sail* par rapport aux plantes *Ler* sauvages isogéniques sera conduite afin de valider ces résultats.

Etant donné les différences apparues entre Col et *Ler* quant au rôle de RTL1 dans la senescence, nous avons voulu examiner si RTL1 jouait aussi un rôle dans la variabilité d'efficacité du PTGS des transgènes, observée entre Col et *Ler*. En effet, notre équipe a constaté que 20% des plantes *Col/Hc1* déclenchent le PTGS du transgène (Elmayan et al., 1998) alors qu'aucune plante *Ler/Hc1* ne déclenche le PTGS (**Figure 57** ; données non publiées du laboratoire). Nous avons donc dans un premier temps généré des plantes homozygotes *Col/Hc1/rtl1-sail* et *Ler/Hc1/rtl1-sail* et comparé le nombre de plantes silencées par le locus *Hc1* par rapport aux plantes *Col/Hc1* et *Ler/Hc1*. Nous avons montré que 20% des plantes *Col/Hc1* et *Col/Hc1/rtl1-sail* déclenchent

a



b

>Col-0.MPI_chr4:8821759-8823258 nucleotide

```

ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAATCGACGGTAAAGATAACACAAAACCATCGGATCAGCGGATCCGGACCAGCTTATGGAGATCGAATCCTGGAGAAGATCTTAAATTACAAGTTC
AAAGACAAGAGTTTGTGCTGAAAGCGTTCACAGACGCTAGTTACGTTGATGACAAGAGTGAATCGTACGAACTCCTAGAACTTTTAGGAGATTCGATCCTAAATATGGGTATAATCTAT
GATTTTATTAAGCTCTACCTAAAGAAGCACCTGGTCCGTTGACCAAGCTCCGAGCCGTCACAGTAGATACCGAGAAATGGCACGGGTGCTGTAATCACCACACTCTATAGCTATCTC
CGTCAATAAGAACCCCTTCTGAGGACAAgtaagttacattcttaaaaacccactcaattatcatctttgaaatccctagatatttaaccgtgtcaaatcttataaattttttattt
aattacttcgatcatgtctttgcaatttggttcatttataaaatccatggaaaaataaactttgtcaacctttttccattctctataatcactttccacaatttgcctcaatga
atgtgttagtttattccataaccatgggctaattagaaatttaccacaataatctttaataaaaacgtttattggtgtgtgtaaatgtgaaatcaatattattatagcagATA
CTAGAATTTGTGGAAGCCATGGAAAAATATCCATTACATTCAAATGGTCTTTTAAAAGTTCTTAAAGTTCTAGCAGACATAGTAGAGTCTACCATTGGAGCTATCTTCATGGACTGCAAC
TCCACCGAGACCGTCTGGAAGgtaacttactatacatttagttataaatatctagctactagactaaggcaatcgattaatccatgactcttttgggtgtgaaaccattgtgacaaaa
cattgttgatagGTGATAAAACCATTTGTTGGACCAATAATACATTTAGACAAAATGAAGAGCCATCCAATGACAGAACTCAATGAGATGTGTCAGAAGAGAACTTGAAATGACGTC
AAAGACACTTGGGAAGAAAATCAAACCTATTGTTTCCATATTGAGGATAAGTTTGTGGATGTGGTCACCATCCTGTCAAGAAAAGAACTGCTCGTAATTTCCGTCGCAAAAATGCTATT
GACAAATTTGCTAAATTTTCCGAGACCTTTAGatataatcgaaaagaaaaagaaaaattatattttataaatttttacagtataaattgtaaatctttctgtttttcttttgttaaaa
aaaaaaaaggcaaaaagaaaacataaagaaatattgtactgtctttgtatttttaaccagctgttatcaaatccatcttcatttttcttatgaatggtgcaaaagcgtaaaaaacg
aaaaagaaaaatagaatgatgtgaatgaacctagccaaatggttataagcatatataagt

```

>Ler-0.WTC_chr4:8821759-8823258 nucleotide

```

ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAATCGACGGTAAAGATAACACAAAACCATCGGATCAGCGGATCCGGACCAGCTTATGGAGATCGAATCCTGGAGAAGATCTTAAATTACAAGTTC
AAAGACAAGAGTTTGTGCTGAAAGCGTTCACAGACGCTAGTTACGTTGATGACAAGAGTGAATCGTACGAACTCCTAGAACTTTTAGGAGATTCGATCCTAAATATGGGTATAATCTAT
GATTTTATTAAGCTCTACCTAAAGAAGCACCTGGTCCGTTGACCAAGCTCCGAGCCGTCACAGTAGATACCGAGAAATGGCACGGGTGCTGTAATCACCACACTCTATAGCTATCTC
CGTCAATAAGAACCCCTTCTGAGGACAAgtaagttacattcttaaaaacccactcaattatcatctttgaaatccctagatatttaaccgtgtcaaatcttataaattttgatttatt
aattacttcgatcatgtctttgcaatttggttcatttataaaatccgtaaaaataaaactttgtcaaaactttttccattctctataatcactttccacaatttgcctcaatga
atgtgttagtttattccataaccatgggctaattagaaatttaccacaataatctttaataaaaacgtttattggtgtgtgtaaatgtgaaatcaatattattatagcagATA
CTAGAATTTGTGGAAGCCATGGAAAAATATCCATTACATTCAAATGGTCTTTTAAAAGTTCTTAAAGTTCTAGCAGACATAGTAGAGTCTACCATTGGAGCTATCTTCATGGACTGCAAC
TCCACCGAGACCGTCTGGAAGgtaacttactatacatttagttataaatatctagctactagactaaggcaatcgattaatccatgactcttttgggtgtgaaaccattgtgacaaaa
cattgttgatagGTGATAAAACCATTTGTTGGACCAATAATACATTTAGACAAAATGAAGAGCCATCCAATGACAGAACTCAATGAGATGTGTCAGAAGAGAACTTGAAATGACGTC
AAAGACACTTGGGAAGAAAATCAAACCTATTGTTTCCATATTGAGGATAAGTTTGTGGATGTGGTCACCATCCTGTCAAGAAAAGAACTGCTCGTAATTTCCGTCGCAAAAATGCTATT
GACAAATTTGCTAAATTTTCCGAGACCTTTAGatataatcgaaaagaaaaagaaaaattatattttataaatttttacagtataaattgtaaatctttctgtttttcttttgttaaaa
aaaaaaaaggcaaaaagaaaacataaagaaatattgtactgtctttgtatttttaaccagctgttatcaaatccatcttcatttttcttatgaatggtgcaaaagcgtaaaaaacg
aaaaagaaaaatagaatgatgtgaatgaacctagccaaatggttataagcatatataagt

```

Figure 64 : Comparaison de la séquence RFL1 chez Col-0 et Ler-0 (données 1001 Génome, browser Salk)

Chez Ler-0 de nombreux SNPs sont présents dans le promoteur de RFL1 (At4g15417) constitué d'un transposon (en jaune) (a) et de nombreux SNPs sont présent dans les introns (b), 1 SNP est présent à la fin de l'exon 1 et 1 SNP à la fin de l'exon l'exon 3 par rapport à Col-0. Les SNPs sont mis en évidence par du rouge (A), du bleu (C), du vert (G) ou du jaune (T). Les exons sont en majuscules et surlignés en bleu clair, les introns sont en minucules.

le PTGS, suggérant que la mutation *rtl1-sail* n'a pas d'effet sur le PTGS du locus *Hcl* en fond Col (**Figure 57**). Par contre, 20% des plantes *Ler/Hcl/rtl1-sail* déclenchent le PTGS alors qu'aucune plante *Ler/Hcl* ne déclenche le PTGS (**Figure 57**). Ces résultats suggèrent qu'en fond *Ler*, RTL1 inhibe le PTGS du locus *Hcl*.

Pour consolider ces résultats, nous générons actuellement des plantes homozygotes *Ler/Hcl/rtl1-crispr*. Si l'allèle *rtl1-crispr* induit le PTGS de *Hcl* chez *Ler* comme le fait l'allèle *rtl1-sail*, il faudra chercher pourquoi RTL1 réprime le PTGS chez *Ler* et pas chez Col. Il est possible qu'il y ait une activité de RTL1 plus forte chez *Ler* que chez Col. Mes expériences de RT-qPCR montrent que, chez *Ler* comme chez Col, *RTL1* n'est pas exprimé dans les feuilles et les fleurs (**Figure 58**). Toutefois, des RT-PCR semi-quantitatives effectuées par Nahid Shamandi dans l'équipe avaient montré une accumulation du mRNA *RTL1* plus forte dans des jeunes plantules de *Ler* que dans des jeunes plantules de Col. Sachant que *RTL1* s'exprime faiblement dans la racine de Col (**Figure 39**), cette différence d'accumulation du mRNA *RTL1* dans les plantules pourrait être due à une expression plus forte de *RTL1* dans la racine de *Ler* que dans la racine de Col. Des expériences de RT-qPCR sur racines isolées devront être effectuées pour tester cette hypothèse. On sait aussi que le PTGS du locus *Hcl* est plus fort dans les racines (qui expriment légèrement *RTL1*) que dans les feuilles (qui n'expriment pas *RTL1*) de la lignée *Col/Hcl* (**Figure 39** et **Figure 57** ; données non publiées du laboratoire). Si *RTL1* est exprimé plus fortement dans la racine chez *Ler* que chez Col, nous testerons si RTL1 influence le niveau de PTGS dans la racine. Nous analyserons l'accumulation des siRNAs *GUS* dans les feuilles et les racines des plantes *Hcl* qui déclenchent le PTGS et qui surexpriment *RTL1* ou sont mutées pour *rtl1* en fond Col et *Ler* (*Col/Hcl/RTL1*, *Col/Hcl/rtl1*, *Ler/Hcl/RTL1* et *Ler/Hcl/rtl1*). De plus, nous avons montré que la mutation *rtl1-sail* n'a pas d'effet sur l'accumulation des ta-siRNAs dans les racines des plantes *Col/rtl1-sail* par rapport aux plantes sauvages (**Figure 56**). Nous testerons si l'accumulation des ta-siRNAs est supprimée dans les racines des plantes qui surexpriment *RTL1* en fond *Col* et en fond *Ler* et si l'accumulation des ta-siRNAs diffère dans les racines des plantes *Col/rtl1* et *Ler/rtl1*.

Si une différence est confirmée, les bases de cette différence seront recherchées. Des SNPs distinguant Col de *Ler* sont présents dans le promoteur du gène *RTL1* (**Figure 64a**). Ils pourraient influencer le niveau de transcription de *RTL1*. Des SNPs sont également trouvés dans les introns, et pourraient influencer l'épissage ou la stabilité du pré-mRNA *RTL1* (**Figure 64b**). Deux SNPs sont également présents dans les exons du gène *RTL1* (**Figure 64b**). Ils

Alignment of Sequence_1: [RTL1_Col-0_CDS.txt.xdna] with Sequence_2: [RTL1_Ler-0_CDS.txt.xdna]

Similarity : 793/795 (99,75 %)

```

Seq_1 1      M G S Q L S N A I D G K D N T K T I G S
              ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAATCGACGGTAAAGATAACACCAAACCATCGGATCA 60
              |||
Seq_2 1      ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAATCGACGGTAAAGATAACACCAAACCATCGGATCA 60
              M G S Q L S N A I D G K D N T K T I G S

Seq_1 61      A D P D Q L M E I E S L E K I L N Y K F
              GCGGATCCGACCAGCTTATGGAGATCGAATCCTTGGAGAAGATCTTAAATTACAAGTTC 120
              |||
Seq_2 61      GCGGATCCGACCAGCTTATGGAGATCGAATCCTTGGAGAAGATCTTAAATTACAAGTTC 120
              A D P D Q L M E I E S L E K I L N Y K F

Seq_1 121     K D K S L L L K A F T D A S Y V D D K S
              AAAGACAAGAGTTTGTGTGCTGAAAGCGTTACAGACGCTAGTTACGTTGATGACAAGAGT 180
              |||
Seq_2 121     AAAGACAAGAGTTTGTGTGCTGAAAGCGTTACAGACGCTAGTTACGTTGATGACAAGAGT 180
              K D K S L L L K A F T D A S Y V D D K S

Seq_1 181     E S Y E L L E L L G D S I L N M G I I Y
              GAATCGTACGAACCTCCTAGAACCTTTAGGAGATTCGATCCTAAATATGGGTATAATCTAT 240
              |||
Seq_2 181     GAATCGTACGAACCTCCTAGAACCTTTAGGAGATTCGATCCTAAATATGGGTATAATCTAT 240
              E S Y E L L E L L G D S I L N M G I I Y

Seq_1 241     D F I K L Y P K E A P G P L T K L R A V
              GATTTTATTAAGCTCTACCCTAAAGAAGCACCTGGTCCGTTGACCAAGCTCCGAGCCGTC 300
              |||
Seq_2 241     GATTTTATTAAGCTCTACCCTAAAGAAGCACCTGGTCCGTTGACCAAGCTCCGAGCCGTC 300
              D F I K L Y P K E A P G P L T K L R A V

Seq_1 301     N V D T E K L A R V A V N H Q L Y S Y L
              AACGTAGATACCGAGAAATGGCACGGGTCGCTGTAATCACCACCTCTATAGCTATCTC 360
              |||
Seq_2 301     AACGTAGATACCGAGAAATGGCACGGGTCGCTGTAATCACCACCTCTATAGCTATCTC 360
              N V D T E K L A R V A V N H Q L Y S Y L

Seq_1 361     R H K K P L L E E Q I L E F V E A M E K
              CGTCATAAGAAACCTTCTTGAGGAGCAAATACTAGAAATTTGTGGAAGCCATGGAAAAA 420
              |||
Seq_2 361     CGTCATAAGAAACCTTCTTGAGGAGCAAATACTAGAAATTTGTGGAAGCCATGGAAAAA 420
              R H K K P L L E E Q I L E F V E A M E K

Seq_1 421     Y P L H S N G L L K V P K V L A D I V E
              TATCCATTACATTCAAATGGTCTTTTAAAAGTTCCCTAAAGTTCTAGCAGACATAGTAGAG 480
              |||
Seq_2 421     TATCCATTACATTCAAATGGTCTTTTAAAAGTTCCCTAAAGTTCTAGCAGACATAGTAGAG 480
              Y P L H S N G L L K V P K V L A D I V E

Seq_1 481     S T I G A I F M D C N S T E T V W K V I
              TCTACCATTGGAGCTATCTTCATGGACTGCAACTCCACCGAGACCGTCTGGAAGGTGATA 540
              |||
Seq_2 481     TCTACCATTGGAGCTATCTTCATGGACTGCAACTCCACCGAGACCGTCTGGAAGGTGATA 540
              S T I G A I F M D C N S T E T V W K V I

Seq_1 541     K P L L E P I I H L D K M K S H P M T E
              AAACCATTGTTGGAGCCAATAATACATTTAGACAAAATGAAGGCCATCCAATGACAGAA 600
              |||
Seq_2 520     AAACCATTGTTGGAGCCAATAATACATTTAGACAAAATGAAGGCCATCCAATGACAGAA 600
              K P L L E P I I H L D K M K S H P M T E

Seq_1 601     L N E M C Q K R N L K L T S K D T W E E
              CTCAATGAGATGTGTCAGAAGGAACTTGAATTTGACGTCCTCAAGACACTTGGGAAGAA 660
              |||
Seq_2 580     CTCAATGAGATGTGTCAGAAGGAACTTGAATTTGACGTCCTCAAGACACTTGGGAAGAA 660
              L N E M C Q K R N L K L T S K D T W E E

Seq_1 661     N Q T Y C F H I E D K F V G C G H H P V
              AATCAAACCTATTGTTCCATATTGAGGATAAGTTTGTGGATGTGGTCACCATCCTGTCT 720
              |||
Seq_2 640     AATCAAACCTATTGTTCCATATTGAGGATAAGTTTGTGGATGTGGTCACCATCCTGTCT 720
              N Q T Y C F H I E D K F V G C G H H P V

Seq_1 721     K K E T A R N F A A K N A I D N F A K F
              AAGAAAGAACTGCTCGTAATTTTCGCTGCAAAAATGCTATGACAATTTTGCTAAATTT 780
              |||
Seq_2 700     AAGAAAGAACTGCTCGTAATTTTCGCTGCAAAAATGCTATGACAATTTTGCTAAATTT 780
              K K E T A R N F A A K N A I D N F A K F

```

Figure 65 : Les SNPs présents dans la séquence RTL1 de Ler-0 sont des substitutions synonymes

Les CDS de *RTL1* chez Col-0 et Ler-0 sont blastés sur Serial Cloner. Les différences sont mises en évidence par la couleur rouge.

pourraient affecter la stabilité du mRNA *RTL1* ou sa traduction. En revanche, ils ne devraient pas modifier l'activité de la protéine puisque ces substitutions sont synonymes (**Figure 65**).

Nous déterminerons également si *RTL1* module l'infection par le TYMV chez *Ler*. En effet, nous avons observé qu'une mutation *rtl1* en fond Col défavorise légèrement l'infection du TYMV puisque *RTL1* contrecarre l'action du PTGS anti-viral en limitant la quantité de siRNAs dirigés contre le virus (**Figure 63** ; Partie II-4 p.105). Si *RTL1* est plus exprimé chez *Ler* que chez Col, l'infection devrait être plus efficace chez *Ler* que chez Col. En revanche, l'infection devrait être similaire chez *Ler/rtl1* et *Col/rtl1*. L'accumulation des mRNAs et siRNAs viraux sera quantifiée chez *Ler/RTL1*, *Ler/rtl1*, *Col/RTL1* et *Col/rtl1* afin de tester cette hypothèse.

Enfin, nous déterminerons si *RTL1* influence le taux de transmission du TYMV par la graine chez *Ler*. En effet, nous n'avons observé aucune différence significative dans le taux de transmission entre Col et *rtl1* (**Figure 52**), ce qui est cohérent avec une expression très faible de *RTL1* chez Col (**Figure 39**). Un taux de transmission du TYMV par la graine plus faible chez La-0 que chez Col ayant été observé (environ 7% chez La-0 ; Filho and Sherwood, 2000 contre 18% chez Col-0 ; **Figure 45**), nous quantifierons le taux de transmission du TYMV par la graine chez *Col/RTL1*, *Col/rtl1*, *Ler/RTL1*, *Ler/rtl1*, afin de déterminer si *RTL1* influence le taux de transmission du TYMV par la graine.

V] Conclusion

RTL1 semble favoriser l'infection par des virus comme le TYMV dont le VSR n'inhibe pas son activité. Dans ce cas, RTL1 clive les siRNAs et dsRNAs viraux produits par le PTGS (Partie II p.77). Le TYMV est à l'abri de l'activité de RTL1 car il se réplique au sein d'invaginations de la membrane externe des chloroplastes, où RTL1 n'est pas présente, et qu'une partie du pool cytoplasmique de RTL1 est vraisemblablement redirigée vers les siRNA-bodies lors de l'infection (**Figure 63**). A l'inverse, l'analyse de l'effet de RTL1 sur l'infection par un TuMV délété de son VSR suggère que RTL1 pourrait cibler les dsRNAs du TuMV (Partie I p.67). En conséquence, ce virus a évolué de manière à inhiber l'activité de RTL1. Etant donné que l'effet de RTL1 sur la plante lors d'infections virales est, au mieux neutre, au pire délétère, *RTL1* devrait subir une pression de sélection car il est défavorable à la survie de la plante. Mais la séquence de *RTL1* est bien conservée dans les accessions d'*Arabidopsis thaliana* et est sujette à une sélection de conservation (Partie III p.123 et **Tableau S1** Annexes). Nous avons montré que RTL1 pourrait jouer un rôle dans le développement de la graine de différentes accessions d'*A. thaliana*, mais que son effet sur le PTGS varie selon les écotypes (Partie III p.123). En effet, l'activité de RTL1 vis-à-vis du PTGS des transgènes semble plus forte en fond *Ler* qu'en fond *Col*. L'absence d'effet ou les effets délétères de RTL1 en condition d'infection virale chez *Col* devront donc être ré-examinés chez *Ler*. Il sera également intéressant de comprendre le mécanisme d'induction de l'expression de *RTL1* en condition d'infection virale puisque le promoteur de *RTL1* est constitué d'un transposon méthylé (**Figure 64a** ; données non publiées du laboratoire).

MATERIEL ET METHODES

I] Matériel biologique

1) Description des lignées

Les lignées d'*Arabidopsis* transgéniques et mutantes suivantes sont à l'état homozygote dans l'accession Columbia-0 (Col-0).

Les lignées *L1*, *Hc1*, *6b4*, *6b4/306*, *JAP3*, *SUC:SUL* ont été précédemment décrites (Elmayan et al., 1998; Waterhouse et al., 1998; Béclin et al., 2002; Himber et al., 2003; Smith et al., 2007; Gy et al., 2007). Les simples et doubles mutants *rdr1-1* (SAIL_672F1), *rdr6* (*sgs2-1*), *rdr1-1/rdr6*, *ago1-27*, *dcl2-1* (SALK_064627), *dcl4-2* (GABI_160G05), *dcl2-1/dcl4-2*, *drd4-1* (SALK_000736), *dcl2-Kas1* (*dcl2^{Kas-1}*), *dcl4-5*, *dcl2-Kas1/dcl4-5*, *sgs3*, *sde5*, *ski3-3*, *vcs-8* (SAIL_1257_H12), *cbp80* (SAIL_1227_E07), et *xrn4-5* (SAIL_681_E01) ont été décrits (Mourrain et al., 2000; Hugouvieux et al., 2001; Morel et al., 2002; Souret et al., 2004; Xie et al., 2004; Dunoyer et al., 2005; Nakazawa et al., 2007; Martínez de Alba et al., 2015; Yu et al., 2015; Parent et al., 2015a; Xie et al., 2005; Garcia-Ruiz et al., 2010; Martinez de Alba et al., 2011). Les lignées *L1/rdr6*, *6b4/xrn4-5*, *6b4/ski3-3*, *6b4/vcs-8* et *6b4/cbp80* ont été également décrites (Elmayan et al., 1998; Martínez de Alba et al., 2011; Martinez de Alba et al., 2015; Yu et al., 2015).

Les mutants *ago2-3* (RATM15_3703) et *rtl1-sail* (SAIL_337_F04.1) ont été générées par l'équipe. *ago2-3*, originellement dans l'accession Nossent, a été back-crossé 6 fois à Col. Les lignées *Col/Hc1/rtl1-sail* et *Ler/Hc1* ont été générées par l'équipe. La lignée *Ler/Hc1* a été obtenue en back-crossant 10 fois la lignée *Col/Hc1* à *Ler*.

Les lignées transgéniques *OE-TuMV-GFP* et *OE-TuMV-AS9-GFP* en fond Col ou *dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2* (Deleris et al., 2006) nous ont été fournies par Rajeswaran Rajendran (ETH Zurich) et ne sont pas publiées.

| lignée | transgène | références |
|----------------|--------------------|--|
| <i>6b4</i> | <i>p35S:GUS</i> | (Gy et al., 2007) |
| <i>L1</i> | <i>p35S:GUS</i> | (Elmayan et al., 1998) |
| <i>306</i> | <i>p35S:hpGUS</i> | (Waterhouse et al., 1998; Béclin et al., 2002; Parent et al., 2015b) |
| <i>JAP3</i> | <i>pSUC2:hpPDS</i> | (Smith et al., 2007) |
| <i>SUC:SUL</i> | <i>pSUC2:PDS</i> | (Himber, 2003) |
| <i>Hc1</i> | <i>p35S:GUS</i> | (Elmayan et al., 1998) |

| mutant | Nom commercial | références |
|----------------------|-----------------------|---|
| <i>rdr1-1</i> | SAIL_672F1 | (Xie et al., 2004) |
| <i>rdr6 (sgs2-1)</i> | / | (Mourrain et al., 2000) |
| <i>ago1-27</i> | / | (Morel et al., 2002) |
| <i>ago2-3</i> | RATM15_3703 | / |
| <i>dcl2-1</i> | SALK_064627 | (Xie et al., 2004) |
| <i>dcl2-Kas1</i> | / | (Parent et al., 2015a) |
| <i>dcl4-2C</i> | GABI_160G05 | (Xie et al., 2005; Nakazawa et al., 2007) |
| <i>dcl4-5</i> | / | (Dunoyer et al., 2005) |
| <i>drb4-1</i> | SALK_000736 | (Nakazawa et al., 2007) |
| <i>sgs3 (sgs3-1)</i> | / | (Mourrain et al., 2000) |
| <i>sde5 (sgs3-7)</i> | / | (Jauvion et al., 2010) |
| <i>xrn4-5</i> | SAIL_681_E01 | (Souret et al., 2004) |
| <i>ski3-3</i> | / | (Yu et al., 2015) |
| <i>vcs-8</i> | SAIL_1257_H12 | (Martínez de Alba et al., 2015) |
| <i>cbp80</i> | SAIL_1227_E07 | (Hugouvieux et al., 2001) |
| <i>rtl1-sail</i> | SAIL_337_F04.1 | Cette thèse |
| <i>rtl1-crispr</i> | / | Cette thèse |

Tableau 2 : Lignées transgéniques et mutantes utilisées au cours de cette thèse

2) Génération du mutant *rtl1* par CRISPR

Le mutant *rtl1-crispr* a été généré pendant ma thèse par CRISPR. Le RNA guide ciblant la séquence du gène *RTL1* (At4g15417, en jaune) en amont d'un site PAM est obtenu sur le site CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>), synthétisé par IDT (<https://eu.idtdna.com>) puis inséré par clonage Gateway (kits Thermofisher Gateway BP Clonase Enzyme Mix ref. 11789100 et LR Clonase Enzyme Mix ref. 11791019) dans un vecteur *pDE-Cas9-GentR* (laboratoire d'Holger Puchta, fourni par Fabien Nogué) :

- RNA guide *RTL1_30fwd_BB1* obtenu sur le site CRISPOR

ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttcGGATCCTTTTCTTCTTTTTAACTTTCCATTCCGGAGTTTT
 TGTATCTTGTTTCATAGTTTGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAA
 TTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAGGCCCTGG
 GAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATA
 TAGGCCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACG
 AAGCTGAGTTTATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTG**CAACTCTCAAACGCAATCGAG**
 TTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACT
 TGA AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTgaccagcttctgtacaaagtgtcccc

Le vecteur résultant est inséré dans l'agrobactérie C58C1 (pMP90). Après transformation de plantes Col-0, les T1 sont semées *in vitro* sur un milieu de sélection solide S-Medium supplémenté de Gentamycine 100µg/mL et de Cefotaxine 100 µg/mL puis, après repiquage en serre, la présence de la mutation *rtl1-crispr* est criblée par séquençage Sanger.

- Séquence du gène *RTL1* :

Codon Start cible de *RTL1_30fwd_BB1* site PAM

ATGGGATCG**CAACTCTCAAACGCAATCGA****CGG**TAAAGATAACACCAAACCATC
 GGATCAGCGGATCCGGACCAGCTTATGGAGATCGAATCCTTGGAGAAGATCTTA
 AATTACAAGTTCAAAGACAAGAGTTTGTGCTGAAAGCGTTCACAGACGCTAGTT
 ACGTTGATGACAAGAGTGAATCGTACGAACTCCTAGAACTTTTAGGAGATTCGAT
 CCTAAATATGGGTATAATCTATGATTTTATTAAGCTCTACCCTAAAGAAGCACCTG
 GTCCGTTGACCAAGCTCCGAGCCGTCAACGTAGATACCGAGAAATTGGCACGG
 GTCGCTGTAAATCACCAACTCTATAGCTATCTCCGTCATAAGAAACCCTTGCTTG
 AGGAGCAAgaagtacattcttaaaaaccctactcaattatcatcttgaatccctagtatttaaccgtgcaaatctt
 ataaatctttatttataaattactctgatcatgtcttattgcaattggctcattataaaatccatggaaaataaacttgtcaacct
 tttttccattctctatatcactttcatccacaattgtctcaatgaatgtgttagttattccataaccatgggctaattagaa
 atttaccacaataatcttaataaaaacgtttgtattggtgtgtgtaatatgtgaatcaatattattatgcagATACT
 AGAATTTGTGGAAGCCATGGAAAAATATCCATTACATTCAAATGGTCTTTTAAAAG
 TTCCTAAAGTTCTAGCAGACATAGTAGAGTCTACCATTGGAGCTATCTTCATGGA
 CTGCAACTCCACCGAGACCGTCTGGAAGgtaacttactatacatttagttataaatatctagctactag
 actaaggcaatcgattaatccatgactcttttgggtgaaaccattgttgacaaaaccattgttgatagGTGATAAAA
 CCATTGTTGGAGCCAATAATACATTTAGACAAAATGAAGAGCCATCCAATGACAG
 AACTCAATGAGATGTGTCAGAAGAGGAACCTTGAATTGACGTCCAAAGACACTTG
 GGAAGAAAATCAAACCTATTGTTTCCATATTGAGGATAAGTTTGTGGATGTGGT
 CACCATCCTGTCAAGAAAGAACTGCTCGTAATTTGCTGCAAAAAATGCTATTG
 ACAATTTTGCTAAATTTTTCGGAGACCTT**AG**

Codon Stop

- Mutation induite par CRISPR (*rtl1*) par rapport aux plantes sauvages (*RTL1 WT*) (63 premiers nucléotides de la séquence *RTL1* représentés) :

insertion d'une thymine



| | |
|--------------------|---|
| <i>RTL1 WT</i> | ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAA-TCGACGGTAAAGATAACACCAAACCAT |
| <i>rtl1-crispr</i> | ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAATTCGACGGTAAAGATAACACCAAACCAT |

- Un codon Stop précoce est présent dès le 12^{ème} nucléotide chez le mutant *rtl1-crispr* à l'état homozygote chez les T2 (blast sur SerialCloner) :

Alignment of Sequence_1: [RTL1.xdna] with Sequence_2: [*rtl1-crispr*.xdna]

Similarity : 53/54 (98,15 %)

```

Seq_1 1      M G S Q L S N A I D G K D N T K T X
          ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAAT-CGACGGTAAAGATAACACCAAACCAT 53
          |||
Seq_2 1      ATGGGATCGCAACTCTCAAACGCAATT#CGACGGTAAAGATAACACCAAACCAT 54
          M G S Q L S N A I R R * R * H Q N H

```

Les mutants *rtl1-crispr* en fond Col-0 sont génotypés par restriction enzymatique de l'enzyme *TasI* (Tsp5091 ThermoFisher) sur un fragment PCR obtenu avec les primers RTL1 CRISPR 30-1 + RTL1 CRISPR 30-2 (voir Tableau des primers p.217). Les plantes homozygotes *Ler/rtl1-crispr* et *Ws/rtl1-crispr* sont issues respectivement de 6 et 5 back-crosses entre la lignée *Col/rtl1-crispr* et les accessions *Ler-0* et *Ws*.

3) Semis et condition de culture

Les semis sont effectués soit directement en godet soit par repiquage de semis *in vitro* sur le milieu de bouturage solide 1,3% S-Medium de Duchefa Biochimie (S0261.0010) et 1% Phyto Agar (P1003 Duchefa Biohemie) pH=5,9 supplémenté ou non avec un antibiotique de sélection et stratifiés à 4°C pendant 48h. Pour les semis *in vitro*, les graines sont stérilisées comme suit : elles sont agitées 10 minutes dans un tampon Bayrochlore 8mg/mL et EtOH 95%. La solution est éliminée puis les graines sont lavées 10 minutes sous agitation dans de l'EtOH 95%. La solution est enlevée et les graines sont mises à sécher sous hotte stérile pendant 1h.

Les conditions de jours courts en chambre de culture climatisée sont de 8h de jour, 16h de nuit pour une humidité relative de 65%, une intensité lumineuse de 1502 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ passant à 801 au crépuscule et à l'aube (soit une heure avant le jour et la nuit) ainsi qu'une température de 21°C en journée, 18°C de nuit ainsi que 19°C au crépuscule et à l'aube.

Les conditions de jours longs en chambre de culture climatisée sont de 8h de jour, 16h de nuit pour une humidité relative de 65%, une intensité lumineuse de 1502 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, passant à 801 au crépuscule et à l'aube (soit une heure avant le jour et la nuit) ainsi qu'une température de

21°C en journée, 18°C de nuit ainsi que 19°C au crépuscule et à l'aube. L'humidité relative est de 70%.

Les conditions de jours longs en serre sont de 16h de jour et 8h de nuit avec un éclairage de complément en début et fin de jour. La température de jour est au minimum de 22°C, mais augmente en cas de fortes chaleurs. L'humidité relative est de 45-60%.

II] Transformation stable, transformation transitoire et infection virale

1) Clonage Gateway

A partir du vecteur *pTY* (Pflieger et al., 2008) fourni par Isabelle Jupin, contenant l'ADNc du génome du TYMV sous le contrôle d'un promoteur 35S, l'ORF *P69* est amplifié par PCR à partir d'amorces flanquées des sites *attb1* et *attb2*, et dont la séquence varie selon la fusion C-ter ou N-ter voulue (voir Tableau des primers p.217)). Une mutation est générée par PCR, avec l'ajout d'un C à la place d'un T sur le 8^{ème} nucléotide du CDS de *P69*, car à partir du 7^{ème} nucléotide se trouve le codon Start ATG de l'ORF de la multiprotéine *206K* du TYMV. Un clonage Gateway est réalisé (kits Thermofisher Gateway BP Clonase Enzyme Mix ref. 11789100 et LR Clonase Enzyme Mix ref. 11791019), avec un vecteur d'entrée obtenu par BP entre le vecteur donneur *pDONR207* (Invitrogen) et le fragment PCR de *P69* suivi d'une LR entre le vecteur d'entrée obtenu et les vecteurs de destinations *pUBC-GFP-Dest*, *pUBN-GFP-Dest* et *pUB-Dest* (Grefen et al., 2010).

De la même manière, à partir d'un vecteur d'entrée obtenu par BP entre le vecteur donneur *pDONR207* et la séquence codante de *RTL1* (*RTL1 C.3* ; Shamandi et al., 2015), une LR est réalisée avec les vecteurs de destination *pUBC-GFP-dest* (Grefen et al., 2010) et *pB7FWG2* (Karimi et al., 2002). La fusion GFP est effectuée en C-ter car elle affecte moins l'activité de *RTL1* que la fusion en N-ter (Shamandi et al., 2015).

Les vecteurs d'expression produits sont introduits dans des agrobactéries C58C1 (pMP90) soit par directement par électroporation ou soit par conjugaison triparentale après électroporation d'*E. Coli* DH10B ou DH5 α (Thermofisher).

2) Transformation stable

Les lignées d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques *6b4*, *6b4/xrn4-5*, *6b4/ski-3*, *6b4/vcs-8* et *6b4/306* sont transformées avec le vecteur *p35S:P69* (*pCambia1301*, fourni par Shou Wei

Ding ; Chen et al., 2004). Les plantes d'*A. thaliana* sauvages (Col) sont transformées avec les vecteurs *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:P69-GFP* générés pendant cette thèse.

Les plantes sont cultivées en jours longs en serre et transformées par *floral dipping* au début de la floraison (Clough and Bent, 1998). Un pré-culture de 2 ml est utilisée pour implémenter 300 mL d'une culture liquide overnight à 28°C d'agrobactéries C58C1 (pMP90) portant la construction d'intérêt supplémentée de gentamycine 25µL/ml et de l'antibiotique de sélection du vecteur d'intérêt. La culture est centrifugée 10 min à 6000 rpm puis le culot est resuspendu dans une solution 5% sucrose, 10 mM MgCl₂ et 0,015% Silwet L-77. Les fleurs sont immergées 30 secondes dans la solution de transformation puis les plantes sont placées en chambre de culture et en jours longs. Le processus est répété 1 semaine après. Les T1 sont sélectionnées *in vitro* sur milieu S-Medium solide supplémenté de Cefotaxine 100µL/mL et de l'antibiotique de la construction d'intérêt. Les plantules résistantes sont repiquées en serre généralement au bout de 12 jours et les T2 homozygotes pour l'insertion sont sélectionnées sur antibiotique par la suite.

3) Transformation transitoire de feuilles de tabac

Des plantes de *Nicotiana benthamiana* sont cultivées en serre jours longs pendant trois semaines jusqu'au stade 4-5 feuilles. 10 mL d'une culture sur la nuit à 28°C d'agrobactéries C58C1 (pMP90) ou GV3101 portant la construction d'intérêt, supplémentée de gentamycine 25µL/ml et de l'antibiotique de sélection du vecteur d'intérêt, sont centrifugés 10 min à 6000 rpm. Le culot est resuspendu dans une solution 10mM MgCl₂, 10mM MES pH=5,2 et 150 mM d'acétosyringone jusqu'à une DO₆₀₀=1. Pour les co-agroinfiltrations, la DO₆₀₀ est ajustée individuellement pour une DO₆₀₀ finale de 1 dans le mélange entre les différentes cultures. Après 3h sous faible agitation à température ambiante, les feuilles de tabacs sont agro-infiltrées à l'aide d'une seringue sans aiguille. Les prélèvements sont effectués 48 à 72h après l'agroinfiltration.

Les constructions *pUBQ10:P69-GFP* et *pUBQ10:P69-GFP* ont été générées comme précédemment décrit. Pour les analyses de localisation de protéine en feuille de tabac, l'épiderme des feuilles agroinfiltrées est prélevé et imagé par microscopie confocale au Leica TCS SP5.

4) Transformation transitoire de plantules d'*A. thaliana*

Le protocole de Marion et al., 2008 est utilisé et adapté comme suit. Des graines d'*A. thaliana* sauvages (Col) stériles sont semées *in vitro* sur le milieu de bouturage solide 1,3% S-Medium de Duchefa Biochimie (S0261.0010) et sont placées après 48h de stratification à 4°C sur un support de pousse verticale en chambre de culture en jours longs. Les agrobactéries portant les constructions *p35S:RTL1-GFP* et *pUBQ10:RTL1-GFP* précédemment décrites et la construction *p35S:SGS3-mCherry* (générée par Taline Elmayan, non publiée) sont cultivées à 28°C dans 15 mL de milieu LB supplémenté en antibiotique de sélection pendant environ 30h afin d'obtenir une culture saturée avec une DO_{600} entre 4 et 5. Les cultures sont centrifugées 15 min à 6000 rpm. Le culot est lavé à l'eau puis resuspendu dans une solution 10mM $MgCl_2$, 10mM MES pH=5,2 et 150 mM d'acétosyringone jusqu'à une $DO_{600}=1$. Pour les co-agroinfiltrations, la DO_{600} est ajustée individuellement à 2 pour une DO finale de 1 dans le mélange entre les différentes cultures. Après 4 jours en chambre de culture, les plantules sont couvertes de solution bactérienne et agroinfiltrées à l'aide d'une cloche sous vide 2 fois pendant 1 min. Les plantules sont rincées à l'eau et à nouveau placées sur un support de pousse verticale chambre de culture. Les racines sont imagées 3 jours post-agroinfiltration par microscopie confocale au Leica TCS SP5.

5) Virus et inoculation

Pour les inoculations mécaniques, les virus utilisés sont le *Turnip crinckle virus* (TCV), le *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) et le *Turnip yellow virus* (TuMV) et le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) sauvages. Les *inocula* sont constitués de feuilles d'*A. thaliana* infectées broyées dans un tampon phosphate 5 mM Na_2HPO_4 et 5mM NaH_2PO_4 . Les feuilles de plantules sont recouvertes d'une fine couche de poudre de carborundum puis frottées mécaniquement avec l'*inoculum* à l'aide d'un outil râpeux. Pour les expériences réalisées en jours longs, des plantules de 15 jours sont infectées. Pour les expériences réalisées en jours courts, des plantules de 30 jours sont infectées.

Le *Turnip crinckle virus* (TRV) est inoculé par agroinfiltration. Des agrobactéries portant les constructions VIGS contenant le cDNA correspondant au RNA1 et au RNA2 du TRV,

respectivement *pTRV1* (YL192) et *pTRV2-MCS* (YL156) (Fu et al., 2005), sont co-agroinfiltrées à une DO₆₀₀ finale de 1 dans les feuilles de plantules d'*A. thaliana* de 35 jours en jours courts.

Les prélèvements sont effectués 1 semaine après infection en jours longs et deux 2 semaines après infection en jours courts. Pour les cinétiques d'infection, les prélèvements sont effectués 1 à 4 semaines après infection sur les rosettes entières ou sur 3 à 4 feuilles infectées. Les RNAs sont extraits et l'accumulation des siRNAs et/ou des grands RNAs est analysée par northern blot.

III] Micro-greffes et induction d'infection virale

1) Micro-greffe

Des graines préalablement stérilisées sont semées *in vitro* sur un milieu 1,3 % S-medium et 1,5% Phytoblend (PTP01 Caisson) puis stratifiées 2 jours à 4°C avant d'être placées sur un support de pousse verticale en chambre de culture et en jours courts pendant 1 semaine. Les micro-greffes sont effectuées comme décrit par Turnbull et al., 2002 avec l'aide d'Agnès Yu de notre équipe. Sous une hotte stérile, une incision horizontale est effectuée au niveau de l'hypocotyle des plantules sous loupe binoculaire. Le greffon et le porte greffe sont insérés dans un micro-tube stérile en silicone de 0,3 mm de large sur une membrane neutre de nitrocellulose (Hybond-NX RPN303T) en boîte de pétri sur un milieu 1,3 % S-medium et 1% Phytoblend. Les boîtes sont ensuite placées sur un support de pousse verticale en chambre de culture et en jours courts pendant 2 semaines. 1 semaine après la greffe, les micro-tubes sont enlevés et les éventuelles racines adventives éliminées. 3 jours après, une seconde vérification de la présence de racines adventives est effectuée. Une dernière vérification est effectuée 2 semaines après la greffe et les greffes sans racines adventives sont repiquées en godet en chambre de culture et en jours courts. Les feuilles et les racines des plantes sont prélevées 4 semaines post-greffe. Après extraction des RNAs, l'accumulation des siRNAs et des grands RNAs est analysée par northern blot.

2) Induction d'infection virale

L'infection du TuMV-GFP et du TuMV-AS9-GFP des lignées transgéniques *OE-TuMV-GFP* et *OE-TuMV-AS9-GFP* en fond Col ou *dcl2-1/dcl3-1/dcl4-2* (Deleris et al., 2006) est inductible à l'œstradiol (fournies par Rajeswaran Rajendran, données non publiées). Lors de la deuxième vérification de greffe impliquant ces lignées, les greffes sont transférées sur un milieu 10 µM de β-œstradiol (Sigma-Aldrich ref. E8875), 1,3 % S-medium et 1% Phytoblend avant d'être replacées sur support verticale en chambre de culture et en jours courts. 4 jours après, une dernière vérification est effectuée (2 semaines post-greffe) et les greffes sans racines adventives sont repiquées en godet en chambre de culture sécurisée et en jours courts. La progression de

l'infection du TuMV-GFP et du TuMV-AS9-GFP est surveillée à la lampe UVA. Les rosettes sont prélevées 4 semaines post-greffe. L'accumulation des RNAs viraux est analysée par northern blot HMW.

IV] Analyses Moléculaires

Les extractions d'ADN et de RNAs, les analyses d'activité GUS et les northern blot ont été réalisés comme précédemment décrits (Gy et al., 2007; Mallory and Vaucheret, 2009).

1) Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN sont réalisées à partir du protocole modifié de Taylor and Powell, 1982. Un morceau de feuille est broyé dans un volume de tampon CTAB (100 mM Tris pH=7,5, 0,7 M NaCl, 10mM EDTA, 1% CTAB) et placé 30 min à 65°C. Après 5 min de centrifugation à 3000 rpm, un volume de chloroforme/IAA (ratio 24/1) est ajouté. Après 15 min de centrifugation à 3000 rpm, le surnageant est prélevé et 2/3 de volume d'isopropanol froid est ajouté. Après 30 min de centrifugation à 3000 rpm et à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est lavé à l'EtOH 70% pendant 5 min de centrifugation à 3000 rpm et 4°C. L'EtOH est éliminé, le culot est séché puis resuspendu dans de l'eau stérile.

2) Purification de plasmides

2 mL d'une culture de bactéries overnight portant le plasmide d'intérêt sont centrifugés 5 min à 14 000 rpm et le surnageant est éliminé. La purification du plasmide est effectuée par lyse alcaline (Sambrook et al., 1989). Le culot est resuspendu dans un volume de tampon BDI (50 mM de glucose, 25 mM de Tris Hcl pH=8, 10 mM d'EDTA, environ 30 unités de RNase) et placé 25 min à 37°C. Le tube est placé dans la glace et 1 volume de tampon BDII (0,2M NaOH 1% SDS) est ajouté. Le tube est vortexé puis 1 volume de BDIII (3M Acétate de potassium, 11,5 % d'acide acétique glacial) est délicatement ajouté. Après une centrifugation de 5 min à 13000 rpm à 4°C, le surnageant est prélevé et 0,7 volume d'isopropanol froid est ajouté. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est lavé à l'EtOH 70% pendant une nouvelle centrifugation. L'EtOH est enlevé, le culot est séché puis resuspendu dans de l'eau stérile.

3) Quantification de l'activité GUS

L'analyse de l'activité GUS est effectuée comme décrit par Elmayan et al., 1998 et Jefferson et al., 1987. Brièvement, les feuilles sont broyées dans un tampon phosphate Na_2HPO_4 50 mM, NaH_2PO_4 50 mM, EDTA 10 mM, pH=7 2 fois 1 min 30 à 30 Hz puis centrifugée 20 min à 3000 rpm et 4°C. L'estimation de la quantité de protéine est effectuée par dosage de Bradford à partir de Bradford 1x (Protein Assay Dye Reagent de BioRad No Cat#500-0006) et d'une gamme de BSA de 0 à 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sur un lecteur de microplaque Elisa Elx 808 d'Avantec. La quantité de fluorescence est testée par lecture au Fluoroskan Ascent II de Thermo Scientific avec un tampon MUG 2mM (4-méthyl- β -D-glucuronidetrihydraté de Duchefa dans tampon phosphate, 81,27 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DMSO). L'activité GUS est exprimée en unité arbitraire de fluorescence par μg de protéine par min.

4) Extraction d'ARNs

Les extractions des RNAs totaux et la séparation des grands (HMW) et petits (LMW) RNAs sont effectuées comme décrit par Elmayan et al., 1998 et Vaucheret et al., 2004.

Des tissus préalablement broyés dans l'azote liquide sont vortexés dans 1 volume de tampon d'extraction NaCl (0,1M de NaCl, 2% SDS, 50 mM Tris/HCl pH=9, 10 mM EDTA et 20 mM B-mercaptoethanol) et 1 volume de phénol (Tris pH 8). 1 volume de chloroforme est ensuite ajouté, suivi d'un nouveau vortexage. Après une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm, la phase aqueuse est prélevée et lui sont ajoutés son volume en phénol et en chloroforme avant une nouvelle centrifugation. La phase aqueuse est à nouveau prélevée et lui est ajouté deux fois son volume en chloroforme. Après une nouvelle centrifugation, la phase aqueuse est à nouveau prélevée puis 1/10 de son volume en NaOAc 3M (pH 5,2) et 3 volumes de EtOH 100% lui sont ajoutés, avant une précipitation d'1h à -80°C. Après une centrifugation de 30 min à 4°C et 13 000 rpm, l'EtOH est retiré et le culot est lavé à l'EtOH 75%. Après une nouvelle centrifugation de 10 min, l'EtOH est retiré, le culot est séché puis est resuspendu dans de l' H_2O stérile avant une série de congélation-décongélation entrecoupée de vortexage. Les RNAs sont stockés à -80°C. La quantification est effectuée au NanoDrop 2000C d'Ozyme. Les RNAs totaux sont utilisés pour les northern LMW.

Pour la séparation des grands et petits RNAs, le même protocole est appliqué à l'exception d'un broyage des tissus dans 1 volume de tampon d'extraction LiCl (0,1M de LiCl, 2% SDS, 50 mM Tris/HCl pH=9, 10 mM EDTA et 20 mM B-mercaptoethanol) au lieu d'1 volume de tampon d'extraction NaCl et d'une précipitation sur la nuit à 4°C dans 1 volume de LiCl 4M après la centrifugation de la phase aqueuse et du chloroforme. Après une centrifugation de 30 min à 4°C et 13 000 rpm, les grands RNAs du surnageant sont précipités 1h à -80°C dans 3 volumes d'EtOH et la suite du protocole est suivie. Les grands RNAs sont utilisés pour les qPCRs et les northern HMW.

5) Northern blot HMW et LMW

Les northern blots Low Molecular Weight (LMW) et High Molecular Weight (HMW) sont effectués comme décrit par Gy et al., 2007 et Mallory et al., 2009. Pour les northern LMW, 5 à 30 µg de RNAs totaux sont utilisés et pour les northern HMW, 5 µg de grands RNAs sont utilisés.

Brièvement, les RNAs sont dénaturés 5 à 10 min à 85°C et séparés dans un gel 15% polyacrylamide, 7,5M urée et 1X TBE pour les RNAs totaux ou dans un gel 1,5% agarose, 0,7% formaldéhyde, 20 mM HEPES et 1 mM EDTA pH=7,8 pour les grands RNAs. Un transfert est effectué sur une membrane Hybond NX (Amersham) pour les RNAs totaux et une membrane Genescreen Plus (NEN/DuPont, Cat. No. NEF-976) pour les grands RNAs. Des sondes PCR (voir Tableau des primers p.217) sont purifiées après migration du gel d'agarose 1,5% à l'aide du kit Prime-a-gene Labeling System (Promega Ref U1100). Elles sont radiomarquées aux dCTP-P³² à l'aide du kit Prime-a-gene Labeling System (Promega Ref U1100). Les sondes oligos sont radiomarquées aux dATP-P³² à l'aide du kit T4 Polynucléotide Kinase (Thermofisher T4 PNK EK0031). Les sondes sont hybridées overnight dans un tampon PerfectHyb (Sigma-Aldrich H7033) à 37°C (sondes dCTP-P³²) ou 50°C (sondes dATP-P³²) pour les northern LMW et dans un tampon Church (7% SDS, 250 mM Na₂HPO₄, 2mM EDTA 200 µg/mL Heparin) à 65°C pour les northern HMW. Après incubation de la membrane sur un écran BAS-MP 2040P Imaging Plate (FujiFilm), la révélation est faite avec le phosphoimager au Typhoon-FLA9500 (Ge-Healthcare). L'intensité des bandes est quantifiée sur ImageJ.

6) RT-qPCR

Un traitement DNase sur 1,5 µg de RNAs est effectué à l'aide du kit DNase I (Invitrogen) selon les indications du constructeur. Pour obtenir des cDNAs, une rétro-transcription (RT) est effectuée à l'aide du kit RevertAid H Minus (Thermo Scientific EPO452) sur 1 µg de RNA selon les indications du constructeur. Pour les RNAs viraux, des random primers sont utilisés à la place des dTNN. La RT-qPCR est effectuée sur une dilution au 10^{ème} des ADNc, auxquels sont ajoutés un mix PCR SYBR GreenSuperMix (BioRad 1725261) et 10mM par primers du gène d'intérêt ou du gène contrôle *GAPDH*. Les RNAs DNasés non-rétrotranscrits sont utilisés en contrôle de contamination d'ADN. Les conditions de qPCR sont généralement les suivantes : 95°C 30s, 39 cycles de 95°C 10s, 55°C 10s et 72°C 30s puis après ces cycles 95°C 10s, 65°C 5s et 95°C 5s avec le CFX Connect Real Time PCR de BioRad. Trois réplicats sont effectués par échantillon. Les résultats sont standardisés par rapport à l'expression du gène de contrôle interne *GAPDH* (voir Tableau des primers p.217).

V] Phénotypage et analyse par microscopie confocale

1) Phénotypage des rosettes

Le phénotypage haut-débit des mutants *rtll-sail* et *rtll-crispr* et des lignées isogéniques sauvages associées est réalisé par la plateforme Phénoscope de l'IJPB de Versailles (Tisné et al., 2013). Après un test de germination, 3 lignées par génotypes sont sélectionnées. 10 plantes par lots de graines sont cultivées en chambre de culture et en jours courts puis repiquées au bout de 7 jours sur la plateforme de phénotypage. Elles sont analysées pour différentes caractéristiques pendant 23 jours.

2) Analyse de la sénescence

Les feuilles des rosettes de plantes âgées de 2 mois (croissance en jours longs) sont prélevées, triées selon leur taille et disposées sur une feuille de papier blanche puis scannées. La quantification de la biomasse sénescence est réalisée sur ImageJ comme suit (protocole de Larry Reinking, Université de Millersville):

Image>type>8-bit

Analyse>Set Scale (la largeur de la feuille scannée par exemple)

Process>Binary>Make Binary (les parties vertes non sénescences de la feuille passent en noir)

Analyse>Analyse Particles (aire des parties non-sénescences)

Image>Ajust Threshold (permet de prendre en compte les parties jaunes des feuilles)

Analyse>Analyse Particles (aire total de la feuille)

3) Phénotypage des racines

Après stérilisation, les graines sont semées *in vitro* sur milieu solide ½ MS + vit 0,7% Phytoblend et les racines sont analysées 12 jours après germination avec le plugin NeuronJ du logiciel ImageJ. Les valeurs sont exprimées en pixel.

4) Test de germination

Le taux de germination d'1 lignée par génotype pour les mutants *rtl1-sail* et *rtl1-crispr* et des lignées isogéniques sauvages associées est analysé par Boris Collet (équipe Physiologie de la germination). Les semis sont placés à 25°C en jours continus. Le taux de germination est mesuré sur 30 à 50 graines en trois réplicats avec ou sans stratification de 48h à 4°C.

5) Analyse de la composition des graines

Les teneurs en lipide, protéine, carbone, azote et galactose d'un lot de 300 µg de graines par génotype pour les mutants *rtl1-sail* et *rtl1-crispr* et les lignées isogéniques sauvages associées sont analysées au NIRS de la plateforme de Spectroscopie de l'IJPB avec l'aide d'Alain Lecureuil (équipe Homéostasie Lipide-protéine dans la Graine). Les différentes équations utilisées ont été publiées par l'équipe HLG (Jasinski et al., 2016).

6) Microscopie confocale

Les analyses de localisation sont effectuées sur l'épiderme de feuilles de tabac agroinfiltrées ou sur les racines de semis *in vitro* d'*Arabidopsis* sur milieu de bouturage solide 1,3% S-Medium de Duchefa Biochimie (S0261.0010) et 1% Phyto Agar (P1003 Duchefa Biochemie) pH=5,9 5 jours après la germination en chambre de culture et en jours longs. Les signaux GFP, mCherry et RFP sont révélés au Leica TSC SP5 avec une immersion à l'eau et un objectif x10, x40 ou x63 avant et après un stress de 1h à 37°C en phytotron.

ANNEXES

I] Figures supplémentaires

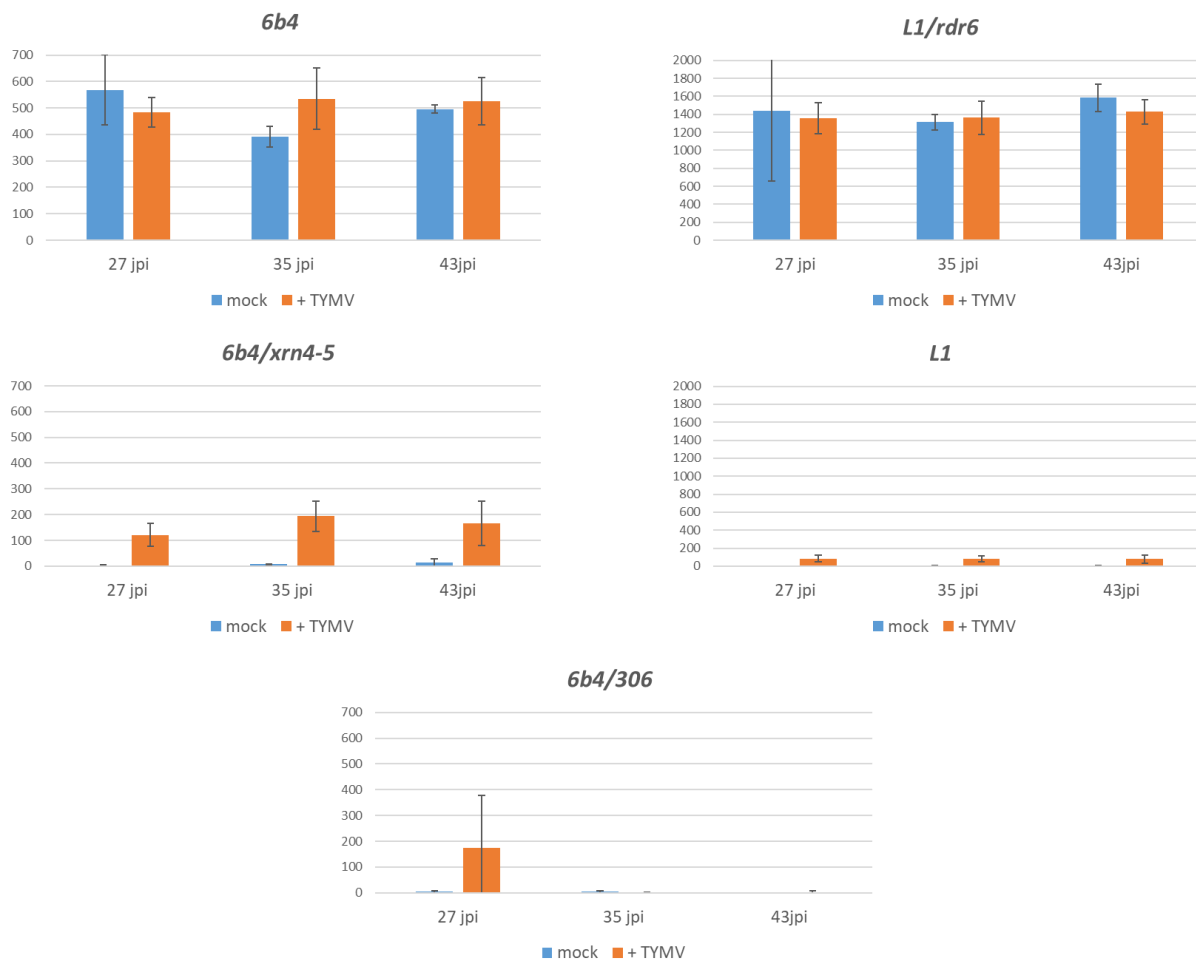


Figure S1 : Le TYMV inhibe le S-PTGS induit par déficience du RQC, a un faible effet sur le S-PTGS et pas d'effet sur l'IR-PTGS

Un pool de 16 plantes par génotype est infecté avec le TYMV en jours courts. L'activité GUS de chaque plante est analysée 27, 35 et 43 jours post-inoculation et est exprimée en unité arbitraire de fluorescence par minute par μg de protéine. La moyenne de l'activité GUS de 16 plantes par génotype est représentée et les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

Données brutes : Effet de la mutation *rtl1* sur l'expression de différents facteurs du PTGS lors de l'infection du TCV

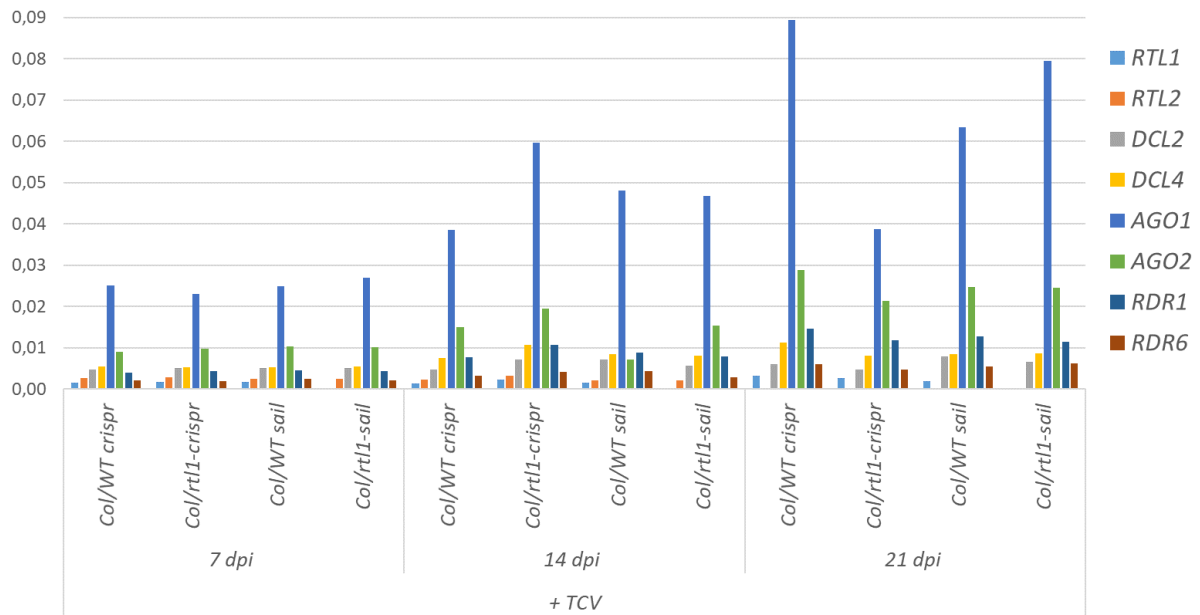


Figure S2 : La mutation *rtl1* n'a pas d'effet sur l'induction de l'expression de différents gènes du PTGS lors de l'infection du TCV

Les données brutes présentées sont issues de la quantification de l'expression des gènes *RTL1*, *RTL2*, *DCL2*, *DCL4*, *AGO2*, *AGO2*, *RDR1* et *RDR6* relative au gène contrôle *GAPDH* (formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$) par RT-qPCR sur un pool de 16 plantes/génotypes 7, 14 et 21 jours post-inoculation (dpi) avec le TCV.

| Gene IDs | Organisme | A | S | K _A | K _S | K _A /K _S |
|---|-----------------------------------|-------|-------|----------------|----------------|--------------------------------|
| <i>Araha.1062s0005.1</i> | <i>Arabidopsis harelli</i> | 606 | 186 | 0,0387 | 0,0854 | 0,4533 |
| <i>AL7G40150.1</i> | <i>Arabidopsis lyrata</i> | 609 | 183 | 0,0437 | 0,1143 | 0,3826 |
| <i>Bol005050 (primary)</i> | <i>Brassica oleracea capitata</i> | 600,3 | 182,7 | 0,2614 | 0,5184 | 0,5043 |
| <i>Brara.C04432.1</i> | <i>Brassica rapa FPsc</i> | 600,4 | 188,6 | 0,2661 | 0,4831 | 0,5509 |
| <i>Brara.A01997.1 (primary)</i> | <i>Brassica rapa FPsc</i> | 582,5 | 206,5 | 0,3193 | 0,5265 | 0,6065 |
| <i>Bostr.26326s0052.1 (primary)</i> | <i>Boechera stricta</i> | 591,1 | 200,9 | 0,1025 | 0,1257 | 0,8154 |
| <i>Ciclev10016164m (primary)</i> | <i>Citrus clementina</i> | 584,7 | 204,3 | 0,4568 | 5,4905 | 0,0832 |
| <i>Cagra.8085s0006.1 (primary)</i> | <i>Capsella grandiflora</i> | 597 | 195 | 0,2289 | 0,3791 | 0,6037 |
| <i>Cagra.8085s0007.1 (primary)</i> | <i>Capsella grandiflora</i> | 593,1 | 186,9 | 0,2336 | 0,5433 | 0,43 |
| <i>evm.model.supercontig_87.111 (primary)</i> | <i>Carica papaya</i> | 385,6 | 124,4 | 0,461 | 51,875 | 0,0089 |
| <i>Carubv10007185m (primary)</i> | <i>Capsella rubella</i> | 596,9 | 195,1 | 0,2385 | 0,3804 | 0,6268 |
| <i>Carubv10007521m (primary)</i> | <i>Capsella rubella</i> | 599,9 | 180,1 | 0,2411 | 0,5593 | 0,4312 |
| <i>Cucsa.148740.1 (primary)</i> | <i>Cucumis sativus</i> | 607 | 182 | 0,4314 | 3,2938 | 0,131 |
| <i>orange1.1g041023m (primary)</i> | <i>Citrus sinensis</i> | 582 | 192 | 0,4328 | 5,5385 | 0,0781 |
| <i>Eucgr.K00771.1 (primary)</i> | <i>Eucalyptus grandis</i> | 594,5 | 194,5 | 0,4856 | 51,2639 | 0,0095 |
| <i>Thhalv10025932m (primary)</i> | <i>Eutrema salsugineum</i> | 611 | 175 | 0,2545 | 0,5377 | 0,4732 |
| <i>mna23985.1-v1.0-hybrid (primary)</i> | <i>Fragaria vesca</i> | 598,9 | 187,1 | 0,4276 | 53,2374 | 0,008 |
| <i>mna06299.1-v1.0-hybrid (primary)</i> | <i>Fragaria vesca</i> | 601,8 | 178,2 | 0,5135 | 2,5495 | 0,2014 |
| <i>Gorai.001G215700.1 (primary)</i> | <i>Gossypium raimondii</i> | 596,1 | 186,9 | 0,4313 | 15,9683 | 0,027 |
| <i>Gorai.007G171400.2</i> | <i>Gossypium raimondii</i> | 86,1 | 146,9 | 0,5825 | 4,7316 | 0,1231 |
| <i>Gorai.007G171400.1</i> | <i>Gossypium raimondii</i> | 607,1 | 178,9 | 0,4547 | 3,421 | 0,1329 |
| <i>Kaladp0081s0404.1</i> | <i>Kalanchoe fedtschenkoi</i> | 602,7 | 183,3 | 0,5376 | 4,141 | 0,1298 |
| <i>Kaladp0114s0014.1 (primary)</i> | <i>Kalanchoe fedtschenkoi</i> | 591,4 | 185,6 | 0,5334 | 5,4557 | 0,0978 |
| <i>Kalax.0010s0130.1 (primary)</i> | <i>Kalanchoe laxiflora</i> | 600,6 | 185,4 | 0,5452 | 4,4685 | 0,122 |
| <i>Kalax.0687s0009.1 (primary)</i> | <i>Kalanchoe laxiflora</i> | 601,3 | 184,7 | 0,5383 | 5,1651 | 0,1042 |
| <i>Lus10015141 (primary)</i> | <i>Linum usitatissimum</i> | 412,4 | 148,6 | 0,39 | 47,9807 | 0,0081 |
| <i>Lus10000182 (primary)</i> | <i>Linum usitatissimum</i> | 561 | 177 | 0,454 | 3,5579 | 0,1276 |
| <i>MDP0000169234 (primary)</i> | <i>Malus domestica</i> | 596,5 | 183,5 | 0,403 | 2,8891 | 0,1395 |
| <i>MDP0000248673 (primary)</i> | <i>Malus domestica</i> | 608,7 | 174,3 | 0,4091 | 2,724 | 0,1502 |
| <i>MDP0000128997 (primary)</i> | <i>Malus domestica</i> | 297,8 | 83,2 | 0,3626 | 5,4919 | 0,66 |
| <i>Manes.13G068400.1</i> | <i>Manihot esculenta</i> | 600,9 | 188,1 | 0,4064 | 15,5539 | 0,0261 |
| <i>Migut.M01455.1 (primary)</i> | <i>Mimulus guttatus</i> | 597 | 186 | 0,5223 | 53,0387 | 0,0098 |
| <i>Medtr3g079980.1 (primary)</i> | <i>Medicago truncatula</i> | 599,8 | 183,2 | 0,3885 | 10,7375 | 0,0362 |
| <i>Medtr3g079860.1 (primary)</i> | <i>Medicago truncatula</i> | 613,1 | 187,9 | 0,455 | 6,295 | 0,0723 |
| <i>Prupe.3G213200.1 (primary)</i> | <i>Prunus persica</i> | 606,7 | 185,3 | 0,4343 | 3,2912 | 0,1319 |
| <i>Potri.002G226700.1 (primary)</i> | <i>Populus trichocarpa</i> | 595,8 | 193,2 | 0,4216 | 29,9969 | 0,0141 |
| <i>SapurVIA.0014s1090.1 (primary)</i> | <i>Salix purpurea</i> | 592,7 | 196,3 | 0,4112 | 51,0121 | 0,0081 |
| <i>SapurVIA.0014s1090.2</i> | <i>Salix purpurea</i> | 592,8 | 196,2 | 0,4146 | 51,0303 | 0,0081 |
| <i>PGSC0003DMT400053499 (primary)</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 604 | 185 | 0,5365 | 2,7807 | 0,1929 |
| <i>PGSC0003DMT400037835 (primary)</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 585 | 186 | 0,634 | 51,9004 | 0,0122 |
| <i>PGSC0003DMT400086351 (primary)</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | 43502 | 131,8 | 0,4983 | 54,2833 | 0,0092 |
| <i>Tp57577_TGAC_v2_mRNA37064 (primary)</i> | <i>Trifolium pratense</i> | 596,7 | 174,3 | 0,6449 | 6,3531 | 0,1015 |
| <i>Tp57577_TGAC_v2_mRNA28540 (primary)</i> | <i>Trifolium pratense</i> | 315,3 | 86,7 | 0,3721 | 13,0106 | 0,0283 |
| <i>GSVIVT01030481001 (primary)</i> | <i>Vitis vinifera</i> | 592,3 | 196,7 | 0,4529 | 3,2376 | 0,1399 |

Tableau S1: Analyse du ratio taux de mutation non-synonymes sur le taux de mutation synonymes entre la séquence RTL1 d'A. thaliana et différentes espèces d'Eucotylédones

Le gène RTL1 D'A. thaliana est blasté sur Phytozome aux Eucotylédones. Les séquences homologues présentant une homologie d'au moins 50% et une E-value <1e-30 sont sélectionnées (Legrand et al., 2019). Les séquences protéiques sont blastées deux à deux à la séquence protéique de RTL1 sur Clustal Omega. Le ratio K_A/ K_S est calculé sur PAL2NAL (Suyama et al., 2006) selon la méthode de Goldman and Yang, 1994. A : nombre de mutation non-synonymes ; S : nombre de mutation synonymes ; K_A : taux de mutation non-synonymes ; K_S : taux de mutation synonymes

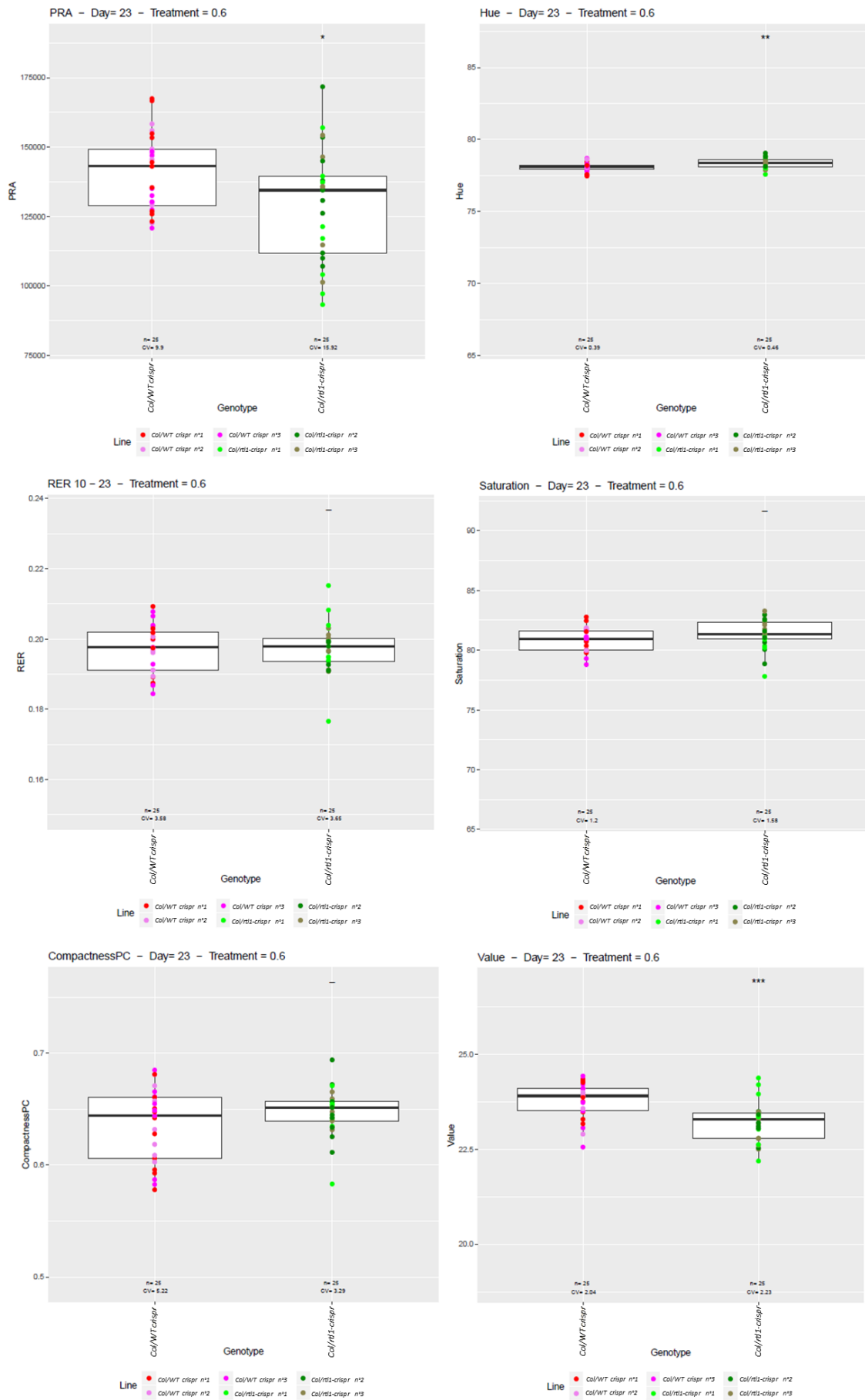


Figure S3 : Effet de la mutation rtl1-crispr sur différents paramètre de la rosette
 Effectuée par la plateforme Phénoscope de l'IJPB. Voir légende en partie III.

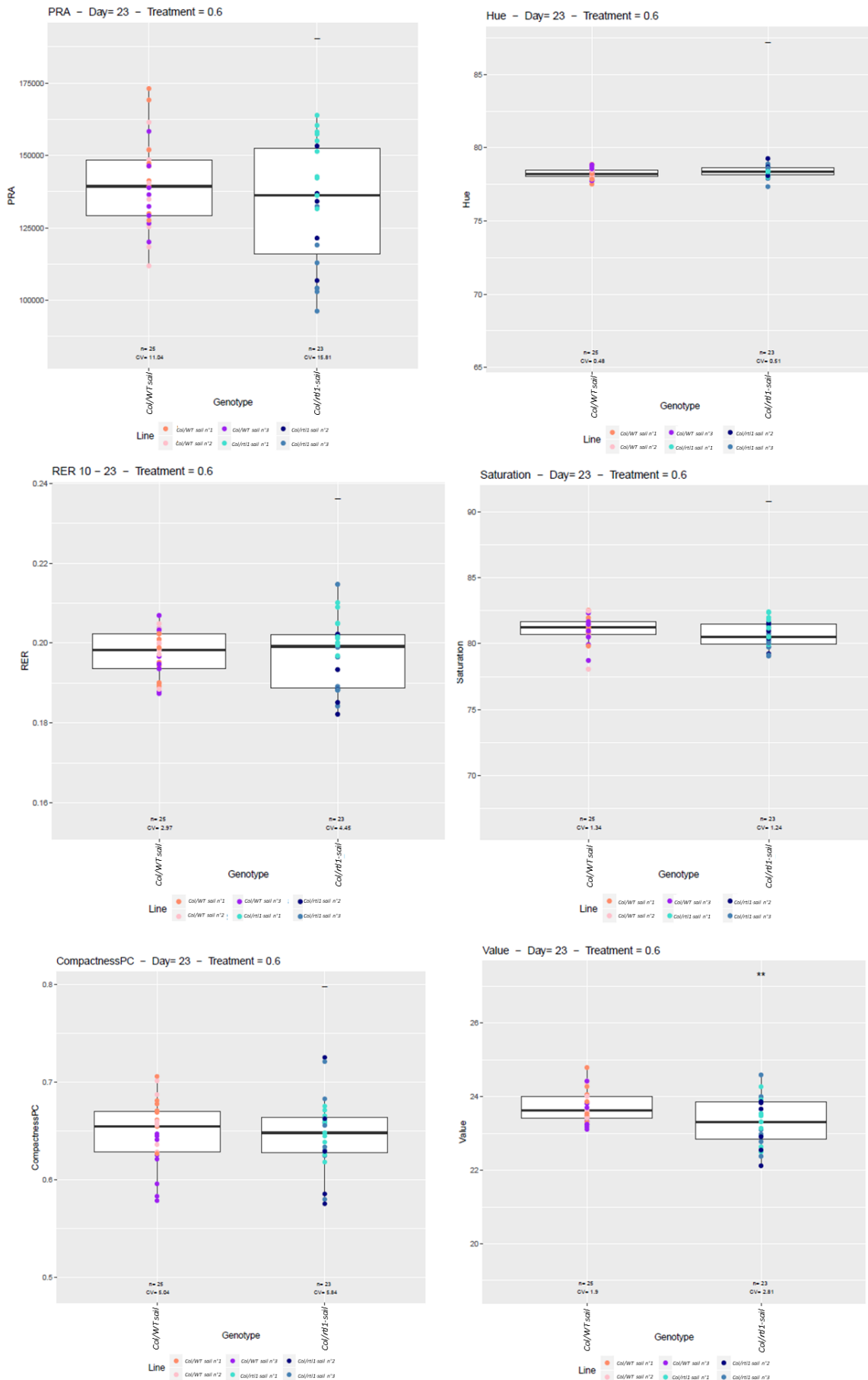


Figure S4 : Effet de la mutation *rtl1-sail* sur différents paramètre de la rosette
 Effectuée par la plateforme Phénoscope de l'IJPB. Voir légende en partie III.

II] Tableau des primers

| Gène ou ORF | But | Nom du primer | Séquence du primer |
|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|---|
| <i>RTL1</i> | RT-qPCR | RTL1-7 | CCAAAACCATCGGATCAGCGG |
| | | RTL1-qPCR-5R | CAACGGACCAGGTGCTTCTT |
| | Génotypage allèle CRISPR | RTL1 sail seq F | CTCCTCAAACCCACCTCTTG |
| | | RTL1 CRISPR 30-2 | ACGCTTTCAGCAACAACTC |
| | Génotypage allèle SAIL | gabi747b05-f | GAAGTGTCAAACAGAGGAAG |
| | | LB4 | CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAA GCGTC |
| RTL6mR | | CGAATCTCCTAAAAGCCATAGGAGTTCGT ACG | |
| <i>GAPDH</i> | RT-qPCR | 461 | GGTACGACAACGAATGGGGT |
| | | 462 | TGACTGCGCATGGAATCAGT |
| <i>TYMV P69</i> | RT-qPCR | TYMV-ORF1-F | TCGCTCCTCGATACAGACCT |
| | | TYMV-ORF1-R | CTTCAGCTCCCGAAAGTTTG |
| | clonage, pour fusion N-ter | TYMV-P69-F1 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TACATGAGTAACGGCCTTCCAATTAGCA |
| | | TYMV-P69-R1bis | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCAATCGGTGTCGGGGGCGC |
| | clonage, pour fusion C-ter | TYMV-P69-F2 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TACCATGAGTAACGGCCTTCCAATTAGCA |
| | | TYMV-P69-R2bis | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AATCGGTGTCGGGGGCGCT |
| clonage P69 et sonde northern | TYMV-P69-F2 + TYMV-P69-R1bis | | |
| <i>GFP</i> | sonde northern | GFP-TuMV-1 | TCTGTCAGTGGAGAGGGTGAA |
| | | GFP-TuMV-2 | GAAAGGGCAGATTGTGTGGAC |
| <i>TAS1</i> siRNAs | | TAS1_miR175 | TACGCTATGTTGGACTTAGAA |
| <i>TAS2</i> siRNAs | | TAS2_as_F | AAGTATCATCATTTCGCTTGGA |
| <i>TAS3</i> siRNAs | | asTAS3 5'D7+ | TGGGGTCTTACAAGGTCAAGA |
| <i>IR71</i> siRNAs | | IR71-as | TCCTTCCCTTTCCTTCTAC |
| <i>PDS</i> | | T7 PDS 5' | GCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGGCA AGACGATATAACTGAAC |
| | | PDS 5862r | CATTTACTGAAGAGAGTAAGG |
| <i>SULPHUR</i> | | SUL_5pFor | TCTGCAATCTGGGCTTCTCCT |
| | | SUL_3pRev | TCGGCGAACTTCTCGGAACT |
| TCV CP | | TCV-CP T7 | GATGCTAATACGACTCACTATAGGGATGG AAAATGATCCTAGAGT |
| | | TCV-CP T3 | GATGCATTAACCCTCACTAAAGGGACTAA ATTCTGAGTGCTTGCA |
| TYMV CP | | TYMV-CP-F2 | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TACCATGGAAATCGACAAAGAAGCTCG |
| | | TYMV-CP-R1bis | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TTAGGTGGAAGTGTCCGTGA |

| | | | |
|----------------|---------|---------------|---------------------------|
| <i>TuMV CP</i> | | CP-TuMV-1 | ACACACGTTCAACGCGAAAAG |
| | | CP-TuMV-2 | CCCTGAACGCCCAGTAAGTT |
| <i>5'GUS</i> | | GUS-5'-fw | AACTGTGGAATTGATCAGCG |
| | | GUS-5'-rev | CGCGACATGCGTCACCACGG |
| <i>RTL2</i> | RT-qPCR | RTL2-3 | CTCAAGGCTCTAATCATGTG |
| | | RTL2-10 | GATATCGCAAGGCTGATCGCTGC |
| <i>DCL2</i> | | DCL2-qPCR-fw | TGTCAACTCTCTCACAGGATGC |
| | | DCL2-qPCR-rev | TGCAATCCACTTTCGGATGG |
| <i>DCL4</i> | | DCL4-qPCR-fw | GCTGCACCTTCTTCGTTGC |
| | | DCL4-qPCR-rev | GCAAAACCGCAAAATCCCTCT |
| <i>AGO1</i> | | AGO1-qPCR-1 | AAGGAGGTCGAGGAGGGTATGG |
| | | AGO1-qPCR-2 | CAAATTGCTGAGCCAGAACAGTAGG |
| <i>AGO2</i> | | AGO2-qPCR-1 | GAAGGATGTACCACGAGGCAA |
| | | AGO2-qPCR-2 | TGAAGAGGCAAGCGAAGCA |
| <i>RDR1</i> | | RDR1-qPCR-1 | AAGAGCGGTTTCGGGCGTTGA |
| | | RDR1-qPCR-2 | AGCCGAAGCCTTTGCTGACTCA |
| <i>RDR6</i> | | RDR6-qPCR-1 | AAAGCTATCCGGCCATGCAT |
| | | RDR6-qPCR-2 | TGACAGCACGGCCTAAACTCTT |

III] Abréviations couramment utilisées

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| AGO | ARGONAUTE |
| AS-PTGS | antisens PTGS |
| BWYV | <i>Beet western yellow virus</i> |
| CaMV | <i>Cauliflower mosaic virus</i> |
| CP | COAT PROTEIN |
| DCL | DICER-LIKE |
| dsRNA | double-stranded RNA |
| endoIR-siRNA | Endogenous Inverse Repeat siRNA |
| IR-PTGS | Inverse Repeat PTGS |
| GFP | GREEN FLUORESCENT PROTEIN |
| GUS (UIDA) | BETA-GLUCURONIDASE |
| HPT | HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE |
| mRNA | messenger RNA |
| NPT | NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE |
| NOS | NOPALINE SYNTHASE |
| NIR | NITRITE REDUCTASE |
| -nt | nucléotide |
| PB | Processing-bodies |
| Pol | POLYMERASE |
| PVX | <i>Potato virus X</i> |
| PTGS | Post-Transcriptional Gene Silencing |
| RdDM | RNA-Directed DNA Methylation |
| RDR | RNA-Dependant RNA POLYMERASE |
| RNAi | RNA interference |
| RQC | RNA Quality Control |
| RTL | RNase-THREE LIKE |
| SB | siRNA-bodies |
| SG | Stress Granules |
| SGS | SUPRESSOR OF GENE SILENCING |
| siRNA | short interfering RNA |
| S-PTGS | Sens-PTGS |
| ssRNA | single-stranded RNA |
| SUL | SULPHUR |
| ta-siRNA | trans acting siRNA |
| TCV | <i>Turnip crinckle virus</i> |
| TBSV | <i>Tomato bushy stunt virus</i> |
| TE | Transposable Element |
| TGS | Transcriptional Gene Silencing |
| TMV | <i>Tobacco mosaic virus</i> |
| TRV | <i>Tobacco rattle virus</i> |
| TuMV | <i>Turnip mosaic virus</i> |
| TYMV | <i>Turnip yellow mosaic virus</i> |
| VSR | Viral Suppressor of RNAi |

IV] Table des figures

| | |
|--|-----|
| <i>Figure 1 : Première observation du silencing induit par un transgène</i> | 16 |
| <i>Figure 2 : Phénotype des pétunias Red Star</i> | 16 |
| <i>Figure 3 : Première mise en évidence du phénomène de recovery</i> | 27 |
| <i>Figure 4 : Modèle simplifié du RNA silencing chez les plantes</i> | 32 |
| <i>Figure 5 : Structure des protéines DICER-LIKE chez Arabidopsis thaliana</i> | 38 |
| <i>Figure 6 : Voie de biosynthèse des miRNAs et siRNAs endogènes chez Arabidopsis thaliana</i> | 42 |
| <i>Figure 7 : Voie de la RdRM canonique chez Arabidopsis thaliana</i> | 44 |
| <i>Figure 8 : Effet de la mutation et de la sur-expression de RTL1 sur l'infection du TuMV</i> | 66 |
| <i>Figure 9 : RTL1 bloque la propagation du TuMV délété de son VSR</i> | 72 |
| <i>Figure 10 : RTL1 bloque l'accumulation des ARNs issus TuMV délété de son VSR</i> | 72 |
| <i>Figure 11 : Le TuMV-AS9-GFP est capable de se propager du porte-greffe au greffon dcl2/dcl4</i> | 74 |
| <i>Figure 12 : Symptômes provoquées par le TCV et le TYMV sur des Arabidopsis sauvages</i> | 78 |
| <i>Figure 13 : Symptômes provoqués par le TYMV sur différents mutants du RNAi</i> | 78 |
| <i>Figure 14 : Analyse de l'accumulation des siRNAs et mRNAs viraux chez les mutants du RNAi infectés par le TYMV</i> | 80 |
| <i>Figure 15 : Le TYMV s'accumule plus chez les mutants du RNAi hypersensibles à l'infection</i> | 80 |
| <i>Figure 16 : Structure de l'insertion T-DNA des lignées transgéniques p35S:GUS et p35S:hpGUS utilisées</i> | 82 |
| <i>Figure 17 : Probabilité de déclenchement de silencing chez les lignées transgéniques p35S:GUS et p35S:hpGUS sauvages et mutantes utilisées</i> | 82 |
| <i>Figure 18 : L'infection par le TYMV lève le silencing du transgène chez les lignées 6b4/xrn4, a un faible effet chez L1 et aucun chez 6b4/306</i> | 84 |
| <i>Figure 19 : L'infection par le TYMV lève le silencing de 6b4 uniquement en fond RQC-déficient</i> | 86 |
| <i>Figure 20 : L'infection par le TYMV lève le silencing de la lignée L1 indépendamment des mutations du RQC</i> | 88 |
| <i>Figure 21 : L'infection par le TYMV supprime le silencing chez Hc1</i> | 88 |
| <i>Figure 22 : L'expression de P69 in planta lève le silencing de 6b4 induit en fond RQC-déficient et n'a pas d'effet sur l'IR-PTGS de 6b4/306</i> | 90 |
| <i>Figure 23 : L'expression de P69 in planta induit une diminution de l'accumulation des TAS siRNAs</i> | 92 |
| <i>Figure 24 : L'expression de P69 n'a pas d'effet sur l'accumulation des siRNAs PDS dans la lignée JAP3</i> | 94 |
| <i>Figure 25 : P69 a une localisation cytoplasmique et nucléaire</i> | 94 |
| <i>Figure 26 : P69 forme des granules en condition de stress chaud et colocalise avec PAB2 (figure 1/2)</i> | 96 |
| <i>Figure 27 : P69 forme des granules en condition de stress chaud et colocalise avec PAB2 (figure 2/2)</i> | 99 |
| <i>Figure 28 : P69 forme des granules en condition de stress chaud et colocalise avec SG3 (figure 1/2)</i> | 100 |
| <i>Figure 29 : P69 forme des granules en condition de stress chaud et colocalise avec SG3 (figure 2/2)</i> | 103 |
| <i>Figure 30 : Schéma de l'insertion T-DNA dans le mutant rtl1-sail 337F04 et de la mutation CRISPR chez le mutant rtl1-crispr</i> | 104 |
| <i>Figure 31 : L'expression de RTL1 n'est pas induite par l'infection du TYMV chez rtl1-sail</i> | 106 |
| <i>Figure 32 : La mutation rtl1 favorise la production des siRNAs et ralentie la réplication du TYMV</i> 106 | |
| <i>Figure 33 : La mutation rtl1 n'a pas d'effet sur l'expression de différents facteurs du PTGS anti-viral</i> | 108 |
| <i>Figure 34 : RTL1 clive les siRNAs SUL</i> | 110 |

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 35 : RTL1 n'est pas localisée dans les chloroplastes</i> | 112 |
| <i>Figure 36 : RTL1 colocalise avec SGS3 en condition de stress chaud</i> | 114 |
| <i>Figure 37 : Symptômes et effets de l'infection par le TRV, le CaMV et le TuMV sur le S-PTGS, l'IR-PTGS et le S-PTGS induit en fond RQC-déficient</i> | 118 |
| <i>Figure 38 : Effet de l'absence et de la sur-expression de RTL1 les symptômes induits par l'infection du TRV et du CaMV</i> | 120 |
| <i>Figure 39 : Profil d'expression de RTL1 chez Arabidopsis thaliana (données du site bar.utoronto.ca)</i> | 122 |
| <i>Figure 40 : La mutation rtl1 induit une variabilité intra-lignée du PRA</i> | 124 |
| <i>Figure 41 : La mutation rtl1 n'a pas d'effet sur la compaction de la rosette</i> | 124 |
| <i>Figure 42 : Illustration des composants HSV (Source Wikipédia)</i> | 125 |
| <i>Figure 43 : La mutation rtl1 n'a pas d'effet sur le taux d'expansion de la rosette</i> | 126 |
| <i>Figure 44 : La mutation rtl1 n'a pas d'effet clair sur la teinte des feuilles de la rosette</i> | 126 |
| <i>Figure 45 : La mutation rtl1 n'a pas d'effet sur la saturation des feuilles de la rosette</i> | 128 |
| <i>Figure 46 : La mutation rtl1 induit un éclat plus fort et variable de la rosette</i> | 128 |
| <i>Figure 47: Analyse du phénotype de senescence chez les plantes sauvages et rtl1 mutantes</i> | 130 |
| <i>Figure 48 : La mutation rtl1 n'a pas d'effet sur la quantité de biomasse sénescente</i> | 130 |
| <i>Figure 49 : La mutation rtl1 augmente le poids des graines</i> | 132 |
| <i>Figure 50 : La mutation rtl1 n'affecte pas la composition de la graine</i> | 132 |
| <i>Figure 51 : La mutation rtl1 n'affecte pas le taux de germination des graines</i> | 134 |
| <i>Figure 52 : La mutation rtl1 n'affecte pas le taux de transmission du TYMV par la graine</i> | 136 |
| <i>Figure 53 : La dérégulation de RTL1 ne modifie pas l'effet de la mutation osd1</i> | 138 |
| <i>Figure 54 : La mutation rtl1 n'affecte pas la vigueur hybride</i> | 140 |
| <i>Figure 55 : Effet de la mutation rtl1 sur la longueur de la racine principale</i> | 142 |
| <i>Figure 56 : La mutation rtl1 n'a pas d'effet sur l'accumulation des ta-siRNAs et des endoIR-siRNAs dans les racines</i> | 144 |
| <i>Figure 57 : La mutation rtl1 induit le silencing de la lignée Hc1 en fond Ler</i> | 146 |
| <i>Figure 58 : L'expression de RTL1 est similaire dans les feuilles et les fleurs des accessions Col et Ler</i> | 146 |
| <i>Figure 59 : La mutation rtl1 n'affecte pas la longueur de la racine principale de différents accessions d'Arabidopsis</i> | 148 |
| <i>Figure 60 : Effet de la mutation rtl1 sur le développement de différentes accessions d'Arabidopsis</i> 150 | |
| <i>Figure 61 : La mutation rtl1 affecte le poids des graines chez différentes accessions d'A. thaliana</i> . | 152 |
| <i>Figure 62 : "Major RNA regulatory processes in plant cells" de la review Mäkinen et al 2017</i> | 170 |
| <i>Figure 63 : Modèle du RNAi dirigé contre le TYMV</i> | 176 |
| <i>Figure 64 : Comparaison de la séquence RTL1 chez Col-0 et Ler-0 (données 1001 Génome, browser Salk)</i> | 184 |
| <i>Figure 65 : Les SNPs présents dans la séquence RTL1 de Ler-0 sont des substitutions synonymes</i> . | 186 |

V] Table des tableaux

| | |
|--|------------|
| <i>Tableau 1 : Mode d'action de différents VSR sur le RNAi et sur l'activité de RTL1</i> | <i>64</i> |
| <i>Tableau 2 : Lignées transgéniques et mutantes utilisées au cours de cette thèse</i> | <i>194</i> |
| <i>Tableau SI: Analyse du ratio taux de mutation non-synonymes sur le taux de mutation synonymes entre la séquence RTL1 d'<i>A. thaliana</i> et différentes espèces d'<i>Eucotylédones</i></i> | <i>214</i> |

VI] Références

- Abel, P.P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., and Beachy, R.N.** (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* (80-.). **232**: 738–743.
- Aceves-García, P., Álvarez-Buylla, E.R., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Muñoz, R., and Sánchez, M. de la P.** (2016). Root Architecture Diversity and Meristem Dynamics in Different Populations of *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **7**: 1–14.
- Achard, P. and Genschik, P.** (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **60**: 1085–1092.
- Adenot, X., Elmayan, T., Lauressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V., and Vaucheret, H.** (2006). DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Curr. Biol.* **16**: 927–932.
- Agorio, A. and Vera, P.** (2007). ARGONAUTE4 Is Required for Resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3778–3790.
- Aguilar, E., Almendral, D., Allende, L., Pacheco, R., Chung, B.N., Canto, T., and Tenllado, F.** (2015). The P25 Protein of Potato Virus X (PVX) Is the Main Pathogenicity Determinant Responsible for Systemic Necrosis in PVX-Associated Synergisms. *J. Virol.* **89**: 2090–2103.
- Aliyari, R., Wu, Q., Li, H.-W., Wang, X.-H., Li, F., Green, L.D., Han, C.S., Li, W.-X., and Ding, S.-W.** (2008). Mechanism of Induction and Suppression of Antiviral Immunity Directed by Virus-Derived Small RNAs in *Drosophila*. *Cell Host Microbe* **4**: 387–397.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C.** (2005). microRNA-Directed Phasing during Trans-Acting siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* **121**: 207–221.
- Amasino, R.M., Powell, A.L.T., and Gordon, M.P.** (1984). Changes in T-DNA methylation and expression are associated with phenotypic variation and plant regeneration in a crown gall tumor line. *Mol. Gen. Genet. MGG* **197**: 437–446.
- Ambros, V.** (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**: 277–279.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V.B.** (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* (80-.). **290**: 142–144.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B.** (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 13079–13084.
- Aravin, A. and Tuschl, T.** (2005). Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett.* **579**: 5830–5840.
- Aregger, M., Borah, B.K., Seguin, J., Rajeswaran, R., Gubaeva, E.G., Zvereva, A.S., Windels, D., Vazquez, F., Blevins, T., Farinelli, L., and Pooggin, M.M.** (2012). Primary and Secondary siRNAs in Geminivirus-induced Gene Silencing. *PLoS Pathog.* **8**: e1002941.
- de Assis Filho, F.M. and Sherwood, J.L.** (2000). Evaluation of Seed Transmission of Turnip yellow mosaic virus and Tobacco mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*® **90**: 1233–1238.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R., and Bartel, D.P.** (2006). A Two-Hit Trigger for siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* **127**: 565–577.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., Lagrange, T., and Voinnet, O.** (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.* **24**: 904–915.

- Bajczyk, M., Bhat, S.S., Szewc, L., Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A., and Dolata, J.** (2019). Novel Nuclear Functions of Arabidopsis ARGONAUTE1: Beyond RNA Interference. *Plant Physiol.* **179**: 1030–1039.
- Ballut, L., Drucker, M., Pugnère, M., Cambon, F., Blanc, S., Roquet, F., Candresse, T., Schmid, H.P., Nicolas, P., Le Gall, O., and Badaoui, S.** (2005). HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *J. Gen. Virol.* **86**: 2595–2603.
- Bamford, D.H., Grimes, J.M., and Stuart, D.I.** (2005). What does structure tell us about virus evolution? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**: 655–663.
- Barton, K.A., Binns, A.N., Matzke, A.J.M., and Chilton, M.D.** (1983). Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* **32**: 1033–1043.
- Baulcombe, D.** (1994). Replicase-mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants? *Trends Microbiol.* **2**: 60–63.
- Baulcombe, D.C.** (1996). Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *Plant Cell* **8**: 1833–1844.
- Baulcombe, D.C. and Dean, C.** (2014). Epigenetic Regulation in Plant Responses to the Environment. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**: a019471–a019471.
- Baulcombe, D.C. and English, J.J.** (1996). Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 173–180.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D.C.** (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 11928–11933.
- Baumberger, N., Tsai, C.-H., Lie, M., Havecker, E., and Baulcombe, D.C.** (2007). The Ploverovirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Curr. Biol.* **17**: 1609–1614.
- Bayne, E.H., Rakitina, D. V., Morozov, S.Y., and Baulcombe, D.C.** (2005). Cell-to-cell movement of Potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J.* **44**: 471–482.
- Beauchemin, C., Boutet, N., and Laliberté, J.-F.** (2007). Visualization of the Interaction between the Precursors of VPg, the Viral Protein Linked to the Genome of Turnip Mosaic Virus, and the Translation Eukaryotic Initiation Factor iso 4E In Planta. *J. Virol.* **81**: 775–782.
- Beauchemin, C. and Laliberté, J.-F.** (2007). The Poly(A) Binding Protein Is Internalized in Virus-Induced Vesicles or Redistributed to the Nucleolus during Turnip Mosaic Virus Infection. *J. Virol.* **81**: 10905–10913.
- Béclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P., and Vaucheret, H.** (2002). A Branched Pathway for Transgene-Induced RNA Silencing in Plants. *Curr. Biol.* **12**: 684–688.
- Beijerinck, M.W.** (1898). Concerning a contagium viwm fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. In *Koninklijke Nederlandsche Akademie van Wetenschappen Proceedings*, vol. 1, pp. 170–176.
- Belmonte, M.F. et al.** (2013). Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the Arabidopsis seed. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: E435–E444.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363–366.
- Bevan, M.W., Flavell, R.B., and Chilton, M.D.** (1992). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. 1983. *Biotechnology* **24**: 367–70.
- Bhatnagar, S.P. and Johri, B.M.** (1972). DEVELOPMENT OF ANGIOSPERM SEEDS. In *Seed Biology* (Elsevier), pp. 77–149.
- Bhattacharjee, S., Zamora, A., Azhar, M.T., Sacco, M.A., Lambert, L.H., and Moffett, P.** (2009). Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *Plant J.* **58**: 940–951.

- Blevins, T., Podicheti, R., Mishra, V., Marasco, M., Wang, J., Rusch, D., Tang, H., and Pikaard, C.S.** (2015). Identification of pol IV and RDR2-dependent precursors of 24 nt siRNAs guiding de novo DNA methylation in arabidopsis. *Elife* **4**: 1–22.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Aregger, M., Borah, B.K., Schepetilnikov, M., Baerlocher, L., Farinelli, L., Meins, F., Hohn, T., and Pooggin, M.M.** (2011). Massive production of small RNAs from a non-coding region of Cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense. *Nucleic Acids Res.* **39**: 5003–5014.
- Van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J.N.M., and Kooter, J.M.** (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* **6**: 861–877.
- Boccarda, M., Sarazin, A., Thiébeauld, O., Jay, F., Voinnet, O., Navarro, L., and Colot, V.** (2014). The Arabidopsis miR472-RDR6 Silencing Pathway Modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-transcriptional Control of Disease Resistance Genes. *PLoS Pathog.* **10**: e1003883.
- Bohmert, K.** (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* **17**: 170–180.
- Bollman, K.M.** (2003). HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* **130**: 1493–1504.
- Bologna, N.G., Iselin, R., Abriata, L.A., Sarazin, A., Pumplun, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M., and Voinnet, O.** (2018). Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Mol. Cell* **69**: 709-719.e5.
- Bologna, N.G. and Voinnet, O.** (2014). The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**: 473–503.
- Borges, F. and Martienssen, R.A.** (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 727–741.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., and Zhu, J.-K.** (2005). Endogenous siRNAs Derived from a Pair of Natural cis-Antisense Transcripts Regulate Salt Tolerance in Arabidopsis. *Cell* **123**: 1279–1291.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., and Ziegler-Graff, V.** (2007). The Ploverovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing. *Curr. Biol.* **17**: 1615–1621.
- Bouché, N., Laressergues, D., Gascioli, V., and Vaucheret, H.** (2006). An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J.* **25**: 3347–3356.
- Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Béclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Crété, P., Chen, X., and Vaucheret, H.** (2003). Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr. Biol.* **13**: 843–8.
- 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.
- Brand, L., Hörler, M., Nüesch, E., Vassalli, S., Barrell, P., Yang, W., Jefferson, R.A., Grossniklaus, U., and Curtis, M.D.** (2006). A Versatile and Reliable Two-Component System for Tissue-Specific Gene Induction in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **141**: 1194–1204.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., and Voinnet, O.** (2008). Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science* (80-.). **320**: 1185–1190.
- Brosseau, C., Bolaji, A., Roussin-Léveillé, C., Zhao, Z., Biga, S., and Moffett, P.** (2020). Natural variation in the Arabidopsis AGO2 gene is associated with susceptibility to potato virus X. *New Phytol.* **226**: 866–878.
- Brosseau, C. and Moffett, P.** (2015). Functional and Genetic Analysis Identify a Role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in Antiviral RNA Silencing. *Plant Cell* **27**: 1742–1754.

- Brosseau, C., El Oirdi, M., Adurogbangba, A., Ma, X., and Moffett, P.** (2016). Antiviral defense involves AGO4 in an Arabidopsis-potexvirus interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **29**: 878–888.
- Brusslan, J.A., Bonora, G., Rus-Canterbury, A.M., Tariq, F., Jaroszewicz, A., and Pellegrini, M.** (2015). A Genome-Wide Chronological Study of Gene Expression and Two Histone Modifications, H3K4me3 and H3K9ac, during Developmental Leaf Senescence. *Plant Physiol.* **168**: 1246–1261.
- Burgyán, J. and Havelda, Z.** (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* **16**: 265–272.
- Camagna, M. and Takemoto, D.** (2018). Hypersensitive Response in Plants. In *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK), pp. 1–7.
- 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.
- Cao, M., Du, P., Wang, X., Yu, Y.-Q., Qiu, Y.-H., Li, W., Gal-On, A., Zhou, C., Li, Y., and Ding, S.-W.** (2014). Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 14613–14618.
- Carbonell, A. and Carrington, J.C.** (2015). Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**: 111–117.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., and Hannon, G.J.** (2002). The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* **16**: 2733–2742.
- Carrington, J.C. and Herndon, K.L.** (1992). Characterization of the potyviral HC-pro autoproteolytic cleavage site. *Virology* **187**: 308–315.
- de Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., Van Montagu, M., Inzé, D., and Castresana, C.** (1992). Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J.* **11**: 2595–2602.
- de Carvalho Niebel, F., Frendo, P., Montagu, M. Van, and Cornelissen, M.** (1995). Post-Transcriptional Cosuppression of b-1,3-Glucanase Genes Does Not Affect Accumulation of Transgene Nuclear mRNA. *Plant Cell* **7**: 347.
- Castel, S.E. and Martienssen, R.A.** (2013). RNA interference in the nucleus: Roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **14**: 100–112.
- Castillo-González, C., Liu, X., Huang, C., Zhao, C., Ma, Z., Hu, T., Sun, F., Zhou, Y., Zhou, X., Wang, X.-J., and Zhang, X.** (2015). Geminivirus-encoded TrAP suppressor inhibits the histone methyltransferase SUVH4/KYP to counter host defense. *Elife* **4**: 1–31.
- Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N.** (1974). Genome Construction Between Bacterial Species In Vitro: Replication and Expression of Staphylococcus Plasmid Genes in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**: 1030–1034.
- Chapman, E.J.** (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* **18**: 1179–1186.
- Charbonnel, C. et al.** (2017). The siRNA suppressor RTL1 is redox-regulated through glutathionylation of a conserved cysteine in the double-stranded-RNA-binding domain. *Nucleic Acids Res.* **45**: 11891–11907.
- Chellappan, P., Xia, J., Zhou, X., Gao, S., Zhang, X., Coutino, G., Vazquez, F., Zhang, W., and Jin, H.** (2010). siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Res.* **38**: 6883–6894.
- Chen, D.-H., Huang, Y., Jiang, C., and Si, J.-P.** (2018). Chromatin-Based Regulation of Plant Root Development. *Front. Plant Sci.* **9**: 1–12.
- Chen, H.-M., Chen, L.-T., Patel, K., Li, Y.-H., Baulcombe, D.C., and Wu, S.-H.** (2010). 22-nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 15269–15274.
- Chen, J., Li, W.X., Xie, D., Peng, J.R., and Ding, S.W.** (2004). Viral Virulence Protein Suppresses RNA Silencing-Mediated Defense but Upregulates the Role of MicroRNA in Host Gene Expression. *Plant Cell* **16**: 1302–1313.

- Chen, X., Lu, L., Mayer, K.S., Scalf, M., Qian, S., Lomax, A., Smith, L.M., and Zhong, X.** (2016). POWERDRESS interacts with HISTONE DEACETYLASE 9 to promote aging in Arabidopsis. *Elife* **5**: 1–23.
- Cheng, X. and Wang, A.** (2017). The Potyvirus Silencing Suppressor Protein VPg Mediates Degradation of SGS3 via Ubiquitination and Autophagy Pathways. *J. Virol.* **91**: e01478-16.
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., and Nester, E.W.** (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**: 263–271.
- Chiu, M.-H., Chen, I.-H., Baulcombe, D.C., and Tsai, C.-H.** (2010). The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.* **11**: no-no.
- Cho, E.J., Choi, S.H., Kim, J.H., Kim, J.E., Lee, M.H., Chung, B.Y., Woo, H.R., and Kim, J.H.** (2016). A mutation in plant-specific SWI2/SNF2-Like chromatin-remodeling proteins, DRD1 and DDM1, delays leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **11**: e0146826.
- Chuang, C.-F. and Meyerowitz, E.M.** (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 4985–4990.
- De Cillia, J., Mütterer, J., Bortolamiol-Bécet, D., and Ziegler-Graff, V.** (2010). Les Polérovirus: Mouvement vasculaire et suppression du RNA silencing. *Virologie* **14**: 377–392.
- Clavel, M., Péliissier, T., Montavon, T., Tschopp, M.-A., Pouch-Péliissier, M.-N., Descombin, J., Jean, V., Dunoyer, P., Bousquet-Antonelli, C., and Deragon, J.-M.** (2016). Evolutionary history of double-stranded RNA binding proteins in plants: identification of new cofactors involved in easiRNA biogenesis. *Plant Mol. Biol.* **91**: 131–147.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Clough, S.J., Tuteja, J.H., Li, M., Marek, L.F., Shoemaker, R.C., and Vodkin, L.O.** (2004). Features of a 103-kb gene-rich region in soybean include an inverted perfect repeat cluster of CHS genes comprising the I locus. *Genome* **47**: 819–831.
- Coen, E.S. and Carpenter, R.** (1988). A semi-dominant allele, niv-525, acts in trans to inhibit expression of its wild-type homologue in Antirrhinum majus. *EMBO J.* **7**: 877–883.
- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U., and Macino, G.** (1996). Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of Neurospora is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* **15**: 3153–3163.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., and Helling, R.B.** (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**: 3240–3244.
- Collins, R.E. and Cheng, X.** (2005). Structural domains in RNAi. *FEBS Lett.* **579**: 5841–5849.
- Comella, P., Pontvianne, F., Lahmy, S., Vignols, F., Barbezier, N., DeBures, A., Jobet, E., Brugidou, E., Echeverria, M., and Sáez-Vásquez, J.** (2008). Characterization of a ribonuclease III-like protein required for cleavage of the pre-rRNA in the 3'ETS in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* **36**: 1163–1175.
- Copeland, N.G., Zelenetz, A.D., and Cooper, G.M.** (1979). Transformation of NIH/3T3 mouse cells by DNA of Rous sarcoma virus. *Cell* **17**: 993–1002.
- Cottrell, T.R. and Doering, T.L.** (2003). Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. *Trends Microbiol.* **11**: 37–43.
- Creasey, K.M., Zhai, J., Borges, F., Van Ex, F., Regulski, M., Meyers, B.C., and Martienssen, R.A.** (2014). miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in Arabidopsis. *Nature* **508**: 411–415.
- Csorba, T., Kontra, L., and Burgyán, J.** (2015). viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* **479–480**: 85–103.

- Cuellar, W.J., Kreuze, J.F., Rajamaki, M.-L., Cruzado, K.R., Untiveros, M., and Valkonen, J.P.T.** (2009). Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 10354–10358.
- Cuerda-Gil, D. and Slotkin, R.K.** (2016). Non-canonical RNA-directed DNA methylation. *Nat. Plants* **2**.
- d'Erfurth, I., Jolivet, S., Froger, N., Catrice, O., Novatchkova, M., and Mercier, R.** (2009). Turning Meiosis into Mitosis. *PLoS Biol.* **7**: e1000124.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C.** (2000). An RNA-Dependent RNA Polymerase Gene in Arabidopsis Is Required for Posttranscriptional Gene Silencing Mediated by a Transgene but Not by a Virus. *Cell* **101**: 543–553.
- Daxinger, L., Hunter, B., Sheikh, M., Jauvion, V., Gascioli, V., Vaucheret, H., Matzke, M., and Furner, I.** (2008). Unexpected silencing effects from T-DNA tags in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **13**: 4–6.
- Deans, C. and Maggert, K.A.** (2015). What Do You Mean, “Epigenetic”? *Genetics* **199**: 887–896.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., and Voinnet, O.** (2006). Hierarchical Action and Inhibition of Plant Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense. *Science* (80-.). **313**: 68–71.
- Deng, X., Kelloniemi, J., Haikonen, T., Vuorinen, A.L., Elomaa, P., Teeri, T.H., and Valkonen, J.P.T.** (2013). Modification of Tobacco rattle virus RNA1 to Serve as a VIGS Vector Reveals That the 29K Movement Protein Is an RNA Silencing Suppressor of the Virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**: 503–514.
- Devers, E.A., Brosnan, C.A., Sarazin, A., Albertini, D., Amsler, A.C., Brioudes, F., Jullien, P.E., Lim, P., Schott, G., and Voinnet, O.** (2020). Movement and differential consumption of short interfering RNA duplexes underlie mobile RNA interference. *Nat. Plants* **6**: 789–799.
- Devic, M. and Roscoe, T.** (2016). Seed maturation: Simplification of control networks in plants. *Plant Sci.* **252**: 335–346.
- Diaz-Pendon, J.A., Li, F., Li, W.-X., and Ding, S.-W.** (2007). Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in Arabidopsis Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *Plant Cell* **19**: 2053–2063.
- Diéguez, M.J., Vaucheret, H., Paszkowski, J., and Mittelsten Scheid, O.** (1998). Cytosine methylation at CG and CNG sites is not a prerequisite for the initiation of transcriptional gene silencing in plants, but it is required for its maintenance. *Mol. Gen. Genet. MGG* **259**: 207–215.
- Ding, S.-W. and Lu, R.** (2011). Virus-derived siRNAs and piRNAs in immunity and pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* **1**: 533–544.
- Ding, S.W. and Voinnet, O.** (2007). Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* **130**: 413–426.
- Dlakić, M.** (2006). DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics* **22**: 2711–2714.
- Dolata, J., Bajczyk, M., Bielewicz, D., Niedojadlo, K., Niedojadlo, J., Pietrykowska, H., Walczak, W., Szweykowska-Kulinska, Z., and Jarmolowski, A.** (2016). Salt Stress Reveals a New Role for ARGONAUTE1 in miRNA Biogenesis at the Transcriptional and Posttranscriptional Levels. *Plant Physiol.* **172**: 297–312.
- Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I., and Llave, C.** (2008). Structural and Genetic Requirements for the Biogenesis of Tobacco Rattle Virus-Derived Small Interfering RNAs. *J. Virol.* **82**: 5167–5177.
- Drinneberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R., and Bartel, D.P.** (2009). RNAi in budding yeast. *Science* (80-.). **326**: 544–550.
- Drugeon, 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.

- Du, Z., Lee, J.K., Tjhen, R., Stroud, R.M., and James, T.L.** (2008). Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: A conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 2391–2396.
- Duan, C.-G., Fang, Y.-Y., Zhou, B.-J., Zhao, J.-H., Hou, W.-N., Zhu, H., Ding, S.-W., and Guo, H.-S.** (2012). Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-Mediated Slicing, Transgene-Induced RNA Silencing, and DNA Methylation by Distinct Domains of the Cucumber mosaic virus 2b Protein. *Plant Cell* **24**: 259–274.
- Duan, C. et al.** (2015). Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO 4 and AGO 6 in RNA-directed DNA methylation. *EMBO J.* **34**: 581–592.
- Dumas, C. and Rogowsky, P.** (2008). Fertilization and early seed formation. *C. R. Biol.* **331**: 715–725.
- Dunoyer, P., Brosnan, C.A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C., and Voinnet, O.** (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J.* **29**: 1699–1712.
- Dunoyer, P., Himber, C., Ruiz-Ferrer, V., Alioua, A., and Voinnet, O.** (2007). Intra- and intercellular RNA interference in Arabidopsis thaliana requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nat. Genet.* **39**: 848–856.
- Dunoyer, P., Himber, C., and Voinnet, O.** (2005). DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat. Genet.* **37**: 1356–1360.
- Durán-Figueroa, N. and Vielle-Calzada, J.P.** (2010). ARGONAUTE9-dependent silencing of transposable elements in pericentromeric regions of Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* **5**.
- Durand, S., Bouché, N., Perez Strand, E., Loudet, O., and Camilleri, C.** (2012). Rapid Establishment of Genetic Incompatibility through Natural Epigenetic Variation. *Curr. Biol.* **22**: 326–331.
- Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Wang, M.-B., and Waterhouse, P.M.** (2009). The Arabidopsis thaliana double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA* **15**: 2219–2235.
- Earley, K.W. and Poethig, R.S.** (2011). Binding of the Cyclophilin 40 Ortholog SQUINT to Hsp90 Protein Is Required for SQUINT Function in Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **286**: 38184–38189.
- van Eldik, G.J., Litier, K., Van Montagu, M., Jacobs, J.J.M.R., and Cornelissen, M.** (1998). Silencing of 1,3-glucanase genes in tobacco correlates with an increased abundance of RNA degradation intermediates. *Nucleic Acids Res.* **26**: 5176–5181.
- Elmayan, T., Adenot, X., Gissot, L., Laressergues, D., Gy, I., and Vaucheret, H.** (2009). A neomorphic sgs3 allele stabilizing miRNA cleavage products reveals that SGS3 acts as a homodimer. *FEBS J.* **276**: 835–844.
- Elmayan, T., Balzergue, S., Béon, F., Bourdon, V., Daubremet, J., Guénet, Y., Mourrain, P., Palauqui, J.-C., Vernhettes, S., Vialle, T., Wostrikoff, K., and Vaucheret, H.** (1998). Arabidopsis Mutants Impaired in Cosuppression. *Plant Cell* **10**: 1747–1757.
- Elmayan, T., Proux, F., and Vaucheret, H.** (2005). Arabidopsis RPA2: A Genetic Link among Transcriptional Gene Silencing, DNA Repair, and DNA Replication. *Curr. Biol.* **15**: 1919–1925.
- Elmayan, T. and Vaucheret, H.** (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J.* **9**: 787–797.
- Elvira-Matlot, E., Hachet, M., Shamandi, N., Comella, P., Sáez-Vásquez, J., Zytnicki, M., and Vaucheret, H.** (2016). Arabidopsis RNASE THREE LIKE2 Modulates the Expression of Protein-Coding Genes via 24-Nucleotide Small Interfering RNA-Directed DNA Methylation. *Plant Cell* **28**: 406–425.
- Elvira-Matlot, E., Martínez de Alba, Á.E., and Vaucheret, H.** (2017). Diversity of RNA silencing pathways in plants. In *Plant gene silencing: mechanisms and applications* (CABI: Wallingford), pp. 1–31.
- Endo, Y., Iwakawa, H., and Tomari, Y.** (2013). Arabidopsis ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly. *EMBO Rep.* **14**: 652–658.

- English, J., Davenport, G., Elmayan, T., Vaucheret, H., and Baulcombe, D.** (1997). Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans- inactivation. *Plant J.* **12**: 597–603.
- English, J.J., Mueller, E., and Baulcombe, D.C.** (1996). Suppression of Virus Accumulation in Transgenic Plants Exhibiting Silencing of Nuclear Genes. *Plant Cell* **8**: 179.
- Eun, C., Lorkovic, Z.J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E.R., Simon, S.A., Meyers, B.C., Matzke, A.J.M., and Matzke, M.** (2011). AGO6 Functions in RNA-Mediated Transcriptional Gene Silencing in Shoot and Root Meristems in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **6**: e25730.
- Fahlgren, N., Montgomery, T.A., Howell, M.D., Allen, E., Dvorak, S.K., Alexander, A.L., and Carrington, J.C.** (2006). Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA Affects Developmental Timing and Patterning in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **16**: 939–944.
- Fang, X. and Qi, Y.** (2016). RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. *Plant Cell* **28**: 272–285.
- Fang, Y.-Y., Zhao, J.-H., Liu, S.-W., Wang, S., Duan, C.-G., and Guo, H.-S.** (2016). CMV2b-AGO Interaction Is Required for the Suppression of RDR-Dependent Antiviral Silencing in *Arabidopsis*. *Front. Microbiol.* **7**: 1329.
- Faugeron, G., Goyon, C., and Grégoire, A.** (1989). Stable allele replacement and unstable non-homologous integration events during transformation of *Ascobolus immersus*. *Gene* **76**: 109–119.
- Faugeron, G., Rhounim, L., and Rossignol, J.L.** (1990). How does the cell count the number of ectopic copies of a gene in the premeiotic inactivation process acting in *Ascobolus immersus*? *Genetics* **124**: 585–591.
- Feng, L., Duan, C.-G., and Guo, H.-S.** (2013). Inhibition of in vivo Slicer activity of Argonaute protein 1 by the viral 2b protein independent of its dsRNA-binding function. *Mol. Plant Pathol.* **14**: 617–622.
- Fernández-Calvino, L., Martínez-Priego, L., Szabo, E.Z., Guzmán-Benito, I., González, I., Canto, T., Lakatos, L., and Llave, C.** (2016). Tobacco rattle virus 16K silencing suppressor binds ARGONAUTE 4 and inhibits formation of RNA silencing complexes. *J. Gen. Virol.* **97**: 246–257.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806–811.
- Foss, E.J., Garrett, P.W., Kinsey, J.A., and Selker, E.U.** (1991). Specificity of repeat-induced point mutation (RIP) in *Neurospora*: sensitivity of non-*Neurospora* sequences, a natural diverged tandem duplication, and unique DNA adjacent to a duplicated region. *Genetics* **127**: 711–7.
- Fraley, R.T. et al.** (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 4803–4807.
- de Framond, A.J., Barton, K.A., and Chilton, M.-D.** (1983). Mini-Ti: A New Vector Strategy for Plant Genetic Engineering. *Nat. Biotechnol.* **1**: 262–269.
- Frank, F., Hauver, J., Sonenberg, N., and Nagar, B.** (2012). *Arabidopsis* Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO J.* **31**: 3588–3595.
- Fu, D.-Q., Zhu, B.-Z., Zhu, H.-L., Jiang, W.-B., and Luo, Y.-B.** (2005). Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J.* **43**: 299–308.
- Fu, Z.Q. and Dong, X.** (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 839–863.
- Fukudome, A., Kanaya, A., Egami, M., Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H., and Fukuhara, T.** (2011). Specific requirement of DRB4, a dsRNA-binding protein, for the in vitro dsRNA-cleaving activity of *Arabidopsis* Dicer-like 4. *RNA* **17**: 750–760.
- Fusaro, A.F., Correa, R.L., Nakasugi, K., Jackson, C., Kawchuk, L., Vaslin, M.F.S., and Waterhouse, P.M.** (2012). The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology* **426**: 178–187.
- Gaffar, F.Y. and Koch, A.** (2019). Catch me if you can! RNA silencing-based improvement of antiviral plant immunity. *Viruses* **11**.

- Galagan, J.E. and Selker, E.U.** (2004). RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends Genet.* **20**: 417–423.
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J.A., and Imler, J.-L.** (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. *Nat. Immunol.* **7**: 590–597.
- Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J.S., Fahlgren, N., Gilbert, K.B., Takeda, A., Giampetruzzi, A., Garcia Ruiz, M.T., McGinn, M.G., Lowery, N., Martinez Baladejo, M.T., and Carrington, J.C.** (2015). Roles and Programming of Arabidopsis ARGONAUTE Proteins during Turnip Mosaic Virus Infection. *PLOS Pathog.* **11**: e1004755.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J., and Carrington, J.C.** (2010). Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerases and Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense and Small Interfering RNA Biogenesis during Turnip Mosaic Virus Infection. *Plant Cell* **22**: 481–496.
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P., and Vaucheret, H.** (2005). Partially Redundant Functions of Arabidopsis DICER-like Enzymes and a Role for DCL4 in Producing trans-Acting siRNAs. *Curr. Biol.* **15**: 1494–1500.
- Gebert, D. and Rosenkranz, D.** (2015). RNA-based regulation of transposon expression. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **6**: 687–708.
- Ghazala, W., Waltermann, A., Pilot, R., Winter, S., and Varrelmann, M.** (2008). Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. *J. Gen. Virol.* **89**: 1748–1758.
- Gilroy, S. and Jones, D.L.** (2000). Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends Plant Sci.* **5**: 56–60.
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V., and Gafni, Y.** (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 157–161.
- Goldman, N. and Yang, Z.** (1994). A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 725–736.
- Gonzalez, I., Rakitina, D., Semashko, M., Taliansky, M., Praveen, S., Palukaitis, P., Carr, J.P., Kalinina, N., and Canto, T.** (2012). RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of Cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization. *RNA* **18**: 771–782.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H.** (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 7380–7384.
- Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., and Masuta, C.** (2007). Characterization of Silencing Suppressor 2b of Cucumber Mosaic Virus Based on Examination of its Small RNA-Binding Abilities. *Plant Cell Physiol.* **48**: 1050–1060.
- Goyon, C. and Faugeron, G.** (1989). Targeted transformation of *Ascobolus immersus* and de novo methylation of the resulting duplicated DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2818–2827.
- Goyon, C., Faugeron, G., and Rossignol, J.L.** (1988). Molecular cloning and characterization of the met2 gene from *Ascobolus immersus*. *Gene* **63**: 297–308.
- Grayburn, W.S. and Selker, E.U.** (1989). A natural case of RIP: degeneration of the DNA sequence in an ancestral tandem duplication. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4416–4421.
- Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L., and Bitonti, M.B.** (2012). In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *J. Exp. Bot.* **63**: 695–709.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., and Blatt, M.R.** (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J.* **64**: 355–365.
- Grishok, A.** (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* **579**: 5932–5939.

- Groszmann, M., Greaves, I.K., Albertyn, Z.I., Scofield, G.N., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (2011). Changes in 24-nt siRNA levels in Arabidopsis hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 2617–2622.
- Gu, S., Jin, L., Huang, Y., Zhang, F., and Kay, M.A.** (2012). Slicing-Independent RISC Activation Requires the Argonaute PAZ Domain. *Curr. Biol.* **22**: 1536–1542.
- Guo, S. and Kemphues, K.J.** (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**: 611–620.
- Guo, X. and Lu, R.** (2013). Characterization of Virus-Encoded RNA Interference Suppressors in *Caenorhabditis elegans*. *J. Virol.* **87**: 5414–5423.
- Gy, I., Gascioli, V., Laressergues, D., Morel, J.-B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H., and Mallory, A.C.** (2007). Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 Are Endogenous RNA Silencing Suppressors. *Plant Cell* **19**: 3451–3461.
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M., and Voinnet, O.** (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.* **27**: 2102–2112.
- Haas, M., Bureau, M., Geldreich, A., Yot, P., and Keller, M.** (2002). Cauliflower mosaic virus: Still in the news. *Mol. Plant Pathol.* **3**: 419–429.
- Hafrén, A., Löhmus, A., and Mäkinen, K.** (2015). Formation of Potato Virus A-Induced RNA Granules and Viral Translation Are Interrelated Processes Required for Optimal Virus Accumulation. *PLOS Pathog.* **11**: e1005314.
- Hafrén, A., Üstün, S., Hochmuth, A., Svenning, S., Johansen, T., and Hofius, D.** (2018). Turnip Mosaic Virus Counteracts Selective Autophagy of the Viral Silencing Suppressor HCpro. *Plant Physiol.* **176**: 649–662.
- Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X., and Fang, R.** (2012). Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J.* **69**: 104–115.
- Hamilton, A.** (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* **21**: 4671–4679.
- Hamilton, A.J.** (1999). A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* (80-.). **286**: 950–952.
- Hamilton, A.J., Brown, S., Yuanhai, H., Ishizuka, M., Lowe, A., Solis, A.-G.A., and Grierson, D.** (1998). A transgene with repeated DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato. *Plant J.* **15**: 737–746.
- Hamilton, R.I.** (1974). Replication of Plant Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **12**: 223–245.
- Hammond, S.M.** (2001). Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science* (80-.). **293**: 1146–1150.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293–296.
- Harvey, J.J.W., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J.P., and Baulcombe, D.C.** (2011). An Antiviral Defense Role of AGO2 in Plants. *PLoS One* **6**: e14639.
- Hatta, T., Bullivant, S., and Matthews, R.E.F.** (1973). Fine Structure of Vesicles Induced in Chloroplasts of Chinese Cabbage Leaves by Infection with Turnip Yellow Mosaic Virus. *J. Gen. Virol.* **20**: 37–50.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H., and Baulcombe, D.C.** (2010). The Arabidopsis RNA-Directed DNA Methylation Argonautes Functionally Diverge Based on Their Expression and Interaction with Target Loci. *Plant Cell* **22**: 321–334.
- He, H., Liang, G., Li, Y., Wang, F., and Yu, D.** (2014). Two Young MicroRNAs Originating from Target Duplication Mediate Nitrogen Starvation Adaptation via Regulation of Glucosinolate Synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **164**: 853–865.

- He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.-L., Wang, C.-S., Jin, H., and Zhu, J.-K.** (2009). An Effector of RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis Is an ARGONAUTE 4- and RNA-Binding Protein. *Cell* **137**: 498–508.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., and Jacobsen, S.E.** (2006). Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.* **38**: 721–725.
- Hepburn, A.G., Clarke, L.E., Pearson, L., and White, J.** (1983). The role of cytosine methylation in the control of nopaline synthase gene expression in a plant tumor. *J. Mol. Appl. Genet.* **2**: 315–29.
- Hernandez-Pinzon, I., Yelina, N.E., Schwach, F., Studholme, D.J., Baulcombe, D., and Dalmay, T.** (2007). SDE5, the putative homologue of a human mRNA export factor, is required for transgene silencing and accumulation of trans-acting endogenous siRNA. *Plant J.* **50**: 140–148.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., and Schell, J.** (1992). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. 1983. *Biotechnology* **24**: 377–81.
- Heyman, J., Van den Daele, H., De Wit, K., Boudolf, V., Berckmans, B., Verkest, A., Kamei, C.L.A., De Jaeger, G., Koncz, C., and De Veylder, L.** (2011). Arabidopsis ULTRAVIOLET-B-INSENSITIVE4 Maintains Cell Division Activity by Temporal Inhibition of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome. *Plant Cell* **23**: 4394–4410.
- Hillung, J., Cuevas, J.M., and Elena, S.F.** (2012). Transcript Profiling of Different Arabidopsis thaliana Ecotypes in Response to Tobacco etch potyvirus Infection. *Front. Microbiol.* **3**: 1–9.
- Himber, C.** (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* **22**: 4523–4533.
- Hinnen, A., Hicks, J.B., and Fink, G.R.** (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**: 1929–1933.
- Hochholdinger, F. and Hoecker, N.** (2007). Towards the molecular basis of heterosis. *Trends Plant Sci.* **12**: 427–432.
- Holliday, R. and Pugh, J.E.** (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* (80-.). **187**: 226–32.
- Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Schroeder, J.I.** (2001). An mRNA Cap Binding Protein, ABH1, Modulates Early Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis. *Cell* **106**: 477–487.
- Hussain, M., Abraham, A.M., and Asgari, S.** (2010). An Ascovirus-Encoded RNase III Autoregulates Its Expression and Suppresses RNA Interference-Mediated Gene Silencing. *J. Virol.* **84**: 3624–3630.
- Iki, T., Tschopp, M.-A., and Voinnet, O.** (2017). Biochemical and genetic functional dissection of the P38 viral suppressor of RNA silencing. *RNA* **23**: 639–654.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Meshi, T., and Ishikawa, M.** (2012). Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO J.* **31**: 267–278.
- Irelan, J.T. and Selker, E.U.** (1997). Cytosine methylation associated with repeat-induced point mutation causes epigenetic gene silencing in *Neurospora crassa*. *Genetics* **146**: 509–523.
- Ivanov, K.I., Eskelin, K., Bašić, M., De, S., Löhmus, A., Varjosalo, M., and Mäkinen, K.** (2016). Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *Plant J.* **85**: 30–45.
- Jacobsen, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M.** (1999). Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* **126**: 5231–5243.
- Jaenisch, R. and Mintz, B.** (1974). Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**: 1250–1254.
- Jakowitsch, J., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, M.A., and Matzke, A.J.M.** (1999). Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 13241–13246.

- Jakubiec, A., Yang, S.W., and Chua, N.-H.** (2012). Arabidopsis DRB4 protein in antiviral defense against Turnip yellow mosaic virus infection. *Plant J.* **69**: 14–25.
- Jasinski, S., Lécureuil, A., Durandet, M., Bernard-Moulin, P., and Guerche, P.** (2016). Arabidopsis Seed Content QTL Mapping Using High-Throughput Phenotyping: The Assets of Near Infrared Spectroscopy. *Front. Plant Sci.* **7**: 1–11.
- Jaubert, M., Bhattacharjee, S., Mello, A.F.S., Perry, K.L., and Moffett, P.** (2011). ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against potato virus X in arabidopsis. *Plant Physiol.* **156**: 1556–1564.
- Jauvion, V., Elmayan, T., and Vaucheret, H.** (2010). The Conserved RNA Trafficking Proteins HPR1 and TEX1 Are Involved in the Production of Endogenous and Exogenous Small Interfering RNA in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 2697–2709.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901–3907.
- Jin, H. and Zhu, J.K.** (2010). A viral suppressor protein inhibits host RNA silencing by hooking up with Argonautes. *Genes Dev.* **24**: 853–856.
- Johansen, L.K. and Carrington, J.C.** (2001). Silencing on the Spot. Induction and Suppression of RNA Silencing in the Agrobacterium -Mediated Transient Expression System. *Plant Physiol.* **126**: 930–938.
- Jorgensen, W.L., Maxwell, D.S., and Tirado-Rives, J.** (1996). Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 11225–11236.
- Jouannet, V., Moreno, A.B., Elmayan, T., Crespi, M.D., and Maizel, A.** (2012a). Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates is required for ta-siRNA biogenesis. **31**: 1704–1713.
- Jouannet, V., Moreno, A.B., Elmayan, T., Vaucheret, H., Crespi, M.D., and Maizel, A.** (2012b). Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. *EMBO J.* **31**: 1704–1713.
- Jover-Gil, S., Candela, H., and Ponce, M.-R.** (2005). Plant microRNAs and development. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 733–744.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193–195.
- Kasschau, K.D. and Carrington, J.C.** (1998). A Counterdefensive Strategy of Plant Viruses. *Cell* **95**: 461–470.
- Kasschau, K.D., Cronin, S., and Carrington, J.C.** (1997). Genome Amplification and Long-Distance Movement Functions Associated with the Central Domain of Tobacco Etch Potyvirus Helper Component–Proteinase. *Virology* **228**: 251–262.
- Kasschau, K.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A., and Carrington, J.C.** (2007). Genome-Wide Profiling and Analysis of Arabidopsis siRNAs. *PLoS Biol.* **5**: e57.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., and Carrington, J.C.** (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**: 205–217.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.-K., Staskawicz, B.J., and Jin, H.** (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 18002–18007.
- Kavi, H.H., Fernandez, H.R., Xie, W., and Birchler, J.A.** (2005). RNA silencing in Drosophila. *FEBS Lett.* **579**: 5940–5949.
- Kermode, A.R.** (2005). Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. *J. Plant Growth Regul.* **24**: 319–344.
- Kilby, N.J., Leyser, H.M.O., and Furner, I.J.** (1992). Promoter methylation and progressive transgene inactivation in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **20**: 103–112.

- Kim, J., Kim, J.H., Lyu, J. II, Woo, H.R., and Lim, P.O.** (2018). New insights into the regulation of leaf senescence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **69**: 787–799.
- Koornneef, M., Reymond, M., and Alonso-Blanco, C.** (2011). Natural Variation in *Arabidopsis thaliana*. In *Genetics and Genomics of the Brassicaceae* (Springer New York: New York, NY), pp. 123–151.
- Koseki, M., Goto, K., Masuta, C., and Kanazawa, A.** (2005). The Star-type Color Pattern in *Petunia hybrida* ‘Red Star’ Flowers is Induced by Sequence-Specific Degradation of Chalcone Synthase RNA. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1879–1883.
- Kradolfer, D., Hennig, L., and Köhler, C.** (2013). Increased Maternal Genome Dosage Bypasses the Requirement of the FIS Polycomb Repressive Complex 2 in *Arabidopsis* Seed Development. *PLoS Genet.* **9**: e1003163.
- Kreuze, J.F., Savenkov, E.I., Cuellar, W., Li, X., and Valkonen, J.P.T.** (2005). Viral Class 1 RNase III Involved in Suppression of RNA Silencing. *J. Virol.* **79**: 7227–7238.
- van der Krol, A.R., Lenting, P.E., Veenstra, J., van der Meer, I.M., Koes, R.E., Gerats, A.G.M., Mol, J.N.M., and Stuitje, A.R.** (1988). An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* **333**: 866–869.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N.M., and Stuitje, A.R.** (1990). Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**: 291–299.
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R., and Watanabe, Y.** (2009). SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett.* **583**: 1261–1266.
- Kumar, V., Mishra, S.K., Rahman, J., Taneja, J., Sundaresan, G., Mishra, N.S., and Mukherjee, S.K.** (2015). Mungbean yellow mosaic Indian virus encoded AC2 protein suppresses RNA silencing by inhibiting *Arabidopsis* RDR6 and AGO1 activities. *Virology* **486**: 158–172.
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y.** (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 12753–12758.
- Kwak, P.B. and Tomari, Y.** (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**: 145–151.
- Lacombe, S., Bangratz, M., Vignols, F., and Brugidou, C.** (2010). The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *Plant J.* **61**: 371–382.
- Laird, J. et al.** (2013). Identification of the domains of cauliflower mosaic virus protein P6 responsible for suppression of RNA silencing and salicylic acid signalling. *J. Gen. Virol.* **94**: 2777–2789.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V. V., Calvino, L.F., López-Moya, J.J., and Burgyán, J.** (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* **25**: 2768–2780.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., and Burgyán, J.** (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.* **23**: 876–884.
- Lamontagne, B., Larose, S., and Boulanger, J.** (2001). The RNase III Family: A Conserved Structure and Expanding Functions in Eukaryotic dsRNA Metabolism. *Curr. Issues Mol. Biol.* **3**: 71–78.
- Landthaler, M.** (2010). Chaperones Get RISC Loaded. *Mol. Cell* **39**: 161–162.
- van Larebeke, N., Genetello, C., Schell, J., Schilperoort, R.A., Hermans, A.K., Hernalsteens, J.P., and van Montagu, M.** (1975). Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic *agrobacteria* as a result of plasmid transfer. *Nature* **255**: 742–743.
- Laubinger, S., Sachsenberg, T., Zeller, G., Busch, W., Lohmann, J.U., Ra, G., and Weigel, D.** (2008). Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. **105**.

- Law, J.A., Ausin, I., Johnson, L.M., Vashisht, A.A., Zhu, J.-K., Wohlschlegel, J.A., and Jacobsen, S.E.** (2010). A Protein Complex Required for Polymerase V Transcripts and RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **20**: 951–956.
- Law, J.A. and Jacobsen, S.E.** (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 204–220.
- Law, J.A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., and Jacobsen, S.E.** (2011). SHH1, a Homeodomain Protein Required for DNA Methylation, As Well As RDR2, RDM4, and Chromatin Remodeling Factors, Associate with RNA Polymerase IV. *PLoS Genet.* **7**: e1002195.
- Lecoq, H.** (2001). Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac : 1892 ou 1898 ? *Comptes Rendus l'Académie des Sci. - Ser. III - Sci. la Vie* **324**: 929–933.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V.** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843–854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N.** (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**: 4051–4060.
- Legrand, S. et al.** (2019). Differential retention of transposable element-derived sequences in outcrossing Arabidopsis genomes. *Mob. DNA* **10**: 30.
- Lewsey, M., Robertson, F.C., Canto, T., Palukaitis, P., and Carr, J.P.** (2007). Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant J.* **50**: 240–252.
- Li, F., Huang, C., Li, Z., and Zhou, X.** (2014). Suppression of RNA Silencing by a Plant DNA Virus Satellite Requires a Host Calmodulin-Like Protein to Repress RDR6 Expression. *PLoS Pathog.* **10**: e1003921.
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., and Baker, B.** (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 1790–1795.
- Li, F. and Wang, A.** (2018). RNA decay is an antiviral defense in plants that is counteracted by viral RNA silencing suppressors. *PLOS Pathog.* **14**: e1007228.
- Li, H.-W., Lucy, A.P., Guo, H.-S., Li, W.-X., Ji, L.-H., Wong, S.-M., and Ding, S.-W.** (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO J.* **18**: 2683–2691.
- Li, H.** (2002). Induction and Suppression of RNA Silencing by an Animal Virus. *Science (80-.)*. **296**: 1319–1321.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., and Chen, X.** (2005). Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **15**: 1501–1507.
- Linne, F., Heidmann, I., Saedler, H., and Meyer, P.** (1990). Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *Petunia hybrida*: Role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Mol. Gen. Genet. MGG* **222**: 329–336.
- Liou, W., Barefoot, A., Dickman, M., and Zhang, X.** (2014). Arabidopsis Argonaute 10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. **145**: 242–256.
- Liu, C., Axtell, M.J., and Fedoroff, N. V.** (2012). The Helicase and RNaseIIIa Domains of Arabidopsis Dicer-Like1 Modulate Catalytic Parameters during MicroRNA Biogenesis. *Plant Physiol.* **159**: 748–758.
- Liu, L. and Chen, X.** (2016). RNA Quality Control as a Key to Suppressing RNA Silencing of Endogenous Genes in Plants. *Mol. Plant* **9**: 826–836.
- Liu, P., Zhang, S., Zhou, B., Luo, X., Zhou, X.F., Cai, B., Jin, Y.H., Niu, D., Lin, J., Cao, X., and Jin, J.B.** (2019). The Histone H3K4 Demethylase JMJ16 Represses Leaf Senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* **31**: 430–443.
- Liu, Q., Feng, Y., and Zhu, Z.** (2009a). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct. Integr. Genomics* **9**: 277–286.

- Liu, Q., Yao, X., Pi, L., Wang, H., Cui, X., and Huang, H.** (2009b). The ARGONAUTE10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in Arabidopsis. *Plant J.* **58**: 27–40.
- Liu, W., Duttke, S.H., Hetzel, J., Groth, M., Feng, S., Gallego-Bartolome, J., Zhong, Z., Kuo, H.Y., Wang, Z., Zhai, J., Chory, J., and Jacobsen, S.E.** (2018). RNA-directed DNA methylation involves co-transcriptional small-RNA-guided slicing of polymerase ν transcripts in Arabidopsis. *Nat. Plants* **4**: 181–188.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.-W., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002). Role of SCF Ubiquitin-Ligase and the COP9 Signalosome in the N Gene-Mediated Resistance Response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**: 1483–1496.
- Love, A.J., Geri, C., Laird, J., Carr, C., Yun, B.-W., Loake, G.J., Tada, Y., Sadanandom, A., and Milner, J.J.** (2012). Cauliflower mosaic virus Protein P6 Inhibits Signaling Responses to Salicylic Acid and Regulates Innate Immunity. *PLoS One* **7**: e47535.
- Love, A.J., Laird, J., Holt, J., Hamilton, A.J., Sadanandom, A., and Milner, J.J.** (2007). Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *J. Gen. Virol.* **88**: 3439–3444.
- Lu, C., Kulkarni, K., Souret, F.F., MuthuValliappan, R., Tej, S.S., Poethig, R.S., Henderson, I.R., Jacobsen, S.E., Wang, W., Green, P.J., and Meyers, B.C.** (2006). MicroRNAs and other small RNAs enriched in the Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant. *Genome Res.* **16**: 1276–1288.
- Lu, J., Zhang, C., Baulcombe, D.C., and Chen, Z.J.** (2012). Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of Arabidopsis seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 5529–5534.
- Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H.W., Broitman-Maduro, G., Li, W.X., and Ding, S.W.** (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **436**: 1040–1043.
- Luo, Z. and Chen, Z.** (2007). Improperly Terminated, Unpolyadenylated mRNA of Sense Transgenes Is Targeted by RDR6-Mediated RNA Silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 943–958.
- Ma, Z. and Zhang, X.** (2018). Actions of plant Argonautes: predictable or unpredictable? *Curr. Opin. Plant Biol.* **45**: 59–67.
- Mäkinen, K. and Hafrén, A.** (2014). Intracellular coordination of potyviral RNA functions in infection. *Front. Plant Sci.* **5**: 181–188.
- MacRae, I.J.** (2006). Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* (80-.). **311**: 195–198.
- Maia, I.G., Haenni, A.-L., and Bernardi, F.** (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J. Gen. Virol.* **77**: 1335–1341.
- Maillard, P. V, Ciaudo, C., Marchais, A., Li, Y., Jay, F., Ding, S.W., and Voinnet, O.** (2013). Antiviral RNA Interference in Mammalian Cells. *Science* (80-.). **342**: 235–238.
- Mäkinen, K., Lõhmus, A., and Pollari, M.** (2017). Plant RNA Regulatory Network and RNA Granules in Virus Infection. *Front. Plant Sci.* **8**.
- Mallory, A. and Vaucheret, H.** (2010). Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *Plant Cell* **22**: 3879–3889.
- Mallory, A.C., Hinze, A., Tucker, M.R., Bouché, N., Gascioli, V., Elmayer, T., Laressergues, D., Jauvion, V., Vaucheret, H., and Laux, T.** (2009). Redundant and Specific Roles of the ARGONAUTE Proteins AGO1 and ZLL in Development and Small RNA-Directed Gene Silencing. *PLoS Genet.* **5**: e1000646.
- Mallory, A.C. and Vaucheret, H.** (2009). ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Rep.* **10**: 521–526.
- Maloisel, L. and Rossignol, J.-L.** (1998). Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascomobolus*. *Genes Dev.* **12**: 1381–1389.

- Manavella, P.A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., Macek, B., and Weigel, D.** (2012). Fast-Forward Genetics Identifies Plant CPL Phosphatases as Regulators of miRNA Processing Factor HYL1. *Cell* **151**: 859–870.
- Mandadi, K.K. and Scholthof, K.-B.G.** (2013). Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *Plant Cell* **25**: 1489–1505.
- Marchais, A., Chevalier, C., and Voinnet, O.** (2019). Extensive profiling in Arabidopsis reveals abundant polysome-associated 24-nt small RNAs including AGO5-dependent pseudogene-derived siRNAs. *RNA* **25**: 1098–1117.
- Marion, J., Bach, L., Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L., and Faure, J.-D.** (2008). Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. *Plant J.* **56**: 169–179.
- Martín-Hernández, A.M. and Baulcombe, D.C.** (2008). Tobacco Rattle Virus 16-Kilodalton Protein Encodes a Suppressor of RNA Silencing That Allows Transient Viral Entry in Meristems. *J. Virol.* **82**: 4064–4071.
- Martin, R.C., Pluskota, W.E., and H. Nonogaki** (2010). Seed Germination. In *Plant Developmental Biology*, E.C. Pua and M.R. Davey, eds (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg), pp. 383–404.
- Martínez-Priego, L., Donaire, L., Barajas, D., and Llave, C.** (2008). Silencing suppressor activity of the Tobacco rattle virus-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. *Virology* **376**: 346–356.
- Martínez de Alba, A.E., Jauvion, V., Mallory, A.C., Bouteiller, N., and Vaucheret, H.** (2011). The miRNA pathway limits AGO1 availability during siRNA-mediated PTGS defense against exogenous RNA. *Nucleic Acids Res.* **39**: 9339–9344.
- Martínez de Alba, A.E., Moreno, A.B., Gabriel, M., Mallory, A.C., Christ, A., Bounon, R., Balergue, S., Aubourg, S., Gautheret, D., Crespi, M.D., Vaucheret, H., and Maizel, A.** (2015). In plants, decapping prevents RDR6-dependent production of small interfering RNAs from endogenous mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **43**: 2902–2913.
- Masuta, C., Inaba, J., and Shimura, H.** (2012). The 2b proteins of Cucumber mosaic virus generally have the potential to differentially induce necrosis on Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* **7**: 43–45.
- Matthews, R.E.F.** (1981). Portraits of Viruses: Turnip Yellow Mosaic Virus. *Intervirology* **15**: 121–144.
- Matzke, A.J.M., Neuhuber, F., Park, Y.D., Ambros, P.F., and Matzke, M.A.** (1994). Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet. MGG* **244**: 219–229.
- Matzke, M.A. and Birchler, J.A.** (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 24–35.
- Matzke, M.A., Kanno, T., and Matzke, A.J.M.** (2015). RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**: 243–267.
- Matzke, M.A., Neuhuber, F., and Matzke, A.J.M.** (1993). A variety of epistatic interactions can occur between partially homologous transgene loci brought together by sexual crossing. *Mol. Gen. Genet. MGG* **236–236**: 379–386.
- Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J., and Matzke, A.J.M.** (1989). Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* **8**: 643–649.
- Maunoury, N. and Vaucheret, H.** (2011). AGO1 and AGO2 Act Redundantly in miR408-Mediated Plantacyanin Regulation. *PLoS One* **6**: e28729.
- McCue, A.D., Nuthikattu, S., Reeder, S.H., and Slotkin, R.K.** (2012). Gene Expression and Stress Response Mediated by the Epigenetic Regulation of a Transposable Element Small RNA. *PLoS Genet.* **8**: e1002474.
- McCue, A.D., Nuthikattu, S., and Slotkin, R.K.** (2013). Genome-wide identification of genes regulated in trans by transposable element small interfering RNAs. *RNA Biol.* **10**: 1379–1395.

- McCue, A.D., Panda, K., Nuthikattu, S., Choudury, S.G., Thomas, E.N., and Slotkin, R.K.** (2015). ARGONAUTE 6 bridges transposable element m RNA -derived si RNAs to the establishment of DNA methylation. *EMBO J.* **34**: 20–35.
- McCue, A.D. and Slotkin, R.K.** (2012). Transposable element small RNAs as regulators of gene expression. *Trends Genet.* **28**: 616–623.
- Meins, F., Si-Ammour, A., and Blevins, T.** (2005). RNA SILENCING SYSTEMS AND THEIR RELEVANCE TO PLANT DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 297–318.
- Melquist, S.** (2003). Transcription from an upstream promoter controls methylation signaling from an inverted repeat of endogenous genes in Arabidopsis. *Genes Dev.* **17**: 2036–2047.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D.** (2006). Double-Stranded RNA Binding May Be a General Plant RNA Viral Strategy To Suppress RNA Silencing. *J. Virol.* **80**: 5747–5756.
- Metegnier, L.-V., Zhou, J., Cohen, M., Bhattacharjee, S., Brosseau, C., Caamal Chan, M.G., Robotzke, S., and Moffett, P.** (2016). NB-LRR signaling induces translational repression of viral transcripts and the formation of RNA processing bodies through mechanisms differing from those activated by UV stress and RNAi. *J. Exp. Bot.* **67**: 2353–2366.
- Mette, M.F.** (1999). Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *EMBO J.* **18**: 241–248.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., and Matzke, A.J.M.** (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* **19**: 5194–5201.
- Metzlaff, M., O’Dell, M., Cluster, P.D., and Flavell, R.B.** (1997). RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in Petunia. *Cell* **88**: 845–854.
- Mi, S. et al.** (2008). Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5’ Terminal Nucleotide. *Cell* **133**: 116–127.
- Michaeli, S. et al.** (2019). The viral F-box protein P0 induces an ER-derived autophagy degradation pathway for the clearance of membrane-bound AGO1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**: 22872–22883.
- Minoia, S., Carbonell, A., Di Serio, F., Gisel, A., Carrington, J.C., Navarro, B., and Flores, R.** (2014). Specific Argonautes Selectively Bind Small RNAs Derived from Potato Spindle Tuber Viroid and Attenuate Viroid Accumulation In Vivo. *J. Virol.* **88**: 11933–11945.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Gao, Z., Mgutshini, N.L., Li, J., Chen, X., Bowman, L.H., and Vance, V.** (2010). Transcriptional silencing induced by Arabidopsis T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing. *Plant J.* **64**: 699–704.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H., and Vance, V.** (2008). DICER-LIKE2 Plays a Primary Role in Transitive Silencing of Transgenes in Arabidopsis. *PLoS One* **3**: e1755.
- Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, E., Lacomme, C., and Burgyán, J.** (2005). Plant Virus-Derived Small Interfering RNAs Originate Predominantly from Highly Structured Single-Stranded Viral RNAs. *J. Virol.* **79**: 7812–7818.
- Montgomery, M.K., Xu, S., and Fire, A.** (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 15502–15507.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., and Carrington, J.C.** (2008a). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell* **133**: 128–141.
- Montgomery, T.A., Yoo, S.J., Fahlgren, N., Gilbert, S.D., Howell, M.D., Sullivan, C.M., Alexander, A., Nguyen, G., Allen, E., Ahn, J.H., and Carrington, J.C.** (2008b). AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 20055–20062.

- Morel, J.-B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., and Vaucheret, H.** (2002). Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (ago1) Mutants Impaired in Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance. *Plant Cell* **14**: 629–639.
- Moreno, A.B., Martínez de Alba, A.E., Bardou, F., Crespi, M.D., Vaucheret, H., Maizel, A., and Mallory, A.C.** (2013). Cytoplasmic and nuclear quality control and turnover of single-stranded RNA modulate post-transcriptional gene silencing in plants. *Nucleic Acids Res.* **41**: 4699–4708.
- Moriceau, L., Jomat, L., Bressanelli, S., Alcaide-Loridan, C., and Jupin, I.** (2017). Identification and molecular characterization of the chloroplast targeting domain of turnip yellow mosaic virus replication proteins. *Front. Plant Sci.* **8**: 1–19.
- Morita, Y., Saito, R., Ban, Y., Tanikawa, N., Kuchitsu, K., Ando, T., Yoshikawa, M., Habu, Y., Ozeki, Y., and Nakayama, M.** (2012). Tandemly arranged chalcone synthase A genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia hybrida*. *Plant J.* **70**: 739–749.
- Mourrain, P. et al.** (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 Genes Are Required for Posttranscriptional Gene Silencing and Natural Virus Resistance. *Cell* **101**: 533–542.
- Mourrain, P., Van Blokland, R., Kooter, J.M., and Vaucheret, H.** (2007). A single transgene locus triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing through double-stranded RNA production. *Planta* **225**: 365–379.
- Mueller, E., Gilbert, J., Davenport, G., Brigneti, G., and Baulcombe, D.C.** (1995). Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J.* **7**: 1001–1013.
- Muhammad, T., Zhang, F., Zhang, Y., and Liang, Y.** (2019). RNA Interference: A Natural Immune System of Plants to Counteract Biotic Stressors. *Cells* **8**: 38.
- Mukherjee, K., Campos, H., and Kolaczowski, B.** (2013). Evolution of Animal and Plant Dicers: Early Parallel Duplications and Recurrent Adaptation of Antiviral RNA Binding in Plants. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 627–641.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., and Summers, M.D.** (1995). *Virus Taxonomy*. F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, and M.D. Summers, eds (Springer Vienna: Vienna).
- Nagano, H., Fukudome, A., Hiraguri, A., Moriyama, H., and Fukuhara, T.** (2014). Distinct substrate specificities of Arabidopsis DCL3 and DCL4. *Nucleic Acids Res.* **42**: 1845–1856.
- Nakahara, K.S. et al.** (2012). Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 10113–10118.
- Nakayashiki, H.** (2005). RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications. *FEBS Lett.* **579**: 5950–5957.
- Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H., and Fukuhara, T.** (2007). The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway. *Plant Mol. Biol.* **63**: 777–785.
- Nanney, D.L.** (1958). EPIGENETIC CONTROL SYSTEMS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44**: 712–717.
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S.Y., and Voinnet, O.** (2008). Suppression of the MicroRNA Pathway by Bacterial Effector Proteins. *Science* (80-.). **321**: 964–967.
- Nejdat, A.** (1990). Transgenic Tobacco Plants Expressing a Coat Protein Gene of Tobacco Mosaic Virus Are Resistant to Some Other Tobamoviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 247.
- Nemes, K., Gellért, Á., Balázs, E., and Salánki, K.** (2014). Alanine scanning of cucumber mosaic virus (CMV) 2B protein identifies different positions for cell-to-cell movement and gene silencing suppressor activity. *PLoS One* **9**.
- Neuhuber, F., Park, Y.D., Matzke, A.J.M., and Matzke, M.A.** (1994). Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing. *Mol. Gen. Genet. MGG* **244**: 230–241.

- Ni, F., Wu, L., Wang, Q., Hong, J., Qi, Y., and Zhou, X.** (2017). Turnip Yellow Mosaic Virus P69 Interacts with and Suppresses GLK Transcription Factors to Cause Pale-Green Symptoms in Arabidopsis. *Mol. Plant* **10**: 764–766.
- Nuthikattu, S., McCue, A.D., Panda, K., Fultz, D., DeFraia, C., Thomas, E.N., and Slotkin, R.K.** (2013). The Initiation of Epigenetic Silencing of Active Transposable Elements Is Triggered by RDR6 and 21-22 Nucleotide Small Interfering RNAs. *Plant Physiol.* **162**: 116–131.
- Nykänen, A., Haley, B., and Zamore, P.D.** (2001). ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell* **107**: 309–321.
- Obbard, D.J., Gordon, K.H.J., Buck, A.H., and Jiggins, F.M.** (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **364**: 99–115.
- Olmedo-Monfil, V., Durán-Figueroa, N., Arteaga-Vázquez, M., Demesa-Arévalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., Slotkin, R.K., Martienssen, R.A., and Vielle-Calzada, J.P.** (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature* **464**: 628–632.
- Otten, L., De Greve, H., Hernalsteens, J.P., Van Montagu, M., Schieder, O., Straub, J., and Schell, J.** (1981). Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **183**: 209–213.
- Palauqui, J.-C.** (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* **16**: 4738–4745.
- Pandit, N.N. and Russo, V.E.A.** (1992). Reversible inactivation of a foreign gene, hph, during the asexual cycle in *Neurospora crassa* transformants. *MGG Mol. Gen. Genet.* **234**: 412–422.
- Parent, J.-S., Bouteiller, N., Elmayan, T., and Vaucheret, H.** (2015a). Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing. *Plant J.* **81**: 223–232.
- Parent, J.-S., Jauvion, V., Bouché, N., Béclin, C., Hachet, M., Zytnicki, M., and Vaucheret, H.** (2015b). Post-transcriptional gene silencing triggered by sense transgenes involves uncapped antisense RNA and differs from silencing intentionally triggered by antisense transgenes. *Nucleic Acids Res.* **43**: 8464–8475.
- Park, Y.-D., Papp, I., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J.M., and Matzke, M.A.** (1996). Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* **9**: 183–194.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V. r., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K.E., Genschik, P., and Ziegler-Graff, V. r.** (2006). F-box-like domain in the poliovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 1994–1999.
- Pélissier, T., Thalmeir, S., Kempe, D., Sängler, H.L., and Wassenegger, M.** (1999). Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **27**: 1625–1634.
- Pélissier, T. and Wassenegger, M.** (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA* **6**: 55–65.
- Pennisi, E.** (2012). ENCODE Project Writes Eulogy for Junk DNA. *Science* (80-.). **337**: 1159–1161.
- Peragine, A.** (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* **18**: 2368–2379.
- Pérez-Cañamás, M. and Hernández, C.** (2015). Key Importance of Small RNA Binding for the Activity of a Glycine-Tryptophan (GW) Motif-containing Viral Suppressor of RNA Silencing. *J. Biol. Chem.* **290**: 3106–3120.
- Pflieger, S., Blanchet, S., Camborde, L., Drugeon, G., Rousseau, A., Noizet, M., Planchais, S., and Jupin, I.** (2008). Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a “one-step” TYMV-derived vector. *Plant J.* **56**: 678–690.
- Pontier, D. et al.** (2012). NERD, a Plant-Specific GW Protein, Defines an Additional RNAi-Dependent Chromatin-Based Pathway in Arabidopsis. *Mol. Cell* **48**: 121–132.

- Pooggin, M.M.** (2013). How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 15233–15259.
- Poulsen, C., Vaucheret, H., and Brodersen, P.** (2013). Lessons on RNA Silencing Mechanisms in Plants from Eukaryotic Argonaute Structures. *Plant Cell* **25**: 22–37.
- Prakash, V., Devendran, R., and Chakraborty, S.** (2017). Overview of plant RNA dependent RNA polymerases in antiviral defense and gene silencing. *Indian J. Plant Physiol.* **22**: 493–505.
- 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.
- Pumplin, N., Sarazin, A., Jullien, P.E., Bologna, N.G., Oberlin, S., and Voinnet, O.** (2016). DNA Methylation Influences the Expression of DICER-LIKE4 Isoforms, Which Encode Proteins of Alternative Localization and Function. *Plant Cell* **28**: 2786–2804.
- Pumplin, N. and Voinnet, O.** (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 745–760.
- Qi, Y., Denli, A.M., and Hannon, G.J.** (2005). Biochemical Specialization within Arabidopsis RNA Silencing Pathways. *Mol. Cell* **19**: 421–428.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J., and Hannon, G.J.** (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **443**: 1008–1012.
- Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J., and Yuan, Y.A.** (2010). Structure of the Arabidopsis thaliana DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. *RNA* **16**: 474–481.
- Que, Q., Wang, H.Y., English, J.J., and Jorgensen, R.A.** (1997). The Frequency and Degree of Cosuppression by Sense Chalcone Synthase Transgenes Are Dependent on Transgene Promoter Strength and Are Reduced by Premature Nonsense Codons in the Transgene Coding Sequence. *Plant Cell* **9**: 1357–1368.
- Raja, P., Sanville, B.C., Buchmann, R.C., and Bisaro, D.M.** (2008). Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses. *J. Virol.* **82**: 8997–9007.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., and Bartel, D.P.** (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.* **20**: 3407–3425.
- Rajamäki, M.-L., Streng, J., and Valkonen, J.P.T.** (2014). Silencing Suppressor Protein VPg of a Potyvirus Interacts With the Plant Silencing-Related Protein SGS3. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **27**: 1199–1210.
- Rajeswaran, R. and Pooggin, M.M.** (2012). RDR6-mediated synthesis of complementary RNA is terminated by miRNA stably bound to template RNA. *Nucleic Acids Res.* **40**: 594–599.
- Ratcliff, F.** (1997). A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants. *Science* (80-.). **276**: 1558–1560.
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A., and Baulcombe, D.C.** (1999). Gene Silencing without DNA: RNA-Mediated Cross-Protection between Viruses. *Plant Cell* **11**: 1207–1215.
- Reavy, B., Dawson, S., Canto, T., and MacFarlane, S.A.** (2004). Heterologous expression of plant virus genes that suppress post-transcriptional gene silencing results in suppression of RNA interference in Drosophila cells. *BMC Biotechnol.* **4**: 18.
- Reichel, C. and Beachy, R.N.** (2000). Degradation of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein by the 26S Proteasome. *J. Virol.* **74**: 3330–3337.
- Ren, G., Chen, X., and Yu, B.** (2012). Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in arabidopsis. *Curr. Biol.* **22**: 695–700.
- Revers, F. and García, J.A.** (2015). Molecular Biology of Potyviruses. In *Advances in virus research* (Elsevier), pp. 101–199.

- Rhounim, L., Rossignol, J.L., and Faugeron, G.** (1992). Epimutation of repeated genes in *Ascobolus immersus*. *EMBO J.* **11**: 4451–4457.
- Riggs, A.D.** (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Genome Res.* **14**: 9–25.
- Rodriguez, A., Angel, C.A., Lutz, L., Leisner, S.M., Nelson, R.S., and Schoelz, J.E.** (2014). Association of the P6 Protein of Cauliflower mosaic virus with Plasmodesmata and Plasmodesmal Proteins. *PLANT Physiol.* **166**: 1345–1358.
- Romano, N. and Macino, G.** (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* **6**: 3343–3353.
- Ron, M., Alandete Saez, M., Eshed Williams, L., Fletcher, J.C., and McCormick, S.** (2010). Proper regulation of a sperm-specific cis-nat-siRNA is essential for double fertilization in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **24**: 1010–1021.
- Roossinck, M.J.** (2015). Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology* **479–480**: 271–277.
- Rossignol, J.L. and Faugeron, G.** (1994). Gene inactivation triggered by recognition between DNA repeats. *Experientia* **50**: 307–317.
- Roussin-Léveillé, C., Silva-Martins, G., and Moffett, P.** (2020). ARGONAUTE5 Represses Age-Dependent Induction of Flowering through Physical and Functional Interaction with miR156 in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **61**: 957–966.
- Saijo, Y.** (2013). Epigenetic Memory and Control in Plants G. Grafi and N. Ohad, eds (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Sakai, K., Tacconnat, L., Borrega, N., Yansouni, J., Brunaud, V., Paysant-Le Roux, C., Delannoy, E., Martin Magniette, M.-L., Lepiniec, L., Faure, J.D., Balzergue, S., and Dubreucq, B.** (2018). Combining laser-assisted microdissection (LAM) and RNA-seq allows to perform a comprehensive transcriptomic analysis of epidermal cells of *Arabidopsis* embryo. *Plant Methods* **14**: 10.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold spring harbor laboratory press).
- Sanford, J.C. and Johnston, S.A.** (1985). The concept of parasite-derived resistance—Deriving resistance genes from the parasite’s own genome. *J. Theor. Biol.* **113**: 395–405.
- Sarazin, A. and Voinnet, O.** (2014). Exploring new models of easiRNA biogenesis. *Nat. Genet.* **46**: 530–531.
- Sastry, K.S.** (2013). *Seed-borne plant virus diseases* (Springer India: India).
- Schatlowski, N., Wolff, P., Santos-González, J., Schoft, V., Siretskiy, A., Scott, R., Tamaru, H., and Köhler, C.** (2014). Hypomethylated pollen bypasses the interploidy hybridization barrier in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 3556–3568.
- Schott, D.H., Cureton, D.K., Whelan, S.P., and Hunter, C.P.** (2005). An antiviral role for the RNA interference machinery in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 18420–18424.
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S., and Schmidt, R.** (2004). Silencing in *Arabidopsis* T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *Plant Cell* **16**: 2561–2572.
- Schütz, S. and Sarnow, P.** (2006). Interaction of viruses with the mammalian RNA interference pathway. *Virology* **344**: 151–157.
- Selker, E.U. and Garrett, P.W.** (1988). DNA sequence duplications trigger gene inactivation in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 6870–6874.
- Selker, E.U. and Stevens, J.N.** (1985). DNA methylation at asymmetric sites is associated with numerous transition mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 8114–8118.

- Shamandi, N., Zytnicki, M., Charbonnel, C., Elvira-Matlot, E., Bochnakian, A., Comella, P., Mallory, A.C., Lepère, G., Sáez-Vásquez, J., and Vaucheret, H.** (2015). Plants Encode a General siRNA Suppressor That Is Induced and Suppressed by Viruses. *PLOS Biol.* **13**: e1002326.
- Sharma, B., Joshi, D., Yadav, P.K., Gupta, A.K., and Bhatt, T.K.** (2016). Role of Ubiquitin-Mediated Degradation System in Plant Biology. *Front. Plant Sci.* **7**: 1–8.
- Shen, H., He, H., Li, J., Chen, W., Wang, X., Guo, L., Peng, Z., He, G., Zhong, S., Qi, Y., Terzaghi, W., and Deng, X.W.** (2012). Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Gene Expression Changes in Two Arabidopsis Ecotypes and Their Reciprocal Hybrids. *Plant Cell* **24**: 875–892.
- Shivaprasad, P. V., Chen, H.-M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A.C.M., and Baulcombe, D.C.** (2012). A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs. *Plant Cell* **24**: 859–874.
- Silhavy, D.** (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* **21**: 3070–3080.
- Singer, M.J., Marcotte, B.A., and Selker, E.U.** (1995). DNA methylation associated with repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5586–5597.
- van Slogteren, G.M.S., Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A.** (1984). Silent T-DNA genes in plant lines transformed by *Agrobacterium tumefaciens* are activated by grafting and by 5-azacytidine treatment. *Plant Mol. Biol.* **3**: 333–336.
- Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdžić, M., Becker, J.D., Feijó, J.A., and Martienssen, R.A.** (2009). Epigenetic Reprogramming and Small RNA Silencing of Transposable Elements in Pollen. *Cell* **136**: 461–472.
- Smith, C.J.S., Watson, C.F., Bird, C.R., Ray, J., Schuch, W., and Grierson, D.** (1990). Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet. MGG* **224**: 477–481.
- Smith, L.M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F.K., Herr, A.J., Pikaard, C.S., and Baulcombe, D.C.** (2007). An SNF2 Protein Associated with Nuclear RNA Silencing and the Spread of a Silencing Signal between Cells in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1507–1521.
- Smith, S. and De Smet, I.** (2012). Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **367**: 1441–1452.
- Soldan, S.S., Plassmeyer, M.L., Matukonis, M.K., and González-Scarano, F.** (2005). La Crosse Virus Nonstructural Protein NSs Counteracts the Effects of Short Interfering RNA. *J. Virol.* **79**: 234–244.
- Song, M.-S. and Rossi, J.J.** (2017). Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochem. J.* **474**: 1603–1618.
- Sorenson, R.S., Deshotel, M.J., Johnson, K., Adler, F.R., and Sieburth, L.E.** (2018). Arabidopsis mRNA decay landscape arises from specialized RNA decay substrates, decapping-mediated feedback, and redundancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**: E1485–E1494.
- Sorin, C., Bussell, J.D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H., Sandberg, G., and Bellini, C.** (2005). Auxin and Light Control of Adventitious Rooting in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 1343–1359.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P., and Green, P.J.** (2004). AtXRN4 Degrades mRNA in Arabidopsis and Its Substrates Include Selected miRNA Targets. *Mol. Cell* **15**: 173–183.
- Stam, M., Viterbo, A., Mol, J.N.M., and Kooter, J.M.** (1998). Position-Dependent Methylation and Transcriptional Silencing of Transgenes in Inverted T-DNA Repeats: Implications for Posttranscriptional Silencing of Homologous Host Genes in Plants. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6165–6177.
- Sudan, J., Raina, M., and Singh, R.** (2018). Plant epigenetic mechanisms: role in abiotic stress and their generational heritability. *3 Biotech* **8**: 172.
- Sullivan, C.S. and Ganem, D.** (2005). A Virus-Encoded Inhibitor That Blocks RNA Interference in Mammalian Cells. *J. Virol.* **79**: 7371–7379.

- Suyama, M., Torrents, D., and Bork, P.** (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.* **34**: W609–W612.
- Suzuki, J. and Haselkorn, R.** (1968). Studies on the 5'-terminus of turnip yellow mosaic virus RNA. *J. Mol. Biol.* **36**: 47–56.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., and Watanabe, Y.** (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* **49**: 493–500.
- Tang, G.** (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* **17**: 49–63.
- Taochy, C., Gursansky, N.R., Cao, J., Fletcher, S.J., Dressel, U., Mitter, N., Tucker, M.R., Koltunow, A.M.G., Bowman, J.L., Vaucheret, H., and Carroll, B.J.** (2017). A Genetic Screen for Impaired Systemic RNAi Highlights the Crucial Role of DICER-LIKE 2. *Plant Physiol.* **175**: 1424–1437.
- Taochy, C., Yu, A., Bouché, N., Bouteiller, N., Elmayan, T., Dressel, U., Carroll, B.J., and Vaucheret, H.** (2019). Post-transcriptional gene silencing triggers dispensable DNA methylation in gene body in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* **47**: 9104–9114.
- Taylor, B. and Powell, A.** (1982). Isolation of plant DNA and RNA. *Focus (Madison)*. **4**: 4–6.
- Thierry, D. and Vaucheret, H.** (1996). Sequence homology requirements for transcriptional silencing of 35S transgenes and post-transcriptional silencing of nitrite reductase (trans)genes by the tobacco 271 locus. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1075–1083.
- Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C., and Maule, A.J.** (2003). Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* **306**: 33–41.
- Tisné, S. et al.** (2013). Phenoscope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *Plant J.* **74**: 534–544.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T., and Pooggin, M.M.** (2005). Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes. *J. Virol.* **79**: 2517–2527.
- Tschopp, M.-A., Iki, T., Brosnan, C.A., Jullien, P.E., and Pumplin, N.** (2017). A complex of *Arabidopsis* DRB proteins can impair dsRNA processing. *RNA* **23**: 782–797.
- Tucker, M.R., Okada, T., Hu, Y., Scholefield, A., Taylor, J.M., and Koltunow, A.M.G.** (2012). Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*. *Development* **139**: 1399–1404.
- Turnbull, C.G.N., Booker, J.P., and Leyser, H.M.O.** (2002). Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**: 255–262.
- Tuteja, J.H., Clough, S.J., Chan, W.-C., and Vodkin, L.O.** (2004). Tissue-Specific Gene Silencing Mediated by a Naturally Occurring Chalcone Synthase Gene Cluster in *Glycine max*. *Plant Cell* **16**: 819–835.
- Tuteja, J.H., Zabala, G., Varala, K., Hudson, M., and Vodkin, L.O.** (2009). Endogenous, Tissue-Specific Short Interfering RNAs Silence the Chalcone Synthase Gene Family in *Glycine max* Seed Coats. *Plant Cell* **21**: 3063–3077.
- Ubeda-Tomás, S., Beemster, G.T.S., and Bennett, M.J.** (2012). Hormonal regulation of root growth: Integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci.* **17**: 326–331.
- Ushiyama, R. and Matthews, R.E.F.** (1970). The significance of chloroplast abnormalities associated with infection by turnip yellow mosaic virus. *Virology* **42**: 293–303.
- Valli, A.A., Gallo, A., Rodamilans, B., López-Moya, J.J., and García, J.A.** (2018). The HCPro from the Potyviridae family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Mol. Plant Pathol.* **19**: 744–763.
- Várallyay, É. and Havelda, Z.** (2013). Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol. Plant Pathol.* **14**: 567–575.

- Vaucheret, H.** (1993). Identification of a general silencer for 19S and 35S promoters in a transgenic tobacco plant: 90 bp of homology in the promoter sequence are sufficient for trans-inactivation. *Comptes Rendus l'Academie des Sci. - Ser. III* **316**: 1471–1483.
- Vaucheret, H.** (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.* **13**: 350–358.
- Vaucheret, H.** (1994). Promoter-dependent trans-inactivation in transgenic tobacco plants: Kinetic aspects of gene silencing and gene reactivation. *Comptes Rendus l'Academie des Sci. - Ser. III* **317**: 310–323.
- Vaucheret, H.** (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.* **18**: 1187–1197.
- Vaucheret, H., Chabaud, M., Kronenberger, J., and Caboche, M.** (1990). Functional complementation of tobacco and *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase deficient mutants by transformation with the wild-type alleles of the tobacco structural genes. *MGG Mol. Gen. Genet.* **220**: 468–474.
- Vaucheret, H., Kronenberger, J., Lepingle, A., Vilaine, F., Boutin, J., and Caboche, M.** (1992). Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. *Plant J.* **2**: 559–569.
- Vaucheret, H., Nussaume, L., Palauqui, J.C., Quillere, I., and Elmayan, T.** (1997). A Transcriptionally Active State Is Required for Post-Transcriptional Silencing (Cosuppression) of Nitrate Reductase Host Genes and Transgenes. *Plant Cell* **9**: 1495–1504.
- Vazquez, F. and Hohn, T.** (2013). Biogenesis and Biological Activity of Secondary siRNAs in Plants. *Scientifica (Cairo)*. **2013**: 1–12.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.-L., Bartel, D.P., and Crété, P.** (2004). Endogenous trans-Acting siRNAs Regulate the Accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol. Cell* **16**: 69–79.
- Della Vedova, C.B., Lorbiecke, R., Kirsch, H., Schulte, M.B., Scheets, K., Borchert, L.M., Scheffler, B.E., Wienand, U., Cone, K.C., and Birchler, J.A.** (2005). The Dominant Inhibitory Chalcone Synthase Allele C2-Idf (Inhibitor diffuse) From *Zea mays* (L.) Acts via an Endogenous RNA Silencing Mechanism. *Genetics* **170**: 1989–2002.
- Verchot-Lubicz, J. and Carr, J.P.** (2008). Viral Suppressors of Gene Silencing. In *Encyclopedia of Virology* (Elsevier), pp. 325–332.
- Verchot, J.** (2016). Plant Virus Infection and the Ubiquitin Proteasome Machinery: Arms Race along the Endoplasmic Reticulum. *Viruses* **8**: 314.
- Vissenberg, K., Claeijs, N., Balcerowicz, D., and Schoenaers, S.** (2020). Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **71**: 2412–2427.
- Voynet, O.** (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell* **136**: 669–687.
- Voynet, O.** (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.* **13**: 317–328.
- Voynet, O. and Baulcombe, D.C.** (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**: 553–553.
- Voynet, O., Lederer, C., and Baulcombe, D.C.** (2000). A Viral Movement Protein Prevents Spread of the Gene Silencing Signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**: 157–167.
- Voynet, O., Pinto, Y.M., and Baulcombe, D.C.** (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1999) 96:24 (14147-14152)). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 14147–14152.
- Voynet, O., Vain, P., Angell, S., and Baulcombe, D.C.** (1998). Systemic Spread of Sequence-Specific Transgene RNA Degradation in Plants Is Initiated by Localized Introduction of Ectopic Promoterless DNA. *Cell* **95**: 177–187.
- Waddington, C.H.** (2012). The Epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* **41**: 10–13.
- Waddington, C.H.** (1942). Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. *Nature* **150**: 563–565.

- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buchmann, R.C., and Bisaro, D.M.** (2005). Adenosine Kinase Inhibition and Suppression of RNA Silencing by Geminivirus AL2 and L2 Proteins. *J. Virol.* **79**: 7410–7418.
- Wang, H., Hao, L., Shung, C.-Y., Sunter, G., and Bisaro, D.M.** (2003). Adenosine Kinase Is Inactivated by Geminivirus AL2 and L2 Proteins. *Plant Cell* **15**: 3020–3032.
- Wang, L., Yamashita, M., Greaves, I.K., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (2020). Arabidopsis Col/Ler and Ws/Ler hybrids and Hybrid Mimics produce seed yield heterosis through increased height, inflorescence branch and silique number. *Planta* **252**: 40.
- Wang, X.-B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W., Gascioli, V., Vaucheret, H., and Ding, S.** (2011). The 21-Nucleotide, but Not 22-Nucleotide, Viral Secondary Small Interfering RNAs Direct Potent Antiviral Defense by Two Cooperative Argonautes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **23**: 1625–1638.
- Wang, X.-B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.-X., Chen, X., Yu, J.-L., and Ding, S.-W.** (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 484–489.
- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Wardle, G.S., Tuschl, T., and Patel, D.J.** (2009). Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* **461**: 754–761.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., and Sänger, H.L.** (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**: 567–576.
- Wassenegger, M. and Krczal, G.** (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* **11**: 142–151.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., and Wang, M.-B.** (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 13959–13964.
- Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.D., and Nester, E.W.** (1975). Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **123**: 255–264.
- Weber, C., Nover, L., and Fauth, M.** (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J.* **56**: 517–530.
- Wei, S., Chai, S., Zhu, R., Duan, C., Zhang, Y., and Li, S.** (2020). HUA ENHANCER1 Mediates Ovule Development. *Front. Plant Sci.* **11**: 1–11.
- Weigel, D.** (2012). Natural Variation in Arabidopsis: From Molecular Genetics to Ecological Genomics. *Plant Physiol.* **158**: 2–22.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R., and Pikaard, C.S.** (2008). Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. *Cell* **135**: 635–648.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., and Pikaard, C.S.** (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.* **41**: 630–634.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G.** (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**: 855–862.
- Wilkins, C., Dishongh, R., Moore, S.C., Whitt, M.A., Chow, M., and Machaca, K.** (2005). RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **436**: 1044–1047.
- Willmann, M.R., Endres, M.W., Cook, R.T., and Gregory, B.D.** (2011). The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis. *Arab. B.* **9**: e0146.
- Wingard, S.A.** (1928). Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *J. Agric. Res.* **37, No. 3**: 127–153.
- Wolkowicz, R. and Schaechter, M.** (2008). What makes a virus a virus? *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 643.
- Woo, H.R. et al.** (2016). Programming of Plant Leaf Senescence with Temporal and Inter-Organelle Coordination of Transcriptome in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **171**: 452–467.

- Woo, H.R., Kim, H.J., Lim, P.O., and Nam, H.G.** (2019). Leaf Senescence: Systems and Dynamics Aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* **70**: 347–376.
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C., and Qi, Y.** (2010). DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Mol. Cell* **38**: 465–475.
- Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., and Carrington, J.C.** (2005). DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 12984–12989.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C.** (2004). Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. *PLoS Biol.* **2**: e104.
- Yang, L., Huang, W., Wang, H., Cai, R., Xu, Y., and Huang, H.** (2006). Characterizations of a Hypomorphic *Argonaute1* Mutant Reveal Novel AGO1 Functions in *Arabidopsis* Lateral Organ Development. *Plant Mol. Biol.* **61**: 63–78.
- Ye, J., Qu, J., Zhang, J.-F., Geng, Y.-F., and Fang, R.-X.** (2009). A critical domain of the Cucumber mosaic virus 2b protein for RNA silencing suppressor activity. *FEBS Lett.* **583**: 101–106.
- Ye, R., Chen, Z., Lian, B., Rowley, M.J., Xia, N., Chai, J., Li, Y., He, X.J., Wierzbicki, A.T., and Qi, Y.** (2016). A Dicer-Independent Route for Biogenesis of siRNAs that Direct DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* **61**: 222–235.
- Ye, R., Wang, W., Iki, T., Liu, C., Wu, Y., Ishikawa, M., Zhou, X., and Qi, Y.** (2012). Cytoplasmic Assembly and Selective Nuclear Import of *Arabidopsis* ARGONAUTE4/siRNA Complexes. *Mol. Cell* **46**: 859–870.
- Yong Chung, H., Lacatus, G., and Sunter, G.** (2014). Geminivirus AL2 protein induces expression of, and interacts with, a calmodulin-like gene, an endogenous regulator of gene silencing. *Virology* **460–461**: 108–118.
- Yoshikawa, M.** (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **19**: 2164–2175.
- Yoshikawa, M.** (2013). Biogenesis of *trans*-acting siRNAs, endogenous secondary siRNAs in plants. *Genes Genet. Syst.* **88**: 77–84.
- Yu, A., Saudemont, B., Bouteiller, N., Elvira-Matlot, E., Lepère, G., Parent, J.-S., Morel, J.-B., Cao, J., Elmayer, T., and Vaucheret, H.** (2015). Second-Site Mutagenesis of a Hypomorphic *argonaute1* Allele Identifies SUPERKILLER3 as an Endogenous Suppressor of Transgene Posttranscriptional Gene Silencing. *Plant Physiol.* **169**: 1266–1274.
- Yu, B., Bi, L., Zhai, J., Agarwal, M., Li, S., Wu, Q., Ding, S.-W., Meyers, B.C., Vaucheret, H., and Chen, X.** (2010). siRNAs compete with miRNAs for methylation by HEN1 in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* **38**: 5844–5850.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X.** (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* (80-.). **307**: 932–935.
- Yu, Y. et al.** (2017a). ARGONAUTE10 promotes the degradation of miR165/6 through the SDN1 and SDN2 exonucleases in *Arabidopsis*. *PLOS Biol.* **15**: e2001272.
- Yu, Y., Jia, T., and Chen, X.** (2017b). The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. *New Phytol.* **216**: 1002–1017.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P.** (2000). RNAi : Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* **101**: 25–33.
- Zhai, J., Liu, J., Liu, B., Li, P., Meyers, B.C., Chen, X., and Cao, X.** (2008). Small RNA-Directed Epigenetic Natural Variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **4**: e1000056.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W.** (2004). Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* **118**: 57–68.

- Zhang, Q., Xing, H.-L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Yang, F., Wang, X.-C., and Chen, Q.-J.** (2018). Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and its prevention. *Plant Mol. Biol.* **96**: 445–456.
- Zhang, W., Murphy, C., and Sieburth, L.E.** (2010). Conserved RNaseII domain protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses *Arabidopsis* decapping mutant phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 15981–15985.
- Zhang, X. et al.** (2012). Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biol.* **13**: R20.
- Zhang, X. et al.** (2015). Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in *Arabidopsis*. *Science* (80-.). **348**: 120–123.
- Zhang, X., Niu, D., Carbonell, A., Wang, A., Lee, A., Tun, V., Wang, Z., Carrington, J.C., Chang, C.A., and Jin, H.** (2014). ARGONAUTE PIWI domain and microRNA duplex structure regulate small RNA sorting in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* **5**: 5468.
- Zhang, X., Shiu, S., Cal, A., and Borevitz, J.O.** (2008). Global Analysis of Genetic, Epigenetic and Transcriptional Polymorphisms in *Arabidopsis thaliana* Using Whole Genome Tiling Arrays. *PLoS Genet.* **4**: e1000032.
- Zhang, X., Yuan, Y.-R., Pei, Y., Lin, S.-S., Tuschl, T., Patel, D.J., and Chua, N.-H.** (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* **20**: 3255–3268.
- Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W.-C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H.-D., Raikhel, N., and Jin, H.** (2011). *Arabidopsis* Argonaute 2 Regulates Innate Immunity via miRNA393*-Mediated Silencing of a Golgi-Localized SNARE Gene, MEMB12. *Mol. Cell* **42**: 356–366.
- Zhang, Z., Liu, X., Guo, X., Wang, X.J., and Zhang, X.** (2016). *Arabidopsis* AGO3 predominantly recruits 24-nt small RNAs to regulate epigenetic silencing. *Nat. Plants* **2**: 16049.
- Zhang, Z. and Zhang, X.** (2012). Argonautes compete for miR165/166 to regulate shoot apical meristem development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 652–658.
- Zheng, B., Wang, Z., Li, S., Yu, B., Liu, J.-Y., and Chen, X.** (2009). Intergenic transcription by RNA Polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **23**: 2850–2860.
- Zheng, X., Fahlgren, N., Abbasi, A., Berry, J.C., and Carrington, J.C.** (2019). Antiviral ARGONAUTES Against Turnip Crinkle Virus Revealed by Image-Based Trait Analysis. *Plant Physiol.* **180**: 1418–1435.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., and Zhu, J.** (2007). Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J.* **26**: 1691–1701.
- Zhong, X., Du, J., Hale, C.J., Gallego-Bartolome, J., Feng, S., Vashisht, A.A., Chory, J., Wohlschlegel, J.A., Patel, D.J., and Jacobsen, S.E.** (2014). Molecular Mechanism of Action of Plant DRM De Novo DNA Methyltransferases. *Cell* **157**: 1050–1060.
- Zhong, X., Hale, C.J., Law, J.A., Johnson, L.M., Feng, S., Tu, A., and Jacobsen, S.E.** (2012). DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**: 870–875.
- Zhong, X., Hale, C.J., Nguyen, M., Ausin, I., Groth, M., Hetzel, J., Vashisht, A.A., Henderson, I.R., Wohlschlegel, J.A., and Jacobsen, S.E.** (2015). DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE3 controls DNA methylation and regulates RNA polymerase V transcript abundance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**: 911–916.
- Zhou, Y., Honda, M., Zhu, H., Zhang, Z., Guo, X., Li, T., Li, Z., Peng, X., Nakajima, K., Duan, L., and Zhang, X.** (2015). Spatiotemporal Sequestration of miR165/166 by *Arabidopsis* Argonaute10 Promotes Shoot Apical Meristem Maintenance. *Cell Rep.* **10**: 1819–1827.
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S.-H., Liou, L.W., Barefoot, A., Dickman, M., and Zhang, X.** (2011). *Arabidopsis* Argonaute10 Specifically Sequesters miR166/165 to Regulate Shoot Apical Meristem Development. *Cell* **145**: 242–256.

Titre : Rôle d'un suppresseur endogène de RNAi dans le développement de la plante et ses interactions avec les pathogènes.

Mots clés : PTGS, RTL1, dsRNA, siRNA, virus, VSR

Résumé : Le Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS) est un mécanisme dirigé contre les acides nucléiques invasifs endogènes (transposons) et exogènes (pathogènes, transgènes). Dans le cas des virus, le PTGS peut s'attaquer aux ARNs double-brin (dsRNAs) intermédiaires de la réplication virale et aux ARNs simple-brin viraux, mais il est souvent inhibé par des protéines virales appelées Viral Suppressor of RNAi (VSR). Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, une enzyme appelée RNase THREE-LIKE 1 (RTL1) est induite en réponse à l'infection virale et détruit les dsRNAs de manière non sélective. Cette enzyme devrait assurer à la plante une seconde ligne de défense en clivant les dsRNAs viraux, mais les VSR qui inhibent le PTGS inhibent généralement RTL1, indiquant que les virus ont mis en place des outils capables de combattre simultanément ces deux mécanismes de défense. Toutefois, un virus, le *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), est incapable d'inhiber RTL1 et semble même tirer profit de RTL1 pour réussir à infecter *A. thaliana* (Shamandi et al., 2015).

Au cours de cette thèse, nous avons approfondi l'étude de l'interaction Arabidopsis-TYMV. Nous avons montré que le TYMV est incapable d'inhiber l'exécution du PTGS, mais est toutefois capable d'inhiber l'étape d'amplification du PTGS. Cette action est due à la protéine virale P69, et nous avons montré que P69 est retrouvée dans des corpuscules cytoplasmiques appelés siRNA-bodies qui sont le siège de l'amplification du PTGS. Par ailleurs, nous avons généré des mutants *rtl1* et montré que l'absence de RTL1 retarde l'infection par le TYMV et augmente la quantité de siRNAs dirigés contre le virus, tandis que la surexpression de *RTL1* favorise l'infection et inhibe la production des siRNAs anti-viraux. Nous avons observé que RTL1 était retrouvée dans les siRNA-bodies, et nous avons montré que RTL1 était capable de détruire non seulement les dsRNAs mais également les siRNAs. Ces résultats indiquent donc que le TYMV réussit à infecter *A. thaliana* en : i) se répliquant dans des invaginations de la membrane chloroplastique (Prod'homme et al., 2003) qui mettent vraisemblablement les dsRNAs intermédiaires de la réplication à l'abri du PTGS et de RTL1, ii) en induisant l'expression de *RTL1* qui s'attaque aux dsRNAs et siRNAs induits par le PTGS dans les siRNA-bodies en réponse à l'infection, et iii) en exprimant la protéine P69 qui complète l'action de RTL1 en inhibant l'amplification du PTGS résiduel.

Malgré un effet neutre ou négatif pour la plante vis-à-vis des virus, *RTL1* est conservé dans toutes les accessions d'*Arabidopsis*, et l'étude du ratio des mutations synonymes et non synonymes dans les gènes *RTL1* de 42 Eucotylédones suggère que *RTL1* subit une pression de sélection de conservation, suggérant un rôle essentiel. Chez *A. thaliana*, *RTL1* est exprimé faiblement dans la racine, les tissus en sénescence, et au cours du développement de la graine. Le phénotypage des plantes sauvages et des mutants *rtl1* n'a pas révélé de différences morphologiques notables, mais nous avons observé que le poids des graines était supérieur chez les mutants *rtl1*. Par ailleurs, nous avons observé une sénescence accrue chez le mutant *rtl1*, en particulier dans l'accession *Ler*. Cette différence entre *Ler* et *Col* nous a poussé à examiner si RTL1 pouvait contribuer à la variabilité naturelle du PTGS des transgènes entre les accessions *Ler* (PTGS peu efficace) et *Col* (PTGS très efficace). Nous avons observé que la mutation *rtl1* n'affectait pas sensiblement l'efficacité du PTGS chez *Col* mais augmentait celle de *Ler* au niveau de *Col*, ce qui pourrait s'expliquer par une plus forte expression de *RTL1* chez *Ler* que chez *Col*. L'effet de l'absence de RTL1 devra donc être précisé en condition normale et en condition d'infection en privilégiant *Ler* plutôt que *Col*.

Title : Role of an endogenous suppressor of RNAi in plant development and plant-pathogen interactions

Keywords : PTGS, RTL1, dsRNA, siRNA, virus, VSR

Abstract : Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS) is a defense mechanism that targets invading nucleic acids of endogenous (transposons) or exogenous (pathogens, transgenes) origins. During virus infection, PTGS theoretically targets double-stranded (ds)RNA intermediates of viral replication and viral single-stranded RNAs; however, most viruses encode proteins, referred to as viral suppressor of RNAi (VSR), which inhibit PTGS. In the model plant *Arabidopsis thaliana*, an enzyme referred to as RNase THREE-LIKE 1 (RTL1) is induced in response to viral infection and cleaves dsRNAs in a non-specific manner. This enzyme should provide a second line of defense by cleaving viral dsRNAs, but VSR that inhibit PTGS generally inhibit RTL1, indicating that viruses had put in place tools that simultaneously counteract these two defense mechanisms. Nevertheless, at least one virus, *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), is not able to inhibit RTL1 and in fact seems to take advantage of RTL1 to successfully infect *A. thaliana* (Shamandi et al., 2015).

In this thesis, we deepened the study of Arabidopsis-TYMV interaction. We show that TYMV is not able to inhibit PTGS execution but is able to inhibit PTGS amplification. This effect is due to the viral protein P69, and we show that P69 localizes in cytoplasmic foci called siRNA-bodies, where PTGS amplification takes place. Furthermore, using in house-generated *rtl1* mutants, we show that the lack of RTL1 delays TYMV infection and promotes the production of siRNAs directed against the virus, whereas *RTL1* overexpression enhances viral symptoms and suppresses the production of anti-viral siRNAs. We show that RTL1 is found in siRNA-bodies, and we show that RTL1 attacks not only dsRNAs but also siRNAs. These results indicate that, TYMV successfully infects *A. thaliana* by : i) replicating in chloroplast membrane invaginations (Prod'homme et al., 2003), which likely shelter dsRNAs intermediates of replication from PTGS and RTL1, ii) inducing *RTL1* expression, which promotes the destruction of dsRNAs and siRNAs produced by PTGS in siRNA-bodies in response to TYMV infection, and iii) expressing the P69 protein to inhibit residual PTGS amplification.

Despite a neutral or detrimental effect on plant anti-viral PTGS, *RTL1* is conserved in all *Arabidopsis* accessions, and the study of synonymous and non-synonymous substitutions ratios in *RTL1* genes from 42 dicotyledonous plant reveals that *RTL1* is under the control of a conservative selection, suggesting an essential role. In *A. thaliana*, *RTL1* is weakly expressed in roots, in senescent tissues and during seed development. Phenotyping wild-type plants and *rtl1* mutants did not reveal any significant morphological differences, but we observed that seeds weight is enhanced in *rtl1* mutants. Moreover, we observed an increased senescence in *rtl1* mutants, in particular in the *Ler* accession. This difference between *Ler* and *Col* prompted us to determine if RTL1 could participate in the natural variability of transgene PTGS efficiency between *Ler* (weak PTGS) and *Col* (strong PTGS). We observed that *rtl1* mutations have no significant effect on PTGS efficiency in *Col*, but enhances PTGS efficiency in *Ler*, up to the level of *Col*, which could be explained by a strongest *RTL1* expression in *Ler* compared to *Col*. These results indicate that the effect of RTL1 impairment should be further examined in normal and infectious contexts by focusing on *Ler* rather than *Col*.